

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07863

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの疾病予防効果を有する抗酸化物質の探索

研究課題名(英文)The exploration of indirect antioxidants preventive effects on non-alcoholic steatohepatitis model mouse

研究代表者

布田 博敏 (Fuda, Hirotoishi)

北海道大学・保健科学研究所・特任教授

研究者番号：60576172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスが要因と考えられているNASHのモデルマウスを用いた実験で、マガキ抽出物が効果的にその疾病発症を抑制した。マガキ抽出物中の抗酸化物質が発症を抑制したと考えた。本研究はマガキ抽出物より間接抗酸化物質を検出できるリポーター遺伝子アッセイを用いて、同物質の探索を行うことを目的とした。同方法により、物質Aを単離した。一方、すでにマガキ抽出物より抗酸化物質、DHMBAを単離している。マガキ抽出物中の物質A及びDHMBAの濃度はそれぞれ5.40-149ng/g、9.80-58.8microg/gであった。これらの結果から、同マウスにおいて疾病発症を抑制した物質はDHMBAと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見は2つの学術的知見及び社会的意義があると考えられている。我々が開発したリポーター遺伝子アッセイとカラムクロマトグラフィーを組み合わせた実験方法は間接抗酸化物質の探索するために極めて有用であった。また今回マガキ抽出物中の物質Aの濃度が低かったために、NASHモデルマウスの疾病予防効果を有すると認められなかったが、肝培養細胞における物質Aの低細胞毒性や優れた抗酸化能から、今後ヒトにおけるNASHの疾病予防効果を有するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The previous study showed that the Pacific oyster's extract attenuated the pathological changes on the nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model mouse. The antioxidants contained in the extracts was thought to inhibit the oxidation stress and attenuated them on NASH. Recently indirect antioxidants contained some foods, activated the Keap1-Nrf2 pathway and induced a series of antioxidant enzymes, have been reported. However there is no report on indirect antioxidants contained in the Pacific oyster.

Our aim is to explore promising indirect antioxidants on the NASH model mouse using the combination of column chromatography and reporter gene assay from it. We have already isolated an antioxidant, DHMBA from it. In this study we isolated and identified compound A from it. The concentrations of compound A and DHMBA in the extract were 5.40-149 ng/g and 9.80-58.8 microg/g, respectively. From these results, DHMBA was thought to attenuate the pathological changes on the NASH model mouse.

研究分野：食品機能学

キーワード：抗酸化物質 マガキ Nrf2 酸化ストレス リポーター遺伝子アッセイ 抗酸化酵素 肝保護作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、45歳を境に低下することから¹⁾、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、ガン、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)等の疾病予防に効果が期待されている。

¹⁾ Antioxid. Redox. Signal., 8(9), 1865-1879, 2006

(2) 肝臓保護作用を持つ治療薬

今までに活性酸素消去能(ORAC法やDPPH法)の高い抗酸化物質を含む食品を摂取することが疾病の予防や治療に有効と考えられてきた。しかしながら、細胞や実験動物を用いた抗酸化能との乖離が指摘されている。近年、従来の活性酸素消去能をもつ物質に替わって、Keap1-Nrf2経路活性化物質が新しい、より有効な抗酸化物質として注目されている。食品中に含まれる同活性物質の刺激により、Nrf2は核に移行し、DNA上の抗酸化剤応答配列(ARE)と結合する。このことにより、一連の抗酸化酵素群を強力に転写誘導する。近年、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンが上述の機序により同経路を活性化し、ガンを予防する効果等が報告されている²⁾。

²⁾ Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 3147-3150, 1994.

