

平成 21年 5月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500620
 研究課題名 (和文) 食品ポリフェノールの肝疾患抑制作用とその関連遺伝子に与える影響
 研究課題名 (英文) Inhibitory effect of food polyphenols on liver disease.

研究代表者

鈴木 康夫 (SUZUKI YASUO)
 名古屋経済大学・人間生活科学部・講師
 研究者番号：32352868

研究成果の概要：クルクミンが正常肝細胞株 Ac2F の抗酸化タンパク質 (HO-1、SOD-1、SOD-2) の mRNA 発現やそのタンパク質発現にどのように与えるかを調べた。その結果、クルクミンは、これらタンパク質の mRNA の発現やたんぱく質を調べた 0 から 40 μ M の濃度で濃度依存的に上昇させることがわかった。これらの結果は、クルクミンが、活性酸素種を取り除くことにより、酸化ストレスを減少させ、肝疾患を抑制する可能性を示唆すると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：肝疾患、クルクミン、抗酸化作用、

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は、エネルギーを獲得するためだけでなく、体内に侵入してきた病原菌やウイルスを殺す白血球やマクロファージに必要である。また、体に必要なホルモンを合成する際にも重要な役割を果たしている。しかし、体の中のある部分で異常に活性酸素が産生されるようになった時、酸化的障害を受けることが明らかにされており、これらが癌、生活習慣病、老化などの原因になると考えられている。活性酸素から身を守るために、体内

には様々な機構が備わっている。その代表的な酵素系として、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどがある。

非酵素系である抗酸化物質としては、アスコルビン酸 (ビタミンC)、ビタミンE、カテキン、ケルセチン、クルクミン、フラボノイドなどが挙げられる。特に緑茶は、ビタミン類、アミノ酸類、無機類を豊富に含むことから強い抗酸化作用があると様々な研究によって明らかにされている。

本研究では、緑茶成分やウコンに含まれるクルクミン、その他の食品成分中のポリフェノールが、肝疾患にどのような影響を与えるか、ラットの肝臓およびラット正常肝細胞Ac2Fを用いて肝疾患に抑制に関連するSOD、ヘムオキシゲナーゼ (HO)、コラーゲン、TGF- β 、PDGF、肝細胞増殖因子 (HGF) などの酵素、サイトカインや細胞外マトリックスに関連する各種遺伝子発現を調べ、肝疾患の抑制効果を検討することを目的としている。

2. 研究の目的

緑茶成分やウコンに含まれるクルクミン、その他の食品成分中のポリフェノールに着目し、肝疾患にどのような影響を与えるか、ラット正常肝細胞Ac2Fを用いて肝疾患に抑制に関連するSOD、ヘムオキシゲナーゼ (HO)、コラーゲン、TGF- β 、PDGF、肝細胞増殖因子 (HGF) などの酵素、サイトカインや細胞外マトリックスに関連する各種遺伝子発現の増減を調べ、肝疾患の抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞株 Ac2F を 0~40 μ M のクルクミン存在下で 0~48 時間培養したのち、全 mRNA を抽出した。抽出した mRNA に対する cDNA をキットを用いて合成した。 β -アクチン、SOD-1、SOD-2、HO-1 に対するプライマーを用い、RT-PCR 法により、それらの mRNA を増幅した。増幅した mRNA は、 β -アクチンを内部標準とし、クルクミンで処理していない細胞の mRNA の発現率を 100% として、数値化しクルクミンが様々な mRNA 発現に与える処理濃度依存性や処理時間依存性を観察した。

(2) Ac2F 細胞を 40 μ M のクルクミン存在下で 0~48 時間培養したのち、細胞溶解緩衝液で全たんぱく質を抽出した。処理時間ごとの抽出たんぱく質の濃度をそろえ、電気泳動にかけ、抽出たんぱく質を PVDF 膜に転写した。抗 SOD-2 抗体、抗 HO-1 抗体を用い、Western blotting 法によりそれらたんぱく質の発現の様子を観察した。クルクミンで処理していない細胞のたんぱく質発現率を 100% として、数値化し 40 μ M のクルクミンが様々な処理時間でそれらのたんぱく質発現に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) mRNA 発現に与えるクルクミンの影響

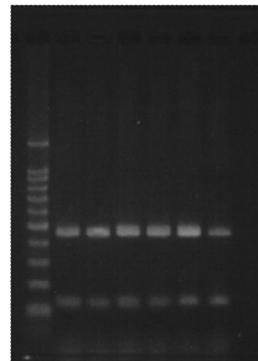
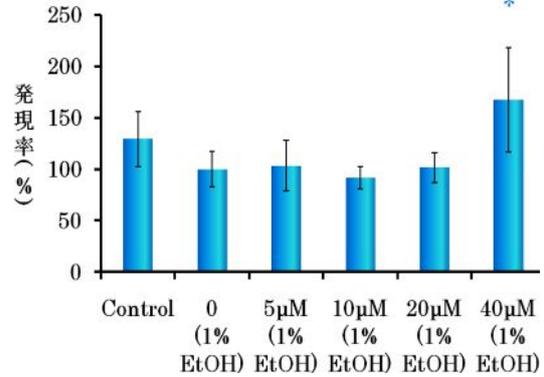
① SOD-1 mRNA 発現に与えるクルクミンの影響 (濃度依存性)

