

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300256

研究課題名（和文） 新規酸化ストレスマーカーを用いた食品機能解析とリスク評価

研究課題名（英文） The study on functional food using oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and 7-hydroxycholesterol

研究代表者

吉田 康一（YOSHIDA YASUKAZU）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究センター付

研究者番号：90358333

研究成果の概要（和文）：本研究では新規酸化ストレスマーカーを用いて、食品機能および食品含有化合物のリスクを科学的に実証、評価することを目的とする。培養細胞および実験動物を用いて各種機能性食品(ビタミンE、コエンザイムQ等)を投与することによる細胞や動物の応答を、脂質酸化生成物やストレス応答タンパク質の変動を指標として、評価方法を確立することを目指した。生体内酸化ストレスの指標としては、生体内で豊富に存在するリノール酸およびコレステロールに注目している。本研究で提案する新規酸化ストレスマーカーは、このリノール酸およびコレステロールが生体内で酸化を受けて生成したヒドロキシリノール酸(HODE)およびヒドロキシコレステロール(OHCh)である。本研究で得られた一連のデータから、HODEおよびOHChの脂質酸化生成物が抗酸化物質や機能性食品の生体中における抗酸化能を評価する上でバイオマーカーとして有用である見通しが得られた。これらの研究成果を学術論文6報へ発表するに至った。

研究成果の概要（英文）：Lipid peroxidation products have received a great deal of attention for the partial application to clinical use as bio-markers. To assess the antioxidative role of functional foods and antioxidants, vitamin E and BO-653, in a mouse model and culture cell using lipid peroxidation and protein oxidation products. In the present study, we proposed that lipid peroxidation (tHODE and tOHCh) and protein oxidation are indeed good markers for the detection of progression of oxidative stress and effect of functional foods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：機能性食品、酸化ストレスマーカー、ヒドロキシリノール酸、ヒドロキシコレステロール、タンパク質酸化修飾、酸化 DJ-1

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進むにつれ健康に対する関心は高まり、疾病の予防や健康維持に果たす食品機能の役割の重要性が認識されている。食品含有化合物の重要性が認識されている一方、そのリスクの評価を行える「バイオマーカー」に適切なものがなかった。本研究では我々が開発した「酸化ストレスマーカー」を用い、食品機能およびその含有化合物のリスクおよび効果を科学的に実証・評価する方法を開発することを目標とする。

2. 研究の目的

脂質酸化生成物マーカーならびに酸化タンパク質の「酸化ストレスマーカー」を指標とした食品成分の機能評価法の確立

(1)培養細胞および実験動物を用いた食品機能成分に対する応答メカニズムとバイオマーカーへの影響

脂質酸化物マーカーと酸化修飾タンパク質マーカーとのその関連研究

食品の効能、リスク評価における応答性研究

(2)ヒトデータを用いた食品機能成分の効能解析

血中の酸化ストレスマーカーの測定により、細胞および動物実験結果との比較検証

3. 研究の方法

生体内酸化ストレスの指標として、生体内で豊富に存在するリノール酸およびコレステロールに注目している。本研究における酸化ストレスマーカーはリノール酸およびコレステロールが生体内酸化により生成する過氧化物、カルボニル体およびそのエステル、遊離体を還元および加水分解することでヒドロキシリノール酸(tHODE)およびヒドロキシコレステロール(tOHCh)として網羅的に分析する。さらに、酸化 DJ-1 の特異的抗体を用いた ELISA 法による定量測定法を行う。本方法による脂質酸化物マーカーと酸化 DJ-1 を定量することで、培養細胞、動物およびヒトに対する応答を評価する。

4. 研究成果

(1)培養細胞を用いた抗酸化物質およびその代謝物のストレス応答解析(論文)

抗酸化物質として代表的な化合物であるビタミン E (トコフェロール) と、その酸化的代謝物のひとつであるトコフェロールキノン(TQ)の培養細胞におけるストレス応答を評価した。特に動植物に多く含まれている α 体と γ 体に注目し、細胞毒性と抗酸化物質への影響について詳細に研究した。

γ -TQ は α -TQ と比べ顕著な毒性が認められたが、毒性が認められない低濃度の TQ を前処理により、その後の酸化剤による細胞死に対して抑制効果を示した(図 1)。

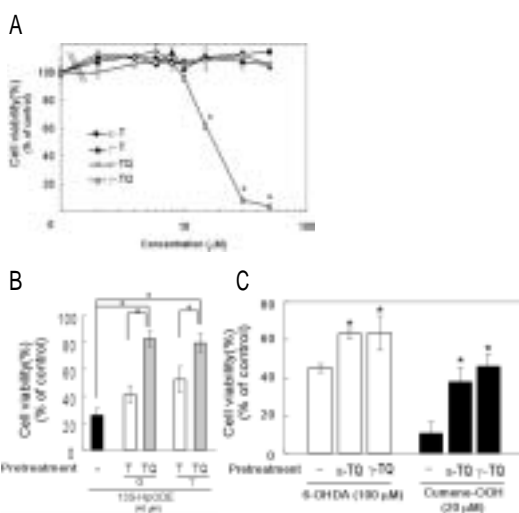


図 1 γ -TQ の細胞毒性と細胞死抑制効果

A PC12 細胞に各濃度の α -Tおよび γ -T, α -TQ, γ -TQ を 24 時間処理後、MTT 法で生細胞率を測定した。*; $p < 0.001$ (Dunnnett, ANOVA)

B PC12 細胞に 8 μ M 13(S)-HpODE を添加し、さらに 24 時間処理した。生細胞率の測定は MTT 法を用いた。*; $p < 0.025$ (Tukey, ANOVA)

C PC12 細胞に 8 μ M α -TQ または γ -TQ を 24 時間処理し、培地交換後に 100 μ M 6-OHDA もしくは 20 μ M Cumene-OOH を添加し 24 時間処理した。生細胞率は MTT 法を用いた。*; $p < 0.001$ (Dunnnett, ANOVA)

さらに低濃度の γ -TQ は細胞内グルタチオン(GSH)を増加し細胞内の抗酸化能の増強作用を有することが判明した(図 2-A)。この GSH 増加作用には小胞体ストレスのひとつである activating transcription factor (ATF4) を転写因子としたシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現上昇が強く関与

していることが解明できた(図 2-B)。これらの基礎研究から、トコフェロールの酸化代謝物の TQ は前駆体にはない作用を有することがわかった。

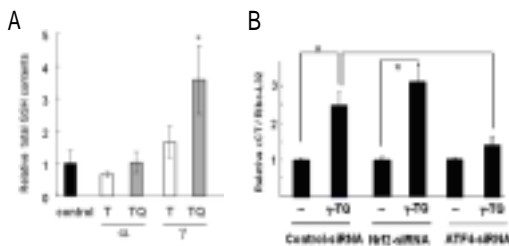


図 2 γ -TQ による GSH の増加と xCT 発現に関する転写因子

A PC12 細胞に 8 μ M T または TQ を 24 時間処理した後、細胞を回収し Total GSH の測定を行った。*; $p < 0.01$ (Tukey, ANOVA)

B PC12 細胞に control-siRNA または Nrf2-siRNA, ATF4-siRNA を 18 時間処理後、8 μ M γ -TQ を 12 時間処理した。その後、細胞を回収し xCT mRNA レベルをリアルタイム PCR により測定した。*; $p < 0.05$ (Tukey, ANOVA)

(2) コレステロール過剰食による脂質酸化の上昇に対するビタミン E (α -T) 接餌による効果(論文)

ビタミン E (α -T 0.002 wt%) および新規抗酸化物質である B0-653 (0.2 wt%) を 10 週間動物へ餌として与え、コレステロール過剰食による血中および肝臓と脳中の脂質酸化の上昇に対する影響を検証した。Plasma の tHODE と肝臓の tOHCh はコレステロール過剰食により有意に上昇した。さらに B0-653 および α -T の接餌によりその上昇は抑制された(表 1)。

