

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450297

研究課題名(和文) マガキで発見された新規抗酸化物質による肝臓保護作用に関する研究

研究課題名(英文) Hepatoprotective effects of novel antioxidant isolated from the Pacific oyster

研究代表者

布田 博敏 (Fuda, Hirotoishi)

北海道大学・保健科学研究所・特任准教授

研究者番号：60576172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マガキ由来の新規の抗酸化物質(DHMBA)において、肝培養細胞を用いた抗酸化能の観察、及び非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスを用いた肝病変の改善効果を検証した。肝培養細胞を用いた実験では、DHMBAは酸化剤に対する細胞保護作用や酸化誘導性のアポトーシスに対する抑制効果が観察された。NASHモデルマウスを用いた実験では、DHMBAを高濃度含むマガキ抽出物によりNASHの肝臓特有に見られる病理組織学的症状の改善、及び抗肥満、インスリン抵抗性の改善が見られた。これらのことから、DHMBAは酸化ストレスが発生原因と考えられているNASHの予防や治療に有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to characterize the hepatoprotective potency of 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA), a novel phenolic antioxidant, isolated from the Pacific oyster, using hepatoma-derived cells (C3A) cultured in the presence of pro-oxidant, as well as well-known antioxidants. We found that only DHMBA significantly protected C3A cells against cell death in a dose-dependent manner, whereas other antioxidants did not. Also our study assessed the effects of DHMBA-rich oyster extracts (DOE) in a novel non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mouse established by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. The NASH model mouse exhibited obesity, insulin resistance, hepatic steatosis, inflammation, fibrosis, and apoptosis. These changes were significantly moderated by supplementation of DOE. From these results, DHMBA might serve as a functional food for people at elevated risk for ROS-related diseases, such as NASH.

研究分野：機能性食品学

キーワード：抗酸化物質 マガキ 非アルコール性脂肪肝炎 酸化ストレス 肝臓 脂肪肝 線維化 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 酸化ストレスと抗酸化物質の必要性
 大気汚染、紫外線の増加、ストレス、喫煙習慣、環境ホルモン、アルコールなどは体内で「活性酸素」を増加させる重要な要因であると考えられている。この活性酸素を消去する「抗酸化物質(酵素)」は体内でも産生されるが、20代をピークにして低下することから、体外から抗酸化作用の高い食品や健康食品を意識して摂取することが重要と考えられる。近年、抗酸化物質はタンパク質、糖質、脂質、ビタミン、ミネラル、食物繊維に次いで「第7の栄養素」とも呼ばれるようになってきた。食物中の良質な抗酸化物質の摂取により、老化、癌、糖尿病、脂肪肝、NASH、精神疾患(アルツハイマー、パーキンソン病)等の疾病の予防に効果が期待されている。

近年、抗酸化物質はタンパク質、糖質、脂質、ビタミン、ミネラル、食物繊維に次いで「第7の栄養素」とも呼ばれるようになってきた。食物中の良質な抗酸化物質の摂取により、老化、癌、糖尿病、脂肪肝、NASH、精神疾患(アルツハイマー、パーキンソン病)等の疾病の予防に効果が期待されている。

(2) 本研究の着想に至った経路

現在までに研究代表者はすでにマガキより、新規の抗酸化物質を発見し、その構造の同定及び構造決定を行った(文献)。また、その結果を基に独自に精製を行ったマガキの新規の抗酸化物質

(3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol、DHMBA、図1)を用い、生化学的及び肝細胞を使った抗酸化能の観察を行った(文献)。

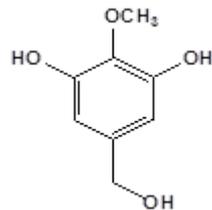


図1 DHMBAの構造

その結果、*in vitro*の抗酸化能実験(ORAC法)では既存の抗酸化物質、クロロゲン酸より低い抗酸化能が得られたが、肝細胞を用いた抗酸化能実験では、ビタミンCやクロロゲン酸よりも高い抗酸化能が得られた。DHMBAの抗酸化能を更に肝培養細胞を用いて酸化剤に対する抗酸化能試験とともに、NASHモデルマウスを用いたDHMBAの効果を検証した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の意義

