

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11768

研究課題名(和文)フラボノイドメトキシ基の構造機能学解析-代謝ダイナミクスと癌免疫療法への新展開

研究課題名(英文)Function of dietary polymethoxylated flavonoid on metabolism and immune function.

研究代表者

酒井 徹 (SAKAI, Tohru)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：40274196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、柑橘類果皮に含まれるスダチチンに抗肥満および免疫増強作用が有することを明らかにしてきた。スダチチンはフラボノイドに分類され多数のメトキシ基を有する構造的特徴がある。本研究では、ポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンは、ヘルパー17型T細胞の分化を抑制し、自己免疫性脳脊髄膜炎の病態を軽減することを明らかにした。これらの治験は果皮に含まれるポリメトキシが自己免疫疾患に対して将来的に機能成分として応用する可能性を示す成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

柑橘類の果皮には様々な機能性栄養成分が含まれており、その一つにポリメトキシフラボノイドが挙げられる。その構造的な特徴として多数のメトキシ基を有していることである。今回は6個のメトキシ基を有するノビレチンのヘルパーT細胞の分化誘導に対する影響を検討した。ノビレチンはin vitroでのヘルパーT17型細胞の分化を抑制するとともにマウスの自己免疫疾患モデルの一つである実験的脳脊髄膜炎の病態を軽減した。これらの結果は廃棄されることが多い柑橘類果皮の有効活用法に役立てる知見である。

研究成果の概要(英文)：I have been found that polymethoxy flavonoids, sudachitin and nobiletin, possess anti-obesitic and anti-inflammatory action. In this study, we showed that nobiletin suppresses induction of T helper 17 cell and development of autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. In view of our data, we demonstrated that nobiletin may become a potential novel therapeutic drug for autoimmune disease, and nobiletin has numerous pharmacological actions to further explore.

研究分野：栄養免疫学

キーワード：ポリメトキシフラボノイド ノビレチン スダチチン Th17 自己免疫疾患

## 1. 研究開始当初の背景

柑橘類の果皮には特徴的な栄養機能成分が含まれている。研究が進んでいる代表的なフラボノイド成分として、ノビレチンが挙げられ、抗炎症作用、抗腫瘍作用、抗肥満作用、近年では神経保護作用を含めた認知機能に関与していることが報告されている<sup>1)</sup>。研究代表者は、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム事業に採択され地域特産食品の研究を進める中、柑橘類の一種であるスダチの果皮に含まれるスダチチンに注目し機能性研究を行ってきた。主な成果としては、スダチチンは、1) Sir-1/PCG1 $\alpha$ 経路を活性化することによりエネルギー代謝を亢進し抗肥満作用を発揮すること (Nutrition Metabolism, 2014)、2) 免疫惹起に関わる細胞機能を活性化し免疫増強作用を有すること (J Clinical Biochemistry Nutrition, 2018) である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はオンリーワンフラボノイドであるスダチチンのフラボノイド骨格に付加するメトキシ基の構造と生体調節機能との関連性を明らかにすることである。スダチチンは、自然界でスダチの果皮にのみ存在するフラボノイドであること、徳島県が精製特許を取得しているため動物実験で使用する量のスダチチンを使用可能なのは全国でも徳島県と包括的共同研究を行っている当教室のみである。シークワサー等の柑橘類に含まれるノビレチンは機能性研究が盛んに行われており PubMed のキーワード検索では 500 件近い報告がなされ、その作用も抗ガン、抗肥満、認知機能改善と多岐にわたる<sup>1)</sup>。スダチチンは構造がノビレチンと類似しているが、抗炎症および抗肥満作用に関してはノビレチンより優れた効果がある<sup>2), 3), 4), 5)</sup>。前述の如くスダチチン、ノビレチンといったフラボノイド成分の生理作用にはメトキシ基の存在が関与していることが推察されているが、メトキシ基の数および結合部位が機能性にどのように関与しているかを並列的に比較検討した研究、特に動物レベルでの研究は皆無である。

癌に対する免疫療法として免疫チェック療法の有用性が示され臨床の現場で広く用いられている。その社会的インパクトの大きさより免疫チェック療法の基礎および臨床研究は世界中で盛んに行われており、人における治療効果に腸内細菌叢が直接関与するといった重要な報告がなされた<sup>6)</sup>。また、糖尿病治療薬としている代謝改善薬であるメトフォルミンをはじめとする腸内細菌叢に直接影響しないと考えられてきた化合物が腸内細菌叢を変化させ日常的に摂取する薬剤や食事が生活習慣病に関与することを示唆する衝撃的な報告が Nature Medicine 誌になされた<sup>7)</sup>。ポリメトキシフラボノイドはミトコンドリア合成を活性化することが明らかになっており、腸内細菌叢を変化させ、その影響も相まって免疫チェック療法の効果を増強させる可能性があるとの発想に至った。

### (参考文献)

1) Evidence-Based Comple Alter Med, Article ID 2918796, 2016, (Review Article), 2) Nutr Metabo 8:32, 2014, 3) J Clin Biochem Nutr, in press, 4) Biosci Biotech Biochem 76:598-600, 2012, 5) J Nutr Biochem 24:156-162, 2013., 6) Science, 359:91-97, 2018, 7) Nat Med 23:850-858, 2018.

## 3. 研究の方法

### フラボノイド骨格におけるメトキシ基構造は生体調節機能性にどのように影響するのか

フラボノイドのメトキシ基構造が異なるスダチチン、ノビレチン、デメトキシスダチチンおよび機能性研究が進んでいるケルセチンを用い以下の実験を行う。骨髓細胞から誘導したマスト細胞 (BMMC) を用い脱顆粒反応およびサイトカイン産生に対するフラボノイドの作用を濃度を変化させ観察を行う。また、炎症に対する影響として腹腔由来マクロファージを LPS で刺激し、柑橘系フラボノイド添加の影響を観察する。アレルギーおよび炎症の実験では、MAP キナーゼを中心としたシグナル伝達分子およびサイトカインの mRNA 発現についても検討を行う。

### ポリメトキシフラボノイドの免疫調節作用の検証

ヘルパー 1 型 T 細胞 (Th1) や Th2 応答にフラボノイドがどのように関わるのか検証した研究に比べ、Th17 分化誘導に関する研究は非常に少ない。これは in vivo で Th17 免疫応答を観察可能なモデルが限られているためである。今回は、ポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンを自己免疫性脳脊髄膜炎モデル動物に経口的に投与を行い、Th17 分化誘導に与える影響の観察を行う。

### ポリメトキシフラボノイドは癌免疫チェック療法をどのように影響するのか

免疫チェック療法とは、腫瘍細胞に発現している PD-L1 が免疫細胞に発現している PD-1 に結合することによる抑制シグナルを PD-L1/PD-1 経路を遮断することにより抗腫瘍効果を高めるものである。マウスに B16 メラノーマあるいは Meth A 腫瘍を移植し抗 PD1 抗体を投与する。抗 PD1 抗体投与に加えてポリメトキシフラボノイドを 0-100 mg/kg、毎日投与を行う。腫瘍の大きさおよび生存率を指標として効果判定を行う。メラノーマの転移実験についてはルシフェラーゼ遺伝子組み換えした B16 細胞を用い、生体イメージングにより経時的に体内の腫瘍大きさを測定する。

