

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292069

研究課題名(和文)ポリフェノール抱合体の活性発現機構の分子基盤となる標的細胞との相互作用解析

研究課題名(英文) Study on the interaction between target cells and polyphenol conjugates underlying the molecular mechanism of their biological activity

研究代表者

河合 慶親 (KAWAI, Yoshichika)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50380027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代表的な食品由来ポリフェノールであるケルセチンの機能性発現メカニズム解明と標的分子同定を目標に研究を進めた。ケルセチンの主要代謝物であるケルセチングルクロン酸抱合体(Q3GA)と硫酸抱合体(Q3'S)はそれぞれマクロファージ細胞において抗炎症活性を示した。ケルセチンおよびQ3GAをそれぞれ誘導化し、標的分子探索のためのプローブの合成を完了した。また、タンパク質へ非共有結合したケルセチン誘導体を架橋剤によって固定化する条件を決定した。一方で、ヒトにおけるケルセチン代謝物のLC-MS/MSによる検出系を確立し、食事摂取方法による代謝パターンの変動についての解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We first examined the anti-inflammatory effects of a quercetin glucuronide (Q3GA) and a sulfate (Q3'S) in macrophages. Next, to identify the target molecules of quercetin, a major polyphenol in human diet, and of its glucuronide metabolite (Q3GA), the derivatives of quercetin and Q3GA were chemically synthesized. We also developed a reaction condition for the formation of cross-link between proteins and these quercetin derivatives. On the other hand, we developed an analytical condition of LC-MS/MS for detection of quercetin metabolites in human plasma. High-sensitive LC-MS/MS analysis enables us to investigate the effects of different methods for quercetin intake on the metabolic profiles of quercetin in humans.

研究分野：食品機能学

キーワード：ポリフェノール 抱合体 マクロファージ 標的細胞 標的分子 炎症

1. 研究開始当初の背景

食品由来ポリフェノールをヒトが経口摂取すると、腸管から吸収される際および肝臓を主体とする各種臓器を通過する際に解毒代謝反応を受け、グルクロン酸や硫酸基が結合した抱合体となって全身を循環し、やがて尿中へ排泄される。筆者らのこれまでの研究から、代表的な食品由来ポリフェノールであるケルセチンのグルクロン酸抱合体 (Quercetin-3-glucuronide, Q3GA) がマクロファージを標的として特異的に蓄積することや、マクロファージとの相互作用によって Q3GA が脱抱合反応を受けてアグリコンとなることで抗炎症作用を示すことなどが明らかになっていった。しかし、Q3GA がマクロファージに特異的に集積するメカニズムや、脱抱合によって生じるアグリコンの作用機構は不明であった。ケルセチンの生体内での作用機構を理解する上で、これらの課題を明らかにすることは極めて重要であり、本課題の計画に至った。

2. 研究の目的

ケルセチンは一般的な食生活において最も多く摂取するポリフェノールの一つである。これまでに、抗動脈硬化作用をはじめとしてケルセチン摂取による疾病予防効果や健康増進作用が報告されてきたが、ケルセチンの生体内での詳細な機能性発現機構は不明であった。ケルセチンの作用機構の詳細を理解することによって、食事に含まれるポリフェノールのより有効な活用法の開発に繋がると期待される。そこで、ヒトがケルセチンを経口摂取した際に血中から検出される主要な抱合代謝物である Q3GA が、その標的細胞であるマクロファージ表面に集積する際の標的タンパク質、および脱抱合の結果として生じるケルセチンアグリコンがマクロファージ細胞内で抗炎症作用を発揮する際の標的タンパク質を同定することを本研究の目的とした。本研究では、標的タンパク質同定のためのプローブとして Q3GA およびケルセチンアグリコンの誘導化を試み、それぞれの標的タンパク質の探索へ向けた準備を開始した。

また、実際に動物レベルでケルセチン代謝物と抗炎症作用との関連を明らかにするために、マウスへのケルセチン投与実験およびヒトでのタマネギ摂食実験を行ない、血中代謝物パターンの解析を試みた。

さらに、ポリフェノールの新たな機能性として、細胞の恒常性維持機構として脚光を浴びているオートファジーに着目し、オートファジー機構を活性化させるポリフェノールの探索を行なった。

3. 研究の方法

(1) 標的分子探索のためのプローブ合成

ケルセチン B 環カテコールの保護

三角フラスコ (50 mL) 内にてケルセチン

(302 mg, 1.00 mmol) を diphenylether (20 mL) に溶解し、dichlorodiphenylmethane (0.3 mL, 1.50 mmol) を加え、アルミビーズバスを用いて 175 で 1.5 時間反応させた。反応後、HPLC 分析および ESI(+)-LC-TOF-MS 分析を行った。反応液をにヘキサンを加えて遠心分離を行った後、沈殿をメタノールに溶解し、濃縮乾固した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、分取した各画分について薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を行った。目的化合物を含む画分をナスフラスコへ移し、濃縮乾固を行った。

アルキン化ケルセチンの調製

三角フラスコ (20 mL) 内にて得られたジフェニル化ケルセチン (19.6 mg, 0.042 mmol) を、4-bromo-1-butyne (96 μ L, 1.04 mmol) を加えた *N,N*-dimethylformamide (5 mL) に溶解させた。これに炭酸セシウム (17 mg) およびヨウ化カリウム (17 mg) を加え、容器内部を窒素ガスで置換した後にセプタムキャップで密閉し、遮光条件下の室温で攪拌しながら 2 時間反応させた。反応後、HPLC 分析および LC-TOF-MS 分析を行った。

生成したアルキン修飾物を分取し、等量の 1 M 塩酸を加え、サーモバスを用いて 80 で 1 時間加水分解反応を行った。反応後、LC-TOF-MS 分析を行った。また、HPLC により目的ピークを分取した。

(2) ケルセチン抱合体の調製

ケルセチン-3-グルクロニド (Q3GA) はハスの葉エキスから HPLC によって分取した。ケルセチン-3'-サルフェート (Q3'S) は以下の通りに調製した。ケルセチン 100 mg (300 μ mol) とスルファミン酸 58 mg (600 μ mol, 2 等量) をマイクロチューブに量り取り、ピリジン 500 μ l に溶解し、80 で 4 時間反応させた。反応後、反応液から未反応のケルセチンを除去するため、5 ml の蒸留水と、酢酸エチルの混合液を反応液に加え混合し、酢酸エチル層にケルセチンを分配する操作を 3 回行った。その後、濃縮乾固を行い、HPLC により Q3'S に相当するピークを分取した。

< HPLC 条件 >

検出器: SPD10A (SHIMADZU)

波長: 370 nm

カラム: TSK-gel 80Ts (4.6 mm x 150 mm)

流速: 0.8 ml/min

溶媒: 0.1% TFA を含む 40% メタノール水溶液

(3) マウスを用いた試験

ICR マウス、BALB/c マウス、C57BL/6J マウス、及び Wistar ラット (いずれもオス、6 週齢、日本エスエルシー株式会社、静岡) をケージ内で室温 23 \pm 1 の条件下で固形飼料と水を与え飼育した。飼育場所は徳島大学医学部栄養学科棟 4 階動物飼育室とした。事前の予備飼育後、0.1% ケルセチンを含む CE-2 の

自由摂取、あるいはケルセチンの胃内強制投与を施した。胃内強制投与においては、プロピレングリコールに溶解したケルセチンを50 mg/kgとなるようにゾンデ針を用いて投与した。これらの投与処置後、ジエチルエーテルにて吸入麻酔を行い、ペントバルビタールを腹腔投与することで麻酔を行った。その後開腹し、心臓から血液を採血した。血液を遠心分離して血漿を得た。また、炎症誘導モデルとして、PBSにて希釈したLPS溶液を5-10 mg/kgとなるようにマウスへ腹腔投与した。

(4) Griess 法による血漿中 NO_2^- 量の測定

Griess 法とは一酸化窒素 (NO) の酸化により生じる NO_2^- 量を測定する方法である。血漿 50 μl に 12.5 mM NADPH を 1 μl 、0.5 mM FAD を 1 μl 、nitrate reductase を 4 μl (5 U/ml) 混合したものを室温で 90 分反応後、限外ろ過フィルターで限外ろ過し、1 %スルファニルアミド-5 %リン酸溶液 25 μl と 0.1 %N-1-ナフチルエチレンジアミド二塩酸塩水溶液をそれぞれ 25 μl 加え、550 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。標準品は亜硝酸ナトリウムを 0 ~ 100 μM に希釈し、吸光度より検量線を得た。

(5) ヒトにおけるタマネギ単回摂取試験

本実験は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において実施が認められた研究 (受付番号 346-2) であり、被験者には実験方法や安全性について事前に十分な説明を行なった後、実験を実施した。20-40 代の健康人男性 3 名被験者は、試験前日からケルセチンを含む野菜の摂取を控え、アルコールの摂取は禁止とした。試験前日 21:00 から試験当日の 9:00 まで絶食状態 (水のみ摂取可能) とした。まず、試験当日の 8:55 に採血を行ない、これを 0 時間の試料とした。採血後、9:00 よりレンジ加熱タマネギ (タマネギ 200 g を約 5 mm 幅の串切りにした後に 500 W で 6 分間レンジ加熱し、1% (2 g) のサラダ油を加え、食塩 3 振り混合したもの) の摂食を開始し、5 分以内に摂食が完了するようにした。タマネギ摂取 1.5 時間後 (10:30) に採血を行なった。なお、採血は以下に示す方法で、徳島大学医学部濱田康弘教授 (医師) が実施した。シリンジに翼状針を装着し、滅菌済バキューイナ採血管に約 6 ml 採血した後、よく混合した。これを遠心分離し、上清を血漿として回収し、0.6 ml マイクロチューブに 210 μl ずつ分注した。分注した血漿は -30 °C で冷凍保存した。

(6) LC-MS/MS による血漿中ケルセチン代謝物の分析

等量のメタノールを加えて混合し、5 分氷上に静置した後、遠心分離 (15000 rpm, 5 min) により上清を回収した。この上清を遠心エバポレーターにより濃縮乾固し、メタノールを 200 μl 加えて混合し、5 分氷上に静置した後、

遠心分離 (15000 rpm, 5 min) により上清を回収した。この上清を以下に示す条件により LC-MS/MS 分析を行なった。

< LC-MS/MS 条件 >

- ・質量分析装置 : API 3200 (AB SCIEX)
- ・ポンプ : LC-20AD (SHIMADZU)
- ・カラム : COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (2.0×100 mm, nacalai tesque)
- ・流速 : 0.2 ml/min
- ・溶媒 : A, 0.1% formic acid; B, acetonitrile/0.1% formic acid
- ・グラジエント条件 : 10-80% B (0-10 min), 80% B (10-12 min)
- ・検出モード : negative mode

4. 研究成果

(1) ケルセチン抱合体の抗炎症活性 (培養細胞実験)

LPS 刺激をした J774.1 マウスマクロファージにケルセチンおよびその抱合体を処理し、 NO 産生量や iNOS 発現について検討することで抗炎症作用について評価した。Q3GA および Q3'S を細胞に対して LPS と同時処理したところ、ともにケルセチンよりは活性が弱いものの、 NO 産生に対する顕著な抑制作用が認められた。また iNOS タンパク質および mRNA 発現についても同様の傾向が認められた。一方、ケルセチンを LPS に対して前処理することで同時処理をした場合と比較して顕著な NO 産生に対する抑制効果が発揮されたことから、さらに低濃度での検討を行った。ヒトによるケルセチン摂取後における血中濃度レベルに匹敵する 2 μM のケルセチンやその抱合体の抗炎症活性について検討した。その結果、30 分の前処理により、同時処理においては見られなかった NO 産生および iNOS タンパク質発現に対する顕著な抑制作用が認められた。

(2) 標的分子探索のためのプローブ合成

クリック反応を用いた標的分子探索を進めるため、ケルセチンに三重結合を導入するアルキン化を試みた。B 環カテコール部分は抗酸化性をはじめとする機能性に重要であるため、これ以外の水酸基を修飾することとした。そこで、ジフェニルジクロロメタンを用いて B 環水酸基をジフェニル化することで保護した後、3 位あるいは 7 位のアルキン化を行なった。得られた生成物は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および HPLC-飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) によって分析を行い、それぞれの生成を確認した。

また、Q3GA のプローブとして同様のアルキン化を試みた。グルクロン酸部分のカルボキシル基を利用してプロパルギルアミンとの縮合反応によってアルキン化 Q3GA を得た。しかし、得られたアルキン化 Q3GA はマクロファージによる脱抱合反応の基質にならないことや、Q3GA に比べて疎水性が高く細胞

内に取り込まれる傾向が認められたため、Q3GAの挙動を模倣するプローブとして活用困難であると結論付けた。そこで、より水溶性の高い修飾であるビオチン化を行なった。ビオチンアミドペンチルアミンを同様にQ3GAに縮合させてビオチン化Q3GAを調製し、HPLC-TOF-MSによって生成を確認した。

(3) ケルセチン類縁体のタンパク質への架橋反応の検討

ポリフェノールとタンパク質との結合は一般的に非共有結合であることから、標的分子探索の際には安定にこれを回収する必要がある。そのため、本研究ではケルセチンと結合したタンパク質を架橋剤によって共有結合させ、安定に標的タンパク質を回収する方法の確立を試みた。ケルセチンを種々のアミノ酸誘導体存在下で、タンパク質架橋剤Xと反応させたところ、リジンあるいはアルギニン存在下で反応させた際において、新たな反応物がHPLC分析により検出された。よって、一級アミンが本反応に関与しているものと予想された。同様の反応について、ヒト血清アルブミン(HSA)をモデルタンパク質として実施したところ、ケルセチンのHSAへの結合がレドックスサイクリング染色によって確認された。

(4) マウスにおけるケルセチン摂取による抗炎症作用

各系統のマウスへケルセチンを投与した後の血漿中総ケルセチン濃度を測定したところ、Balb/cマウスにおいて最もケルセチンの吸収効率の高かった。そこで、BALB/cを用いてケルセチンの抗炎症作用を評価した。ケルセチンを50 mg/kgとなるように胃内強制投与し、30分後にLPSを10 mg/kgとなるように投与し、6時間後に採血を行った。Griess法によるNO産生量の測定ではケルセチン摂取によりNO産生が減少する傾向が確認された。また、NO産生量に減少傾向が認められたことからプロスタグランジン類やNOと同様に代表的な炎症マーカーの一つであるTNF- α をELISA法によって測定した結果NO産生量と同様にケルセチン摂取によりTNF- α の減少が見られた。今後ケルセチンによる炎症性疾患に対する予防効果をさらに検討する上でNOに加えてTNF- α についても評価を続けていくことが重要であると考えられる。ICRマウスではケルセチンの吸収効率が悪く、抗炎症作用が認められなかったことから、マウスにおけるケルセチン摂取による抗炎症作用には吸収効率および血中ケルセチン濃度が重要であることが示唆された。

(5) ヒトおよびマウスにおけるケルセチン代謝物パターンの解析

LC-MS/MSによる血中ケルセチン代謝物検出方法を確立し、代謝物パターンの評価を試みた。ケルセチン摂取後のヒト血中には

Q3GAとQ3'Sが主要な抱合体として存在することが知られているため、これらの標準品を調製し、LC-MS/MS分析を実施した。ケルセチンを投与したマウス血漿およびタマネギ摂取後のヒト血漿中の各ケルセチン抱合体の検出を試みた結果、やはりQ3GAとQ3'Sが主要な抱合体として検出された。さらに被験者8人のQ3GA/Q3'S比について検討したところ、2倍程度の個人差が認められた。今後、さらに被験者を増やして検討を行い、個人差の程度について解析を行なう必要がある。特にQ3GA/Q3'S比が低かった被験者に注目し、グルクロン酸抱合体比を高めることが可能か否かについて検討することも興味深い。また、マウス血漿中の代謝物パターンはヒトとは大きく異なり、ケルセチンがグルクロン酸抱合、硫酸抱合、さらにはメチル化を受けたisorhamnetin glucuronide sulfateが主要な代謝物として検出された。今後、マウスにおいてケルセチンの機能性を評価し、ヒトへの応用へ繋げる上では、マウスを用いてヒトの代謝パターンに類似したケルセチン投与方法を確立する必要がある。

(6) まとめ

本研究では、ケルセチンおよびその抱合体による抗炎症作用とその標的分子の探索について検討を進めてきた。これまで比較的高濃度においてのみケルセチンによる抗炎症作用がみられるという報告がされていたが、マクロファージに対してケルセチンやその抱合体を処理するタイミングを変化させることによって、ヒト血中に存在する濃度レベルにおいても顕著な抗炎症作用が発揮されることが明らかとなった。同時処理を行うとケルセチンが細胞内に蓄積するのに一定の時間を要するため、LPS処理後すぐに活性化すると考えられるシグナル伝達経路に対して作用できなかったため、同時処理では抗炎症作用が発揮されなかったと推察された。

一方、前処理によりあらかじめ細胞内にケルセチンを蓄積させることで抗炎症活性が向上したことから、標的分子との相互作用が抗炎症活性に重要であることが示された。このように、ケルセチンおよび抱合体の標的分子の存在が示唆されたことから、これらの標的分子を探索するための化学プローブの合成を試み、アルキル化ケルセチンおよびビオチン化Q3GAの合成に成功した。今後はこれらのプローブを用いて標的分子が同定されることが期待される。

また、マウスやヒトにおけるケルセチン代謝パターンをLC-MS/MSによって評価する条件を構築した。これまでの検討からグルクロン酸抱合体の脱抱合によってケルセチンの機能性が発揮されることが示唆されている。ケルセチンの代謝はグルクロン酸抱合と硫酸抱合の競合反応であると理解されていることから、食事摂取方法や共存物質の存在によってグルクロン酸抱合比を高めること

で、ケルセチンの生体内での機能性発現をより強化するような取り組みも興味深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kawai, Y. β -Glucuronidase activity and mitochondrial dysfunction: the sites where flavonoid glucuronides act as anti-inflammatory agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 54, 145-150 (2014). (査読無)
DOI: 10.3164/jcfn.14-9

Ishisaka, A., Mukai, R., Terao, J., Shibata, N., and Kawai, Y. Specific localization of quercetin-3-*O*-glucuronide in human brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 557, 11-17 (2014). (査読有)
DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.025

〔学会発表〕(計 7 件)

齋藤豪紀、河合慶親「ブドウ飲料中に含まれるポリフェノールの抗炎症作用の解析」日本農芸化学会 2016 年度中四国支部大会, 2016 年 9 月 16 日, 高知大学 (高知県高知市)

額惠理香、寺尾純二、河合慶親「アデニン類による炎症促進機構に対するポリフェノールの作用」第 22 回フードサイエンスフォーラム学術集会, 2016 年 9 月 8 日, ゆのこう美春閣(岡山県美作市)

Kenji Kurokawa, Erika Nuka, Kohta Ohnishi, Shin-ichi Ikushiro, Toshiyuki Sakaki, Zai-Si Ji, Hiroshi Tsuboi, Junji Terao, Yoshichika Kawai “Anti-inflammatory activity of quercetin and the conjugates at human plasma levels” The 6th International Conference on Food Factors, 2015 年 11 月 24 日, ソウル (韓国)

Yoshichika Kawai “Two distinct pathways for anti-inflammatory activity of quercetin conjugates” The 6th International Conference on Food Factors, 2015 年 11 月 24 日, ソウル (韓国)

黒川健治、額惠理香、大西康太、生城真一、榊利之、紀再思、坪井洋、寺尾純二、河合慶親「ヒト血中濃度レベルのケルセチンおよびケルセチン抱合体の抗炎症作用」第 19 回日本フードファクター学会, 2014 年 11 月 8 日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

坂下友紀、額惠理香、大西康太、河合慶親「オートファジー関連遺伝子の発現を誘導するポリフェノール類の探索と作用機構の解析」第 19 回日本フードファクター学会, 2014 年 11 月 7 日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

坂井麻衣子、大西康太、河合慶親「リソソーム活性を亢進するポリフェノールの探索」第 19 回日本フードファクター学会, 2014 年 11 月 7 日, 鹿児島大学 (鹿児島県・鹿児島市)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/med/culture/shokuhinkino/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 慶親 (KAWAI, Yoshichika)
徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：50380027