

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 2 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500680

研究課題名（和文） イソフラボン・ポリアミン誘導体が持つヘム分解調節作用の機能性食品・医薬品への応用

研究課題名（英文） New therapeutic approach based on the regulation of heme and iron metabolism by isoflavones, polyamines, and heme/iron-related agents

研究代表者

小川 和宏 (OGAWA KAZUHIRO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30344659

研究成果の概要：

ヘム代謝系・鉄代謝系は、ヘム分解酵素・ヘムオキシゲナーゼ（HO）を中心に、生体防御や生体調節に重要な役割を果たしている。代表者らは、ヘムによる HO-1 の発現誘導メカニズムを解明し、種々の物質などによるヘム分解系調節と、ヘム代謝と鉄代謝の関連を見出してきた。本研究では、食品成分を中心とした種々の物質によるヘム代謝系・鉄代謝系の調節メカニズムの解明と、医薬品などへの応用可能性を探った。その結果、ヘム代謝や鉄代謝を調節する化合物群が、原虫の増殖を抑制することを見出した。これは、感染症とヘム代謝系・鉄代謝系の関連についての基盤的な新知見であり、治療応用の可能性を示した成果である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：創薬・食品科学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ヘム鉄、ヘムオキシゲナーゼ、イソフラボン、ポリアミン、ヘム代謝、鉄代謝、デフェロキサミン、原虫感染症

1. 研究開始当初の背景

食品は栄養源としての他に、健康の維持・増進、疾患の予防や治療にも重要な役割を担っている。

鉄は生体に必須かつ含有量の多い金属である。鉄補充の目的で広く摂取されているヘ

ム（ヘム鉄）は、ヘモグロビン等のヘムタンパク質の補欠分子族などとして生体に必須の物質であるが、過剰の遊離ヘムはラジカル発生源で毒性が強い。過剰の遊離ヘムは、生体内で分解されて、抗体酸化物質であるビリルビンや血管弛緩物質である一酸化炭素などが産生される。すなわち、ヘム分解系は、

不要の過剰物質を廃棄するだけでなく、同時に生体防御物質・生体調節物質の産生系でもある。また、体内の大部分の鉄は再利用されているが、この鉄再利用にもヘム分解系が重要であることが報告されている。

ヘム分解酵素・ヘムオキシゲナーゼ (HO) には、誘導型の HO-1 と構成型の HO-2 がある。HO-1 は基質であるヘムや種々の刺激によって発現が誘導されるが、これは酸化ストレスなどに対する重要な生体防御反応である。代表者らは、この生体防御タンパク質 HO-1 の発現が、ヒトの細胞ではげっ歯類などとは逆に、低酸素で抑制されることなどを見出して来た (J Biol Chem, 278, 9125 (2003) など)。これは、ヒトの細胞では、生体防御機能がより必要となる低酸素下において、HO-1 の減少によって、かえって生体防御機能が低下することを意味しており、HO-1 の発現を誘導する方法を開発することは、特にヒトにおける生体防御に有用と考えられる。

代表者らは、過剰のヘムによる HO-1 の誘導という、ヘム (ヘム鉄) 代謝および生体防御反応の基本とも言える転写誘導のメカニズムを解明した (Ogawa et al., EMBO J, 20, 2835 (2001))。これは、ヘムが転写抑制因子 Bach1 に直接結合して、Bach1 の DNA 結合を阻害するという脱抑制によって HO-1 を誘導する機構であり、世界初の高等生物のヘム結合性転写因子の同定でもあった。代表者らは、この論文の中で、鉄塩はヘム (ヘム鉄) とは異なり、Bach1 の DNA 結合を阻害しないこと、すなわち、ヘム鉄と非ヘム鉄では生体分子への作用および作用メカニズムが異なることも、併せて報告した。

代表者らはまた、ヘモクロマトーシス治療薬でもある鉄キレート剤のデフェロキサミン (別名デスフェリオキサミン、商品名はデスフェラール) によって、ヒト HO-1 の発現が抑制されることなど、ヘム (ヘム鉄) 代謝と鉄代謝との関連についても新たな知見を得て、報告を行ってきた (J Biol Chem, 278, 9125 (2003))。

一方、HO-2 は、in vivo で酸素センサーとして機能していることを代表者らは見出すとともに (Biochem Biophys Res Commun, 320, 514 (2004) など)、構成型とされてきた HO-2 の発現が低酸素で抑制されることも見出した (FEBS J, 273, 3136 (2006) など)。

