

機関番号：14602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700753

研究課題名(和文) COX-2およびPPARを指標としたハーブの機能性評価

研究課題名(英文) Evaluation of herb by activation of PPARs and
suppression of COX-2 expression研究代表者 勝川 路子 (KATSUKAWA MICHIKO)
奈良女子大学・生活環境学部・助教

研究者番号：20508519

研究成果の概要(和文)：

レモングラスは調味料や香料として世界的に広く利用されているハーブであり、鎮痛や消炎作用を目的として用いられるが、その分子メカニズムは明らかになっていない。本研究において、我々はプロスタグランジン産生に重要な酵素である COX-2 や生活習慣病の分子標的である PPAR を指標としてレモングラス精油の評価を行い、レモングラス油主成分のシトラールが COX-2 を抑制し、PPAR を活性化することを同定した。

研究成果の概要(英文)：

Lemongrass is a widely used herb as a food flavoring, as a perfume, and for its analgesic and anti-inflammatory purposes; however, the molecular mechanisms of these effects have not been elucidated. In this study, we evaluated the essential oil of lemongrass using our established assays for COX-2, a key enzyme for prostaglandin synthesis, and PPAR, a molecular target for "lifestyle-related" diseases. We identified citral from the essential oil of lemongrass as a suppressor of COX-2 and also an activator of PPAR.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：食品機能学、栄養生化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：COX-2、PPAR、ハーブ、機能性評価

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病、高血圧症、高脂血症といった生活習慣病の患者および予備軍の人口が急激に増加しており、2008年4月からは特定健康診査制度がスタートしている。本研究はこれを背景として「COX-2 および PPAR を指標としたハーブの機能性評価」を提案するものであり、具体的には体内の炎症に関わる COX-2 (誘導型シクロオキシゲナーゼ) や PPAR (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体) を指標としてハーブの生活習慣病予防・改善効果を検討する。

シクロオキシゲナーゼ (COX) -2 は炎症物質であるプロスタグランジンの律速酵素であり、炎症や発癌、生活習慣病に関与することが明らかになってきた。また、その COX-2 のフィードバック制御を行う物質としてペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) が注目されている。

PPAR は核内受容体スーパーファミリーの一つであり、 α ・ β/δ ・ γ の3つのサブタイプが見出されている。PPAR α の合成リガンドであるフィブラート系薬剤は高脂血症治療薬として利用されている。PPAR β/δ は運動持久力改善効果や皮膚保護効果があるとされており、PPAR γ の合成リガンドであるチアゾリジン誘導体はインスリン抵抗性改善薬として広く一般に使用されている。

COX-2 や PPAR を指標にした新薬開発の研究は 10 年以上前から報告があるが、食品成分に関する研究は十分とはいえない。報告されているものとしては、赤ワインに含まれるレスベラトロール、パセリに含まれるアピゲニン、ビールホップの成分フムロンなどがあり、世界的にも注目が集まっている。本研究のテーマとしたハーブは、機能性の評価が定まっていなかった成分が多く残っており、今後の発展が期待できる。

2. 研究の目的

体内の炎症に関わる COX-2 や PPAR を指標としてハーブの生活習慣病予防・改善効果を検討する。

3. 研究の方法

ハーブ精油に対しプロモーターアッセイを行い、COX-2 プロモーター活性誘導抑制効果がみられた精油から作用成分の同定を行う。同定された成分について mRNA レベルおよびタンパク質レベルでの COX-2 発現抑制効果を測定する。また、プロモーターアッセイで PPAR 活性化能の測定および PPAR 応

用遺伝子の発現に対する作用を測定することで、PPAR のアゴニストとして作用しているか確認する。これらの指標にハーブ精油およびその成分が炎症および発癌、生活習慣病に対し効果が期待できるか検討を行う。

(1) プロモーターアッセイによる各ハーブ精油の COX-2 プロモーター活性誘導抑制効果の測定：ウシ血管内皮細胞 (BAEC) にヒト COX-2 プロモーターで転写制御されるルシフェラーゼレポーターベクターとヒト PPAR γ 発現ベクターを共導入する。導入 48 時間後に炎症性刺激剤であるリポポリサッカライド (LPS) とともにハーブ精油を添加し、5 時間反応後、細胞を回収し、そのライセートのルシフェラーゼ活性の測定を行う。測定の際に問題となる、各実験での導入効率の違いについては、 β -ガラクトシダーゼを発現するレポーターベクターを同時に導入し、その活性で補正することによって相対評価を行うことで解決する。

(2) プロモーターアッセイによるハーブ精油中の作用物質の同定：各ハーブ精油成分について(1)と同様の実験を行い、COX-2 プロモーター活性誘導抑制効果のある成分を同定する。

(3) プロモーターアッセイによるハーブ精油成分の PPAR 活性化能の測定：BAEC に PPAR 応答性エレメントをもつレポーターベクターとヒト PPAR α もしくは γ 発現ベクターを共導入する。導入 24 時間後にハーブ精油成分を添加し、24 時間反応後、細胞を回収し、そのライセートのルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシダーゼ活性を測定する。

