

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02902

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能異常を指標とした新規生活習慣病予防食品の開発

研究課題名(英文) Development of functional food based on the improvement of mitochondrial dysfunction to prevent lifestyle related diseases

研究代表者

永井 竜児 (Nagai, Ryoji)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20315295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに研究代表者は、2SCは高血糖によるミトコンドリアの機能異常に伴い脂肪細胞へ蓄積することを明らかにしてきた。本研究課題では、これまでに困難とされてきた2SCの分析技術をさらに向上させ、1 $\mu$ Lの血清でも安定した測定が可能となった。また、生体内で糖尿病など生活習慣と2SC蓄積との関連を示し、動物実験においては体内部位によってその蓄積レベルが異なることを明らかにした。さらに、数種の天然物抽出物により2SC生成が抑制されることを確認した。これらの結果は、ある種の天然物を定期的に摂取することで、糖尿病など生活習慣病予防の可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that S-(2-succinyl) cysteine (2SC) accumulation in adipocyte is associated with mitochondrial dysfunction caused by hyperglycemia. In this study, analysis method of 2SC, which was considered to be difficult to measure, was further improved and it provides stable results with even 1 $\mu$ L of serum. It was demonstrated that some lifestyle related diseases such as diabetes are associated with 2SC accumulation in vivo and 2SC level in mice varies by organs. Furthermore, some extract from natural products shows inhibitory effects on 2SC formation. These results indicate that regular intake of effective compounds could help us to stay away from lifestyle related diseases such as diabetes complications.

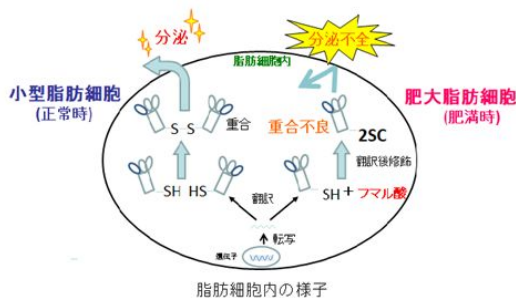
研究分野：食品機能学・生化学

キーワード：ミトコンドリア 翻訳語修飾 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本はトップクラスの長寿国といわれているが、平均寿命の伸びに伴い高血圧・糖尿病・脂質異常症などの生活習慣病の増加は日本社会の大きな問題となっている。これらの疾病の中には一度発症するとなかなか治療をうけても完治できない動脈硬化などの多くの疾病を含み、「早期発見」よりさらに踏み込んだ「疾病予防」がより重要と考えられる。また、糖尿病・心臓病などを含む生活習慣病は日本の医療費を圧迫している。これらの対策として、国民の健康づくりに対する様々な対策がたてられ、予防の重要性の認識の広がりがみられるが、必ずしも十分とは言えない。

研究代表者は生活習慣病の発症により生体への蓄積増加が認められる糖とタンパクの反応から生成されるメイラード反応後期生成物 (AGEs) 及び、フマル酸由来の翻訳後修飾物 S-(2-succinyl) cysteine (2SC) に注目し、その生体における機能解明及び測定法の確立を検討してきた。その研究過程で、2SC がミトコンドリアの機能異常に伴い脂肪細胞に蓄積し、生活習慣病の憎悪に関与する新たな現象を発見した(Nagai R et al., J Biol Chem. 282, 34219-34228, 2007)。また、これまで、この 2SC の測定は非常に困難であるとされてきたが、研究代表者は液体クロマトグラフィ質量分析装置(LC-MS/MS)による定量法を確立しており少量の血液から 2SC 量の測定を可能としている。しかし、2SC の生成・蓄積を抑える方法は明らかになっていない。



## 2. 研究の目的

研究代表者は生活習慣病こそ正に「予防は治療に勝る」ものと考えており、本研究では既に確立した 2SC 及び AGEs の分析技術と、農学部である利点を生かし、品種・栽培情報の明確な農産物を用いて、(1) 2SC および AGEs と生活習慣病の関連を解明し、(2) 生体における 2SC の役割を解析、(3) 2SC 生成阻害化合物による生活習慣病の予防効果を検証する。この結果として「食品によるヒト生活習慣病の予防」を目標に置き、現在日本が抱える生活習慣病予防の取り組みに寄与することを旨とする。

## 3. 研究の方法

### 生活習慣病と 2SC の関連

1 型及び 2 型糖尿病マウス血清・apoE 欠損マウスの各種臓器、ヒト糖尿病患者血清等をサンプルとし 2SC 及び AGEs の測定を行った。血清は測定する対象により、C18 カラム・分子量カットフィルターなどの処理に付した後、13C 標識 2SC あるいは AGEs の内部標準を添加し、0.1% 酢酸含アセトニトリル液で希釈した溶媒を用い、これまでに確立した方法で LC-MS/MS (TSQ Quantiva, Thermo Fisher) によって測定し比較を行った。

### 2SC 生成阻害化合物の探索

3T3-L1 細胞を定法にしたがい脂肪細胞に分化した後、成熟期の細胞培養液に汎用食材の抽出物を培養液に添加し、細胞外に分泌されるアディポネクチン量の比較をウェスタンブロッティングにておこなった。さらに、脂肪細胞を 6N 塩酸で加水分解し、脂肪細胞内の 2SC 含量を内因性標準物質を用い LC-MS/MS で測定した。

## 4. 研究成果

### 測定法の改良

2SC 測定法に関しては、確立された測定法にさらに改良を加え、ODS カラムである SepPak を用いイオンサプレッションの低減を可能にした。

### 生活習慣病と 2SC の関連

#### 糖尿病マウス

これまでマウスの血清中 2SC は測定が困難であったが、これが可能となった。そして、1 型及び 2 型糖尿病マウスの血清で健常群に比べ 2SC が顕著に高いことが明らかとなった。

#### apoE 欠損マウス

いくつかの特定の臓器では、apoE 欠損マウスにおいて有意に 2SC が高いレベルで検出された。

### 2SC 生成阻害化合物の探索

脂肪細胞を用い、2SC 阻害化合物の候補をスクリーニングした結果、いくつかの天然物粗抽出物に阻害効果があることが分かった。この粗抽出物をオープンカラムにかけ大まかな分離を行い得られた分画をさらに同法によりスクリーニングを続けた結果、数種の 2SC 阻害成分候補となるものが見出された。

## 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6件)

1. Kinoshita S, Furusawa C, Sugawa H, Shirakawa J, Ohno R, Ichimaru K, Nagai M, Nagai R. Inhibitory effect of natural products on the formation of advanced glycation end products. *Glycative Stress Research* 4 (2): 109-116, 2017, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/gsr/4/2/4\\_109/\\_article/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/gsr/4/2/4_109/_article/-char/ja)
2. Rowan S, Jiang S, Korem T, Szymanski J, Chang ML, Szelog J, Cassalman C, Dasuri K, McGuire C, Nagai R, Du XL, Brownlee M, Rabbani N, Thornalley PJ, Baleja JD, Deik AA, Pierce KA, Scott JM, Clish CB, Smith DE, Weinberger A, Avnit-Sagi T, Lotan-Pompan M, Segal E, Taylor A. Involvement of a gut-retina axis in protection against dietary glycemia-induced age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(22): E4472-E4481, 2017, doi: 10.1073/pnas.1702302114
3. Matsuda S, Sugawa H, Shirakawa J, Ohno R, Kinoshita S, Ichimaru K, Arakawa S, Nagai M, Kabata K, Nagai R. *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada prevents cataractogenesis in type 1 diabetic mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 63(4):263-268, 2017, doi: 10.3177/jnsv.63.263
4. Ito K, Sakata N, Nagai R, Shirakawa JI, Watanabe M, Mimata A, Abe Y, Yasuno T, Sasatomi Y, Miyake K, Ueki N, Hamauchi A, Nakashima H. High serum level of methylglyoxal-derived AGE, N $\delta$ -(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine, independently relates to renal dysfunction. *Clin Exp Nephrol.* 21(3): 398-406, 2017, doi: 10.1007/s10157-016-1301-9

5. Shirakawa J, Arakawa S, Tagawa T, Gotoh K, Oikawa N, Ohno R, Shinagawa M, Hatano K, Sugawa H, Ichimaru K, Kinoshita S, Furusawa C, Yamanaka M, Kobayashi M, Masuda S, Nagai M, Nagai R. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats, *Food Funct*, 7(6):2508-2515, 2016, doi: 10.1039/c5fo01618e
6. Sugawa H, Ohno R, Shirakawa J, Nakajima A, Kanagawa A, Hirata T, Ikeda T, Moroishi N, Nagai M and Nagai R. *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products, *Food Funct*, 7(6):2566-2573, 2016, doi: 10.1039/c5fo01563d

〔学会発表〕(計39件)

1. 永井 竜児、代謝異常マーカーとしてのAGEsの検出および生活習慣病予防への利用、第17回 TOKushima Young Investigators Conference、2018年3月8日
2. 須川日加里, 藤本雄己, 白河 潤一, 宮原浩二, 永井竜児 . AGEs生成抑制物質のin vivoにおける新規スクリーニング系の確立 .第15回日本機能性食品医用学会総会 . 東京, 2017年12月
3. 木下奨, 細佳奈恵, 白河潤一, 佐藤ひかり, 永井竜児 . 高脂肪食投与マウスにおけるヨモギ (*Artemisia indica* var. *maximowiczii*) 抽出物のAGEs生成抑制効果 .第15回日本機能性食品医用学会総会 . 東京, 2017年12月 .
4. Nagai R, Ohno R, Sugawa H, Kuwata H, Ichimaru K, Kinoshita S, Suzuki R, Arakawa S, Shirakawa J, Nagai M. Detection of 2SC and AGEs as markers for metabolic abnormalities and proteins denaturation during ageing process. *Biology of Aging*.

Singapore 2017年11月

5. 永井竜児、大野礼一、須川日加里、山口広子、荒川翔太郎、鈴木隆介、木下奨、市丸健太、佐藤ひかり、砂掛詩織、勝田奈那、長岡愛、富永悠幹、白河潤一、永井美芽、生体で有効なAGEs生成阻害成分の探索法とその利用価値、第14回糖化ストレス研究会、東京、2017年11月17日
6. 白河潤一、市丸健太、細佳奈恵、福重幸、藤原章雄、永井竜児。LC-MS/MSを用いたミトコンドリア代謝異常由来生成物2SCの血中における測定。第27回日本メイラード学会年会。埼玉、2017年11月。
7. 木下奨、南里友明、澤野有里、白河潤一、佐藤ひかり、勝田奈那、永井竜児。1型糖尿病モデルラットにおけるヒシエキス・ルテイン投与による白内障予防効果およびAGEs生成抑制効果。第27回日本メイラード学会年会。埼玉、2017年11月。
8. 山口広子、永井美芽、白河潤一、保田尚孝、永井竜児。メチルグリオキサール由来の終末糖化産物であるMG-H1の免疫化学的な測定系の確立。第27回日本メイラード学会年会。埼玉、2017年11月。
9. 永井竜児、大野礼一、須川日加里、山口広子、荒川翔太郎、鈴木隆介、木下奨、市丸健太、佐藤ひかり、砂掛詩織、勝田奈那、長岡愛、富永悠幹、白河潤一、永井美芽。生体で有効なAGEs生成阻害成分の探索法とその利用価値。第14回糖化ストレス研究会。東京、2017年11月。
10. 鈴木隆介、斎藤充、荒川翔太郎、前田啓太、谷口海友、白河潤一、永井竜児、丸毛啓史。マウス骨芽細胞における終末糖化産物の測定法の確立。液体クロマトグラフィータンデム型質量分析装置を用いて。第32回日本整形外科基礎学術集会。沖縄、2017年10月。
11. 白河潤一、市丸健太、福重幸、坂田則行、永井竜児。糖尿病関連疾患の評価を目的としたLC-MS/MSによるミトコンドリア代謝異常由来生成物2SCの血中濃度測定。第32回日本糖尿病合併症学会。東京、2017年10月。
12. 福重幸、細佳奈恵、白河潤一、市丸健太、永井竜児。生活習慣病の予防や改善を目的とした2SC生成抑制成分の探索。第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。熊本、2017年8月。
13. 市丸健太、白河潤一、永井竜児。ミトコンドリアの機能異常のメカニズム解明および病態マーカーとしてのS-(2-Succinyl) cysteineの測定系確立。第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。熊本、2017年8月。
14. 木下奨、細佳奈恵、白河潤一、佐藤ひかり、永井竜児。高脂肪食投与マウスにおけるAGEs蓄積。第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。熊本、2017年8月。
15. 勝田奈那、佐藤ひかり、白河潤一、新井誠、永井竜児。カルボニル修飾アミノ酸血中定量法の確立。第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。熊本、2017年8月。
16. 佐藤ひかり、勝田奈那、白河潤一、平野隆雄、村田敏規、永井竜児。LC-MS/MSによるヒト水晶体中AGEsの測定。第41回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム。熊本、2017年8月。
17. Nagai R, Ohno R, Sugawa H, Kuwata H, Ichimaru K, Kinoshita S, Suzuki R, Arakawa S, Shirakawa J, Nagai M. Detection Of AGEs As Markers For Metabolic Disorders And Target For Drug Discovery. Korean Society of Food Science and Technology. Korea, 2017年6月21日
18. 須川日加里、古澤知里、木下奨、白河潤一、荒川翔太郎、永井竜児。STZ誘発糖尿病マウスを用いたAGEs生成抑制効果

- の評価系について．第70回日本栄養食糧学会．兵庫，2016年5月．
19. 木下奨，古澤知里，大野礼一，須川日加里，白河潤一，永井竜児．AGEs生成抑制効果を有する天然物のスクリーニング．第70回日本栄養食糧学会．兵庫，2016年5月．
  20. 永井竜児，大野礼一，畑野孝太，須川日加里，市丸健太，木下奨，白河潤一，永井美芽，AGEsの絶対定量で見えてくる生体蛋白の変性メカニズム，第10回糖化ストレス研究会東京，2016年5月
  21. Nagai R. Can we use AGEs Detection as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation? 3rd World Congress on Glycation. Budapest, 2016年5月27日
  22. 白河潤一，松村剛，木下博之，荒木栄一，伊藤健二，坂田則行，福富竜太，永井竜児．血清中の AGEs量は腎症の進行に伴い増加する．第30回日本糖尿病合併症学会．愛知，2015年11月．
  23. 畑野孝太，永井美芽，白河潤一，松村剛，木下博之，荒木栄一，伊藤健二，坂田則行，福富竜太，永井竜児．Methylglyoxal hydroimidazolone 1を指標とした糖代謝異常に対する免疫学的手法を用いた測定．第30回日本糖尿病合併症学会．愛知，2015年11月．
  24. Arakawa S, Maruyama Y, Shirakawa J, Saito M, Marumo K, Nagai R. Determination of Nε-(carboxymethyl) lysine (CML) in Bones of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using LC-MS/MS and Its Comparison with Bone Strength. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction. Hong Kong, November 2015
  25. Sugawa H, Ohno R, Maejima K, Saigusa M, Yamanaka M, Nagai M, Yoshimura M, Amakura Y, Nagai R. Inhibitory effects of AGEs formation by natural compounds and amelioration of skin elasticity. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction. Hong Kong, November 2015.
  26. Shinagawa M, Shirakawa J, Nagai R. Detection of S-(2-succinyl)cystein (2SC) in cultured cells and human serum by LC-MS/MS as a marker for mitochondrial metabolic abnormalities. 6th World Congress on Targeting Mitochondria 2015. Berlin, Germany, 2015年10月
  27. Shinagawa M, Shirakawa J, Nagai R. Detection of S-(2-succinyl)cystein (2SC) in cultured cells and human serum by LC-MS/MS as a marker for mitochondrial metabolic abnormalities. 6th World Congress on Targeting Mitochondria 2015. Berlin, Germany, 2015年10月
  28. Nagai R, Yamanaka M, Matsumura T, Ohno R, Shinagawa M, Sugawa H, Hatano K, Shirakawa J, Kinoshita H, Araki E. Non-invasive measurement of skin AGEs to evaluate diabetic complications. 12th International symposium on the Maillard reaction. Tokyo, 2015年9月3日
  29. Nagai R, Yamanaka M, Matsumura T, Ohno R, Shinagawa M, Sugawa H, Hatano K, Shirakawa J, Nagai M, Kinoshita H, Araki E. Multiple detection of AGEs as markers for metabolic abnormalities. 9th Glycation Stress Research Meeting. Kyoto, 2015年9月
  30. Arakawa S, Maruyama Y, Kuramoto A, Shirakawa J, Saito M, Marumo K, Nagai R. Establishment of method for the determination of Advanced glycation end products (AGEs) in human bone and cartilage using liquid chromatography

- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).  
12th International Symposium on the  
Millard Reaction (ISMR). Tokyo, 2015年9  
月
31. Hatano K, Nagai M, Shirakawa J, Ichimaru  
K, Sugawa H, Ohno R, Shinagawa M,  
Yamanaka M, Fujiwara Y, Arakawa S,  
Matsumura T, Kinoshita H, Araki E, Ito K,  
Sakata N, Nagai R. Immunochemical  
detection of MG-H1 in human serum by  
specific monoclonal antibody and its  
correlation with LC-MS/MS analysis. 12th  
International Symposium on the Millard  
Reaction (ISMR). Tokyo, 2015年9月
32. Obata I, Sakamoto M, Shirakawa J, Ohno R,  
Ito K, Sakata N, Nagai R. Instrumental  
detection of GA-Pyridine, one of  
glycolaldehyde derived AGEs, in human  
atherosclerosis lesions. 12th International  
Symposium on the Millard Reaction (ISMR).  
Tokyo, 2015年9月
33. Shinagawa M, Ichikawa H, Arakawa S,  
Watanabe M, Nagai M, Shirakawa J, Ito K,  
Sakata N, Nagai R. Immunochemical and  
instrumental detection of collagen-specific  
AGE, International Symposium on the  
Maillard Reaction. 12th International  
Symposium on the Millard Reaction (ISMR).  
Tokyo, 2015年9月
34. Shirakawa J, Matsumura T, Kinoshita H,  
Araki E, Ito K, Sakata N, Nagai R. Multiple  
AGEs monitoring by LC-MS/MS is an  
effective means to evaluate a metabolic  
environment in vivo. 12th International  
Symposium on the Millard Reaction (ISMR).  
Tokyo, 2015年9月
35. Sugawa H, Furusawa C, Kinoshita S,  
Shinagawa M, Ohno R, Hatano K, Nagai M,  
Shirakawa J, Arakawa S, Nagai R. Inhibitory  
effect of Rhodiola rosea extract on AGEs

formation. 12th International Symposium on  
the Millard Reaction (ISMR). Tokyo, 2015  
年9月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 竜児 (NAGAI Ryoji)  
東海大学・農学部・教授  
研究者番号：20315295

### (2) 研究分担者

小野 政輝 (ONO Masateru)  
東海大学・農学部・教授  
研究者番号：60177269

坂田 則之 (SAKATA Noriyuki)  
H26 年度～H27 年度まで  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号：20134273

松村 剛 (MATSUMURA Takeshi)  
熊本大学・医学部附属病院  
研究者番号：20398192

### (3) 連携研究者 無し

### (4) 研究協力者 無し