近年、欧米において、C型慢性肝炎、アルコール性肝障害について「非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)」は最も重要な肝臓病の一つである。わが国でも例外ではなく、近年日本でも急激に増え続けている。またメタボリックシンドロームの表現型である「非アルコール性脂肪性疾患(NAFLD)」数は1,000万人前後いるとみられ、5~10年後にはその10~20%が肝硬変や肝がん等の重症な肝臓病であるNASHに進行する。酸化ストレスがNAFLDから

NASHへ移行する要因の一つと考えられることから、本来体が持っている食物由来の抗酸化物質の摂取による酸化防御システムの強化がNASH予防に大変重要と考えられる。

これらのことから、食品中からNASHの予防や治療に効果的な抗酸化物質が発見できれば、NASHのみならず酸化ストレスが要因となって発生する疾病予防にも有効であり、本研究の意義は大きいと考えられる。

(2) 研究課題

本研究の目的はマガキ由来の新規抗酸化物質(DHMBA)による、酸化ストレスが要因となって発生する疾病、特にNASHの予防・治療への有効性を肝培養細胞、及びNASHモデルマウスを用いて検証することである。そのため具体的な研究課題は以下の3点である。

DHMBAの化学合成、並びにDHMBAを高濃度を含むマガキ抽出物(DOE)の作製

肝培養細胞を用いた細胞保護作用の観察

NASHモデルマウスを用いた肝保護作用の観察

3. 研究の方法

(1) DHMBAの化学合成、並びにDOEの作製

DHMBAは細胞培養実験、DOEはNASHモデルマウスの実験に用いる。

DHMBAの化学合成

すでに小スケールではあるが、研究代表者により合成経路の確立に成功している(図2)。同経路を使い、DHMBAの大量合成を行った。

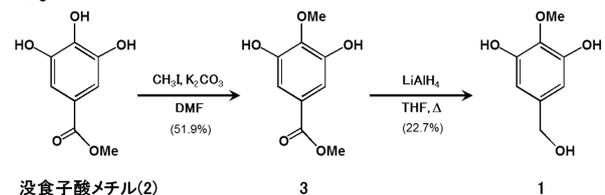


図2 DHMBAの合成経路

没食子酸メチル(5.00 g, 27.2 mmol)(2)のジメチルホルムアミド(DMF)溶液(45 mL)に炭酸カリウム(4.50 g, 32.6 mmol)を加え85で1時間攪拌した。その後、氷浴中でヨウ化メチル(4.00 g, 28.2 mmol)を徐々に滴下し30分間攪拌し、さらに室温で24時間攪拌した。反応液をろ過して精製水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、分離した酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥させた。抽出液、濃縮後にシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(溶媒:クロロホルム/クロロホルム-酢酸エチル(3:1, v/v))で精製、4位メトキシ体(3)を2.79 g(収率51.9%)得た。

氷浴中(0)で、水素化リチウムアルミニウム(469 mg, 12.4 mmol)のテトラヒドロフラン(THF)溶液(6 mL)、没食子酸メチルの4位メトキシ体(3)(560 mg, 2.8 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(4 mL)を注意深く滴下した。その混合液を60~65で6時間攪拌し、酢酸エチルと10%硫酸水溶液を加

えて反応を停止した。反応液に精製水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、分離した酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄後に硫酸ナトリウムで乾燥させた。抽出液は、濃縮後にシリカゲル・カラムクロマトグラフィー（溶媒：クロロホルム-メタノール（50：1, v/v）クロロホルム-メタノール（50：3, v/v）で精製し、還元体（1）を 175.9 mg（収率 36.6%）得た。

DHMBa を高濃度を含むマガキ抽出物(DOE)の作製

マガキを蒸留水で煮沸したものを 70%エタノール沈殿後、遠心を行い、上清を得た。その上清を大型凍結乾燥機にて凍結物を得た。

(2) 肝培養細胞を用いた細胞保護作用の観察

細胞毒性試験

肝培養細胞(C3A)を播種した 96 穴プレートに DHMBA 及び既存の抗酸化物質や不飽和脂肪酸(クロロゲン酸、ビタミン C、ビタミン E、BHT、カテキン、EPA、DHA)を添加し、24 時間後、Cell Counting kit-8(CCK-8、同仁化学)により生細胞数を計測した。

細胞生存能試験

C3A を播種した 96 穴プレートに DHMBA またはクロロゲン酸を添加し、24 時間インキュベートした。その後、酸化剤 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) を添加し、24 時間後、CCK-8 により生細胞数を計測した。

抗アポトーシス効果

C3A を播種した 24 穴プレートに DHMBA またはクロロゲン酸を添加し、24 時間インキュベートした。その後、酸化剤 AAPH を添加し、細胞にアポトーシスを誘導させた。Apoptosis Ladder Detection kit(和光純薬)を用い、細胞から DNA を精製し、アガロース電気泳動により、DNA 断片化を観察した。また、Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit を用い、フローサイトメトリーによりアポトーシス細胞数を計測した。

マガキ中の DHMBA 濃度

DHMBa のトリチウムラベルした内部標準を作製し、LC-MS/MS によりマガキ中の DHMBA 濃度を測定した。

(3) NASH モデルマウスを用いた肝保護作用の観察

NASH モデルマウス

すでに我々の研究室にて NASH モデルマウスの作製について報告している(文献)。

マウス(C57BL/6J)に高脂肪食(HFD-60、オリエンタル酵母)を 24 週与え、最後の 3 週間に尾静脈から酸化 LDL(low-density lipoprotein) を 3 日おきに 8 回注射し、酸化刺激を与えた。

マウス(C57BL/6J)に普通食(MF、オリエンタル酵母)を与えた群(NF)、上記の NASH モデ

ルマウス群(HF-)、NASH モデルマウス作製時高脂肪食に 5%DOE を与えた群(HF+)の 3 群を作製した。

グルコース、トリグリセロール(TG)、総コレステロール(TG)、FFA(遊離脂肪酸)、AST、ALT、インスリン量は和光純薬の測定キット及び Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA kit を用いて測定した。

肝臓の組織学的観察において、脂肪蓄積度は Oil Red O 染色、肝臓細胞のバルーン化度、炎症度は H & E 染色、肝臓の線維化度はマッソントリクローム染色を行った。

肝臓の炎症反応度を観察するために、リンパ球(CD3)、マクロファージ(F4/80)の免疫組織学的染色、Real-time PCR を行った。

肝臓のアポトーシス度を観察するために、TUNNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) Real-time PCR を行った。

肝臓の線維化度を観察するために、コラーゲン(コラーゲン type I)の免疫組織学的染色、Real-time PCR を行った。

4. 研究成果

(1) DHMBA の化学合成、並びに DOE の作製

DHMBa の化学合成

約 2 g の DHMBA の化学合成を行った。

DOE の作製

約 1,800 g の DOE を作製した。

(2) 肝培養細胞を用いた細胞保護作用の観察

細胞毒性試験

DHMBa は 500 μ M まで毒性が観察されなかった。一方、EPA、DHA は高濃度(500 μ M)において、BHT は低濃度(250 μ M)から毒性が観察された。

細胞生存能試験

DHMBa の細胞生存能試験を行った結果、DHMBa は酸化剤 AAPH に対し、濃度依存的に生細胞数の増加が観察された(図 3)。

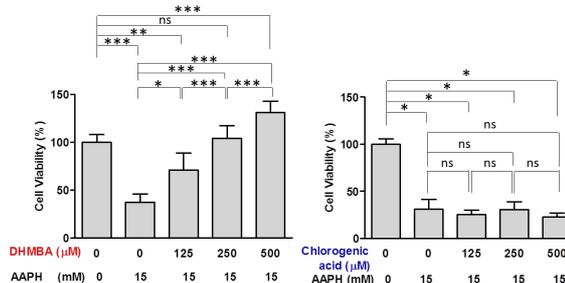


図 3 細胞生存能試験

一方クロロゲン酸においては増加が観察されなかった。このことから、DHMBa は酸化に対して、細胞保護作用を有しているものと考えられた。

抗アポトーシス効果

酸化誘導性のアポトーシスを DHMBa が抑制効果を有するかを DNA fragmentation assay とフローサイトメトリーにより検証した。DNA fragmentation assay において、DHMBa

は濃度依存的に DNA 断片化を抑制していることが観察された(図4)。一方、クロロゲン酸においては抑制が観察されなかった。フローサイトメトリーにおいても、DHMBA は濃度依存的にアポトーシス細胞を抑制していることが観察された(図5)。一方、クロロゲン酸においては抑制が観察されなかった。

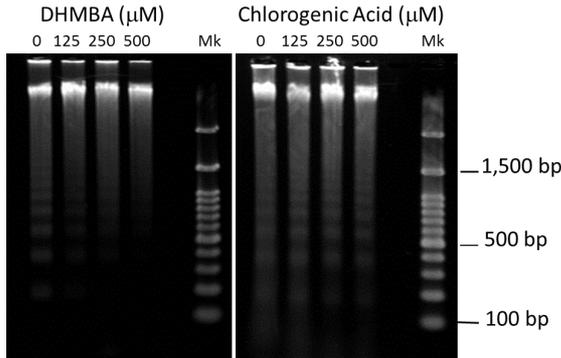


図4 DNA fragmentation assay

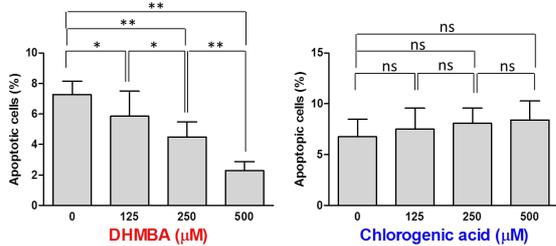


図5 フローサイトメトリー
マガキ中の DHMBA 濃度

マガキ中の DHMBA 濃度は 9.8-58.8 μ g/g(マガキ質重量)であった。

総括

肝培養細胞を用いた実験により、DHMBA の低い細胞毒性、抗アポトーシス効果、酸化剤に対する優れた細胞生存能が観察された。我々は DHMBA の細胞保護作用の要因として、DHMBA が水や非極性の有機溶媒の両方に親和性のある「両親媒性物質」であることが重要と考えた。

(3) NASH モデルマウスを用いた肝保護作用の観察

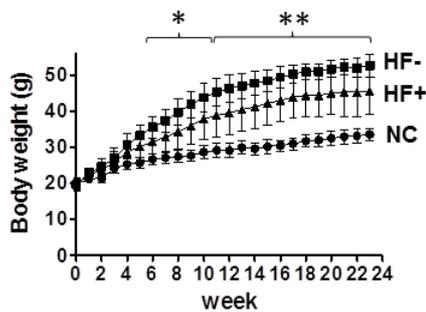


図6 抗肥満効果(* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

抗肥満効果

3群のマウスの体重を摂餌開始時より測定した結果、摂餌6週目より統計学的有意に

($p<0.05$)、DOE を与えた HF + 群の体重の減少が観察された(図6)。

インスリン抵抗性の改善効果

3群のマウスの血漿中の空腹時血糖とインスリン量を測定し、インスリン抵抗指数(HOMA-IR)を測定した。その結果、統計学的有意に($p<0.01$)、DOE を与えた HF + 群の HOMA-IR の減少が観察された(図7)。

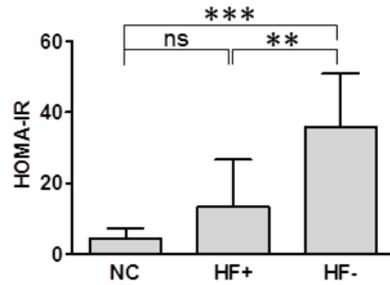


図7 インスリン抵抗性の改善

肝臓における病理組織学的改善

3群のマウスの肝臓において NASH 特有に観察される脂肪蓄積、バルーン化、炎症、及び線維化において、病理組織学的検討を行った。その結果、統計学的有意に、DOE を与えた HF + 群における脂肪蓄積、バルーン化、炎症、及び線維化度の改善が観察された(すべて $p<0.01$) (図8)。

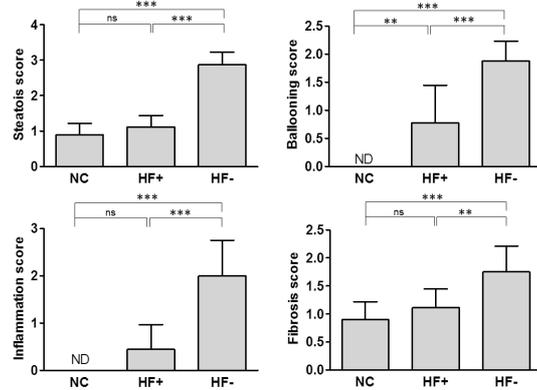


図8 肝臓における病理組織学的観察

肝臓における抗炎症効果

3群のマウスの肝臓の炎症反応における免疫組織学的観察、及び Real-time PCR 法による遺伝子量の測定を行った。その結果、免疫学的観察において、統計学的有意に DOE を与えた HF + 群におけるリンパ球(CD3)及びマクロファージ(F4/80)の減少が観察された(図9)。また Real-time PCR 法による遺伝子量においても統計学的有意に、リンパ球(CD3)、マクロファージ(F4/80)、炎症反応に伴い上昇する TNF- α と IL-6 の減少(それぞれ $p<0.01$, 0.05, 0.05, 0.05)が観察された。

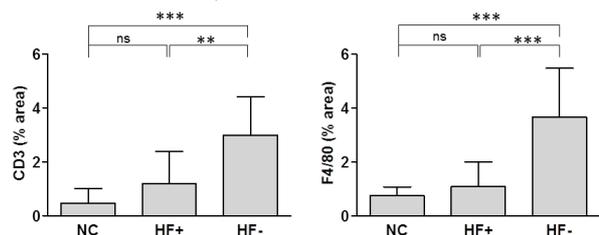


図9 肝臓における抗炎症効果
(CD3, リンパ球; F4/80, マクロファージ)
肝臓における抗アポトーシス効果

3群のマウスの肝臓のアポトーシスにおける免疫組織学的観察、及び Real-time PCR 法による遺伝子量の測定を行った。その結果、TUNNEL 法において、統計学的有意に、DOE を与えた HF+ 群におけるアポトーシスの減少が観察された ($p < 0.01$) (図10)。また Real-time PCR 法による遺伝子量においても統計学的有意に、アポトーシス誘導遺伝子 (Bax, $p < 0.01$) の減少、抗アポトーシス遺伝子 (Bcl₁L, Bcl-2, p53, すべて $p < 0.01$) の増加が観察された。

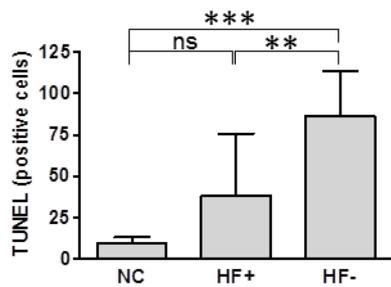


図10 肝臓における抗アポトーシス効果
肝臓における抗線維化効果

3群のマウスの肝臓の線維化における免疫組織学的観察、及び Real-time PCR 法による遺伝子量の測定を行った。その結果、コラーゲンの免疫組織学的観察において、統計学的有意に ($p < 0.05$)、DOE を与えた HF+ 群におけるコラーゲン染色域の減少が観察された (図11)。また Real-time PCR 法による遺伝子量においても統計学的有意に、コラーゲン遺伝子 (COL1a2, COL3, COL4, それぞれ $p < 0.01, 0.01, 0.05$) の減少、コラーゲン関連遺伝子 (TGF- β 1, TIMP1, α SMA, それぞれ $p < 0.01, 0.05, 0.05$) の減少が観察された。

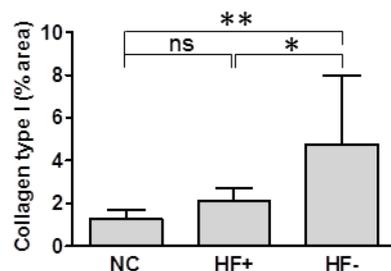


図11 肝臓における抗線維化効果
肝臓における酸化物の抑制

3群のマウスの肝臓のDNA(8-OHdG)、タンパク質(dityrosine)の酸化物における免疫組織学的観察、脂質の酸化物(TBARS)の定量を行った。その結果、DNA(8-OHdG)、タンパク質(dityrosine)の酸化物において、統計学的有意に(ともに $p < 0.05$)、DOE を与えた HF+ 群における両染色域の減少が観察された。また脂質の酸化物においても統計学的有意 ($p < 0.001$) に、TBARS 値の減少が観察された。

総括

NASHモデルマウスを用いた実験から DOE の

高い抗酸化能、並びに代謝異常の改善を示すことが観察された(図12)。今後、DHMBA のヒトへの有効性を検証する必要があるが、DHMBA は酸化ストレスが起因する疾病の予防・治療にきわめて有効と考えられた。

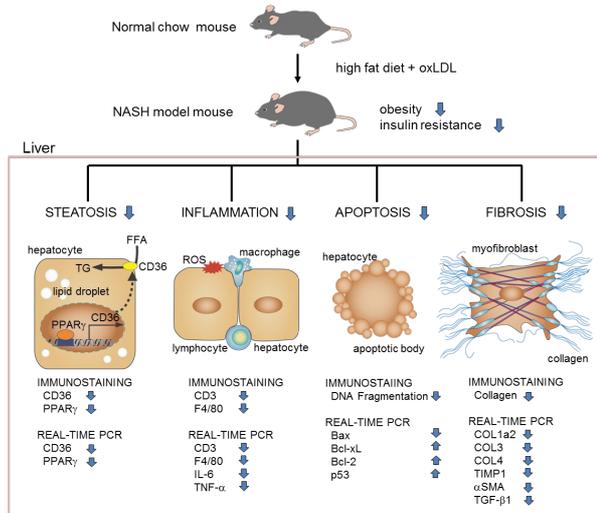


図12 DOEによる肝病変と代謝異常の改善。矢印はDOEの効果を示す。

<引用文献>

Watanabe M, Fuda H, Jin S, Sakurai T, Ohkawa F, Hui SP, Takeda S, Watanabe T, Koike T, Chiba H. Isolation and characterization of a phenolic antioxidant from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(39), 830-835, 2013.

Watanabe M, Fuda H, Jin S, Sakurai T, Hui SP, Takeda S, Watanabe T, Koike T, Chiba H. A phenolic antioxidant from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) inhibits oxidation of cultured human hepatocytes mediated by diphenyl-1-pyrenylphosphine. Food Chemistry, 134(4), 2086-2089, 2013.

Yimin, Furumaki H, Matsuoka S, Sakurai T, Kohanawa M, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, Chiba, H. A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. Laboratory Investigation, 92(2), 265-281, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

布田博敏, 岡部浩昭, 惠淑萍, 千葉仁志. 抗酸化物質の概念の変化と新しい抗酸化食品開発戦略(総説). JSBMS letters, 査読無, 41(1), 7-13, 2016.

Takahiro Hayasaka, Hirotoshi Fuda, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba. Imaging mass spectrometry reveals a decrease of cardiolipin in the kidney of NASH model

mice. Analytical Sciences, 査読有, 32(4), 473-476, 2016.

DOI: 10.2116/analsci.32.473.