Group	Sex	Age (weeks)	Plasma tHODE (nmol/L)		Liver tOHCh (nmol/mg)		Brain tOHCh (nmol/mg)	
			Control	High Fat	Control	High Fat	Control	High Fat
B0-653	F	10	1.00 ± 0.15	2.50 ± 0.20*	1.50 ± 0.10	3.50 ± 0.20*	0.50 ± 0.05	1.50 ± 0.10*
			1.00 ± 0.15	1.50 ± 0.10	1.50 ± 0.10	1.50 ± 0.10	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.05
B0-653 + α -T	F	10	1.00 ± 0.15	1.50 ± 0.10	1.50 ± 0.10	1.50 ± 0.10	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.05
			1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.10	1.50 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.05

表 1 コレステロール過剰食による酸化ストレスマーカーの上昇と抗酸化物質摂餌による抑制効果

(3) 培養細胞を用いたラジカル開始剤による脂質酸化生成物の解析(論文)

ヒトリンパ球細胞にラジカル開始剤の添加による細胞毒性および脂質過酸化物の測定を行った。その結果、酸化ストレスに対して tHODE および tOHCh の上昇が認められた。

さらに、tOHCh の上昇は tHODE と比較して顕著であった(表 2)。これらのことから、plasma 中において Ch は酸化剤からの防御を担っていると考えられ、tOHCh の測定は酸化ストレスに対する鋭敏なマーカーであると示唆された。

Parameter	Control (n=10)		AIPH (n=10)	
	Mean	SD	Mean	SD
tHODE (nmol/L)	1.50	0.20	2.50	0.30*
tOHCh (nmol/L)	1.00	0.10	1.50	0.20*

表 2 ラジカル開始剤処理による細胞内酸化生成物の上昇

(4) ラジカル開始剤給水による脂質過酸化物の上昇とビタミン E 摂餌の抑制効果(論文)

ビタミン E 欠乏食およびビタミン E (α -T 0.002 wt%) 食を摂餌し、ラジカル開始剤 (AIPH) の給水による酸化ストレスマーカーの変動を解析した。AIPH 給水により Plasma 中の tHODE および 8-iso-prostaglandin F₂ α (t8-isoPGF₂ α) の顕著な上昇が認められた。さらにビタミン E 欠乏食群に比べビタミン E 食群では tHODE および 8t-isoPGF₂ α の上昇は有意に抑制された

(5) 酸化型 DJ-1 特異的抗体を用いたパーキンソン病早期診断システムの開発(論文)

DJ-1 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子として発見され、シャペロンおよび抗酸化能を有するたんぱく質であることが知られている。また、DJ-1 の変異は若年性パーキンソン病の発症やパーキンソン病およびアルツハイマー病患者の脳中において酸化修飾された DJ-1 (酸化型 DJ-1) の増加がみとめられている。本研究ではパーキンソン病の早期診断への応用を目的として、酸化 DJ-1 特異的抗体作成とその抗体を用いた ELISA 測定系の確立を試みた。

その結果、薬物治療を行っていない未治療パーキンソン病患者の赤血球中の酸化 DJ-1 値は健康人および治療中のパーキンソン病患者に比べ、顕著に高いことが認められた(図 3)。ヒトの血液からパーキンソン病の診断を行える画期的なマーカーになる可能性がある。

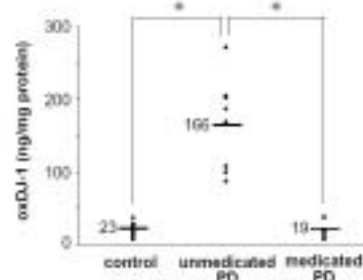


図 3 パーキンソン病患者赤血球中の酸化 DJ-1 含有量

健常者および薬物治療中パーキンソン病患者群、未治療群の赤血球中の酸化 DJ-1 を ELISA を用いて測定した。* $p < 0.01$ (Tukey, ANOVA)

(6) コエンザイム Q10 およびビタミン E の細胞内取り込みと分布 (論文)

培養細胞にコエンザイム Q および α -T を添加し、細胞内への取り込みと細胞内分布について検討した。細胞内に取り込まれたコエンザイム Q はミトコンドリアに多く存在し、一方 α -T は膜画分に多く分布していた。また、 α -T は脂質分布との相関性が認められたが、コエンザイム Q の特にミトコンドリアおよびミクロソーム画分は脂質との相関が認められなかった (図 4)。

