

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05487

研究課題名（和文）プロファイル解析を用いたカロテノイドの抗炎症作用の解明

研究課題名（英文）Assessment of anti-inflammatory activity of carotenoids using a multivariate analysis-based approach

研究代表者

真鍋 祐樹 (Yuki, Manabe)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：20730104

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）：本研究では、多種要因による炎症反応に対するカロテノイドの抑制作用を評価（抗炎症プロファイルを作成）し、結果を多変量解析に供することによって、抗炎症作用に基づくカロテノイドの分類と作用に重要な化学構造の探索を試みた。その結果、非修飾環とC8位のカルボニル基が抗炎症作用に重要な部分構造と推察された。さらに、非修飾環を有するカロテノイドとC8位にカルボニル基を有するカロテノイドでは、強く抑制する炎症反応が異なっていた。両方の化学構造を有するカロテノイドはまだ報告されていないため、それぞれを有するカロテノイドを組み合わせることによって、カロテノイドの抗炎症作用をより効率よく享受できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多種多様な刺激剤によって誘導される炎症反応に対して、様々な被験物質の抑制作用を評価し、その結果を多変量解析で解釈する手法（抗炎症プロファイル解析）は、これまでに報告がなかった。新規の解析手法を試み、一定の成果を得た点に、本研究の意義があると考えられる。また、抗炎症プロファイル解析を進めるために、レポーター遺伝子アッセイを用いた抗炎症作用の評価を多数実施した。そのなかで、これまでに抗炎症作用の報告がなかった化合物を複数見出している。レポーター遺伝子アッセイ以外の方法も組み合わせ、詳細を調べる必要があるが、新規知見につながり得るデータを多数得たという点で、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the inhibitory effects of carotenoids on inflammatory responses induced by various stimulants and subjected the results to multivariate analysis to classify carotenoids based on their anti-inflammatory effects and to search for chemical structures important for their effects. As a result, the unsubstituted β -ring and the carbonyl group at the C8 position were found to be crucial for their anti-inflammatory effects. Furthermore, inflammatory responses suppressed by carotenoids with unsubstituted β -ring and by carotenoids with a carbonyl group at the C8 position were different from each other. Since carotenoids with both chemical structures have not yet been reported, the combination of carotenoids with each of these two chemical structures could be a more efficient way to get the anti-inflammatory effects of carotenoids.

研究分野：食品科学

キーワード：カロテノイド 多変量解析 抗炎症作用 NF- κ B インターフェロン制御因子 レチノイド Nrf2

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドはβ-カロテンを基本骨格とする一連の脂溶性色素である。私たちヒトはカロテノイドを生合成することはできないが、日常的な食事には約50種類のカロテノイドが含まれ、さらには、母乳にもカロテノイドが含まれているため(1)、私たちは生誕以降毎日カロテノイドを摂取し続けていることになる。さらに近年では、ワカメに含まれるフコキサンチンなど、食事中に決して大量には含まれなかったカロテノイドでさえもサプリメントとして販売されるようになり、私たちの身体は常に多種多様なカロテノイドに曝されているといえる。実際、私たちの体内からは様々なカロテノイドとその代謝産物が検出されており、種々の疾患との関連が報告されている。代表的には、疫学調査によってリコペンやルテインの血中濃度と動脈硬化のリスクの逆相関が見出されている。しかしながら、いずれの試験においても血液中の主要なカロテノイドのみを測定しており、それらの代謝産物やその他の微量なカロテノイドまでは解析や考察がなされていなかった。

一方、動脈硬化の進展には免疫担当細胞による炎症反応が深く関わるため、抗炎症作用を示すカロテノイドの探索が盛んに進められてきた。ただし、主に、代表的な炎症性物質であるリポ多糖(LPS)を用いて炎症反応を誘発し、それに対する各種カロテノイド単独での影響を評価するものがほとんどであった。生体内では様々な要因によって炎症反応が引き起こされ、動脈硬化の進展においても、LPSなどの病原体成分、TNF-αなどの炎症性サイトカイン、終末糖化産物(AGEs)など、様々な要因による炎症反応が関与するとされている。しかしながら、このような複合的要因に基づく炎症に着目した研究は乏しかった。TNF-αやAGEsなどのLPS以外の刺激に伴う炎症反応に注目した研究報告もわずかに存在するが、それらは特定のカロテノイドの抗炎症作用の評価を目的としたものであった。すなわち、多種多様なカロテノイドによる、多種要因に基づく炎症反応に対する抑制作用を評価・比較した研究報告はなかった。