(3) 本研究の着想に至った経路

これまでに申請者らはマガキ抽出物からORAC法(活性酸素吸収能力)を用い、新規の抗酸化物質を単離・同定、並びにその化学的合成方法を確立した。肝臓の株化細胞(C3A)を用いて、その抗酸化能を観察した結果、DHMBAは酸化ストレスから細胞を保護しているのみならず、抗アポトーシスといった生物学的性状を持っていた。次に酸化ストレスが要因となって発生する疾病モデルマウス、「非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウス」にDHMBAを高濃度含むマガキ抽出物を与えた結果、NASHの疾病の特徴である肝臓における脂質の蓄積、アポトーシス、炎症、線維化の効果的な抑制、抗肥満、抗インスリン抵抗性などの様々な予防効果が確認された(図1、平成25年度科学研究費)³⁾。しかしながら、マガキ抽出物中の抗酸化物質の同定はDHMBA以外に報告はなく、他の抗酸化物質の可能性も考えられる。

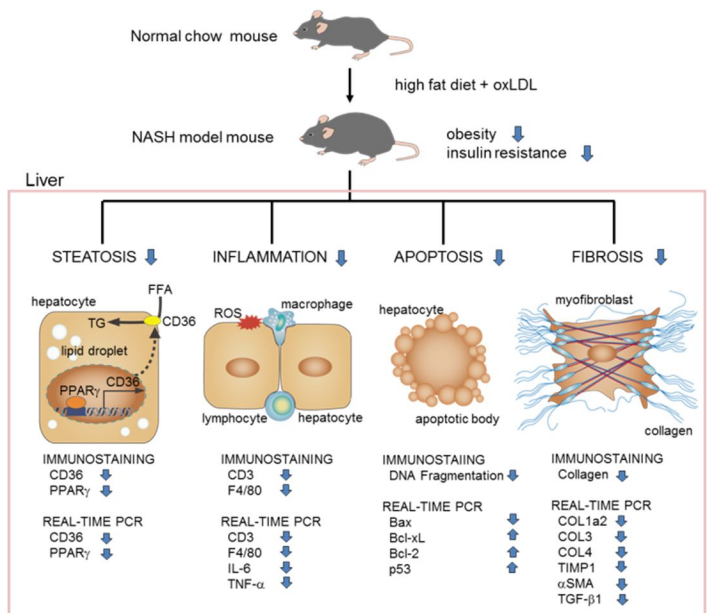


図1 NASHモデルマウスにおけるDHMBAの効果

一方、申請者らはDHMBAの定量法を確立、並びにマガキ中のDHMBAの濃度を報告したが、その過程で多くの化学物質の存在を確認している。また予備実験ではあるが、申請者らが開発したりポーター遺伝子アッセイを用いて、マガキ抽出物がKeap1-Nrf2経路の活性化を確認した。これらことから、マガキ抽出物中に新規の抗酸化物質の存在が予想され、DHMBAを含め、これらの新規抗酸化物質が効果的に同動物の疾病発症を予防したのと考えられた。

³⁾ Journal of Functional Foods, Vol. 20, 2016, 516-531

2. 研究の目的

申請者のグループが独自に作製したマガキ抽出物は酸化ストレスが要因となって発生する疾病、NASHモデルマウスを用いた実験において、効果的に同マウスの疾病発症を予防した。このことはマガキ抽出中の抗酸化物質により酸化が抑制され、発症が改善されたものと考えられる。しかしながら、マガキ抽出中において、申請者のグループが発見・同定した新規の抗酸化物質(DHMBA)以外に報告はなく、他の抗酸化物質の可能性も考えられる。本研究では新規の探索手法を開発し、DHMBA以外の新規の抗酸化物質の単離・同定を行う。次にDHMBAと比較しながら、それらの抗酸化物質能等の生物学的性状観察やマガキ抽出中のそれらの濃度測定を行い、NASHモデルマウスにおける疾病予防効果の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝培養細胞を用いた細胞保護作用の観察

IC₅₀
96穴プレートに播種した肝培養細胞(C3A)にDHMBA及び抗酸化物質(クロロゲン酸、ガリッ

ク酸、ロスマリン酸、シアニジン-3-グルコシド、スルフォラファン、ケルセチン、イソリクイリチゲニン、クルクミン、リコピン)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。コントロール(0 μM 添加群)を 100%とし、 IC_{50} (50%阻害濃度)を求めた。