Ac2F 細胞を 0 から 40 μ M のクルクミンで 24 時間処理して SOD-1 mRNA の発現変化を調べた。

40 μ M のクルクミンが mRNA の発現を有意に上昇誘導させることが分かった。しかし、5 μ M から 20 μ M という低濃度のクルクミン処

理では影響を与えなかった。このことから 40 μ M のクルクミンが SOD-1 の mRNA 発現を有意に増加させることがわかった。

SOD-1 mRNA 発現に与えるクルクミンの影響 (濃度依存性)



1 2 3 4 5 6

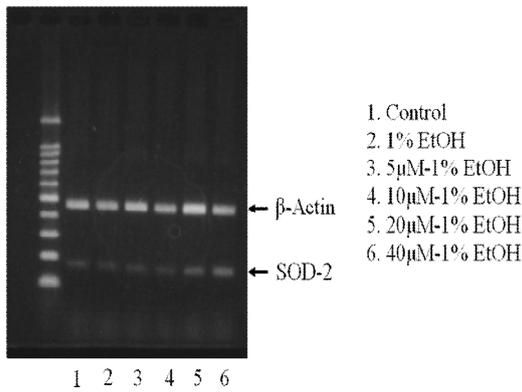
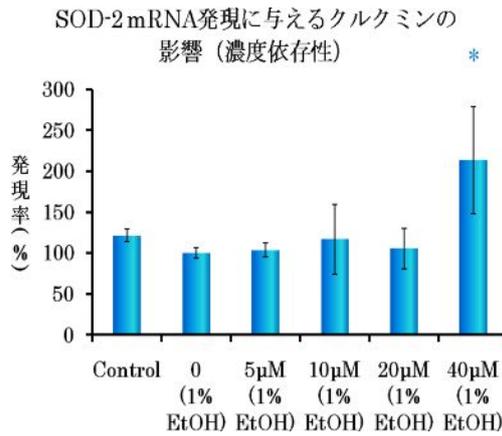
1. Control
2. 1% EtOH
3. 5 μ M-1% EtOH
4. 10 μ M-1% EtOH
5. 20 μ M-1% EtOH
6. 40 μ M-1% EtOH

← β -Actin
← SOD-1

② SOD-2 mRNA 発現に与えるクルクミンの影響 (濃度依存性)

Ac2F 細胞を 0 から 40 μ M のクルクミンで 24 時間処理して SOD-2 mRNA の発現変化を調べた。

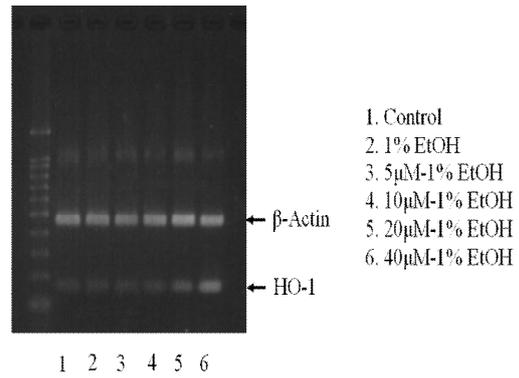
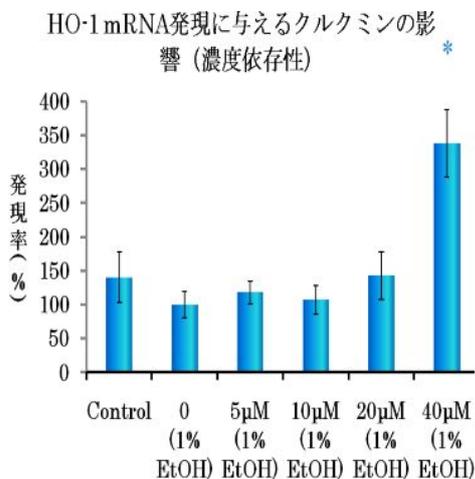
40 μ M のクルクミンが mRNA の発現を有意に上昇誘導させることが分かった。しかし、5 μ M から 20 μ M という低濃度のクルクミン処理では影響を与えなかった。このことから 40 μ M のクルクミンが SOD-2 の mRNA 発現を有意に増加させることがわかった。



③HO-1 mRNA発現に与えるクルクミンの影響(濃度依存性)