(4) ハーブ精油成分添加による COX-2 の mRNA およびタンパク質の発現量変化の測定：U937 細胞を 12- α -テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) で 48 時間刺激し分化させ、さらに 24 時間後にハーブ精油成分を添加し、2-5 時間反応後、細胞を回収し RNA を抽出する。抽出した RNA は逆転写後リアルタイム PCR を用いて COX-2 発現量の測定を行う。タンパク質を抽出する場合はハーブ精油成分添加後 5-8 時間反応後、細胞を回収しタンパク質を抽出する。抽出したタンパク質は濃度測定後ウェスタンブロッティングを用いて COX-2 発現量の測定を行う。

(5) ハーブ精油成分添加による PPAR 応答遺伝子の発現量変化の測定：(4)と同様に分化させた U937 細胞を用い、ハーブ精油成分を添加した後 12 時間反応させ、細胞を回収し RNA を抽出する。抽出した RNA は逆転写後リアルタイム PCR を用いて PPAR α および γ 応答遺伝子発現量を測定する。

4. 研究成果

(1) スクリーニングにより、レモングラス油は0.002%添加により有意にCOX-2プロモーター活性を抑制し、PPAR α および γ をそれぞれ0.001%、0.002%で有意に活性化し、これまでに報告したタイム油より低濃度で作用することを明らかにした。使用したレモングラス油は成分分析の結果、シトラール57.5%、シトラールジエチルアセタール24.7%、リモネン6.4%などが含まれていた。作用成分の同定を行ったところ、レモングラス油の主成分シトラールがPPAR α を50 μ Mで、 γ を100 μ Mで活性化し、さらに、PPAR γ 依存的にCOX-2プロモーター活性を抑制することを明らかにした。また、シトラールはmRNAレベルおよびタンパク質レベルでもCOX-2発現を抑制すると共に、PPAR α ・ γ 応答遺伝子の発現に効果を示した。これらの結果はBiochim. Biophys. Actaおよび複数の学会で報告した。

(2) バラ油は0.01%添加によりCOX-2プロモーター活性を抑制し、PPAR α および γ を活性化した。バラ油は成分分析の結果、シトロネロール38.5%、ゲラニオール31.1%、ネロール7.1%などが含まれていた。これらの化合物は構造が類似しており、ゲラニオールはシトロネロールより二重結合が1つ多く、ネロールはゲラニオールのシス異性体であった。そこで、これら成分の作用を調べたところ、シトロネロールは主にPPAR α を活性化するのに対し、ゲラニオールはPPAR γ を主に活性化した。また、シトロネロールはCOX-2プロモーター活性をPPAR γ 依存的に抑制するのに対し、ゲラニオールはPPAR γ 非依存的な抑制を示した。一方、ネロールではCOX-2およびPPARに対する効果はみられなかった。これらの結果から、バラ油成分シトロネロール、ゲラニオール、ネロールは構造は類似しているがその作用は異なることを明らかにした。これらの結果はBiosci. Biotechnol. Biochem. および複数の学会で報告した。

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 2 件)

- ① Michiko Katsukawa, Rieko Nakata, Satomi Koeji, Kazuyuki Hori, Saori Takahashi and Hiroyasu Inoue, Citronellol and geraniol, components of rose oil, activate peroxisome proliferator-activated receptor α and γ

and suppress cyclooxygenase-2 expression, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有、75、2011、1010-1012

- ② Michiko Katsukawa, Rieko Nakata, Yoshie Takizawa, Kazuyuki Hori, Saori Takahashi and Hiroyasu Inoue, Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression, Biochim. Biophys. Acta., 査読有、1801、2010、1214-1220

[学会発表] (計 8 件)

- ① 勝川路子、中田理恵子、井上裕康、COX-2発現抑制、PPAR活性化を指標としたシトラールの機能性評価、日本家政学会関西支部第32回研究発表会、2010年10月23日、兵庫県立大学
- ② 勝川路子、中田理恵子、井上裕康、COX-2およびPPARを標的としたシトラールの機能性評価、第49回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2010年10月16日、大阪市立大学
- ③ Hiroyasu Inoue, Michiko Katsukawa and Rieko Nakata, Evaluation of essential oils by activation of PPARs and suppression of COX-2 expression, キーストンシンポジウム、2010年6月23-25日、ウェスティン都ホテル京都
- ④ 勝川路子、井上裕康、中田理恵子、滝澤祥恵、堀一之、高橋砂織、PPARおよびCOX-2への作用を指標としたレモングラス精油成分の機能性評価、日本ビタミン学会第62回大会、2010年6月12日、いわて県民情報交流センター
- ⑤ 勝川路子、中田理恵子、井上裕康、COX-2発現抑制、PPAR活性化を指標としたレモングラス油の機能性評価、日本家政学会第62回大会、2010年5月29日、広島大学
- ⑥ 勝川路子、中田理恵子、堀一之、高橋砂織、井上裕康、COX-2およびPPARを標的としたレモングラス油の機能性評価、第64回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月23日、アスティとくしま
- ⑦ 勝川路子、長澤聡美、中田理恵子、井上裕康、COX-2およびPPARを標的とした精油成分の機能性評価—第2報—、第48回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2009年11月8日、京都女子大学
- ⑧ 勝川路子、長澤聡美、高井綾子、中田理恵子、堀一之、高橋砂織、井上裕康、PPAR活性化およびCOX-2発現抑制を指標としたバラ油の機能性評価、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド

[その他]
ホームページ
<http://narawuffc.pl.bindsite.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝川 路子 (KATSUKAWA MICHIKO)
奈良女子大学・生活環境学部・助教
研究者番号：20508519

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし