

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380080

研究課題名（和文） 過剰な炎症反応に由来する酸化ストレス制御機構解析と抗酸化食品因子による抑制

研究課題名（英文） Analysis on the control of oxidative stress derived from overproduction by inflammation reaction and suppression by Antioxidative Food Factors

研究代表者

大澤 俊彦 (OSAWA TOSHIHIKO)

愛知学院大学・心身科学部・教授

研究者番号：00115536

研究成果の概要（和文）：免疫担当細胞は生体防御に重要な役割を果たす半面、過剰な炎症反応は酸化ストレスを誘発し、DNAやタンパク質、リン脂質などを酸化修飾する。特に、脂質過酸化や過剰な炎症反応に由来する酸化ストレスバイオマーカーの有機化学的解析やモノクローナル抗体の作製、さらには、「抗体チップ」を開発することに成功した。さらに、イソフラボノイドやクルクミノイド、ゴマリグナンなどの抗酸化食品因子の機能解析にも成功した。

研究成果の概要（英文）：Immunocyte is important for biophylaxis, however, overproduction of oxidative stress can be produced during the inflammation reaction, and interacts with many biological components such as proteins, phospholipids and DNA. We have also succeeded in construction of novel biomarkers specific to overproduction of oxidative stress during inflammation process by chemical and immunological approach and development of “antibody chip” by application of these biomarkers. We also succeeded in functional evaluation of antioxidative food factors such as soy isoflavonoids, curcuminoid and sesame rignans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、食品科学

キーワード：酸化ストレス・脳内老化・好中球・脂質ヒドロペルオキシド・アラキドン酸
ドコサヘキサエン酸・未病診断・モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスの結果生じる生体内脂質過酸化反応は多種多様な疾病を引き起こす原因として重要であり、特に、脳内老化における役割の検討を進め、多くの研究成果を得ている。例えば、主要な脳内の脂質であるドコサヘキサエン酸（DHA）が、脳内老化と共に

誘導される酸化ストレスにより DHA ヒドロペルオキシドに変化すること、また、この脂質ヒドロペルオキシドがドパミン神経細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。さらに、これらの DHA ヒドロペルオキシドは、タンパク質と反応して新しい付加化合物を生成することを LC/MS などの

有機化学的手法を中心に、免疫化学的手法も併用して明らかにすることができた。その後、DHA に続いて脳内に多く存在するアラキドン酸 (ARA) もドパミンを酸化修飾し、新規な生成物を生成することを明らかにし、ドパミン神経細胞に対してアポトーシスを誘導するという興味ある結果を得ることができた。一方、好中球過剰発現によるハロゲン化反応についても、化学的研究を中心に世界レベルで研究の主導権を争う競争が進み、申請者らの研究グループも、まず、炎症反応による DNA のクロル化反応に着目し、デオキシシチジンの新しいクロル化生成物の有機化学的研究を進め、新規なバイオマーカーとしてモノクローナル抗体の作製にも成功し、動物レベル系でラットの肝臓におけるミエロペルオキシダーゼ由来の炎症反応での免疫染色にも成功している。さらに、クロル化物とともにブロム化チロシンも生成し、しかも、ヒト臨床レベルでも解析が進み、特に、尿中のブロム化チロシンの排泄量が、糖尿病患者の合併症の発症と関連があることを明らかにしている。つい最近に至り、皮膚科領域でも過剰な炎症反応は、皮膚傷害の大きな問題であることが大きく注目されている。申請者らも、過度な紫外線照射でなくても、弱い紫外線の反復照射により、皮膚傷害が起こりうること、また、その原因がミエロペルオキシダーゼの過剰発現の結果生じた炎症反応による酸化傷害であることを、ジチロシンやブロム化チロシンなどのモノクローナル抗体を用いた免疫染色、ELISA 法による定量と共に、LC/MS/MS による化学的同定と定量的な解析に成功している。さらに、茶カテキンが強力な炎症反応に由来する酸化傷害を抑制し、海洋生物由来のアスタキサンチンが強力な炎症反応に由来する酸化ストレスを予防する抗酸化食品因子であることを細胞レベルで証明している。