#### 4. 研究成果

##### フラボノイドを添加した BMCC の脱顆粒率

脱顆粒におけるフラボノイドの作用を検討するために、BMCC に抗 DNP-IgE 抗体を反応させた後、刺激を加える前に各フラボノイドを濃度別に細胞へ添加して 37 °C で 1 時間インキュベートした。その後、刺激を 30 分間加えて脱顆粒率を測定した。スダチチンは、コントロール群に対してフラボノイド添加濃度が高いほど有意に脱顆粒が抑制された (Cont 群 :  $21.3 \pm 4.8\%$ 、50  $\mu\text{M}$  群 :  $6.7 \pm 6.2\%$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $6.8 \pm 5.9\%$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $8.4 \pm 4.3\%$ )。ただし、6.25  $\mu\text{M}$  群では有意な抑制はみられなかった。デメトキシスダチチンは、コントロール群に対してフラボノイド添加濃度が高いほど有意に脱顆粒が抑制された (Cont 群 :  $21.3 \pm 4.8\%$ 、50  $\mu\text{M}$  群 :  $1.5 \pm 2.7\%$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $7.4 \pm 6.9\%$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $8.7 \pm 4.6\%$ )。ただし、6.25  $\mu\text{M}$  では有意な抑制は見られなかった。ノビレチンは、コントロール群に対してフラボノイド添加濃度が高いほど有意に脱顆粒が抑制された (Cont 群 :  $21.3 \pm 4.8\%$ 、50  $\mu\text{M}$  群 :  $1.0 \pm 1.8\%$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $5.4 \pm 1.6\%$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $8.8 \pm 1.2\%$ )。ただし、6.25  $\mu\text{M}$  では有意な抑制は見られなかった。ケルセチンは、コントロール群に対して全ての濃度において有意な抑制は認められなかったが、濃度が高いほど抑制傾向が見られた (図 1)。

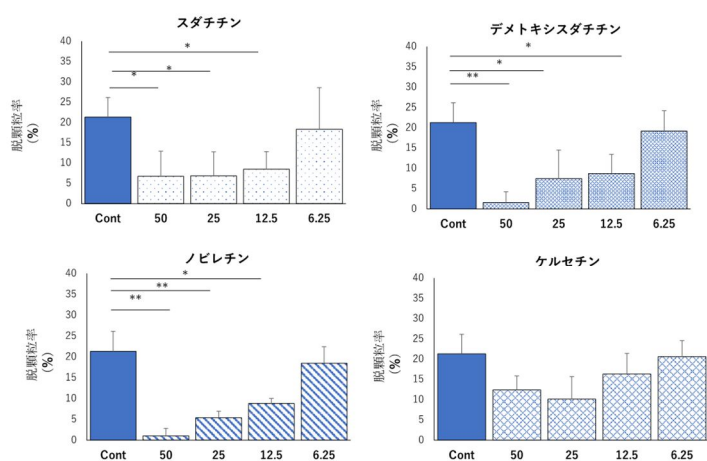


図 1 フラボノイドを添加した BMCC の脱顆粒率の測定

##### フラボノイド添加による BMCC の TNF- $\alpha$ 産生レベル

炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  に対するフラボノイドの作用を検討するために、ELISA 法を用いて、培養上清から TNF- $\alpha$  の産生レベルを測定した。スダチチンやデメトキシスダチチン、ノビレチンおよびケルセチンでは、全ての濃度においてコントロール群より有意に高い値を示した (スダチチン ; Cont 群 :  $35.7 \pm 3.7 \text{ pg/ml}$ 、50  $\mu\text{M}$  群 :  $40.7 \pm 1.9 \text{ pg/ml}$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $76.1 \pm 0.8 \text{ pg/ml}$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $98.5 \pm 8.7 \text{ pg/ml}$ 、6.25  $\mu\text{M}$  群 :  $83.7 \pm 7.8 \text{ pg/ml}$ 、デメトキシスダチチン 50  $\mu\text{M}$  群 :  $57.2 \pm 6.8 \text{ pg/ml}$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $103.8 \pm 20.9 \text{ pg/ml}$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $110.8 \pm 10.6 \text{ pg/ml}$ 、6.25  $\mu\text{M}$  群 :  $122.7 \pm 7.1 \text{ pg/ml}$ 、ノビレチン : 50  $\mu\text{M}$  群 :  $101.6 \pm 10.2 \text{ pg/ml}$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $61.1 \pm 9.6 \text{ pg/ml}$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $135.5 \pm 3.7 \text{ pg/ml}$ 、6.25  $\mu\text{M}$  群 :  $167.7 \pm 8.8 \text{ pg/ml}$ 、50  $\mu\text{M}$  群 :  $171.5 \pm 10.2 \text{ pg/ml}$ 、25  $\mu\text{M}$  群 :  $95.2 \pm 2.1 \text{ pg/ml}$ 、12.5  $\mu\text{M}$  群 :  $127.0 \pm 13.9 \text{ pg/ml}$ 、6.25  $\mu\text{M}$  群 :  $94.9 \pm 9.4 \text{ pg/ml}$ ) (図 2)。スダチチンやデメトキシスダチチンでは、添加濃度が高くなるにつれて TNF- $\alpha$  の産生量が低下する傾向があったが、ノビレチンやケルセチンでは添加濃度に関わらず、高い産生量を示した。

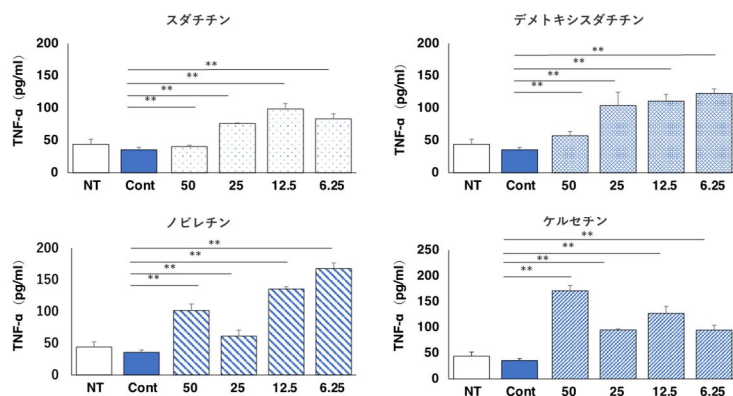


図 2 フラボノイド添加による BMCC の TNF- $\alpha$  産生レベルの測定

### ノビレチンの自己免疫性脳脊髄膜炎モデル動物に対する作用

C57BL/6 マウスにMOG ペプチドを免疫することにより惹起する自己免疫性脳脊髄膜炎モデルで病態の中心となるのは Th17 型細胞である。In vivo におけるノビレチンの Th17 型細胞の分化誘導を病態スコアで評価を行った。MOG ペプチド免疫7日目より神経症状が出現し始め、その後病態スコアが上昇し始めた。ノビレチン投与群において、免疫12日後よりコントロール群に比べ病態スコア値が有意に低下していた。また、脾臓細胞を Th17 分化誘導環境下で培養したところ、ノビレチンの添加は CD4+IL-17+細胞の割合および IL-17A 産生が統計学的に有意に抑制されていた(図3)。

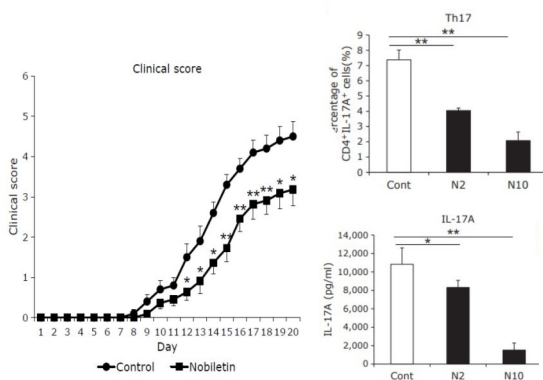


図3 ノビレチンの自己免疫性脳脊髄膜炎モデル動物に対する作用

### ノビレチンと抗 PD-1 抗体によるガン免疫療法

ノビレチンの投与量は体重 1 kg 当たり 100 mg とした。抗 PD-1 抗体精製に関してはカプリル酸沈殿法で行った。なお、抗体の投与は1回当たり 0.5 mg とし B16F10 メラノーマ細胞接種後、3, 6, 9, 12 および 15 日の5回投与を行った。腫瘍の大きさは、コントロール群に比べノビレチン群および抗 PD-1 抗体群の両群で有意に低下していた。一方、単独処置では抗腫瘍作用を認められたが、ノビレチンと抗 PD-1 抗体を組み合わせた場合においては有意な差を認めなかった(図4)。