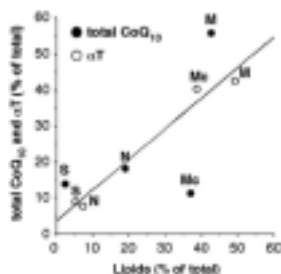


図 5 コエンザイム Q および α -T の細胞内分布と脂質との相関

10 μ M コエンザイム Q または α -T を 24 時間処理し、各細胞内画分 (S; 細胞質、N; 核、M; ミトコンドリア、Mc; ミクロソーム) の濃度と脂質測定を行った。

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)

齋藤芳郎、濱窪隆雄、吉田康一、小川陽子 (以下省略 10 人)、二木鋭雄、Preparation and application of monoclonal antibodies against oxidized DJ-1. Significant elevation of oxidized DJ-1 in erythrocytes of early-stage Parkinson disease patients, *Nuroscience Letters*, 査読あり、vol 463, 2009. pp. 1-5

齋藤芳郎、福原明子、西尾敬子、早川三恵子、小川陽子、坂本 Hirokazu、藤井健志、吉田康一、二木鋭雄、Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 査読あり、

vol. 20, 2009, pp. 350-357

小川陽子、齋藤芳郎、西尾敬子、吉田康一、芦田均、二木鋭雄、Gamma-tocopheryl quinone, not alpha-tocopheryl quinone, induces adaptive response through up-regulation of cellular glutathione and cysteine availability via activation ATF4. *Free Radical Research*, 査読あり、vol. 42, 2008, pp. 674-687

吉田康一、早川三恵子、Cynshi Osamu、Jishage Kou-ichi、二木鋭雄、Acceleration of lipid peroxidation in α -tocopherol transfer protein-knockout mice following the consumption of drinking water containing a radical initiator. *Journal of Oleo Science*, 査読あり、vol. 57, 2008, pp. 577-583

吉田康一、早川三恵子、伊藤奈々子、羽瀨洋子、井上ルリ子、Zhi-Hua Chen、Jiaofei Cao、Cynshi Osamu、Jishage Kou-ichi、二木鋭雄、Antioxidant effects of 2, 3-dihydro-5-hydroxy-4, 6-di-tert-butyl-2,2-dipentylbenzofuran and α -tocopherol in hyperlipidemic mice as evaluated by hydroxyoctadecadienoic acid and 7-hydroxycholesterol. *Biochemical Pharmacology*, 査読あり、vol. 74, 2007, pp. 1010-1019

齋藤芳郎、吉田康一、二木鋭雄、Cholesterol is more susceptible to oxidation than linolates in cultured cells under oxidative stress induced by selenium deficiency and free radicals. *FEBS Letters*, 査読あり、vol. 581, 2007, pp. 4349-4354

〔学会発表〕(計 4 件)

「酸化 DJ-1 とパーキンソン病 (1) 抗体作成と ELISA 開発」

齋藤芳郎、小川陽子、吉田康一、二木鋭雄、第 62 回日本酸化ストレス学会学術総会
2009 年 6 月 11 日

「酸化 DJ-1 とパーキンソン病 (2) 臨床検体の測定」

小川陽子、齋藤芳郎、吉田康一、二木鋭雄、第 62 回日本酸化ストレス学会学術総会
2009 年 6 月 11 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 含硫アミノ酸残基が酸化された酸化型ポリペプチドに対する抗体

発明者: 吉田康一、齋藤芳郎、小川陽子、二

木鋭雄、七里元督、浜窪隆雄、望月康弘、岩成宏子、絹見直樹

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所、東京大学、株式会社ペルセウスプロテオミクス

種類：特許

番号：特願 2009-028042

出願年月日：平成 21 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 康一 (YOSHIDA YASUKAZU)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・研究センター付

研究者番号：90358333

(2)研究分担者

二木 鋭雄 (NIKI ETSUO)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・顧問

研究者番号：20011033

赤澤 (小川) 陽子 (AKAZAWA-OGAWA YOKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究センター・特別研究員

研究者番号：50549897

斎藤 芳郎 (Saito Yoshiro)

独立行政法人産業技術総合研究所・ヒューマンストレスシグナル研究センター・研究員

研究者番号：70357060

(3)連携研究者

特になし