Mitsugu Watanabe, Hirotooshi Fuda, Hiroaki Okabe, Sae Joko, Yusuke Miura, Shu-Ping Hui, Yimin, Naohiro Hamaoka, Emiko Miki, Hitoshi Chiba. Oyster extracts attenuate pathological changes in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model mouse. Journal of Functional Foods, 査読有, 20, 516-531, 2016.

DOI: 10.1016/j.jff.2015.11.029.

Hiroaki Okabe, Shu-Ping Hui, Hirotooshi Fuda, Takayuki Furukawa, Seiji Takeda, Rojeet Shrestha, Yusuke Miura, Mitsugu Watanabe, Hitoshi Chiba. Mass spectrometric quantification of amphipathic, polyphenolic antioxidant of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Analytical Sciences, 査読有, 31(12), 1341-1344, 2015.

DOI: 10.2116/analsci.31.1341.

Hirotooshi Fuda, Mitsugu Watanabe, Shu-Ping Hui, Sae Joko, Hiroaki Okabe, Shigeki Jin, Seiji Takeda, Emiko Miki, Takayuki Watanabe, Hitoshi Chiba. Anti-apoptotic effects of novel phenolic antioxidant isolated from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) on cultured human hepatocytes under oxidative stress. Food Chemistry, 査読有, 176, 226-233, 2015.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.12.066.

〔学会発表〕(計 4 件)

布田博敏、上甲紗愛、渡邊 貢、恵 淑萍、武田晴治、渡邊孝之、千葉仁志。マガキ由来抗酸化物質による抗酸化酵素群の遺伝子発現。日本農芸学会 2016 年度大会。平成 28 年 3 月 29 日。札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)。

布田博敏、渡邊 貢、上甲紗愛、恵 淑萍、武田晴治、渡邊孝之、千葉仁志。マガキ由来抗酸化物質の Keap1-Nrf2 経路活性化による肝臓保護作用。日本農芸学会 2015 年度大会。平成 27 年 3 月 28 日。岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)。

布田博敏、渡邊 貢、上甲紗愛、神 繁樹、川西範明、吉田繁、恵 淑萍、武田晴治、櫻井俊宏、Rojeet Shrestha、池川繁男、三木恵美子、渡邊孝之、千葉仁志。マガキ由来の培養肝細胞保護作用。日本農芸学会 2014 年度大会。平成 26 年 3 月 28 日。明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)。

布田博敏、渡邊 貢、神 繁樹、恵 淑萍、武田晴治、櫻井俊宏、渡邊 孝之、千葉仁志。マガキ由来の新規抗酸化物質における肝臓保護作用。日本農芸化学会 2013 年度大会。平成 25 年 3 月 25 日。東北大学。(宮城県仙台市)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 肝臓保護剤、糖代謝改善剤及び抗肥満剤

発明者: 渡邊 貢、千葉仁志、布田博敏

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-144824

出願年月日: 平成 26 年 7 月 15 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 3 件)

名称: 抗酸化剤、抗酸化組成物及びその製造方法

発明者: 千葉仁志、布田博敏、神 繁樹、渡邊 貢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 201210049

取得年月日: 平成 27 年 9 月 10 日

国内外の別: 国外(オーストラリア)

名称: 抗酸化剤、抗酸化組成物及びその製造方法

発明者: 千葉仁志、布田博敏、神 繁樹、渡邊 貢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 13/980974

取得年月日: 平成 27 年 4 月 21 日

国内外の別: 国外(アメリカ合衆国)

名称: 抗酸化剤組成物の製造方法

発明者: 千葉仁志、布田博敏、神 繁樹、渡邊 貢

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許 2011-016354

取得年月日: 平成 27 年 1 月 16 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hs.hokudai.ac.jp/kifu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布田博敏 (FUDA, Hirotooshi)

北海道大学・大学院保健科学研究院・特任准教授

研究者番号: 60576172

(2) 研究分担者

平松尚志 (HIRAMATSU, Naoshi)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号: 10443920

(3) 連携研究者

神 繁樹 (JIN, Shigeki)

北海道大学・大学院保健科学研究院・助教
研究者番号: 60531845