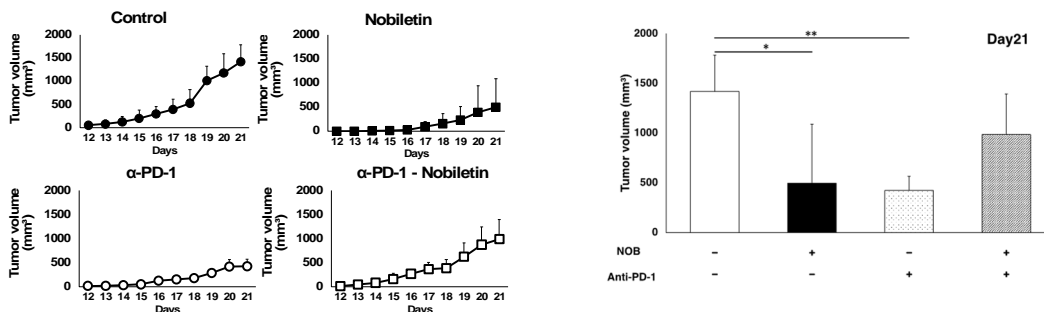


図4 ノビレチンおよび抗 PD-1 抗体投与による B16 細胞増殖

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsuji H, Kondo M, Odani W, Takino T, Takeda R, Sakai T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Treatment with indigo plant ( <i>Polygonum tinctorium</i> Lour) improves serum lipid profiles in Wistar rats fed a high-fat diet.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Med. Invest.	6. 最初と最後の頁 158-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto A, Takeda R, Hirabayashi Y, Nakamoto M, Shuto E, Sakai T	4. 巻 3
2. 論文標題 Citrus Polymethoxyflavonoids, Nobiletin, Heptamethoxyflavone and Natsudaidain, Suppress T cell Activation in vitro and in vivo.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB reports	6. 最初と最後の頁 181-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamoto A, Hirabayashi Y, Anzaki T, Nakamoto M, Shuto E, Sakai T	4. 巻 68
2. 論文標題 Nobiletin suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by modulation of T helper 17 cell differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Clin. Biochem. Nutr.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 NAKAMOTO Akiko, MITANI Mami, URAYAMA Kana, MAKI Akari, NAKAMOTO Mariko, SHUTO Emi, NII Yoshitaka, SAKAI Tohru	4. 巻 65
2. 論文標題 Nobiletin Enhances Induction of Antigen-Specific Immune Responses in BALB/c Mice Immunized with Ovalbumin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Science and Vitaminology	6. 最初と最後の頁 278 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.65.278	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitani Mami, Minatogawa Yuki, Nakamoto Akiko, Nakamoto Mariko, Shuto Emi, Nii Yoshitaka, Sakai Tohru	4. 巻 64
2. 論文標題 Sudachitin, polymethoxyflavone from Citrus sudachi, enhances antigen-specific cellular and humoral immune responses in BALB/c mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 158 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-70	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中本晶子、首藤恵泉、中本真理子、酒井徹
2. 発表標題 スタチ果皮に含まれるスタチチンのin vitroにおける機能評価—マクロファージおよび肥満細胞での評価—
3. 学会等名 第73回日本栄養食糧学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中本晶子、浦山佳奈、安崎千咲里、平林悠和、首藤恵泉、酒井徹
2. 発表標題 ポリメトキシフラボンの免疫細胞に対する機能評価—マクロファージおよび肥満細胞での評価—
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	首藤 恵泉  (SHUTO Emi)  (10512121)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・講師    (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中本 真理子  (NAKAMOTO Mariko)  (40722533)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師    (16101)	
研究 分 担 者	中本 晶子  (NAKAMOTO Akiko)  (90803536)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関