

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14968

研究課題名(和文)ポリフェノールの組織再生・保護および再生医療への応用を目指した基盤技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of a basic technology using polyphenols in terms of application to tissue regeneration/protection and tissue engineering

研究代表者

菅野 太郎 (KANNO, TARO)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：30302160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カテキンオリゴマーから成るプロアントシアニジン(PA)のin vitroでの細胞増殖促進作用をin vivoで検証すべく、ラット部分切除肝再生モデルを用いてPAの反復経口投与の影響を検討したが、正常ラットおよびストレプトゾトシン糖尿病ラットのいずれにおいてもPAによる有意な影響は検出されなかった。PAを構成するカテキンオリゴマーの消化管からの吸収性が低いことから、腸内細菌叢に対する影響に焦点を移し、マウスを用いてエクオール産生菌に対する影響を調べたが、PAの有意な影響は検出できなかった。今後は、摘出臓器での影響を検討していく。

研究成果の概要(英文)：To assess if proanthocyanidin (PA), which is consisted of catechin oligomers and has a potential to accelerate cell proliferation in vitro, could accelerate tissue regeneration in vivo, the effect of repeated oral administration of PA on liver regeneration in partially hepatectomized rats was examined. As a result, PA did not accelerate liver regeneration in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Given that bioavailability of oral catechin oligomers is low, I then focused on enterobacterial flora and examined the effect of repeated oral administration of PA on equol-producing bacteria in mice. However, no significant effects were found. I will further make a study on isolated organs.

研究分野：歯周補綴学

キーワード：プロアントシアニジン カテキン ブドウ種子エキス 細胞内取込み 質量分析

1. 研究開始当初の背景

プロアントシアニジンは主にブドウの種子や皮に存在するポリフェノール的一种であり、ビタミンEの約50倍の抗酸化作用を有する物質として注目され、機能性食材として用いられている。プロアントシアニジンの主な構成成分はカテキン類であり、エピカテキンガレートおよびエピガロカテキンガレートといったピロガロールを有するカテキンを豊富に含んでいる。

これまで申請者らの研究グループではプロアントシアニジン、(+)-カテキン、カフェイン酸などのポリフェノールを線維芽細胞に1分間処理するだけで、その後の細胞増殖を促進することを見出している(図1)。さらにプロアントシアニジン1分間前処理細胞において過酷環境に暴露された場合でも細胞生存性が確保され、増殖が促進される(図2)、すなわちプロアントシアニジンがストレス負荷細胞に対して細胞保護効果を発揮することを明らかとした。従って、プロアントシアニジンなどのポリフェノールを作用させた臓器において、再生の促進や各種刺激に対する抵抗性増加が期待され、例えば損傷皮膚再生や切除肝再生、再生医療や臓器保護における安全かつ簡便な技術を提供できる可能性がある。

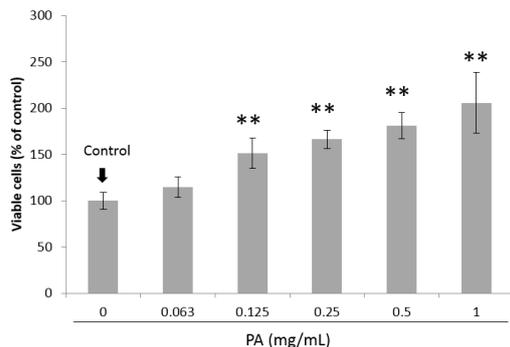


図1 ヒト歯肉線維芽細胞に対するプロアントシアニジン(PA) 1分間前処理の細胞増殖促進作用

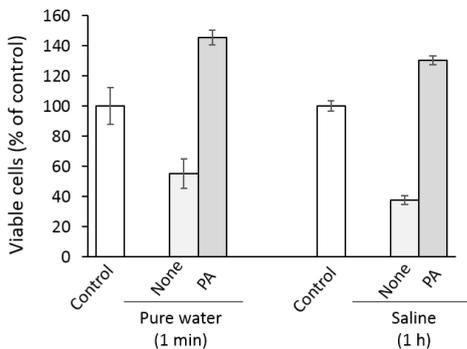


図2 純水に1分間および生理的食塩水に1時間暴露されたヒト歯肉線維芽細胞に対するプロアントシアニジン(PA) 1分間前処理の細胞保護作用

これまでプロアントシアニジンなどのポリフェノールが有する抗酸化活性を介した

様々な生理活性が報告されている。しかしながら、それら活性はポリフェノールを比較的長時間作用させた場合に発揮されるものであり、動物試験などでは比較的長期にわたり強制経口投与あるいは混餌投与で効果が確認される性質のものである。我々の研究の斬新性の一つは、プロアントシアニジン1分間前処理した細胞のストレス抵抗性増強でもわかるように、*in vitro*ではあるが非常に短い時間で効果を見出した点である。もう1点は強い障害を受けるような過酷環境下におかれた細胞を保護する効果を見出した点である。もし*in vitro*培養細胞系で認められたこれら2点が*in vivo*や摘出臓器でも確認されるなら、例えば肝臓癌患者における肝切除後の再生促進、再生医療での幹細胞やiPS細胞からの臓器再生の促進や摘出臓器の保存に有用な安全・簡便な画期的な技術となりうる可能性を秘めている。特にES細胞やiPS細胞は、血清や増殖因子などを含む培地で培養すると多種類の細胞に分化して混在してしまうという問題点がある。もしプロアントシアニジンなどのポリフェノール処理により多種類の細胞に分化することなく多能性幹細胞の増殖を促進できるなら、再生医療に大きく寄与できると考えている。

そこで本研究では、動物試験および摘出臓器標本を用いてプロアントシアニジンなどのポリフェノールの臓器再生、臓器保護効果、多能性幹細胞に対する影響を検討し、再生医療や臓器保存へ適用可能な挑戦的技術としての可能性を探る。

2. 研究の目的

プロアントシアニジンなどのポリフェノールは、機能性食品や化粧品の成分として用いられている。我々は、*in vitro*細胞培養系を用いてこれらポリフェノールの短時間処理が細胞増殖促進や細胞保護効果を発揮することを見出しており、再生医療や臓器保護への応用の可能性を模索したいと考えている。そのための試験系としては、ラット部分切除肝再生モデルおよびラット肝虚血再灌流モデルを用い、前者では組織再生としての部分切除肝再生促進作用を、後者では組織保護としての肝障害予防効果をポリフェノール経口あるいは門脈内投与で検討する。加えて再生医療への応用を視野にマウスES細胞を未分化のまま増殖促進させる方法を検討する。以上より臓器再生・保護、再生医療に使用できる、安全・容易な技術開発という斬新かつ挑戦的な提案をする。

3. 研究の方法

(1)ラット部分切除肝再生モデルでの肝再生促進作用の検討

Higgins & Andersonの方法¹⁾に従い、ラ

ット肝臓を約 70% 切除する。プロアントシアニジン (PA) は、術前に 100 mg/kg の割合で 1 週間連日経口投与した。術後も 1 日 1 回同用量で経口投与を継続した。術後経日的に麻酔下で開腹、腹部大静脈から採血するとともに残存肝を摘出し重量を測定後、一部は組織標本用に 10% ホルマリン中で固定した。肝再生の程度を肝体重比、血清アルブミン濃度などの経日的変化を指標に評価した。ホルマリン固定した肝臓については、パラフィン切片を作製、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、鏡検した。加えて、手術前(d0)および術後 1 日目(d1)の肝については転写因子 nuclear factor-kappa B (NF-kB) 遺伝子の発現を RT-PCR 法にて調べた。

試験設定を図 3 に示す。

文献

1) Higgins and Anderson. *Arc Pathol*, 186-202, 1931

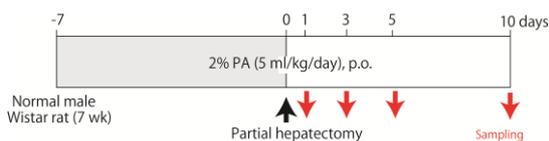


図3 正常ラット部分肝切除後の肝再生試験設定

(2) ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラット部分切除肝再生モデルでの肝再生促進作用の検討

ラットにストレプトゾトシン (STZ) を 70 mg/kg に割合で腹腔投与し、糖尿病を誘発した。STZ 糖尿病ラットに PA を 100 mg/kg/day の割合で 1 週間経口投与した。(1)と同様に肝臓を約 70% 切除した。術後も PA は 100 mg/kg/day の割合で経口投与した。術後 1 および 3 日目に麻酔下で開腹、腹部大静脈から採血するとともに残存肝を摘出し重量を測定後、一部は組織標本用に 10% ホルマリン中で固定した。肝再生の程度を肝体重比、血清アルブミン濃度の経日的変化を指標に評価した。ホルマリン固定した肝臓については、パラフィン切片を作製、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、鏡検した。加えて、肝については転写因子 NF-kB 遺伝子の発現を RT-PCR 法にて調べた。

試験設定を図 4 に示す。

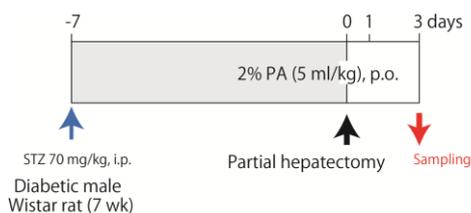


図4 STZ 誘発性糖尿病ラット部分肝切除後の肝再生試験設定

(3) マウスにおけるダイジンおよびダイゼイン代謝に対する影響

(2) でプロアントシアニジン投与により血糖値の低下がみられたこと、および東京医科歯科大学との共同研究でプロアントシアニジン投与によりマウスの腸内細菌叢の改善効果が認められたことから、プロアントシアニジンは、腸内細菌叢の改善を介して血糖値低下などの作用を発揮する可能性を考えた。イソフラボンは、エストロゲン様作用を発揮することが知られているが、実際にはイソフラボン類のうちダイジンのアグリコンであるダイゼインが腸内細菌叢によってエクオールに変換され、エクオールがエストロゲン受容体に作用する。例えば、閉経後の女性において、より効率的に「ダイゼインからエクオールへ代謝できれば、骨訴訟症などの改善効果が期待できる。そこで、マウスにおけるダイゼイン代謝に対する影響を検討することとした。

本実験では、マウスに PA を経口投与し、ダイゼインあるいはダイジンからのエクオール変換が促進されるかを検討することを目的とした。6-7 週齢の ICR 系雌性マウスに純水に懸濁した PA を 100 mg/10 ml/kg の割合で週 5 日、計 4 週間強制経口投与した。対照群には純水を 10 ml/kg の割合で同様に投与した。最終投与の翌日にダイゼイン水溶液 (40 mg/ml) を 0.2 ml/mouse の割合で胃ゾンデを用いて強制経口投与した。ダイゼインあるいはダイジン投与の 6 および 24 時間後にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大静脈より採血した。血漿を分離後、血漿中のダイゼイン、ダイジンおよびエクオールを液体クロマトグラフィー/時間飛行型質量分析計 (LC/TOF-MS) により分析した。

ダイジンからエクオール産生までの概略を図 5 に、試験設定を図 6 に示す。

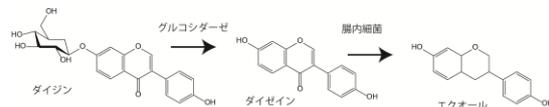


図5 腸内でのダイジンからエクオールへの代謝

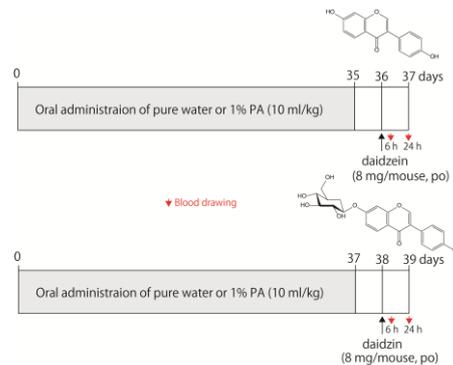


図6 ダイゼインあるいはダイジンからのエクオール産生試験設定

4. 研究成果

(1) ラット部分切除肝再生モデルでの肝再生促進作用の検討

肝体重比のおよび分散分析の結果を図7に示す。術後経日的に相対肝重量は増加したが、プロアントシアニジン (PA) 連日経口投与による有意な影響は認められなかった。代表的な肝組織像を図8に示す。赤い矢印で示すように細胞分裂前期から終期の細胞が散見されたが、対照群と PA 群で差は認められなかった。

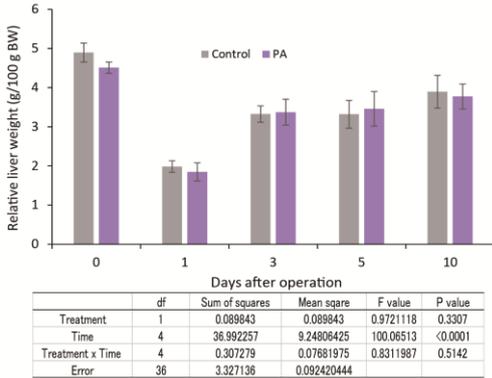


図7 正常ラット肝部分切除後の相対肝重量および分散分析

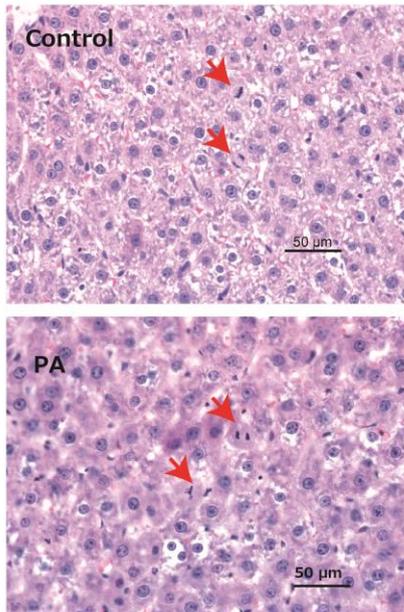


図8 術後1日目の肝組織像

▲: 細胞分裂中の肝実質細胞

血清アルブミン濃度の結果を図9に示す。血清アルブミン濃度も肝での合成低下を反映して術後5日まで術前 (d0) に比し低値を示したが、術後10日目にはほぼ術前レベルまで回復した。しかし、相対肝重量同様、PA 連日経口投与による有意な影響は認められ

なかった。

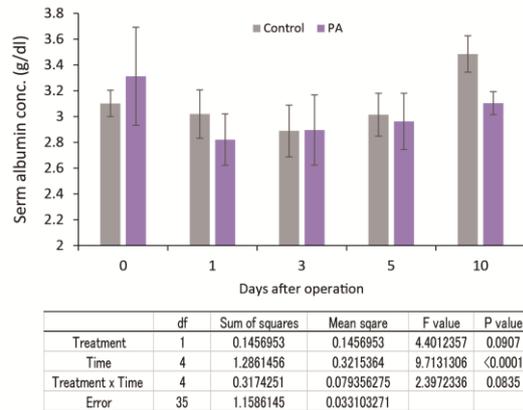


図9 正常ラット肝部分切除後の血清アルブミン濃度および分散分析

術前 (d0) および術後1日目 (d1) の肝中 NFκB 遺伝子の発現を調べた結果を図10に示す。急性および慢性炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなどの数多くの生理現象に関与している転写因子である NFκB 遺伝子は、術後1日目で上昇傾向にあったが、バラツキが多く、PAの影響をとらえることはできなかった。

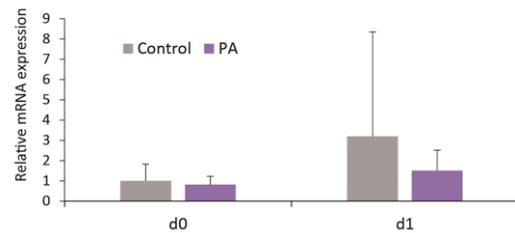


図10 正常ラット肝部分切除後の肝 NFκB 遺伝子発現

(2) ストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラット部分切除肝再生モデルでの肝再生促進作用の検討

STZ 誘発性糖尿病ラットでの術前および術後1および3日目の肝体重比のおよび分散分析の結果を図11に示すが、PA 連日経口投与による有意な影響は認められなかった。

肝の組織学的観察においても図8と同様に術後1日目に細胞分裂像を呈する肝実質細胞が散見されたが、対照群と PA 群で差は認められなかった (図省略)。

血清アルブミン濃度の結果を図12に示すが、正常ラットの場合と同様に PA 連日経口投与による有意な影響は認められなかった。

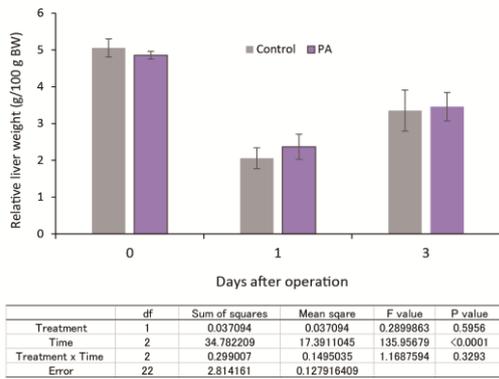


図 1 1 STZ 糖尿病ラット肝部分切除後の相対肝重量および分散分析

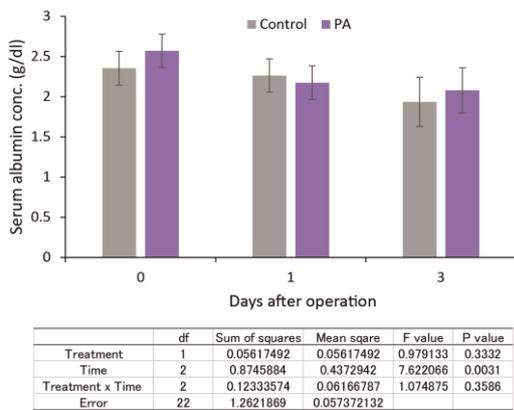


図 1 2 STZ 糖尿病ラット肝部分切除後の血清アルブミン濃度および分散分析

術前(d0)、術後1および3日目(d1, d3)の肝中 NFκ-B 遺伝子の発現を調べた結果を図 1 3 に示すが、図 1 0 と同様、術後1および3日目で上昇傾向にあったが、バラツキが多く、PA の影響をとらえることはできなかった。なお血清グルコース濃度は、200 mg/dl 前後であり、STZ により糖尿病が誘導できていることは確認した。

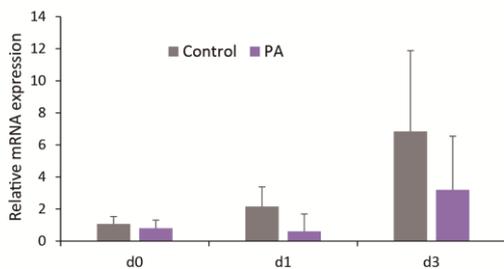


図 1 3 STZ 糖尿病ラット肝部分切除後の肝 NFκ-B 遺伝子発現

(3) マウスにおけるダイゼインおよびダイゼイン代謝に対する影響

エクオール、ダイゼインおよびダイゼインの質量分析 (MS) 条件および MS スペクトラムを図 1 4 に示す。それぞれ親イオンの質量電荷比(m/z)である 241, 253 および 417 のピークを用いて定量できることを確認した。

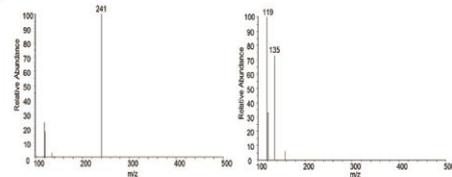
アグリコンであるダイゼイン負荷後6および24時間での血漿中ダイゼインおよびエクオール濃度の結果を図 1 5 に、配糖体であるダイジン負荷後6および24時間での血漿中ダイジン、ダイゼインおよびエクオール濃度の結果を図 1 6 に示す。

ダイゼインおよびダイジンいずれの負荷試験においてもエクオール産生に対する PA 連日経口投与による有意な影響は認められなかった。

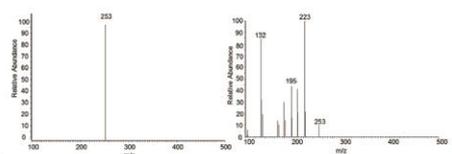
以上、正常な雄性マウスではダイゼイン、ダイジンからのエクオール産生に影響しなかったことから、正常マウスでは腸内のエクオール産生菌には影響しないことが示唆された。

	ESI mode	Parent ion	Product ion	CE (V)	T Lens (V)
Equol	Negative	241	119	27	160
Daidzein	Negative	253	223	37	130
Daidzin	Positive	417	254	18	70

(S)-Equol



Daidzein



Daidzin

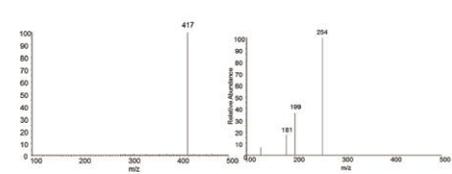


図 1 4 質量分析 (MS) 条件と MS スペクトラム

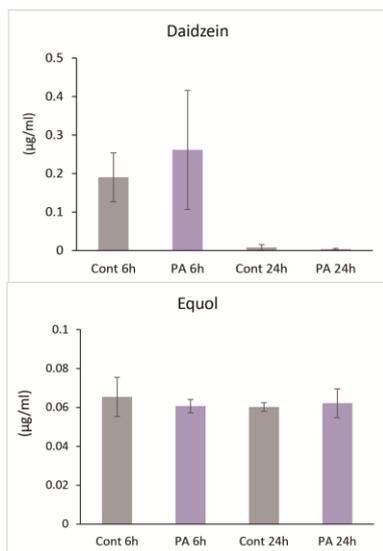


図15 ダイゼイン負荷後6および24時間での血漿中ダイゼインおよびエクオール濃度

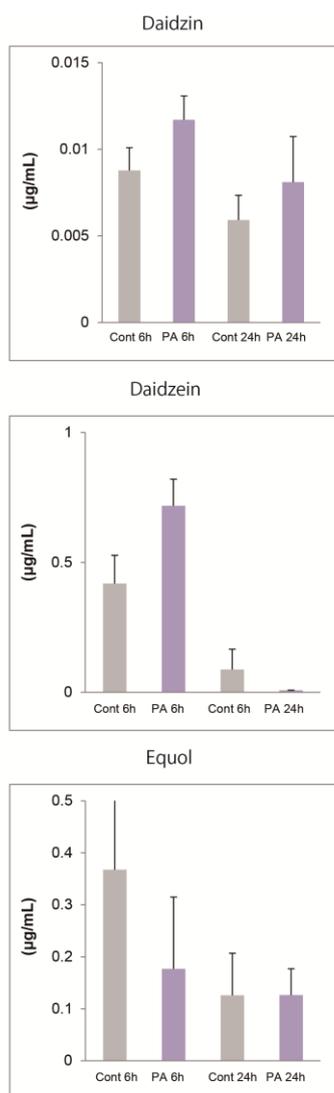


図16 ダイジン負荷後6および24時間での血漿中ダイジン、ダイゼインおよびエクオール濃度

(4) まとめ

PAのin vitroでの細胞増殖促進作用をin vivoで検証すべく、ラット部分切除肝再生モデルを用いてPAの反復経口投与の影響を検討したが、正常ラットおよびSTZ糖尿病ラットのいずれにおいてもPAによる有意な影響は検出されなかった。PAを構成するカテキンオリゴマーの消化管からの吸収性が低いと考えられることがin vivoでの結果に反映したと推論した。加えて、卵巣摘出マウスでは腸内細菌叢に影響するという特許文献(特願 2016-144770)から、腸内細菌叢に対する影響に興味を持ち、マウスを用いてエクオール産生菌に対する影響を調べたが、正常マウスにおいてはPAの影響はないという結果になった。正常マウスでは腸内細菌叢もバランスの良い状態が保たれているためPAの影響がなかったとも考えられるので、今後は腸内細菌叢のバランスが崩れた系で再度検討したい。

細胞促進効果に関しては、今回は肝再生モデルでのみの検討となったが、実施できなかったin vitroでのES細胞やiPS細胞の増殖や摘出臓器に関する検討も継続していく予定である。

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1件)

① Katsuda K, Niwano Y, Nakashima T, Mokudai T, Nakamura K, Oizumi S, Kanno T, Kanetaka H, Egusa H.: Cytoprotective effects of grape seed extract on human gingival fibroblasts in relation to its antioxidant potential. PLoS ONE, 10(8): e0134704, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 太郎 (KANNO, TARO)

東北大学・大学院・歯学研究科・助教

研究者番号：30302160