Ac2F細胞を0から40µMのクルクミンで24時間処理してHO-1 mRNAの発現変化を調べた。

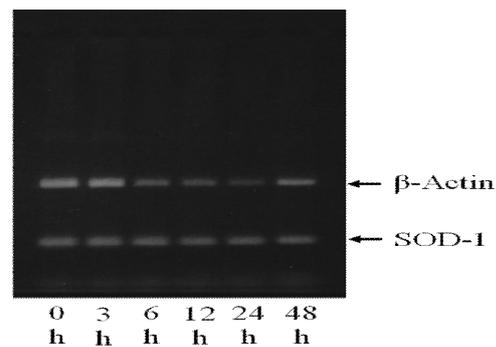
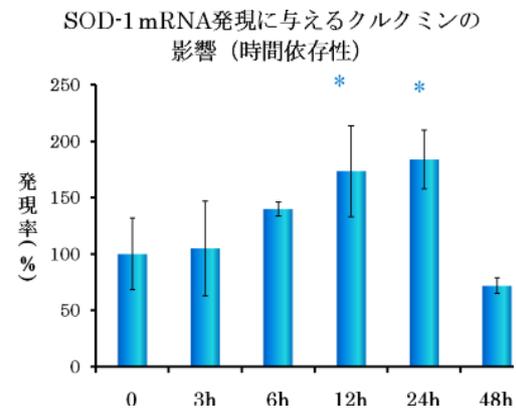
40µMのクルクミンがmRNAの発現を有意に上昇誘導させることが分かった。しかし、5µMから20µMという低濃度のクルクミン処理では影響を与えなかった。このことから40µMのクルクミンがHO-1のmRNA発現を有意に増加させることがわかった。



④SOD-1 mRNA発現に与えるクルクミンの影響(時間依存性)

Ac2F細胞を40µMのクルクミンで0から48時間処理してSOD-1 mRNAの発現変化を調べた。

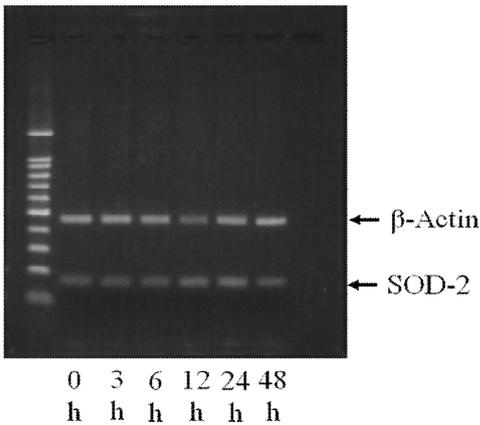
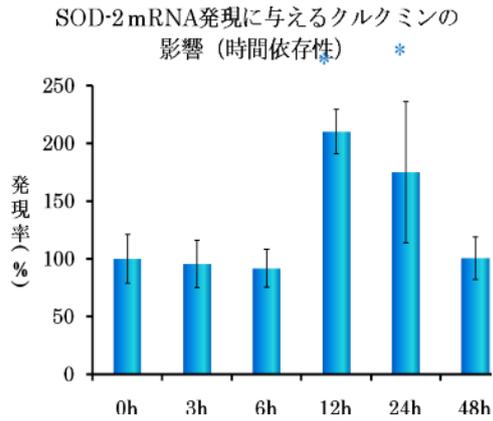
6時間から24時間までは有意に発現を上昇させた。しかしながら、48時間まで処理続けるとコントロールと同程度まで低下することが分かった。



⑤SOD-2 mRNA発現に与えるクルクミンの影響(時間依存性)

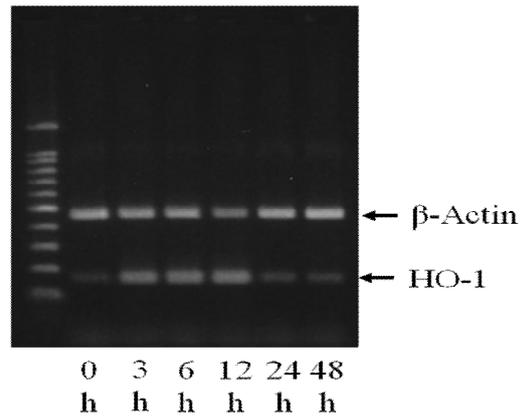
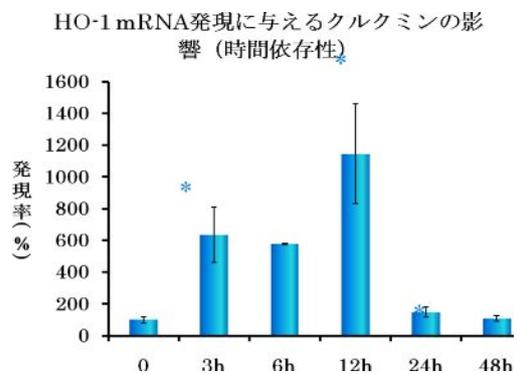
Ac2F細胞を40µMのクルクミンで0から48時間処理してmRNAの発現変化を調べた。