2. 研究の目的

最近特に注目を集めてきているのは、生体内脂質過酸化反応をはじめとする酸化ストレス反応の誘導に過剰な炎症反応が大きな役割を果たしているのではないかという研究アプローチである。そこで、本研究で明らかにしようとするのは、過剰な炎症反応により生じる酸化ストレスの有機化学的な発現機構の解明と、抗酸化食品因子による予防評価の確立である。

マクロファージや好中球のような免疫担当細胞は、本来、生体防御機構に重要な役割を果たしているが、条件によっては過剰な炎症反応を引き起こし、パーキンソン病発症では α -synuclein (α SYN)、アルツハイマー病では amyloid- β -protein ($A\beta$ タンパク) のような病因タンパク質に対し、クロル化やブロ

ム化などのような過剰な炎症反応に由来する酸化修飾を引き起こし、その結果、 α SYN や $A\beta$ タンパクの異常凝集や細胞死が引き起こされるのではないかと考えられる。本研究では、 α SYN や $A\beta$ タンパクを対象に、炎症反応による酸化傷害の結果、どのような酸化修飾反応が生じるのか、また、脳内老化における炎症反応のバイオマーカーになりうるのか、モノクローナル抗体の作成を含めて検討する。また、申請者らは、好中球の過剰発現により増大する MPO ノックアウトマウスをはじめ、数々の動物モデルを入手しているので、これらの系を用いた評価系の確立を行う。最終的に、脳内老化の未病診断とともに、新しい食品機能評価法の確立を目指そうというものである。

3. 研究の方法

(1) 炎症反応に特異的なバイオマーカーの生成機構の解明

マクロファージや、好中球由来のミエロペルオキシダーゼや好酸球ペルオキシダーゼの過剰発現によるフリーラジカル傷害のメカニズム解明を目的に、 α SYN や $A\beta$ タンパクのハロゲン化などの修飾反応を、LC/MS/MS を中心とする機器分析により、有機化学的な解明の検討を行う。

(2) 酸化修飾ドパミンの有機化学的な解析
記憶増進作用やアルツハイマー症予防効果などの機能が注目されている DHA や ARA も過剰摂取など条件によっては脳内抗酸化能の低下、タンパク質修飾などの傷害を惹起させる。そこで、アルキルアミド化修飾ドパミン特異的なモノクローナル抗体を作製し、パーキンソン症モデル動物の脳内での傷害機構に対して、LC-MS/MS による網羅的なプロテオーム解析も含めて免疫化学的、有機化学的な解明を行う。

(3) 抗酸化食品因子の炎症性酸化傷害抑制機構の解明

申請者らの研究グループが世界的にも独自の研究アプローチを進めている抗酸化食品因子として、クルクミノイドやゴマリグナン類などの抗酸化ポリフェノールがあげられる。そこで、これらの抗酸化ポリフェノールのうち、ゴマリグナンとしてセサミノール配糖体の代謝物であるセサミノールカテコールやクルクミン代謝物であるテトラヒドロクルクミンの脳内老化抑制機構、特に、ドパミン神経細胞保護作用機構の解明を行う。そのために、まず、実際に脳関門を通過して脳内老化の抑制に関与すると期待される代謝物を単離・精製し、高分解能 NMR や MS などの機器分析法を駆使して化学構造を明らかにする。

(4)酸化ストレスバイオマーカーに特異的な抗体チップの作製
 神経細胞を用いた細胞レベルだけではなく、種々の脳内老化疾患モデル動物や、疫学研究、介入試験など、ヒト臨床研究を含めた系を対象に、「抗体チップ」の応用も含めた免疫化学的手法を中心に機能性評価を行い、プロテオミクスの解析や免疫化学的手法などを応用することで、酸化ストレス防御機構の解明を中心に「ブレインフーズ」としての開発の基盤的研究を行う。

