

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K14013

研究課題名(和文)クレソンに含まれる抗炎症効果を示す機能性成分とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of functional materials in watercress and their mechanisms of anti-inflammatory activity

研究代表者

中屋 慎(Nakaya, Makoto)

大阪府立大学・研究推進機構・客員研究員

研究者番号：90736886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉菜類であるクレソン(*Nasturtium officinale*)はフェネチルイソチオシアネート(PE-ITC)や1,3-ジフェネチルウレア(PE-UR)を含有している。マウスを用いた動物実験から、これらの物質を摂食した場合、体内で脂質メディエーターの調節に関わる可溶性エポキシヒドロラーゼを阻害することにより、抗炎症効果を発揮することがわかった。また、炎症との関わりが指摘されている腸内菌叢を調べたところ、PE-ITCは菌叢を著しく劣化させるが、PE-URはクレソン粉末と同じく悪影響を与えないことがわかった。以上より、クレソンが示す抗炎症効果の主たる機能性成分はPE-URであると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クレソンはヨーロッパにおいて伝統的に健康増進目的で食されているものの、抗炎症効果を齎す機能性成分とその作用機序に科学的根拠が付与されていない。一般にアブラナ科植物の機能性はイソチオシアネート類に寄るとされるが、本研究から明らかのように、強い殺菌効果による腸内菌叢への悪影響など抗炎症効果の主因とするには説明できない部分が多い。我々はPE-URが抗炎症効果の主因であることを示唆する知見を得たが、この成果は機能性食品学の発展に貢献する。また、明確な科学的根拠を添えて、食品がもつ健康増進効果を示すことにより、伝統的な食品の価値を改めて社会に発信することができる。これは食と農を豊かにする一助となる。

研究成果の概要(英文)：Watercress (*Nasturtium officinale*) is a traditional food plant in Europe that has beneficial effects for human health and is becoming popular in Japan as a healthy vegetable. We found that phenethyl isothiocyanate (PE-ITC) and 1,3-diphenethylurea (PE-UR) in watercress have human soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitory activity and anti-inflammatory effects in mice. sEH is located in the CYP pathway and plays an important role in regulating inflammation. Eicosanoids derived from arachidonic acid had anti-inflammatory effects through not only the CYP pathway but also the COX and LOX pathways in PE-UR-fed mice. We also found that PE-ITC causes damage to gut microbiota in mice but PE-UR does not. PE-ITC is probably not good as an anti-inflammatory, considering that many studies have linked the gut microbiota to suppressing inflammation. We suspect that PE-UR is the main functional material contributing to the beneficial effects of watercress.

研究分野：機能性食品学

キーワード：クレソン ジフェネチルウレア 脂質メディエーター 可溶性エポキシヒドロラーゼ阻害 機能性成分
抗炎症作用 イソチオシアネート

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

クレソンはヨーロッパ原産のアブラナ科植物である(図1)。日本では香味野菜として肉料理の付け合わせなどとして少量食されるのが一般的だが、ヨーロッパでは伝統的に健康増進目的で食されている。



- *Nasturtium officinale*
- アブラナ科オランダガラシ属
- ヨーロッパ原産
- 健康増進効果を持つとして伝統的に食されてきた
- 効能例：ニキビ、高血圧、皮膚炎、脱毛, etc.

細胞レベルの炎症を抑制しているのでは？

図1. クレソンの外観と概要

Guarreraらが報告したイタリアにおける伝統的な食用植物の健康増進効果に関する総説では、クレソンは皮膚炎の緩和など13項目の効能が挙げられている¹⁾。しかし、現在の栄養学・食品学的観点からこれらの効能を説明することはできず、有効にクレソンを活用するために必要な科学的根拠が乏しい。我々は、効能があるとされる疾病の多くは細胞レベルでの炎症反応であることに注目し、クレソンに含まれる機能性成分が細胞の炎症を抑制することで様々な効能が表れると仮説を立てた。炎症の作用機序として、n-6系脂肪酸であるリノール酸やアラキドン酸から生成されるエイコサノイドによる制御が知られている(図2)²⁾。特に、可溶性エポキシドヒドロラーゼ(sEH)の基質となるエイコサトリエノイックアシッド類(EETs)は炎症を抑制し、代謝物であるデヒドロエイコサトリエノイックアシッド類(DHETs)は炎症を抑制することから、本研究ではクレソンに含まれるsEHの阻害物質に着目し、その作用と作用機序の解明を行った。

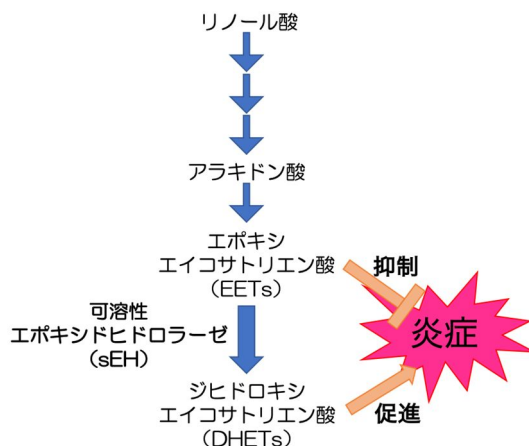


図2. 炎症を抑制するエイコサノイドEETsはsEHにより炎症を促進するDHETsへと代謝される

2. 研究の目的

クレソンなどのアブラナ科植物は二次代謝産物としてグルコシノレート(GL)をもつ(図3)。細胞が破壊されると、GLはミロシナーゼによる分解を受けイソチオシアネート(ITC)となる。ITCは辛味成分や香気成分として知られるだけでなく、抗菌作用や抗腫瘍活性をもつとして知られているが、揮発性が高く不安定であり、水が存在すると速やかにイソシアネート(IC)に構造変化する³⁾。一方、生体内における合成経路は不明であるが、ITCと同じ置換基をもつウレア(UR)の存在が示唆されている⁴⁾。

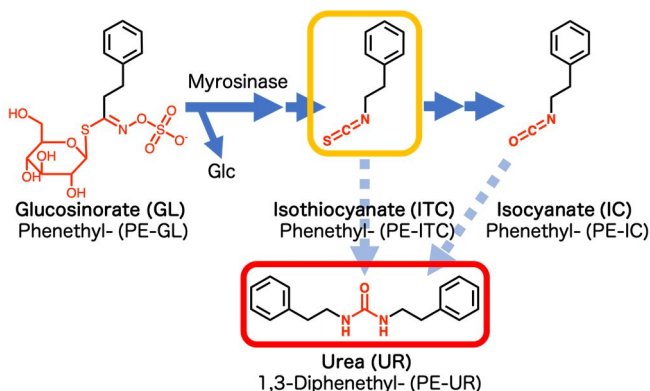


図3. アブラナ科植物に特徴的な物質であるグルコシノレート(GL)とその代謝物イソチオシアネート(ITC)、イソシアネート(IC)および同じ置換基をもつウレア(UR)

これまでに我々は、クレソンには置換基としてフェネチル基をもつ PE-ITC が 33 $\mu\text{mol/g}$ dry weight 含まれるだけでなく、PE-UR が 12 nmol/g dry weight 含まれることを明らかにしている。さらに、これらの物質はヒトの sEH を阻害し、特に PE-UR は PE-ITC に比べ 10 倍程度 sEH 阻害活性が強いことを確認している。また、ラットに対する単回投与実験から、PE-ITC、PE-UR 共に消化管から血液中に吸収されることを確認している。本研究では、これらのことからクレソンに含まれる PE-ITC および PE-UR は sEH を阻害することにより抗炎症作用をもたらすと仮説を立て、クレソンの抗炎症作用に関与する機能性成分とその作用機序を解明することを目的とした研究を行った。

3. 研究の方法

これまでの研究から、クレソンに PE-ITC および PE-UR が含まれること、これらの物質が sEH 阻害活性を示すこと、および体内に吸収されることがわかっている。そこで、病態マウスを用いた動物実験を行い、血清中に含まれる脂質メディエーター130種を網羅的に解析した。脂質メディエーターは細胞間の情報伝達に関与する脂質分子であり、特に、炎症反応にはアラキドン酸から生成されるエイコサノイドが関与することが知られている²⁾。そこで、PE-ITC や PE-UR を摂取したマウスの血中脂質メディエーターを HPLC-MS² 法により解析し、これまでの *in vitro* で確認された sEH 阻害活性の生体内での発現の有無に加えて、他の炎症反応に関与する経路における変化を調べた。また、抗炎症作用と腸内菌叢との関連が指摘されていることから⁵⁾、盲腸内容物を用いて菌叢解析および短鎖脂肪酸分析を行い、PE-ITC および PE-UR が腸内菌叢に与える影響を調べた。

4. 研究成果

PE-ITC、PE-UR をそれぞれ摂取させたマウスでは、これらを摂取させなかった対照群と比較して、11、12-EET など sEH の基質となる EETs が増加し、11、12-DHET などの生成物である DHETs が減少傾向にあった(図4)。これらの結果より、PE-ITC および PE-UR がもつ sEH 阻害活性は摂食によって生体内で発現すると考得ている。

アラキドン酸から生成する炎症に関与するエイコサノイドには、sEH が存在するシトクローム P450 (CYP) 経路の他にシクロオキシゲナーゼ (COX) 経路、リポキシゲナーゼ (LOX) 経路と呼ばれる2つの経路が存在する。興味深いことに、クレソンや PE-UR を摂取した群ではプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、9-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(9-HETE)など炎症促進的に働く脂質メディエーター量が減少傾向にあった(図4)。この結果は、PE-ITC とは異なり、PE-UR の抗炎症効果には、CYP 経路の sEH に

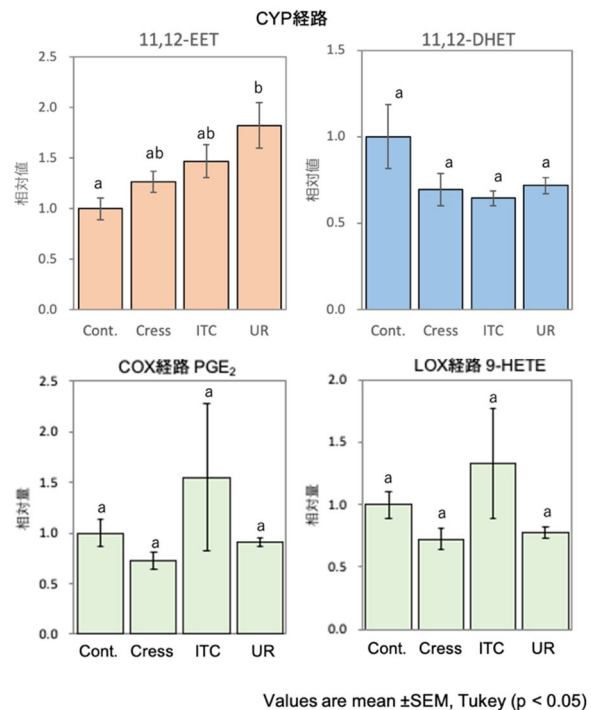


図4. マウス血清に含まれる炎症反応の制御に関与する脂質メディエーター量

11、12-EET は炎症抑制に、11、12-DHET、PEG2 および 9-HETE は炎症促進に関与する

対する阻害に加えて、COX 経路や LOX 経路が関与する抗炎症メカニズムが存在することを示唆する（図 5）。

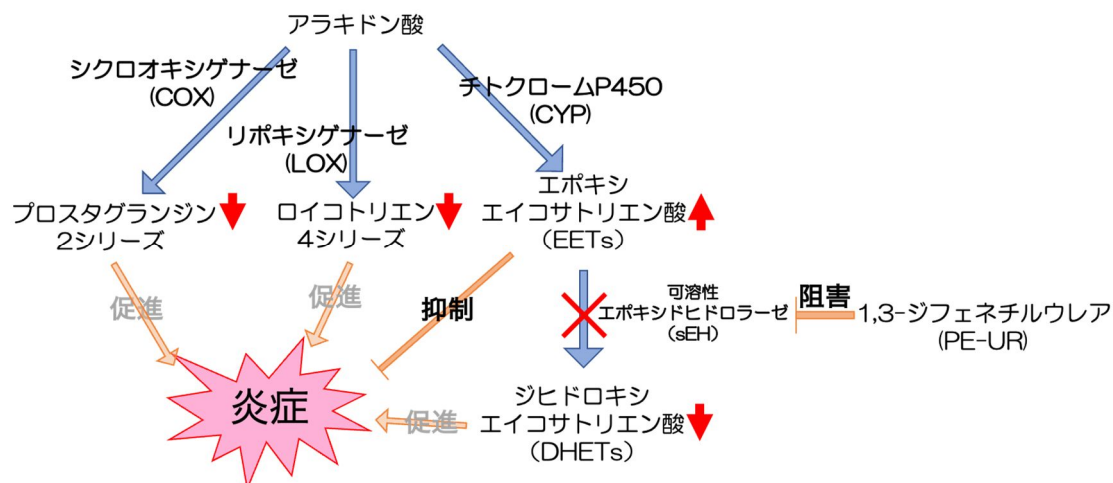


図 5.脂質メディエーター解析から明らかとなった PE-UR の抗炎症作用機序

赤矢印：PE-UR 摂取による量的変化

腸内環境は抗炎症効果との関連が指摘されていることから⁵⁾、特に腸内細菌叢に着目し解析を行った。マウス盲腸内容物に存在する細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした Real Time-PCR を行い菌組成を調べたところ、PE-ITC、PE-UR はそれぞれ腸内細菌叢に影響を与えることがわかった。特に PE-ITC を摂取した場合の菌組成は他群に比べ大きく変化していた。さらに、腸内環境の良好な維持に資する短鎖脂肪酸を定量し組成を調べたところ、やはり PE-ITC を摂取した場合に他群と大きく異なることがわかった。PE-ITC を摂取した場合盲腸内容物重量が他群に比べ減少することが解剖所見から示されている点を合わせ、PE-ITC は抗炎症効果を有するが同時に殺菌効果も有しており、結果として腸内環境が大きく変化したものと考察している。より詳細な検証が必要であるものの、腸内環境に関する先行研究を参考にすると、PE-ITC がもたらす変化は健康増進には好ましくない可能性がある。一方、PE-UR は、クレソン乾燥粉末を摂取した場合と比較して菌組成および短鎖脂肪酸組成に有意な差は認められなかったことから、PE-ITC のような殺菌効果はなく抗炎症効果による健康増進効果が期待できる機能性成分であると考えている。

以上のように、クレソンは PE-ITC や PE-UR を含有しており、これらの物質を摂取した場合、sEH を阻害することにより抗炎症効果を発揮することがマウスを用いた動物実験から示唆された。また、炎症との関わりが指摘されている腸内細菌叢を調べたところ、PE-ITC は菌叢を著しく劣化させるが、PE-UR は悪影響を与えないことがわかった。現在、我々はクレソンが示す抗炎症効果の主たる機能性成分は PE-UR であると考え、培養細胞を用いた検証を進めている。

本研究は、「抗炎症作用を持つ野菜」について明確な学術的根拠を示すものである。これまでの学術的解釈ではアブラナ科植物の機能性成分として ITC のみが知られていたが、本研究により微量成分である UR の機能性について新たな知見が得られた。クレソンだけでなく他の食用アブラナ科植物にも UR が含まれる可能性が高いため機能性成分を再評価する必要がある、新たな学術領域創出に貢献できたと自負している。また、本研究成果は抗炎症作用を意図したクレソンの活用促進に貢献するもので、食による国民の健康増進に役立つだけでなく、クレソンの市場価値上昇に資する。また、本研究遂行のために副次的に発明した効率的クレソン栽培法は「クレソンの栽培方法」(特願 2021-46637)として出願しており、今後のクレソンの普及、特に農業に大きく貢献するものである。

参考文献

- 1) P. M. Guarrera, V. Savo, (2013) *J. Ethnopharmacology*, 146, 659-680.
- 2) J. D. Noia, (2014) *Preventing Chronic Disease*, 11, E95.
- 3) Y. J. Kim, *et al.* (2015) *PLOS ONE*, 10 (8) e0132151.
- 4) Kitamura S. *et al.* (2017) *PLOS ONE*. 12 (5) e0176571.
- 5) J. M. Blander, *et al.* (2017) *Nat. Immunol.* 19, 18(8), 851-860.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Nakaya, Y. Sakuragi, A. Shoji, S. Mizuno, N. Fujiwara, S. Kitamura
2. 発表標題 Analysis of health effects of Ureas in Watercress
3. 学会等名 11TH KYOTO INTERNATIONAL FORUM FOR ENVIRONMENT AND ENERGY (KIFEE-11) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中屋 慎, 庄條 愛子, 水野 淨子, 藤原 永年, 北村 進一
2. 発表標題 クレソンに含まれるウレア化合物の機能性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中屋 慎, 中上 拓海, 濱野 未宇, 藤原 永年, 庄條 愛子, 北村 進一
2. 発表標題 クレソンに含まれるウレア化合物の摂取がマウス血中エイコサノイドに与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 クレソンの栽培方法	発明者 村上 智洋, 中屋 慎	権利者 北大阪農業協同組合
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-46637	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究協力者	北村 進一 (Kitamura Shinichi)		
研究協力者	藤原 永年 (Fujiwara Nagatoshi)		
研究協力者	金子 幸弘 (Kaneko Yukihiro)		
研究協力者	庄條 愛子 (Shojo Aiko)		
研究協力者	水野 浄子 (Mizuno Seiko)		

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