このように、HO を中心とするヘム分解系は、低酸素応答や酸化ストレスに対する防御など、様々な場面で生体保護や生体調節に働くため、種々の疾患の予防や治療への応用可能性が考えられる。

ヒト HO-1 には遺伝子多型があり、個体によって誘導能が異なる。HO-1 低誘導のヒトでは、肺気腫や血管疾患などのリスクが高くなることが示されている。また、虚血再還流傷

害などいくつかの病態モデル動物で、HO-1 誘導物質や HO-1 遺伝子の導入が、組織や細胞の傷害を軽減することが示されている。これらの多くは、HO-1 誘導による抗酸化物質のビリルビンの産生亢進などによるものと考えられている。

他方、HO 低誘導や HO の発現抑制がヒトや動物にとって有利に働く疾患もいくつか示されている。HO-1 低誘導のヒトはマラリアが重症化しにくいこと、HO 阻害物質が新生児黄疸の治療に有効であること、HO 阻害物質が動物に移植した癌を抑制した例などである。

HO-1 を誘導する方法として、代表者は、ポリアミンが単独でヒト HO-1 を強く誘導することを見出した (小川、特開 2005-298492)。それまで、ポリアミンに NO 分子が付加された化合物が HO-1 を誘導することが知られており、この NO 分子が HO-1 を誘導すると考えられてきた。しかし、代表者は、NO を持たないポリアミン自体が HO-1 を強く誘導することを発見したものである。

HO-1 を抑制する方法として、代表者らは、いくつかのイソフラボン誘導体が、異なるメカニズムで HO-1 の誘導を抑制することを見出している (Ogawa et al., Soy Protein Res, 7, 125 (2004))。

これらのことから、生体防御反応として重要なヘム (ヘム鉄) 代謝系や、ヘム代謝系と密接に関連している鉄代謝系の調節メカニズムの解析は、学術面でとても意義深い課題であるとともに、ヘム代謝系・鉄代謝系の発現制御・酵素活性制御は、食品成分や医薬品、化粧品などへの応用も期待できる。

2. 研究の目的

ヘム代謝系・鉄代謝系が、イソフラボンやポリアミンなどの食品成分やその他の種々の物質 (HO 阻害物質、HO 誘導物質、鉄塩、鉄キレート剤、ポリアミン代謝に影響を与える物質など) によって、どのようなメカニズムで調節されるかを解明するとともに、ヘム代謝系・鉄代謝系のを制御することで、疾患の予防や治療、健康増進などを旨とする食品成分、医薬品、化粧品などへの応用可能性を探ることが、本研究の主たる目的である。

3. 研究の方法

本欄 (研究方法) と次欄 (研究成果) では、既に発表済みの成果、およびその発表済みの成果に至った研究方法を中心に述べる。

代表者が既に HO-1 発現調節作用を見出していたイソフラボンやポリアミンをはじめとする食品成分や、ヘム代謝系・鉄代謝系や

ポリアミン代謝系に作用する化合物群などが、生体防御系にどのような影響を与えるかを、ヒト由来培養細胞を用いて解析した。

マラリア原虫感染症における致死的な重症化（脳マラリア発症）に、ヘム代謝や鉄代謝が関連しているとの報告がある。そこで、疾患の予防や治療への応用可能性を探るため、マラリア以外の原虫感染症について、詳細に検討した。

病原性腸管寄生原虫であるクリプトスポリジウムは、水などから経口感染して、集団発症も見られる。クリプトスポリジウム原虫は、小腸の絨毛上皮細胞に寄生して激しい下痢を引き起こし、免疫不全状態の患者では時に致死的である。

クリプトスポリジウム原虫の増殖抑制効果の評価には、ヒト回盲腺癌由来のHCT-8細胞に、クリプトスポリジウムのオーシストを感染させ増殖させる系で、食品成分ならびにヘム代謝・鉄代謝やポリアミン代謝に作用する物質を加えて、原虫の増殖が抑制されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

20 μ M および 40 μ M のダイゼイン、および、20 μ M のゲニステインは、原虫増殖を抑制しなかった。40 μ M のゲニステインは、増殖抑制傾向が見られたものの、その増殖抑制作用は安定したものではなかった。

ポリアミンは、代表的な食品成分の1つであるスペルミンの塩酸塩と、抗がん作用を目的として調製された誘導体の1つであるN1,N11-Diethylnorspermineの塩酸塩を用いた。スペルミンの塩酸塩は、100 μ M および 200 μ M の濃度で、原虫増殖抑制作用を示さなかったが、N1,N11-Diethylnorspermineの塩酸塩は、100 μ M および 200 μ M の濃度で、原虫増殖の抑制傾向を示した。

生体でのポリアミン代謝を阻害するDifluoromethylornithineの塩酸塩は、250 μ M および 500 μ M の濃度において、増殖抑制傾向が見られたものの、その増殖抑制作用は安定したものではなかった。

ヘム代謝に作用する物質として、ヘム（ヘム鉄、試薬名はヘミン=Fe(III)プロトポルフィリン IX・Cl）やSn(IV)メソポルフィリン IX・Cl₂を用いた。鉄補充に汎用されているヘムは、ヘム分解酵素HO-1を強く誘導してヘムの分解を促進し、抗酸化物質ビリルビンなどを生じる。Sn(IV)メソポルフィリン IX・Cl₂は、ヘム分解酵素HOの阻害物質で、ヒト新生児黄疸の治療に有用であることが報告されている。

ヘム（ヘミン）は、2 μ M および 20 μ M の濃度で、それぞれ、27%および 60%と、濃度

依存的に原虫増殖を抑制した。Sn(IV)メソポルフィリン IX・Cl₂は、2 μ M の濃度では原虫増殖を全く抑制しなかったが、20 μ M の濃度では、原虫増殖を 30%抑制した。

鉄代謝に直接影響を与える物質として、鉄欠乏性貧血の治療薬でもある鉄塩（塩化鉄（FeCl₃））や、鉄キレート剤でヘモクロマトーシス治療薬でもあるデフェロキサミンを用いた。塩化鉄は、10 μ M の濃度で原虫増殖を 48%抑制した。デフェロキサミンは、100 μ M の濃度で原虫増殖を 47%抑制した。

これらの化合物群の抗クリプトスポリジウム原虫作用について、本研究期間中の平成20年7月に特許出願し、平成22年1月に公開された（小川ら、原虫感染症の治療又は予防薬。特開2010-13408）。

ヘム代謝の個体差がマラリア重症化と関連することはこれまでに報告されているが、本研究成果は、マラリア以外の原虫であるクリプトスポリジウムについても、ヘム代謝を変化させる物質によって、原虫増殖が抑制できることを初めて示した成果である。また、鉄代謝を変化させる物質によっても、原虫増殖が抑制できることを、併せて示した。従って、原虫感染症とヘム代謝・鉄代謝との関連についての研究領域に、基盤となる新たな知見を提供する研究成果である。

今回本研究で、新たな原虫増殖抑制作用を見出したヘム（ヘム鉄、ヘミン）とSn(IV)メソポルフィリン IX・Cl₂の両化合物は、いずれも細胞内ヘム濃度を上昇させる方向に働き得るが、ヘムはHO-1誘導物質、Sn(IV)メソポルフィリン IX・Cl₂はHO活性の阻害物質という反対の性質も持つ。また、塩化鉄とデフェロキサミンは、前者は鉄濃度を上昇させ、後者は有効鉄濃度を減少させるという、反対の性質を持つ。これらの反対の性質を持つ組み合わせの化合物群が、いずれもクリプトスポリジウム原虫の増殖抑制効果を示したことは興味深い。どの性質が抑制効果に繋がったのかなど詳細なメカニズムについては未だ不明であり、今後の課題と言える。

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）

①Arai, T., Ogawa, K., Kimata, I., Iseki, M., Tokoro, M., Can iron metabolic pathways be targets for novel chemotherapy against *Cryptosporidium* spp.? The 10th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses (Aug 30-31, 2008, National Taiwan

University, Taipei)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

①小川和宏、所正治、荒井朋子. 原虫感染症の治療又は予防薬. 特開 2010-13408 (出願日:平成20年7月4日、公開日:平成22年1月21日) (国内)

[その他] (計2件)

①小川和宏, 感染症の治療薬および生体防御活性化薬・食品. JST イノベーションブリッジCIC東京研究発表会 (2008年11月18日, キャンパスイノベーションセンター東京, 東京)

②小川和宏, 大豆イソフラボンの有効性と安全性を考える. 金沢大学サテライトプラザミニ講演記録, 7(12), 全頁 (2007)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 和宏 (OGAWA KAZUHIRO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 30344659

(2)研究分担者

(3)連携研究者