12時間、24時間処理するとmRNAの上昇が大きく誘導されて、48時間まで処理するとコントロールと同程度まで低下することが分かった。



⑥HO-1 mRNA発現に与えるクルクミンの影響(時間依存性)

Ac2F細胞を40 μ Mのクルクミンで0から48時間処理してmRNAの発現変化を調べた。3時間でmRNAの上昇誘導がみられ、12時間で最も効果的な上昇誘導が得られた。しかし、その後は、著しく減少した。このことから3時間から24時間でクルクミンがHO-1のmRNA発現を有意に増加させることがわかった。



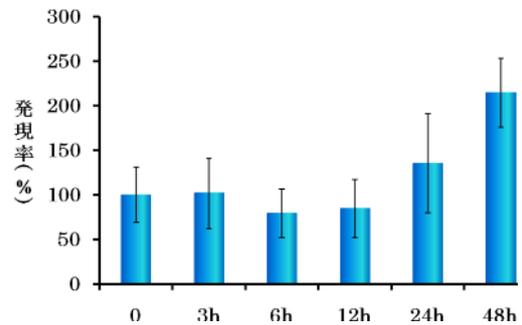
(2) タンパク発現に与えるクルクミンの影響

①SOD-2 タンパク発現に与えるクルクミンの影響(時間依存性)

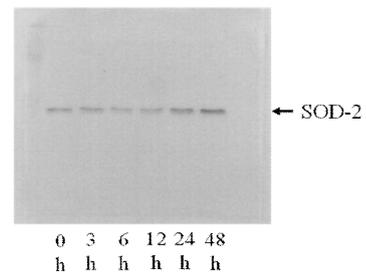
Ac2F細胞を40 μ Mのクルクミンで0から48時間処理し、RIPAバッファで溶解して、タンパク質発現をウエスタンブロッティング法により調べた。

48時間で有意差がみられたが、0時間から24時間までは有意差がみられなかった。このことから48時間でクルクミンがSOD-2タンパク質発現を有意に増加させることがわかった。

SOD-2タンパク発現に与えるクルクミンの影響 (時間依存性)



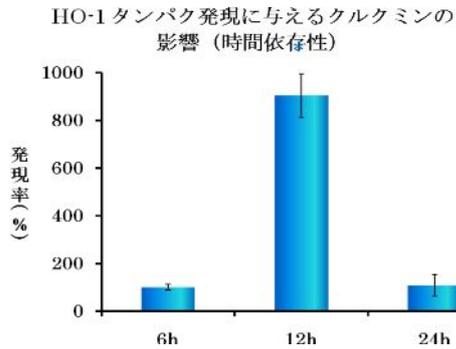
Western Blotting Analysis for SOD-2 Expression.



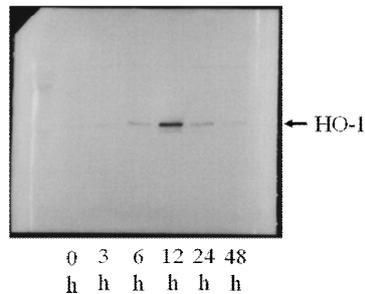
②HO-1 タンパク発現に与えるクルクミンの影響(時間依存性)

Ac2F細胞を40 μ Mのクルクミンで0から48時間処理してmRNAの発現変化を調べた。12時間、クルクミンで処理すると、HO-1のタン

パク発現を有意に増加させることがわかった。0時間、3時間と48時間ではほとんど発現が見られなかった。コントロールで発現が見られなかったため、6時間と比べた。



Western Blotting Analysis for HO-1 Expression



以上の結果から、クルクミンが、活性酸素種を取り除くことにより、酸化ストレスを減少させ、肝疾患ばかりでなく、様々な疾患を抑制する可能性を示唆すると考えている。

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)

[学会発表] (計1件)

1. 鈴木康夫、クルクミンの抗酸化ストレス関連酵素に与える影響、第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会、2008年12月9日、神戸 (ポートアイランド)

[図書] (計1件)

1. Suzuki Y, Sazuka M, Isemura S and Isemura M. *Research Signpost*, Beneficial Health Effects of Green Tea. 'Interaction of green tea catechins with proteins.' 2008, p13-24 (印刷中)

[その他] (計1件)

(講演)

1. 鈴木康夫、「緑茶の効能について」愛知県江南保健所管内栄養士会、特別講演、2008年7月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康夫 (SUZUKI YASUO)

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし