

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32415

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15778

研究課題名(和文)ポリメトキシフラボノイドの物性-吸収-代謝-活性の相互関連解析

研究課題名(英文) A study of the relationship between physical properties and absorption, metabolism, and activity of polymethoxyflavonoids.

研究代表者

渡辺 章夫 (WATANABE, Akio)

十文字学園女子大学・人間生活学部・講師

研究者番号：80630847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ポリメトキシフラボノイドのメトキシ基の付く位置と数の違いが吸収、代謝、生理活性の発現に与える影響を明らかにすることである。代表者は73種類のポリメトキシフラボノイドを入手し、培養細胞株、実験動物を用いて吸収性と生理活性に関する構造相関解析を実施した。その結果、A環の5位と7位にメトキシ基を有し、C環の3位、B環の3'位と4'位にメトキシを有するポリメトキシフラボノイドがin vivoとin vitroの両方において吸収性と生理活性が促進されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

73種類のポリメトキシフラボノイドを使用したCaco-2細胞における吸収試験とその一部を使用したICRマウスにおける吸収試験を実施したところ良好な相関が確認された。しかし、生理活性が非常に高いが、吸収効率が非常に悪い化合物もあり、強い生理活性作用を持つ化合物が、高吸収であるとは限らないことが示された。またその逆のパターンも確認された。本研究課題ではポリメトキシフラボノイドの生理作用と吸収動態における構造相関の一部を明らかにし、機能性食品への開発に非常に重要な知見を得ることができた。今後、より詳細にポリメトキシフラボノイドの吸収と代謝のメカニズムを明らかにしていく必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the effects of varying the positions and numbers of the methoxy groups of flavonoids on absorption, metabolism, and bioactivity. We performed structural correlation analysis on absorbability and bioactivity of 73 types of polymethoxyflavonoids using cultured cell lines and animal models. Results demonstrated that polymethoxyflavonoids having methoxy groups at the 5 and 7 positions of the A ring, at the 3 and 3' positions of the B ring, and at the 3' and 4' positions of the B ring tended to enhance absorbability and bioavailability both in vivo and in vitro.

研究分野：食品分析学

キーワード：メトキシフラボノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポリメトキシフラボノイドは複数のフェノール性水酸基がメトキシ基に置換されたフラボノイドであり、代表的なポリメトキシフラボノイドであるノビレチンは、フラボン骨格のA環の5, 6, 7, 8位およびB環の3', 4'位に合計6つのメトキシ基を持つ化合物であり、抗炎症、抗肥満、抗皮膚老化、記憶障害改善、体内時計調節、抗アレルギーなど多様な生理活性が報告されている。このような生理活性作用が発揮されるメカニズムを明らかにするためには、生体内における代謝、吸収などの体内動態を詳細に調べる必要がある。フラボノイドでは、ヒドロキシ基、アルキル基、メトキシ基、プレニル基などの置換基の種類や付く位置などの分子構造が吸収と代謝に重要な役割を果たすことが報告されている。また近年の研究で、ポリメトキシフラボノイドは他のフラボノイドと比較して、体内吸収に優れていることが明らかとなってきた。ノビレチンなど一部のポリメトキシフラボノイドは、既に機能性表示食品の関与成分となっており、生体における安全性や科学的根拠を評価する上でも、吸収、代謝、組織への移送から排泄に至る体内動態における過程を考慮した網羅的な研究が求められている。

2. 研究の目的

複数のメトキシ基を持つポリメトキシフラボノイドは様々な生理活性が報告されており、その作用が発揮されるメカニズムを明らかにするためには、生体内における代謝、吸収などの体内動態を明らかにすることが非常に重要である。そこで、本研究ではポリメトキシフラボノイドの物性-吸収-代謝-活性は、メトキシ基の付く“位置”や“数”の違いによって異なることを明らかにし、ポリメトキシフラボノイドの生理作用発現と構造活性相関の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、メトキシ基の付く“位置”や“数”の違いが吸収、代謝、体内動態に及ぼす影響を網羅的に明らかにするために、メトキシ基の付く“位置”や“数”の違う様々なポリメトキシフラボノイドを購入または天然物から精製することにより73種類を収集し、下記の3つの課題を実施した。

(1) 様々なポリメトキシフラボノイドの腸管吸収モデル系を用いた吸収動態の解析

様々なポリメトキシフラボノイドのヒト腸管上皮細胞における経時的な腸管透過率や腸管細胞内代謝産物を解析するために、経時的な化合物濃度をHPLCにより定量し、in vitro条件における構造特異的な吸収動態を検討した。具体的にはヒト結腸癌由来Caco-2細胞をトランスウェルに播種し、単層膜に分化させ、50 μMに希釈したサンプルをトランスウェル側(管腔側)に添加し、2時間、4時間後に採取し、HPLC(Waters ACQUITY UPLC)で管腔側および基底膜側の定量分析を行った。カラムはInertsil ODS-3 4.6×150 mm 5 μm、移動相は水:アセトニトリル=6:4、または1%酢酸:アセトニトリル=5:5、測定波長330 nm、流速1.0 ml/min、カラム温度40 °Cの条件で定量分析を行った。

(2) 様々なポリメトキシフラボノイドの培養細胞系を用いた生理活性の解析

様々なポリメトキシフラボノイドの生理活性発現を検討するために、マクロファージ由来RAW264.7細胞におけるLPS炎症誘導評価試験(NO産生量を指標)を用いて、in vitro条件における生理活性と構造特異的な活性相関を検討した。まずRAW264.7細胞をLPSおよびサンプルを添加し、24時間培養した後、上清を分取した。次に、分取した上清に同等量のGriess試薬を添加し、室温で20分静置し、吸光度(540 nm)を測定した。

(3) 高吸収・高機能ポリメトキシフラボノイドの動物実験モデル系を用いた吸収動態の解析

実験動物における構造特異的な活性相関を生体レベルで検証するために、10週齢の雄ICRマウス(日本SLC株式会社)にサンプルを経口投与し15分、45分、120分後に、ランセットを用いて頬から採血した。1,200 rpmで15分遠心し、血漿を分注し、速やかに-80 °Cで保存した。後日、血漿20 μLに内部標準として10 ppmフラボンを含むアセトニトリルを100 μL加え、ボルテックスを用いてよく混合させ、1,200 gで10分間遠心した。上清を分注し、沈殿にメタノール300 μL加え、再びボルテックスでよく混合し、4,000 gで10分間遠心した。遠心後の上清を先ほど分注した上清に加え、遠心エバポレーターを用いて乾固し、メタノール200 μLを加え、フィルター濾過(0.45 μm)をし、HPLCを用いて上記と同じ条件で定量を行った。全ての動物実験は中部大学の実験動物倫理委員会の承認を得た上でガイドラインに従って実施した。

4. 研究成果

(1) 様々なポリメトキシフラボノイドの腸管吸収モデル系を用いた吸収動態の解析

ポリメトキシフラボノイドの構造による吸収効率の違いを確認するために、Caco-2細胞を用いて73種類のポリメトキシフラボノイドの腸管吸収試験を行った。全て50 μMのサンプルを使

用した。その結果、A環とB環のメトキシ基の数が同じであり、3位にメトキシ基を持ち、7位にメトキシ基を持つ場合はA環とB環にそれぞれ2つ以上のメトキシ基を持つ化合物が、吸収効率が良いことが示唆された。一方で、メトキシ基がB環の2'位、4'位のみが付く場合、吸収効率が悪くなる傾向が示唆された。B環の3'位、4'位にメトキシ基を有する場合は、吸収効率が上昇する傾向が示唆された。ただし、メトキシ基を3'位、4'位に有する場合でも、メトキシ基を7位に有すると吸収効率は悪くなる傾向が示唆された。しかしメトキシ基を3'位、4'位、7位に有する場合でも、3位にメトキシ基を持つか、A環とB環のメトキシ基の数が同じ場合、吸収効率は良くなる傾向が示唆された。ただし、メトキシ基がB環に3'位、4'位のみの場合には吸収効率が悪くなることが示唆された。B環に3'位、4'位のみメトキシ基を有する場合、A環とC環に5位と7位と含む3つ以上のメトキシ基を有すると、吸収効率は良くなることが示唆された。

つまり、吸収性に関する構造相関解析を実施した結果、A環の5位と7位にメトキシ基を有し、C環の3位、B環の3'位と4'位にメトキシ基を有するポリメトキシフラボノイドの吸収性が促進される傾向があることが明らかとなった。黒ショウガ由来の3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavoneなどが該当する。

(2) 様々なポリメトキシフラボノイドの培養細胞モデル系を用いた生理活性の解析

ポリメトキシフラボノイドの抗炎症作用の構造活性相関を見るために、炎症性因子であるLPSによって誘導されるNO産生に対する73種類のポリメトキシフラボノイドの作用について、RAW264.7細胞を用いて試験を行った。コントロールを100%とし、3回行い平均値を出すことで73種類のポリメトキシフラボノイドのNO産生抑制効果を比較した。コントロールと比較し、ほとんどのポリメトキシフラボノイドでNO産生抑制傾向が見られた。C環にメトキシ基を持たず、A環に5位と7位のみメトキシ基を有し、B環にメトキシ基を持つ場合、3'位と4'位のいずれか、または両方に有するとNO産生抑制効果が高くなることが示唆された。また、3'位または4'位にメトキシ基を持ち、A環にメトキシ基を持たないとNO産生抑制効果が高くなると示唆された。C環にメトキシ基を持たず、3'位、4'位、5'位にメトキシ基を持ち、A環にメトキシ基を持つ場合5位と7位にメトキシ基を持つとNO産生抑制効果が高くなることが示唆された。

(3) 高吸収・高機能なポリメトキシフラボノイドの動物実験モデル系を用いた吸収動態の解析

ポリメトキシフラボノイドの動物での吸収効率を評価するために、ノビレチン、タンゲレチン、シネンセチン、黒ショウガから単離した3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone、5,7-dimethoxyflavone、5,7,4'-trimethoxyflavone、3,5,7,4'-tetramethoxyflavone、比較対象としてケルセチンを用いてICRマウスを用いた吸収試験を行った。メトキシ基を持たないケルセチンはほとんど吸収されなかったのに対し、ポリメトキシフラボノイドは血漿中の化合物量の吸収効率が高かった。ノビレチン、タンゲレチン、ケルセチン、3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone、5,7-dimethoxyflavone、5,7,4'-trimethoxyflavone、3,5,7,4'-tetramethoxyflavoneは投与後15分で極大吸収が見られたが、シネンセチンは投与後120分で極大吸収が見られた。その中でも3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavoneは他のポリメトキシフラボノイドと比べ、より多く血漿中で検出された。

また、3,5,7,3',4'-Pentamethoxyflavoneを経口投与したICRマウスの血漿中における代謝物をLCMSで経時的に解析したところ、3',4'位が脱メチル化を受けていることが明らかとなった。

本研究課題では、ポリメトキシフラボノイドに付くメトキシ基の数や付く位置など構造の違いが生理活性や吸収効率にどのような影響を及ぼすかを調べ、構造活性相関を見つけることを目的として、73種類のポリメトキシフラボノイドの吸収と抗炎症作用における生理活性評価を行った。ポリメトキシフラボノイドは、Caco-2細胞における吸収試験の結果とICRマウスにおける吸収試験の結果と相関しており、本研究で網羅的に行ったCaco-2細胞における吸収試験の結果は、機能性食品の開発に役立てられる有用な知見であると考えられる。一方で抗炎症作用が非常に高いものの、吸収効率が非常に悪い化合物もあり、強い生理活性作用を持つ化合物が、高吸収であるとは限らないことが示された。

本研究においてポリメトキシフラボノイドの多彩な生理作用と吸収についての構造活性相関の一部を明らかにした。シークワサーや黒ショウガを原料とした加工食品において、ポリメトキシフラボノイドを関与成分とした機能性表示食品が登場しており、本研究で示された構造の条件を満たす化合物は、機能性食品に応用できる可能性が高く重要な知見を得ることができた。今後は、ポリメトキシフラボノイドの代謝動態や臓器での滞留、機能発現に至るメカニズムをより詳細に明らかにしていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 渡辺章夫、夏目矩行、中村太郎、渡邊晴奈、倉若美咲樹、小林 亘、山野亜紀、照屋俊明、米澤貴之、禹濟泰	4. 巻 15
2. 論文標題 黒ショウガ由来ポリメトキシフラボンの新規精製法と健康機能	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 396 ~ 404
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 Noriyuki Natsume, Aki Yamano, Akio Watanabe, Takayuki Yonezawa, Je-Tae Woo, Tohru Yamakuni, Toshiaki Teruya	4. 巻 30
2. 論文標題 Effect of methoxyflavones contained in Kaempferia parviflora on CRE-mediated transcription in PC12D cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.	6. 最初と最後の頁 127606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127606	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 Tsuboi Tomoe, Lu Rui, Yonezawa Takayuki, Watanabe Akio, Woo Je-Tae, Abe-Dohmae Sumiko, Yokoyama Shinji	4. 巻 297
2. 論文標題 Molecular mechanism for nobiletin to enhance ABCA1/G1 expression in mouse macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 32 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.atherosclerosis.2020.01.024	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 渡辺 章夫 , 米澤 貴之 , 小林 桃佳 , 遠藤 由貴 , 禹 濟泰	4. 巻 13
2. 論文標題 黒ショウガ由来メトキシフラボノイドの多様な生理機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 54 ~ 61
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 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 章夫
2. 発表標題 新姫由来ポリメトキシフラボノイドの成分特性と健康機能
3. 学会等名 ノビレチン研究会 第5回 学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 夏目矩行、米澤貴之、山野亜紀、渡辺章夫、照屋俊明、禹濟泰、山國徹
2. 発表標題 ポリメトキシフラボノイド高含有黒ショウガエキス（BGP80）の 学習記憶に対する作用の解析
3. 学会等名 ノビレチン研究会 第5回 学術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 章夫、夏目 矩行、中村 太郎、渡邊 晴奈、山野 亜紀、照屋 俊明、米澤 貴之、禹 濟泰
2. 発表標題 高尿酸血症モデル系における 黒ショウガ由来PMF高純度エキス（BGP80）の尿酸産生抑制作用
3. 学会等名 ノビレチン研究会 第5回 学術研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 章夫、米澤 貴之、深尾 弦貴、渡邊 晴奈、中村 太郎、山野 亜紀、照屋 俊明、禹 濟泰
2. 発表標題 熊野市特産柑橘『新姫』果皮抽出エキスの抗肥満効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花田桃子、呂 銳、米澤貴之、渡辺章夫、禹 濟泰、横山信治
2. 発表標題 ポリメトキシフラボノイドの HDL 産生促進メカニズム
3. 学会等名 ノビレチン研究会 第4回 学術研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 章夫、遠藤 由貴、小塚 隆造、米澤 貴之、禹 濟泰
2. 発表標題 黒ショウガ由来ポリメトキシフラボノイドの体内吸収動態の解析
3. 学会等名 ノビレチン研究会 第3回 学術研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 米澤 貴之、渡辺 章夫	4. 発行年 2019年
2. 出版社 サイゾー	5. 総ページ数 144
3. 書名 ノビレチンで、のびのび、健康生活	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------