4. 研究成果

(1) 過剰な炎症反応は、脳内機能制御に重要な役割を果たすアラキドン酸 (ARA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) に対して脂質過酸化反応を誘導し、その結果、生じた過酸化物によりリン脂質が酸化修飾を引き起こすことを明らかにした。既に、作製した DHA ヒドロペルオキシド修飾リジンに特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫染色により、脳内における tau タンパク質のプロパノイル化が亢進されることが明らかとなった。さらに、ヘキサノイル化反応はリン脂質に対しても起こることを明らかにし、ヘキサノイル化フォスファティジルエタノールアミン (HEPE) やヘキサノイル化フォスファティジルセリン (HEPS) の生成機構の解明を、LC/MS/MS を中心とする機器分析により、有機化学的な解明の検討を行うとともに、HEPE に特異的なモノクローナル抗体を作製することに成功した (図-1)。これは、HEPE をリポゾームに組み込んだ新しいタイプのモノクローナル抗体で、今後、脳内老化評価への応用が期待できる。

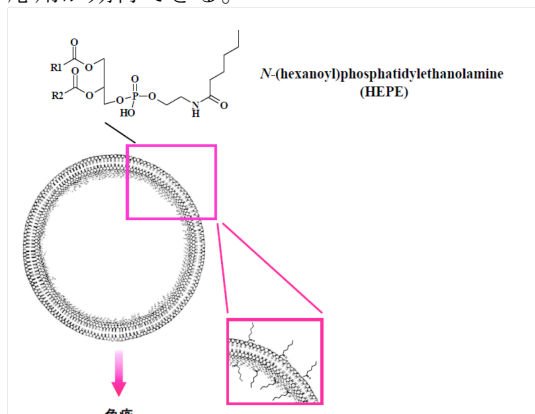


図-1 リポゾームに組み込んだ抗 HEPE 抗体作製

(2) 記憶増進作用やアルツハイマー症予防効果などの脳内機能改善効果が注目されている DHA も過剰摂取など条件によっては脳内抗酸化能の低下、タンパク質修飾などの障害を惹起させる可能性が推定され、DHA 過酸化物である DHA ヒドロペルオキシドによる酸化修

飾タンパク質に特異的なモノクローナル抗体の作製に成功したので、ヒトの尿、血液を対象とした臨床研究への応用も含めて PRL をプローブとした「抗体チップ」の作製を試みた。その結果、DHA に特異的な評価法として、動物モデルからヒト臨床系に応用できる評価法を確立することができた。さらに、ハロゲン化 DNA、特に、8-BrdG に特異的なモノクローナル抗体を搭載した「抗体チップ」の作製も、ほぼ完成することができたので、現在、詳細な実用化試験を進めている (図-2)。

1. モノクローナル抗体
 ・既に市販化され、メタボ未病マーカーとして期待されるモノクローナル抗体
 ・酸化ストレスマーカーを中心とした独自のモノクローナル抗体

① アディポサイトカイン：細胞レベルからヒト臨床系に適用できる炎症性、抗炎症性サイトカイン類	② 酸化ストレスマーカー：細胞レベルからヒト臨床レベルでのバイオマーカーに応用できる酸化修飾タンパク質
アディポネクチン	脂質過酸化物の初期生成物
レプチン	HEL (N-hexanoyl-lysine)
レジスチン	AZL (N-azelaoyl-lysine)
TNF-α	GLL (N-glutaroyl-lysine)
MCP-1	PRL (N-propionoyl-lysine)
IL-6	SUL (N-succinyl-lysine)
	炎症反応初期に生じるタンパク質酸化修飾物
	ジチロシン (Di-tyrosine)
	ニトロチロシン (Nitro-tyrosine)
	ジブロモチロシン (Di-bromo-tyrosine)
	フラーザカル修飾DNA
	8-OHdG (8-hydroxy-deoxyguanosine)
	8-BrdG (8-bromo-deoxyguanosine)

2. アゾポリマーにモノクローナル抗体をインプリンティングした「抗体チップ」の開発
 特徴：可視光で固定化が可能 →紫外線照射のようにタンパク質の変性を受けない

図-2 酸化ストレスバイオマーカーに特異的な「抗体チップ」の開発

また、脳内老化制御が期待される抗酸化ポリフェノールのうち、大豆イソフラボノイドの生体内代謝物であるエコールに特異的なモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法の確立にも成功した。さらに、エコール類縁体 (O-DMA) を用いたレプチン産生の制御機構の検討を行い、新たな知見を得ることに成功した (図-3)。さらに、ゴマリグナンとしてセサミノール配糖体の代謝物であるセサミノールやセサミノールカテコール、さらにはクルクミン代謝物であるヘキサヒドロクルクミンに関しても、脳関門を通過してドパミン神経細胞の酸化障害を予防する可能性についても、多くの新規な知見を得ることができた。

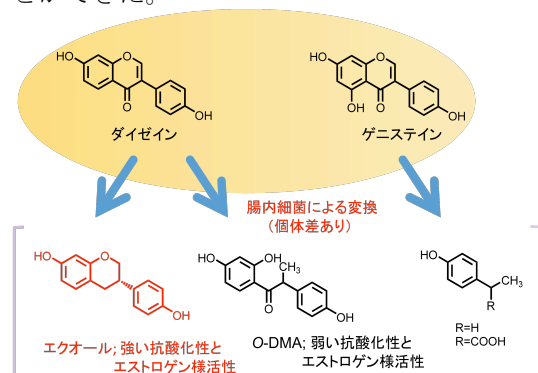


図-3 腸内細菌による大豆イソフラボン(ダイゼイン)から植物エストロゲン(エコール)への代謝メカニズム

(3) 炎症反応に基づく酸化傷害に関連したバイオマーカーのうち DHA ヒドロペルオキシド修飾タンパク質 (PRL) 由来の「抗 PRL 抗

体」は、アルツハイマー症患者の脳内海馬領域での免疫染色に成功し、他の脳内老化マーカーとの組み合わせによるヒト臨床試験への応用の可能性の検討も進めることができた。また、既に確立に成功しているアラキドン酸ヒドロペルオキシド修飾タンパク質 (HEL) に特異的な「抗 HEL 抗体」とも併せて脳内老化の評価のための「抗体チップ」確立の基盤研究も大きく進展することができた。さらに、好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞の過剰発現によるクロル化、ブロム化チロシンやハロゲン化 DNA に特異的な多種多様なモノクローナル抗体を作製でき、細胞系での解析だけでなく老化皮膚での免疫染色も成功し、有効性の確認にも大きく進展することができた。また、未病診断を目的とした酸化ストレスバイオマーカーを用いた網羅的な解析の予備研究にも大きく進展することができた。具体的には、アルツハイマー症やパーキンソン症などの脳内老化や肥満からインスリン抵抗性を獲得する糖尿病発症との関連性の解明を目的に、国立長寿医療センター研究所をはじめ、トヨタ記念病院や中部労災病院などの医療機関との協力で採取された健康人および生活習慣病境界域者の定期的な健康診断による 300 人規模の検体を、本人同意のもとで確保し、血清および尿検体を網羅的に解析した結果、背景因子や他の血液検査項目との関連性にも新しい知見を得ることができた。また、脳内老化が期待できる抗酸化食品因子の開発の基盤研究として、抗酸化ポリフェノールの生体内代謝物であるリグナンカテコール体やクルクミン還元物と共に、ダイズイソフラボノイドの生体内代謝物であるエコールの酸化ストレス予防評価にも大きく進展することができた。

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)

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

- ① Ishitsuka, Y., Maniwa, F., Osawa, T. 外 3 名 6 番目、Increased halogenated tyrosine levels are useful markers of human skin ageing reflecting denatured proteins by the past skin inflammation, *Clinical and Experimental Dermatology*, 査読有、vol. 37、2012、252-258
DOI:10.1111/j.1365-2230.2011.04215.x
- ② Okada H, Naito Y, Takagi T, Osawa, T. 外 11 名中 11 番目、Detection of N-(hexanoyl)lysine in the tropomyosin 1 protein in N-methyl-N'-nitro-N-

nitrosoguanidine-induced rat gastric cancer cells, *J Clin Biochem Nutr.*、査読有、vol. 50(1)、2012、47-52

DOI:10.3164/jcbrn.11-39

- ③ 大澤俊彦、アスタキサンチンの持つ脳内老化制御機能、*Functional Food*、査読無、vol. 50(4)、2012、324-331
- ④ 大澤俊彦、アンチエイジングを考えた食事アドバイス、*creabeaux*、査読無、vol. 72、2012、2-5
- ⑤ Ito, T., Kato, M, Osawa, T. 外 3 名中 6 番目、Ergothioneine as an anti-oxidative/anti-inflammatory component in several edible mushrooms, *Food Sci. Technol. Res.*、査読有、vol. 17、2011、103-110
DOI:10.3136/fstr.17.103
- ⑥ Xiang, L., Nakamura Y., Lim, Y-M., Osawa, T. 外 7 名中 7 番目、Tetrahydrocurcumin extends life span and inhibits the oxidative stress response by regulating the FOXO forkhead transcription factor, *Aging*、査読有、vol. 3、2011、1098-1107、
PMCID: PMC3249455
- ⑦ 大澤俊彦、上野有紀、クルクミノイド、*Functional Food*、査読無、vol. 14(4)、2011、322-332
- ⑧ 大澤俊彦、新しい機能性食品の展望、*Functional Food*、査読無、vol. 14(4)、2011、391-399
- ⑨ 大澤俊彦、「抗酸化食品」をめぐる現状と動向、*おいしさの科学*、査読無、vol. 2、2011、120-123
- ⑩ 丹羽利夫、大澤俊彦 外 2 名中 4 番目、Reduction of leptin secretion by soy isoflavonoids in murine adipocytes in vitro, *Phytochem. Lett.*、査読有、vol. 3、2010、122-125
DOI:10.1016/j.phytol.2010.04.001
- ⑪ 加藤陽二、大澤俊彦、Detection of lipid-lysine amide-type adduct as a marker of PUFA oxidation and its applications, 査読有、*Arch. Biochem. Biophys.*、vol. 501、2010、128-187
DOI:10.1016/j.abb.2010.06.010
- ⑫ 望月美佳、大澤俊彦 外 3 名中 5 番目、Effect of sesame lignans on TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells、査読有、*Biosci. Biotech. Biochem.*、vol. 74、2010、1529-1544
DOI:10.1271/bbb.100095
- ⑬ Asahi, T., Kondo, H., Osawa, T. 外 7 名中 10 番目、Chemical and immunochemical detection of

- 8-halogenated deoxyguanosines at early stage inflammation, 査読有, J. Biol. Chem., vol. 285(12), 2010, 9282-9291
DOI:10.1074/jbc.M109.054213
- ⑭ Hisaka, S., Yamada, N., Naito, K., Osawa, T., The immunological and chemical detection of N-(hexanoyl) phosphatidylethanolamine and N-(hexanoyl)-phosphatidylserine in an oxidative model induced by carbon tetrachloride, 査読有, Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 393, 2010, 631-636
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.02.043
- ⑮ 加藤陽二、大澤俊彦, Detection of a lipid-lysine adduct family with an amide bond as the linkage: novel markers for lipid-derived protein modifications., 査読無, Lipidomics Vol. 2: Methods and Protocols, vo. 580, 2010, 129-141
DOI:10.1007/978-1-60761-325-1_7
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Ito, T., Shimoda, H., Osawa, T. 外 2 名中 5 番目、Coprino extract, the extract from *Coprinus comatus* suppresses photo-damage in fibroblasts and mouse skin induced by ultraviolet-B, International Conference on Food Factors, 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ② Wu, X., Shimoda, H., Kato, Osawa, T. 外 4 名中 7 番目、Effect of Administration of Extract from *Coprinus Comatus* on Skin Inflammation induced by UV-B, International Conference on Food Factors, 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ③ Kazumura, K., Satozono, H., Osawa, T. 外 6 名中 9 番目、New estimation method of food for health progress by simultaneously monitoring superoxide generation and intracellular calcium ion concentration of neutrophils, Inflammation induced by UV-B, International Conference on Food Factors, 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ④ Mochizuki, M., Katsumura, K., Osawa, T. 外 1 名外 2 名中 4 番目、Antioxidant and anti-inflammatory of anthocyanins by the simultaneous measurement of chemiluminescence and fluorescence., International Conference on Food Factors, 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ⑤ Ueno, Y., Osawa, T., Anti-inflammatory Effect and Mechanisms of Action of Rice Antioxidative Components in Adipocytes, International Conference on Food Factors, 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ⑥ 大澤俊彦, Antioxidative Phytochemicals and Biomarkers, International Conference on Food Factors (招待講演), 2011. 11. 20-23, 台北 (台湾)
- ⑦ 大澤俊彦, 次世代食品機能性評価技術、第 84 回日本生化学会大会フォーラム (招待講演), 2011. 9. 21-24, 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑧ 日坂 真輔、林 佳美、大澤俊彦 外 5 名中 8 番目、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 21-24, 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑨ 永井 雅代、日坂 真輔、大澤俊彦 外 2 名中 3 番目、Alpha-synuclein は抗酸化活性をもつ一方、脂質過酸化修飾を受けることで細胞死に関与する可能性がある、第 84 回日本生化学会大会、2011. 9. 21-24, 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑩ 大澤俊彦, 脳内老化制御とアスタキサンチン、第 7 回日本アスタキサンチン研究会, 2011. 9. 9, ルブラ王山 (愛知県)
- ⑪ 大澤俊彦, 老化及び老年病のバイオマーカーの開発の現状、長寿科学研究開発費第 1 回班会議, 2011. 6. 1, 長寿医療研究センター (愛知県)
- ⑫ 大澤俊彦, がん予防と抗酸化フードファクター、第 11 回抗加齢医学学会総会シンポジウム, 2011. 5. 27-29, 国立京都国際会館 (京都)
- ⑬ 大澤俊彦, 長寿社会と食品、包装食品技術協会基調講演, 2011. 5. 23, 名古屋通信会館 (名古屋)
- ⑭ 古川 雄規、湊 健一郎、大澤俊彦 外 4 名中 6 番目、*Coprinus comatus* の抗変異原成分の探索、第 65 回日本栄養・食糧学会, 2011. 5. 13-15, お茶の水女子大学 (東京都)
- ⑮ 大澤俊彦, Chemical and Immunochemical Detection of Oxidative Stress Biomarkers as Early Stage Inflammation., International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine, 2011. 1. 20-22, ハイアット リージェンシー 京都 (京都市)
- ⑯ 大澤俊彦, Brain aging and oxidative stress, The International Symposium on Aging and Anti-aging from Molecular Biology to Nutritional Science, 2010. 9, 東京大学 (東京都)

- ⑰ 大澤俊彦、The development of oxidative stress biomarkers and its application to assess the functionality of antioxidative food factors、Japan-Korea International Symposium -New Trends in Food Biology and Food Chemistry、2010. 6、静岡県立大学（静岡市）
- ⑱ 大澤俊彦、Development of novel biomarkers specific to oxidative stress for evaluation of antioxidative food factors、JPN-NZ First Workshop in Tokyo、2010. 4、東京海洋大学（東京都）
- ⑲ 日坂真輔、林佳美、大澤俊彦外 3 名中 6 番目、生体内脂質過酸化による酸化傷害機構の化学的解明、第 26 回臨床フリーラジカル会議、2010. 1. 29-30、京都
- ⑳ 大澤俊彦、新しい脳内老化制御食品開発に向けて、平成 21 年度日本食品科学工学会大会特別講演、2009. 9. 10-12、名城大学（名古屋市）

〔図書〕（計 6 件）

- ① 瀧本陽介、大澤俊彦、シーエムシー出版、抗ストレス食品の開発と展望 II、2012、pp. 70-80
- ② 大澤俊彦、佐藤祐造、シーエムシー出版、機能性食品・素材と運動療法—生活習慣病予防と運動機能維持、向上を目指して—、2012、225
- ③ 大澤俊彦、シーエムシー出版、アスタキサンチンの機能と応用、2012、pp58-65
- ④ 丸山和佳子、永井雅代、能勢弓、大澤俊彦、直井信、シーエムシー出版、アスタキサンチンの機能と応用、2012、pp73-78
- ⑤ 大澤俊彦、シーエムシー出版、レスベラトロールの基礎と応用、2012、pp11-17
- ⑥ 大澤俊彦、丸山和佳子、シーエムシー出版、脳内老化制御とバイオマーカー：基盤研究と食品素材、2009、321

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 俊彦 (OSAWA TOSHIHIKO)
愛知学院大学・心身科学部・教授
研究者番号：00115536

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

上野 有紀 (UENO YUKI)
愛知学院大学・心身科学部・講師
研究者番号：20388060

望月 美佳 (MOCHIDUKI MIKA)
愛知学院大学・心身科学部・助手
研究者番号：60513091