2. 研究の目的

生体内で起こり得る炎症反応は決して単一ではなく、様々な炎症誘導因子が関与している。したがって、例えば、LPSによって誘導される炎症反応に対して強い抑制作用を示すカロテノイドが、生体内でも同様に強い抗炎症作用を示すかどうかはわからない。そこで本研究では、生体内で起こり得る多様な炎症反応を総合して考えた場合に、真に強い抗炎症作用を示すカロテノイド、あるいはカロテノイドの組み合わせを見出し、動脈硬化などの多様な炎症反応が関わる疾病の予防に対し、より有効なカロテノイドやその組み合わせを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) レポータージーンアッセイを用いた抗炎症作用の評価と抗炎症プロファイル解析

生体内では多種多様な要因によって炎症反応が引き起こされるが、多くの場合で転写因子であるNF-κBやインターフェロン制御因子(IRF)が活性化される。また、ヒト単球性白血球細胞株THP-1は、各種Toll様受容体(TLR)やTNF受容体、AGEs受容体などを発現しており、様々な炎症誘導因子に応答する。そこで本研究では、炎症誘導因子で刺激したTHP-1におけるNF-κBおよびIRFの転写活性化を炎症反応のモデルとして用いた。具体的には、NF-κBおよびIRFの結合領域の下流にレポーター遺伝子を導入したTHP-1細胞(THP1-Dual細胞)を被験物質と共に培養し、表1にあげた炎症誘導因子のうち1種類を用いて刺激した後、レポータータンパク質発現レベル、すなわちNF-κBおよびIRFの転写活性を評価した。

表1 本研究で使用した炎症誘導因子

	炎症誘導因子	受容体・標的
病原体成分	トリアシルリポペプチド(P3C)	TLR1/2
	二本鎖RNA(pIC)	TLR3
	リポ多糖(LPS)	TLR4
炎症性サイトカイン	TNF-α	TNFR
	IL-1β	IL-1R
	IFN-γ	IFNGR
その他	終末糖化産物(AGEs)	RAGE
	アミロイドβ1-42(Aβ1-42)	
	ホルボールエステル(PMA)	PKC

表1に挙げた炎症誘導因子を用いて THP1-Dual 細胞を刺激し、それぞれに対する被験物質(カロテノイドや作用メカニズムが明らかになっている薬剤など)の抑制作用を抗炎症プロファイルとしてまとめ、多変量解析による分類(抗炎症プロファイル解析)を試みた。

多変量解析には SIMCA15 を用いた。レポーター遺伝子アッセイの結果を Pareto scaling し、主成分分析によって、抗炎症作用を指標にしたカロテノイドの分類を試みた。また、判別分析(OPLS-DA)を用いて各カロテノイドの抗炎症作用の特徴を抽出した。

(2) レポーター遺伝子アッセイによらない抗炎症作用の評価

レポーター遺伝子アッセイおよび多変量解析によって得られた、カロテノイドの抗炎症作用に関する特徴をマウスミクログリア細胞株 MG6 (2, 3) およびマウスマクローファージ細胞株 RAW264 を用いて検証した。具体的には、炎症誘導因子で刺激した MG6 および RAW264 における一酸化窒素(NO)産生や炎症関連遺伝子の mRNA 発現レベルを評価した。

4. 研究成果

(1) レポーター遺伝子アッセイを用いた抗炎症作用の評価と抗炎症プロファイル解析

保有する食品由来カロテノイドライブラリーのなかから、化学構造の多様性を考慮し、表2の8種類のカロテノイドについて、レポーター遺伝子アッセイによる抗炎症作用の評価を進めた。

表2 カロテノイドの特徴的な部分構造とその個数

	末端構造	非修飾β環	ヒドロキシ基			カルボニル基	
			3位	5位	19位	4位	8位
β-カロテン	β,β	2	0	0	0	0	0
エキネノン	β,β	1	0	0	0	1	0
ゼアキササンチン	β,β	0	2	0	0	0	0
ルテイン	β,ε	0	2	0	0	0	0
アロキササンチン	β,β	0	2	0	0	0	0
アスタキササンチン	β,β	0	2	0	0	2	0
シフォナキササンチン	β,ε	0	2	0	1	0	1
フコキササンチン	β,β	0	1	1	0	0	1

	アセチル基	エポキシ構造	アレン結合	アセチレン結合
	3位	5位-6位	6位-7位-8位	7位-8位
β-カロテン	0	0	0	0
エキネノン	0	0	0	0
ゼアキササンチン	0	0	0	0
ルテイン	0	0	0	0
アロキササンチン	0	0	0	2
アスタキササンチン	0	0	0	0
シフォナキササンチン	0	0	0	0
フコキササンチン	1	1	1	0

データを俯瞰してみると、β-カロテン、エキネノン、シフォナキササンチン、フコキササンチンに比較的強い抗炎症作用が認められた。また、AGEs に誘導される炎症応答は、シフォナキササンチンによってのみ有意に抑制され、17種類のカロテノイドについて比較検討した既報と同様であった(4)。

主成分分析の結果、図1に示す通り、β-カロテンとエキネノン(Group 1)、シフォナキササンチンとフコキササンチン(Group 2)、それ以外(Group 3)がそれぞれ近傍にプロットされた。表2のカロテノイドの部分構造と照らし合わせて考えると、非修飾β環がGroup 1に、8位のカルボニル基がGroup 2に特徴的な部分構造と考えられた。また、コントロールの近傍であるため、Group 3のカロテノイドの抗炎症作用は弱いと考えられた。

次に、Group 1のカロテノイドが特徴的に抑制する炎症応答をOPLS-DA解析によって抽出したところ、TNF-αやLPSに誘導されるNF-κBの活性化がヒットした。同様に

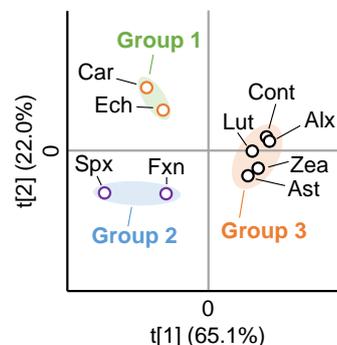


図1. 抗炎症プロファイルの主成分分析
Cont, コントロール; Car, β-カロテン;
Ech, エキネノン; Zea, ゼアキササンチン;
Lut, ルテイン; Alx, アロキササンチン;
Ast, アスタキササンチン; Spx, シフォナ
キササンチン; Fxn, フコキササンチン

Group 2 のカロテノイドは、P3C や LPS によって誘導される IRF の活性化を特徴的に抑制することが示唆された。Group 1 と 2 では、抑制できる炎症応答が異なるため、これらを組み合わせる、例えば、β-カロテンとシフォナキサンチンを組み合わせることによって、効率よく炎症反応を抑制できると予想された。

(2) マウスミクログリア細胞株 MG6 を用いた抗炎症作用の評価

抗炎症プロファイル解析によって、β-カロテンは all-trans-レチノイン酸と同様の作用メカニズムによって抗炎症作用 (TNF-α や LPS に誘導される NF-κB の活性化を抑制する作用) を発揮する可能性が見出された。そこでマウスミクログリア細胞株 MG6 を用い、その詳細を解析した。

β-カロテンはLPSで刺激したMG6細胞におけるNO産生を有意に抑制し、その抑制作用はレチノイン酸受容体 (RAR) アンタゴニストの共存によって減弱した (図2)。また、MG6細胞内のレチノイド量をLC-MSを用いて測定したところ、β-カロテン処理によって all-trans-レチナールや all-trans-レチノイン酸が有意に増加することを見出した。代謝経路を考慮すると、β-カロテンは all-trans-レチナールを経て all-trans-レチノイン酸へと代謝され、RAR を活性化することによって NO 産生を抑制するものと考えられた。

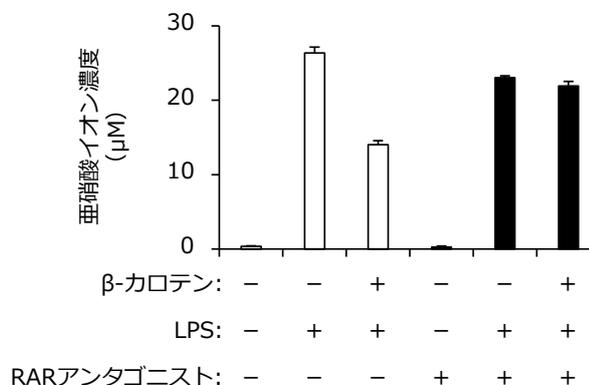


図2. RARを介したβ-カロテンのNO産生抑制作用

(3) マウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いた抗炎症作用の評価

シフォナキサンチンのデヒドロ体の抗炎症プロファイルは、シフォナキサンチンの抗炎症プロファイルと類似していた。これはデヒドロ代謝を受けても 8 位のカルボニル基が維持されているためと推察された。デヒドロ代謝を受ける回数に比例して、P3C に誘導される IRF の活性化を抑制する作用 (抗炎症作用) が強くなることがわかり、Nrf2 の活性化が作用メカニズムと予想された。そこでマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を用いて、P3C 刺激後の炎症関連遺伝子の mRNA 発現を指標に、シフォナキサンチンが最も多くデヒドロ代謝を受けた産物である TDM の抗炎症作用を調べた。TDM は、IL-1β や TNF-α などの NF-κB によって制御される炎症性サイトカインの mRNA 発現に対して有意な影響を与えなかったが、主に IRF によって制御される炎症関連遺伝子の ISG56 の mRNA 発現を有意に抑制した (図3)。さらにこの抑制作用は Nrf2 阻害剤によって打ち消され、レポータージーンアッセイによって見出された Nrf2 の活性化を介した TDM の抗炎症作用が RAW264 細胞においても示された。

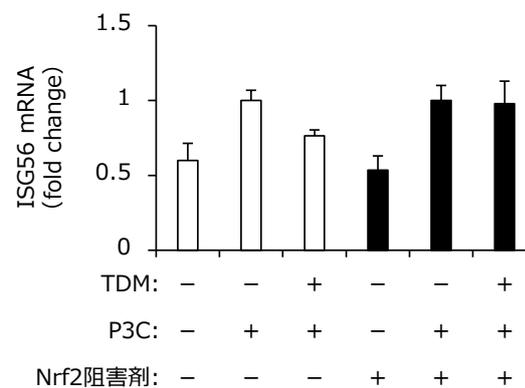


図3. Nrf2を介したTDMのIRF活性化抑制作用

- (1) Khachik, F.; Spangler, C.J.; Smith, J.C.; Canfield, L.M.; Steck, A.; Pfander, H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal. Chem.* **69**, 1873–1881 (1997).
- (2) Takenouchi, T.; Ogihara, K.; Sato, M.; Kitani, H. Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **1726**, 177–186 (2005).
- (3) Nakamichi, K.; Saiki, M.; Kitani, H.; Kuboyama, Y.; Morimoto, K.; Takayama-Ito, M.; Kurane, I. Suppressive effect of simvastatin on interferon-β-induced expression CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neurosci. Lett.* **407**, 205–210 (2006).
- (4) Manabe, Y.; Takii, Y.; Sugawara, T. Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, suppresses advanced glycation end product-induced inflammatory responses. *J. Nat. Med.* **74**, 127–134 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Manabe Yuki, Tomonaga Nami, Maoka Takashi, Sugawara Tatsuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Multivariate Analysis Reveals That Unsubstituted -Ring and C8-Keto Structures Are Important Factors for Anti-Inflammatory Activity of Carotenoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3699 ~ 3699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13113699	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真鍋 祐樹、毛利 晋輔、菅原 達也
2. 発表標題 ヒト肝細胞モデルを用いたシフォナキサンチンの生体内代謝の検討
3. 学会等名 第34回カロテノイド研究談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田 愛佳、真鍋 祐樹、毛利 晋輔、菅原 達也
2. 発表標題 ミクログリアの炎症応答に対するシフォナキサンチンの抑制効果とその作用メカニズム
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	毛利 晋輔 (Mohri Shinsuke) (60836625)	立命館大学・生命科学部・助教 (34315)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	菅原 達也 (Sugawara Tatsuya) (70378818)	京都大学・農学研究科・教授 (14301)	

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