

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：47407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02329

研究課題名(和文) 摂取した食品成分や誘導体等による腸管細胞の活性酸素産生系活性修飾の分子機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanisms of the effects of ingested phytochemicals on the reactive oxygen species-generating system of cells in the intestinal tract

研究代表者

菊池 秀彦(Kikuchi, Hidehiko)

尚綱大学短期大学部・その他部局等・教授

研究者番号：10301384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管に存在する細胞の活性酸素産生系として、本研究課題では主としてマクロファージのNox2(gp91-phox)に着目して研究を進めた。レチノイン酸でU937細胞(ヒト単芽球様株細胞)を処理するとマクロファージ様細胞へと分化するが、この際活性酸素産生能が惹起される。この系に種々のフィトケミカルを添加して、これらが活性酸素産生能に及ぼす影響を調べた。その結果、カルコン類、スルフォラファン、ウロリチンA、3',4'-ジヒドロキシフラボンやL-テアニンがgp91-phoxの遺伝子発現を増強することによって、白血球の活性酸素産生能を惹起して自然免疫を活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品に含まれる植物性生理活性物質(フィトケミカル)は多彩な生物活性を有し、疾病の予防や治療を通じて人間の健康維持に寄与することが期待されている。本研究では、食品成分と直接接する機会が多い消化管の中で活性酸素産生能を有する腸管細胞、特にマクロファージに着目して、フィトケミカルがマクロファージの活性酸素産生能に及ぼす影響を解析した。その結果、カルコン類、スルフォラファン、ウロリチンA、3',4'-ジヒドロキシフラボンやL-テアニンがマクロファージの活性酸素産生能を亢進することが明らかとなった。これらの研究成果は、上記フィトケミカルが免疫力(自然免疫)を増強する可能性を強く示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, I mainly focused on the macrophage Nox2(gp91-phox) as a superoxide-generating system of cells in the intestinal tract. Retinoic acid induces differentiation of human monoblast U937 cells to macrophage-like cells, which induces superoxide-generating ability. To know the effects of phytochemicals on the retinoic acid-induced superoxide-generating ability, U937 cells were grown with retinoic acid in the presence or absence of various phytochemicals. As a result, chalcones, sulforaphane, urolithin A, 3',4'-dihydroxyflavones and L-theanine enhanced the gene expression of gp91-phox, resulting in up-regulation of the retinoic acid-induced superoxide-generating ability of U937 cells. These data suggested that these phytochemicals can bring about enhancement of the superoxide-generating ability of leukocytes, resulting in up-regulation of innate immune response.

研究分野：生化学 分子栄養学

キーワード：フィトケミカル 腸管細胞 マクロファージ 活性酸素 自然免疫 Nox2 ウロリチンA L-テアニン

#### 1. 研究開始当初の背景

フィトケミカルは植物に含まれる低分子有機化合物であり、多彩な生物学的機能を有する。我々は植物性食品を食することによりフィトケミカルを摂取しているが、これらはヒトの細胞にも大きな影響を及ぼすことが知られる。近年、特にフィトケミカル類は食品機能や薬理学的機能の観点からも注目されており、世界中で活発な研究が為されている。しかし、フィトケミカルがヒト体内における活性酸素産生系に及ぼす影響については、これまで散発的な研究報告はあったが、体系的に行われた研究は皆無であった。

#### 2. 研究の目的

本研究課題では、食品成分と直接接触し得る腸管に存在する白血球の一種であるマクロファージの活性酸素産生能にフィトケミカルが及ぼす影響について網羅的に解析して、データの集積および分子機構の解明を行うことを主な目的とした。得られた研究結果は、免疫賦活剤や免疫抑制剤、白血病治療薬及び抗がん剤開発等に有益な情報として活用されることが期待できる。

#### 3. 研究の方法

フィトケミカルの活性酸素産生系への影響の解析には、ヒト単芽球用株細胞 U937 の *in vitro* differentiation system を利用した。U937 細胞はビタミン A の一種である all-*trans* retinoic acid によってマクロファージ様細胞へと分化する。この際に、活性酸素 (スーパーオキシド) 産生能も誘導される。マクロファージの活性酸素産生系は、食細胞や B 細胞に存在する Nox2 であるが、この系には 5 つのタンパク質因子 (p22-phox, gp91-phox, p40-phox, p47-phox 及び p67-phox) が関与する。本研究では、U937 細胞をレチノイン酸で分化誘導する際に、培地中に種々のフィトケミカルを添加することによりもたらされる活性酸素産生能への影響及びその分子機構を解析した。

活性酸素 (スーパーオキシド) の産生はルミノメーターで測定し、活性酸素産生系を構成するタンパク質因子 (p22-phox, gp91-phox, p40-phox, p47-phox 及び p67-phox) の発現は、mRNA 量を半定量性 RT-PCR 法、タンパク質量をイムノブロット法でそれぞれ解析した。さらに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) により、gp91-phox 遺伝子 (上述の活性酸素産生系を構成するタンパク質因子の遺伝子の中で、フィトケミカルによって最も大きな影響を受けた遺伝子) のプロモーター領域のヒストンアセチル化を解析し、フィトケミカルによる遺伝子発現への影響を明らかにした。

また、フィトケミカルが細胞増殖に及ぼす影響やそれらの細胞障害活性についても調査した。細胞増殖への影響の評価はヘモサイトメーターを用いた細胞数の計測で、細胞障害活性の評価はトリパンブルーを用いた dye exclusion 法でそれぞれ行なった。

#### 4. 研究成果

調査した約 100 種のフィトケミカルのうち、カルコン類 (ブテイン、イソリキリチゲニン)、スルフォラファン、ウロリチン A、3',4'-ジヒドロキシフラボンや L-テアニンに強い活性酸素産生能増強効果が認められた。これらのフィトケミカルのうち、スルフォラファン以外はどれも活性酸素産生系の key factor である gp91-phox (Nox2) の遺伝子発現を増強することによって活性産生能を惹起していることが明らかとなった。スルフォラファンは p47-phox と p67-phox のタンパク質量を増強していた。ChIP アッセイの結果、ブテイン、イソリキリチゲニン、ウロリチン A 及び L-テアニンは gp91-phox 遺伝子のプロモーター領域周辺のヒストン H3 の Lys-9 及び Lys-14 残基のアセチル化の亢進をもたらしていることも示された。以上から、ブテイン、イソリキリチゲニン、ウロリチン A、3',4'-ジヒドロキシフラボン及び L-テアニンは gp91-phox 遺伝子の発現を亢進することにより、活性酸素産生能を増強する効果を示すことが明らかとなった。逆に、ブテインやイソリキリチゲニン以外のカルコン類、エラグ酸や 3',4'-ジヒドロキシフラボン以外のヒドロキシフラボン類は U937 細胞のレチノイン酸誘導性活性酸素産生能を低下させることも明らかとなった。また、エクオール (ダイゼインの腸内細菌による代謝産物) が末梢血由来好中球には全く毒性を示さない一方で、白血病細胞にのみ強い細胞障害活性を有することも明らかにした。加えて、緒に就いたばかりではあるが、大腸上皮細胞の活性酸素産生系 Nox1 の活性にもある種のフィトケミカルが影響を及ぼすことを示すデータも得られている。

本研究課題で得られたデータは、フィトケミカル類がマクロファージの活性酸素産生能に及ぼす影響について、世界で初めて体系的に行われた研究成果である。当初予想していたよりも、フィトケミカルの種類によって多種多様なマクロファージ活性酸素産生系への修飾効果が示された。特に、腸管内で腸内細菌によってエラグ酸及びダイゼインからそれぞれ合成されるウロリチン A 及びエクオールは元の分子とはその作用が劇的に変化していた。エラグ酸は U937 細胞のレチノイン酸誘導性活性酸素産生能を阻害する一方、その腸内細菌代謝産物ウロリチン A は逆にこれを増強する。また、ダイゼインは U937 細胞に対して細胞毒性を殆ど示さないが、

その腸内細菌代謝産物エクオールは強い細胞障害活性を示した。これらの研究結果は、フィトケミカルが腸内細菌の代謝を受けることによって、全く異なった生理活性を示す物質に変換されることを明らかにした画期的な研究成果である。今後、その分子機構も含めてより深い解析が必要になる。そして、これらの結果はフィトケミカルの有効利用に大いに貢献することが期待できる。例えば、活性酸素産生能を増強するフィトケミカルは免疫賦活剤や白血病治療薬などへの応用が、逆に活性酸素産生能を阻害するフィトケミカルは抗炎症剤などへの活用が想定できる。また、エクオールは白血病細胞に特異的かつ強力な細胞障害活性（末梢血好中球への毒性は認められなかった）を有することから、白血病治療薬としての可能性が示唆された。加えて、上述のように、大腸上皮細胞の活性酸素産生系 Nox1 の活性にもある種のフィトケミカルが影響を及ぼすことを示すデータも得られているので、今後は大腸上皮細胞 Nox1 を標的とした研究を推進する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Sumiko Akiyoshi, Harishkumar Madhyastha, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 8
2. 論文標題 3', 4'-Dihydroxyflavone enhances all-trans retinoic acid-induced superoxide-generating activity through up-regulating transcription of gp91-phox in human monoblastic U937 cells, as opposed to flavone and other hydroxyflavone derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental and Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Sumiko Akiyoshi, Takefumi Sagara, Harishkumar Madhyastha, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential role of green tea amino acid L-theanine in activation of innate immune response via enhancing expression of cytochrome b 558 responsible for the reactive oxygen species-generating ability of leukocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Chikage Kawai, Harishkumar Madhyastha, Akira Yamauchi, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Retinoic acid dramatically enhances cytotoxicity of equol against human monoblastic U937 cells, but not against human peripheral neutrophils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 201-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.7.201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Kaori Harata, Harishkumar Madhyastha, Futoshi Kuribayashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Ellagic acid and its fermentative derivative urolithin A show reverse effects on the gp91-phox gene expression, resulting in opposite alterations in all-trans retinoic acid-induced superoxide generating activity of U937 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aya Shibata, Kaori Harata, Yuko Moriguchi, Risako Kanegawa, Ayaka Nagahira, Misaki Shigematsu, Yuri Takamura, Haruno Watanabe, Takefumi Sagara, Harishkumar Madhyastha, Hidehiko Kikuchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Production and evaluation of the authentic milk bread using a lactose-utilizing yeast, <i>Kluyveromyces marxianus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Topics in Biotechnology	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidehiko Kikuchi, Yumi Nakagawa, Yui Hirayama, Kaori Harata	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptional profiles of histone acetyltransferases in human monoblast U937 cells treated with all-trans retinoic acid or 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Association of Food Science Education in Japan	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aya Shibata, Sayaka Ichihara, Miwa Kubota, Aimi Sakata, Ayaka Shibata, Yuko Moriguchi, Kaori Harata, Takefumi Sagara, Hidehiko Kikuchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Possibility for nutritional improvement of the "authentic milk bread" by increasing the amount of milk added	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Association of Food Science Education in Japan	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Hidehiko, Mimuro Hitomi, Madhyastha Harishkumar, Kuribayashi Futoshi	4. 巻 63
2. 論文標題 Chalcone skeleton promotes transcription of gp91-phox gene but inhibits expression of gp91-phox protein, and hydroxyl groups in hydroxychalcones participate in the stable expression of gp91-phox protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 438-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyoshi Sumiko, Kikuchi Hidehiko, Kuribayashi Futoshi, Madhyastha Harishkumar, Minami Hisanori	4. 巻 6
2. 論文標題 Sulforaphane displays the growth inhibition, cytotoxicity and enhancement of retinoic acid-induced superoxide-generating activity in human monoblastic U937 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 319-325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.6.319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiyoshi Sumiko, Kikuchi Hidehiko, Minami Hisanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Sulforaphane shows remarkable growth inhibition and cytotoxicity against several human leukemia cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Association of Food Science Education in Japan	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuruta Chigusa, Mimura Akari, Harata Kaori, Kikuchi Hidehiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Sulforaphane shows growth inhibitory effects against Escherichia coli and Bacillus subtilis via reactive oxygen species production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Association of Food Science Education in Japan	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Hidehiko, Kuribayashi Futoshi, Nakayama Masami, Nakayama Tatso	4. 巻 20
2. 論文標題 Functions of B cell development-related transcription factors systematically revealed in immature B cells by gene targeting techniques using chicken DT40 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Topics in Biochemical Research	6. 最初と最後の頁 43-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菊池秀彦、栗林太
2. 発表標題 ヒドロキシカルコンの水酸基の数と位置がヒト白血病細胞U937に対する細胞毒性を決定する。
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年回
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 パン、パン生地およびパンの製造方法	発明者 菊池秀彦、相良剛史、原田香、柴田文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-099640	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

KIKUCHI LAB. <a href="https://kikuchi-biolchem.jimdofree.com/">https://kikuchi-biolchem.jimdofree.com/</a> kikuchi-biolchem <a href="https://kikuchi-biolchem.jimdofree.com">https://kikuchi-biolchem.jimdofree.com</a>
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------