リポーター遺伝子アッセイ

96 穴プレートに播種した C3A 細胞にリポーターベクターを遺伝子導入した。24 時間後、DHMBA または上記抗酸化物質を添加し、24 時間インキュベートした。24 時間後、反応液(ルシフェラーゼ溶液)を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

細胞生存能試験

96 穴プレートに播種した C3A 細胞に DHMBA または上記抗酸化物質を添加し、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, 15mM)を添加し、24 時間後、CCK-8 により生細胞数を計測した。

抗酸化酵素群の遺伝子発現

24 穴プレートに播種した C3A 細胞に DHMBA を添加 24 時間後、細胞から RNA を精製した。RNA より cDNA を合成し、real-time PCR 法により抗酸化酵素群の遺伝子発現量を測定した。

抗酸化酵素のタンパク質発現

6 穴プレートに播種した C3A 細胞に DHMBA を添加 24 時間後、RIPA バッファーによりタンパク質を可溶性・抽出した。HO-1、GST の測定はそれぞれ Western blotting 法、及び酵素的に(GSSG/GSH Quantification Kit、同仁化学)タンパク質発現を測定した。

(2) Keap1-Nrf2 経路活性化物質のスクリーニング

マガキ抽出物の分画

カラムクロマトグラフィーA、B、C による分画を行った。

物質の同定

LC-MS/MS 及び NMR により物質の同定を行った。

DHMBA と物質 A の定量

日本における 12-13 地点のマガキを入手し、内部標準法により DHMBA と物質 A の定量を行った。

4. 研究成果

(1) DHMBA の保護作用

IC_{50}

DHMBA の IC_{50} は 500 μM 以上であった。一方、すでに Keap1-Nrf2 経路活性化物質であることが報告されているスルフォラファン、クルクミン、イソリクイリチゲニンはそれぞれ 296、108.5、153.1 μM と DHMBA より低かった。

リポーター遺伝子アッセイ

リポーター遺伝子アッセイにより、すでに Keap1-Nrf2 経路活性化物質であることが報告されているスルフォラファン、クルクミン、イソリクイリチゲニンのルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。また DHMBA も同様にルシフェラーゼ活性の上昇が観察され、Keap1-Nrf2 経路活性化が観察された(図 2)。

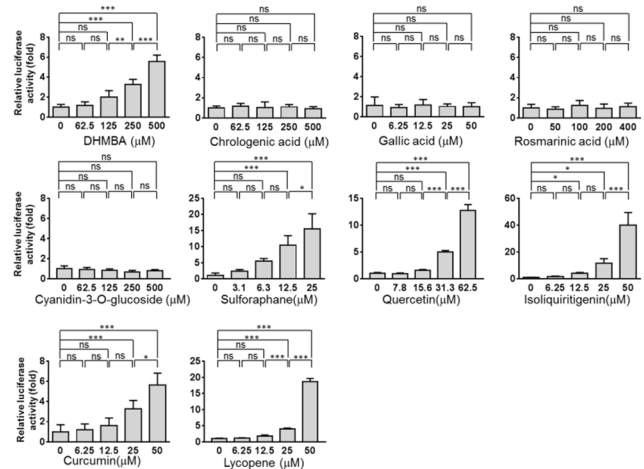


図 2 各抗酸化物質のリポーター遺伝子アッセイ

DHMBA の細胞生存能

C3A 細胞における抗酸化物質添加後、酸化に対する細胞生存能の観察を行った結果、すでに Keap1-Nrf2 経路活性化物質であることが報告されているスルフォラファン、クルクミン、イソリクイリチゲニンの細胞生存能の上昇が観察された。また、DHMBA も濃度依存的に上昇が観察された(図 3)。

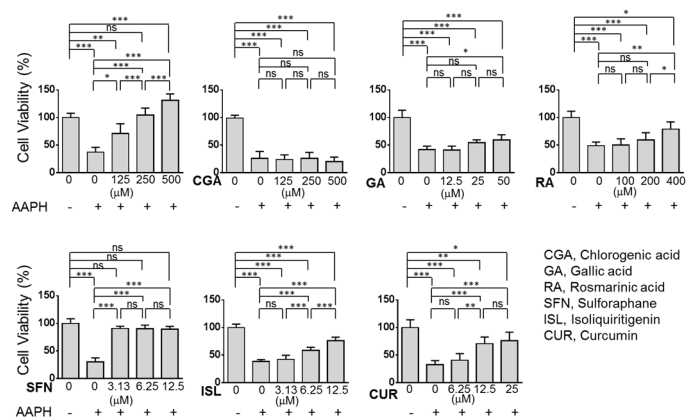


図 3 各抗酸化物質の細胞生存能

DHMB A による抗酸化酵素群の遺伝子とタンパク質発現

DHMB A を C3A 細胞による一連の抗酸化酵素群の遺伝子発現を観察した結果、*HO-1*、*GCLM*、*GCLC* において、10 倍以上の遺伝子発現の増加が観察された。また *NQO1*、*SOD1*、*GR*、*GPx*、*Cat*、*GSTA*、*GSTP*、*GSTM*、*GSTT* の増加が観察された (図 4)。

10 倍以上の遺伝子発現の増加が観察された *HO-1* と *GST* のタンパク質発現を観察した。その結果、*HO-1* においては濃度依存的な増加、*GST* においては 250 μM まで増加傾向が観察された (図 4)。

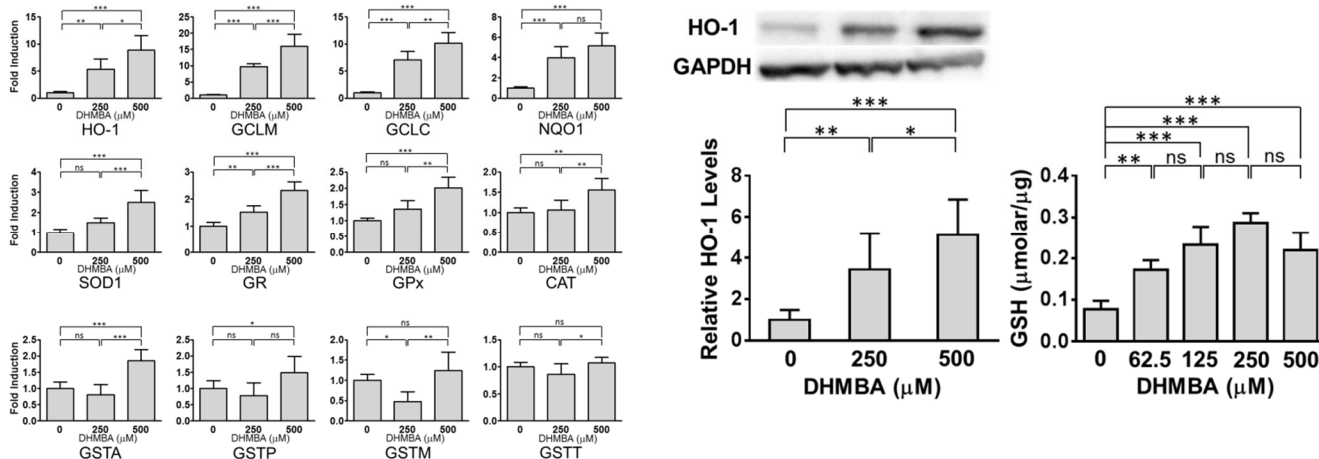


図 4 DHMB A による抗酸化酵素群の遺伝子とタンパク質発現

(2) 物質 A による細胞保護作用

リポーター遺伝子アッセイによる抗酸化物質の探索

カラムクロマトグラフィー A、B、及び C を用いて、マガキの抽出物の分画を行った (図 5)。各々の画分をリポーター遺伝子アッセイによりスクリーニングした。カラムクロマトグラフィー A では第 1 画分、カラムクロマトグラフィー B では第 2 画分を分取した。最終段階のカラムクロマトグラフィー C では第 5 画分を分取した (図 5)。

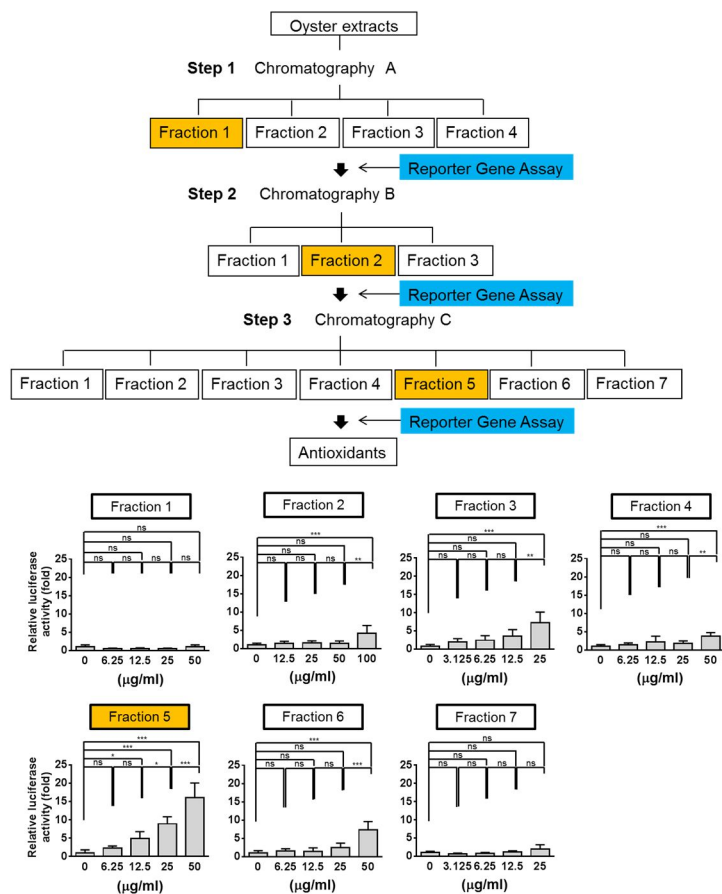


図 5 カラムクロマトグラフィーとリポーター遺伝子アッセイによるスクリーニング

物質の同定

カラムクロマトグラフィーCで分取した第5画分において物質の同定を行った結果、物質A(特許出願中)であった。

IC₅₀
物質AのIC₅₀は500 μM以上であった(図6)。

リポーター遺伝子アッセイ

物質Aは125 μM以上で濃度依存的にルシフェラーゼ活性の増加を観察した(図6)。

物質Aの細胞生存能

C3A細胞に物質Aを添加後、酸化に対する細胞生存能の観察を行った結果、濃度依存的な増加を観察した(図6)。

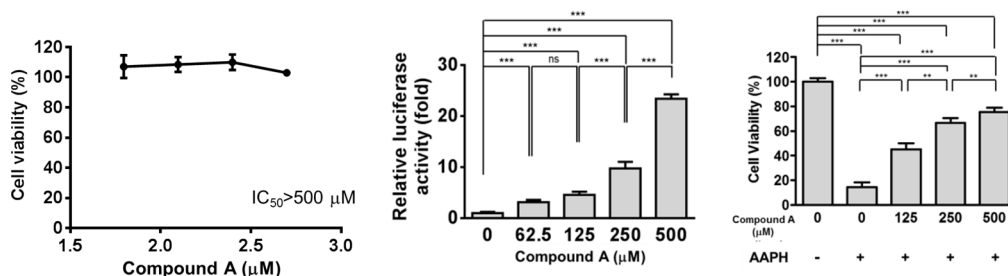


図6 物質AのIC₅₀、リポーター遺伝子アッセイ、細胞生存能

物質Aによる抗酸化酵素群の遺伝子とタンパク質発現

物質AをC3A細胞による一連の抗酸化酵素群の遺伝子発現を観察した結果、NQO1、GCLM、GCLC、GSTPにおいて、10倍以上の遺伝子発現の増加が観察された。またHO-1、SOD1、GR、GPx、Cat、GSTA、GSTTの遺伝子発現の増加が観察された(図7)。

10倍以上の遺伝子発現の増加が観察されたNQO1とGSTのタンパク質発現を観察した結果、NQO1とGSTは濃度依存的な増加を観察した(図7)。

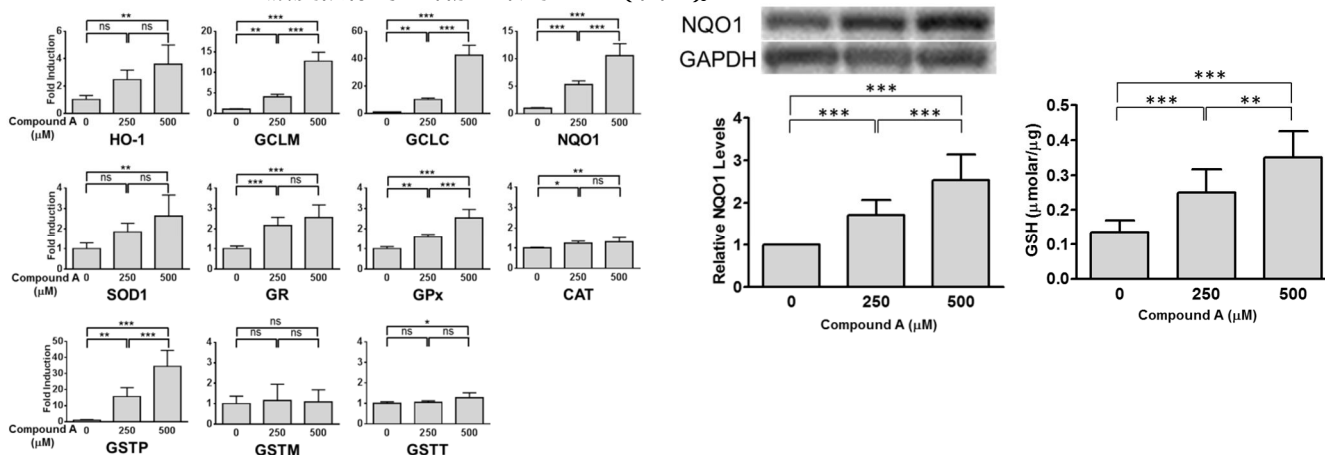


図7 物質Aによる抗酸化酵素群の遺伝子とタンパク質発現

DHMB Aと物質Aの定量

日本の12-13地区におけるマガキ中のDHMB Aと物質Aの定量を行った結果、それぞれ9.8-58.8 μg/g、5.4-149 ng/gであった。

(4) 総合考察

DHMB A及び物質Aにおいて、Keap1-Nrf2経路の活性を観察した結果、濃度依存的に「Keap1-Nrf2経路」の活性化し、下流の一連の抗酸化酵素の遺伝子群を発現させた(図2、4、6、7、8)。一方、日本におけるマガキ中の物質A及びDHMB Aの濃度を測定した結果、物質A及びDHMB Aの濃度はそれぞれ5.40-149 ng/g、9.80-58.8 μg/gと、DHMB Aは物質Aと比較して、約1,000倍高濃度であった。これらの結果から、NASHモデルマウスにおいて疾病発症を抑制した物質はDHMB Aと考えられた。

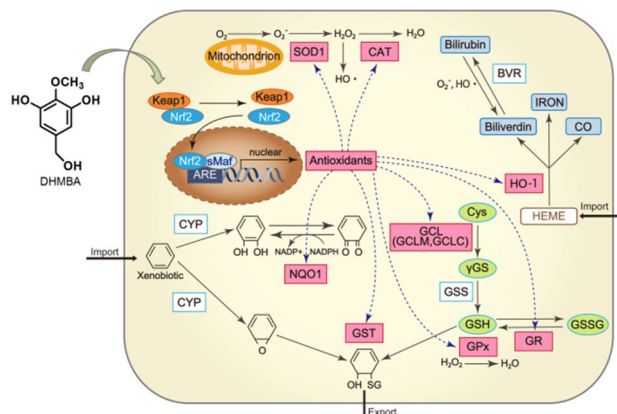


図8 DHMB AによるKeap1-Nrf2経路活性化及び抗酸化酵素群の発現

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)

Seiji Takeda, Toshihiro Sakurai, Shu-Ping Hui, Hirotoshi Fuda, Hitoshi Chiba. Effects of enzymes on elastic modulus of low-density lipoproteins were investigated using atomic force microscopy. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 501, No. 3, 2018, 607-611.

Sae Joko, Mitsugu Watanabe, Hirotoshi Fuda, Seiji Takeda, Takayuki Furukawa, Shu-Ping Hui, Rojeet Shrestha Hitoshi Chiba. Comparison of chemical structures and cytoprotection abilities between direct and indirect antioxidants. Journal of Functional Foods, 査読有, Vol. 35, 2017, 245-255.

[学会発表](計 9 件)

Hirotoshi Fuda, Yuning Roan, Satomi Umetsu, Takayuki Furukawa, Sae Joko, Satoshi Miyana, Hirotaka Suzuki, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba. Nrf2 dependent antioxidants screened by cell-based assay: screening & identification of antioxidant. 第58回日本臨床化学会年次学術集会. 名古屋. 2018年8月26日.

布田博敏、上甲紗愛、渡邊 貢、武田晴治、古川貴之、Rojeet Shrestha, 惠 淑萍、千葉仁志. 食品由来の抗酸化物質における分配係数、細胞生存能に関する比較検討. 日本農芸化学会2018年度大会. 名城大学(名古屋). 2018年3月15日~2018年3月18日.

Hirotoshi Fuda, Mitsugu Watanabe, Hiroaki Okabe, Sae Joko, Yusuke Miura, Shu-Ping Hui, Yimin, Naohiro Hamaoka, Emiko Miki, Hitoshi Chiba. Gene expression of antioxidant enzymes by antioxidant from Pacific oyster. The 25th annual meeting of international congress on nutrition and integrative medicine (Sapporo). 2017年7月8日~平成29年7月9日.

布田博敏、渡邊 貢、岡部浩昭、上甲紗愛、三浦佑介、惠淑萍、伊 敏、濱岡直裕、三木恵美子、千葉仁志. マガキ抽出物は NASH モデルマウスの肝臓において脂肪肝、炎症、アポトーシス、線維化を抑制する. 日本農芸化学会 2017 年度大会. 京都女子大学(京都). 2017年3月17日~2017年3月20日.

布田博敏、渡邊 貢、岡部浩昭、上甲紗愛、三浦佑介、惠淑萍、伊 敏、濱岡直裕、三木恵美子、千葉仁志. NASH モデルマウスによるマガキ抽出物の肝臓保護作用. 第23回日本未病システム学会総会九州大学医学部百年講堂(福岡). 2016年11月5日~2016年11月6日.

布田博敏、渡邊 貢、惠淑萍、千葉仁志. マガキ抽出物による抗肥満作用、インスリン抵抗性改善作用、及び肝臓保護作用. 第23回日本未病システム学会総会. 九州大学医学部百年講堂(福岡) 2016年11月5日~2016年11月6日.

布田博敏、惠淑萍、千葉仁志. マガキ由来抗酸化物質による機能性食品としての可能性. 第67回日本電気泳動学会総会. 釧路市観光国際交流センター(釧路). 2016年8月26日~2016年8月27日.

布田博敏、上甲紗愛、渡邊 貢、惠淑萍、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 Nrf2 標的遺伝子の発現. 第58回日本脂質生化学会秋田市にぎわい交流館AU(秋田). 2016年6月9日~2016年6月10日.

布田博敏、上甲紗愛、渡邊 貢、惠淑萍、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. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 札幌コンベンションセンター(札幌) 2016年3月27日~2016年3月30日.

[図書](計 0 件)[産業財産権] 出願状況(計 0 件) 取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hs.hokudai.ac.jp/ki fu/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古川 貴之
ローマ字氏名：(FURUKAWA, Takayuki)
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学院保健科学研究院
職名：助教
研究者番号：30754642

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮永 賢
ローマ字氏名：(MIYANAGA, Satoshi)
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学院保健科学研究院
職名：博士研究員
研究者番号：90746083