

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：16101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22380077
 研究課題名（和文） ストレス誘導によるケルセチンの活性化と多機能発現ダイナミクスの解明
 研究課題名（英文） Evaluatuion of stress-induced activation of quercetin and its multifunctional dynamics
 研究代表者 寺尾 純二（TERAO JUNJI）
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：60093275

研究成果の概要（和文）：

植物食品由来抗酸化成分であるケルセチンの生体内における機能発現機構を解明することを目的とした。経口摂取したケルセチンは消化管粘膜、血管、中枢神経系及び筋肉組織を標的として酸化ストレスを直接的な活性酸素消去や抗酸化酵素誘導抑制および間接的な抗酸化酵素誘導活性化により抑えることを動物実験で明らかにした。作用機構にマクロファージによるケルセチン代謝物の脱抱合反応が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study was aimed to evaluate the multifunctional mechanism of quercetin as a antioxidative ingredient derived from plant foods. Rodent experiments demonstrated that dietary quercetin protects the intestinal mucosa of digestive tract, blood vessel, central nervous system and muscle tissue from oxidative stress by promoting the antioxidant enzyme expression as well as direct ROS-scavenging and suppression of oxidant enzymes. It is implied that de-conjugation reaction by macrophage participates in these multifunction of dietary quercetin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	11,400,000	3,420,000	14,820,000

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：食品、ストレス、発現制御、分析化学、シグナル伝達、筋萎縮、 β - β グルクロニダーゼ、炎症

1. 研究開始当初の背景

食による疾病予防の観点から非栄養性食品機能因子としての植物フラボノイドが注目されている。ケルセチンは野菜果実に含まれる代表的なフラボノール型フラボノイドであり、日常の食生活で高頻度に摂取するポリフェノ

ールとしてその抗動脈硬化作用、神経保護作用、抗がん作用などの生理機能の解明が待たれている。ケルセチンは活性酸素消去作用や酸化酵素阻害作用を発揮するばかりでなく、プロオキシダントとして細胞レドックスシグナル情報伝達系に寄与する可能性がある。さ

らに直接細胞内たんぱく質を標的として結合することにより、細胞機能を修飾することも示唆される。一般にケルセチンを含むフラボノイドはこれらの作用機構を介して多彩な生理活性を発揮することが多くの *in vitro* の培養細胞実験から推測されている。しかし、ケルセチンはその腸管吸収プロセスでほとんどが不活性な抱合体に代謝変換され、ヒト血流中にはすべて代謝物として存在することが明らかになっている。したがって、食品因子としてのケルセチンの機能性を評価するには代謝変換後の標的部位への移行蓄積のダイナミクスを明らかにする必要がある。われわれはケルセチンを主な対象として平成 19-21 年度に行った基盤研究 (B) において、抗酸化活性を有するケルセチン代謝物 [quercetin 3-glucuronide:Q3GA] は正常血管大動脈には蓄積しないが、ヒト動脈硬化巣マクロファージには特異的に蓄積することを明らかにした。また LPS 刺激によりマクロファージを活性化すると脱抱合反応が惹起し、生じたアグリコンが細胞内においてスクャベンジャー受容体発現を抑制することも明らかにした。以上の研究成果から、ケルセチン代謝物の一部は直接的に抗酸化作用を発揮すると同時に、生体のストレス応答により標的部位において速やかな代謝変換による活性化を受けて多彩な機能を発現すると考えた。ケルセチンの「ストレス誘導活性化仮説」は、その安全性と機能性を総合的に評価する上からも重要な仮説である。

一方、われわれは平成 19 年度に終了した文科省 21 世紀 COE プログラム「ストレス制御をめざす栄養科学」において、ケルセチンに富むタマネギが抗うつ様活性を有することをラット強制水泳試験法により証明したが、その後、水侵拘束ストレス負荷ラットの視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 産生を食餌由来ケルセチンが抑制することを明らかにした。さらにわれわれはラット脳内にケルセチン代謝物が蓄積することを確認した。したがって、中枢神経系でもストレス負荷によりケルセチン代謝物の活性化が惹起され機能発現することが予想された。

2. 研究の目的

食事由来ケルセチンのストレス誘導活性化仮説を証明し、血管大動脈、中枢神経系、消化管及び筋肉組織を標的とした多機能発現機構のダイナミクスを明らかにすることを目的とする。具体的な内容は以下のとおりである。

- (1) ケルセチン代謝物の脱抱合反応に対するストレス負荷の影響： 強制水泳や神経切除により精神ストレスや酸化ストレス負荷したラット・マウスの脳内および筋肉組織内ケルセチン代謝物の蓄積と脱抱合反応を明らかにすることにより、中枢神経系及び筋肉におけるストレス誘導ケルセチン活性化仮説の妥当性を明らかにする。
- (2) 血管系細胞におけるケルセチン代謝物の多機能発現ダイナミクスの解明： 刺激した培養血管内皮細胞を用いてケルセチン代謝物の血流から内皮下への透過性と脱抱合反応を評価するとともにマクロファージへの作用を追跡する。
- (3) 神経系細胞におけるケルセチン代謝物の多機能発現ダイナミクスの解明： 血液脳関門 (BBB) モデル培養細胞を用いてケルセチン代謝物の BBB 透過性を評価するとともに神経系細胞における脱抱合反応と神経伝達物質産生への影響を追跡する。
- (4) 消化管の酸化ストレスに対するケルセチン配糖体の作用： 炎症反応を誘導した消化管粘膜の酸化ストレス状態において、ケルセチン配糖体 (ルチン) 摂取によるストレスへの影響と消化管におけるルチンの代謝変換を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ケルセチンを一定期間摂取させたラットを 6 日間の連続的強制水泳試験に供し、脳を摘出した。ケルセチン代謝物を抽出し、LC-MS および HPLC クーロアレイ分析により両組織の代謝物同定と定量を行った。
- (2) ダブルチャンバー培養系で培養した血管内皮細胞 (HUVEC) に添加したケルセチン抱合体代謝物 Q3GA の内皮透過性を HPLC 分析で測定した。
- (3) 培養脳神経細胞 (Neuro2A) およびマイクログリア細胞に添加したケルセチン抱合体代謝物

Q3GA の脱抱合活性化と細胞内取り込みを HPLC 分析で追跡した。

- (4) 強制水泳ストレス負荷したラットから抽出した脳のモノアミンオキシダーゼ-A (MAO-A) 活性とセロトニンの変動および脳内酸化ストレスを測定し、ケルセチン摂取の影響を評価した。
- (5) 血液脳関門 (BBB) モデル培養細胞 (RBEC1) を用いて、ケルセチン代謝物の透過性の変動を評価した。
- (6) 筋管細胞 C2C12 を用いてケルセチンの取り込みと酸化ストレス抑制の関係を検討した。
- (7) マウスにデキストラン硫酸を連続投与することにより消化管粘膜に炎症を誘導し、生じた酸化ストレスに対するケルセチン及びケルセチン配糖体 (ルチン) の抑制効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) ケルセチンを摂食させたラット脳にケルセチン代謝物が蓄積することを抗体法と HPLC 分析で確認した。
- (2) ケルセチン抱合体代謝物 Q3GA がリゾホスファチジン刺激により内皮細胞を透過することをみとめた。
- (3) マイクログリア細胞がケルセチン抱合体を脱抱合することを明らかにした。
- (4) 強制水泳負荷によりストレスを負荷したマウス脳では MAO-A 活性が上昇すること、脳 MAO-A 活性をケルセチンが抑制することを明らかにした。
- (5) 血流から組織への取り込みには代謝物の脱抱合が鍵となるが、多くの組織に脱抱合酵素である β -グルクロニダーゼが発現していることを確認した。
- (6) マウスマクロファージはLPS刺激で β -グルクロニダーゼを放出し、ケルセチン配糖体を速やかに脱抱合して細胞内に取り込むことが確認された。すなわち、炎症反応により β -グルクロニダーゼを介する脱抱合が起こって、マクロファージへの取り込みが増加すると思われた。
- (7) マウスのデキストラン硫酸ナトリウム投与によるストレス負荷において、ルチン摂取は大腸粘膜の酸化ストレスを抑制した。さらルチンは腸内において加水分解産物アグリコンおよび

代謝物に変換することが示された。その作用機構に抗酸化酵素ペルオキシレドキシンの誘導活性化が含まれることが示された。

- (8) 坐骨神経切除マウスにおいてケルセチン摂取は脾腹筋のミトコンドリア酸化ストレスを抑制することをみとめた。
 - (9) 脂質過酸化で酸化誘導した筋管細胞において、ケルセチンの添加は酸化ストレス抑制作用を発揮することをみとめた。
- 以上の結果から、経口摂取したケルセチンあるいはその配糖体は吸収過程および吸収後、消化管、血管、中枢神経及び筋肉組織を標的として生体内で誘導される酸化ストレス抑制することにより生体の恒常性維持に働くことが示された。炎症反応で活性化するマクロファージ由来の脱抱合体化酵素により不活性代謝物から活性型アグリコンへの変換が起こることが示唆された。さらにその抑制作用には直接的なROS消去作用、酸化酵素の誘導抑制とともに間接的な抗酸化酵素 (ペルオキシレドキシなど) の誘導が考えられた。

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 7 件)

- ① Kotosai M., Shimada S., Kanda M., Matsuda N., Sekido K., Shimizu Y., Tokumura A., Nakamura T., Murota K., Kawai Y., Terao J. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids*. Vol. 48. No.6 2013. pp.569-578. doi:10.1007/s11745-013-3779-1
- ② Bandaruk Y., Mukai R., Kawamura T., Nemoto H. Terao J. Evaluation of the inhibitory effects of quercetin-related flavonoids and catechins on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria *Journal of Agricultural Food Chemistry* Vol.60, No.41, 2012, pp.10270-10277. doi10.1021/jf303055b
- ③ Mukai R., Horikawa H., Fujikura Y., Kawamura T., Nemoto H., Nikawa T., Terao J. Prevention of disuse muscle atrophy by dietary ingestion of 8-prenylnaringenin in denervated mice *PLoS ONE* vol. 9, 2012, e45048

doi:10.1371/journal.pone.0045048

④ Mukai R., Kawabata K., Otsuka S., Ishisaka A., Kawai Y., Ji Z-S., Tsuboi H., Terao J. Effect of quercetin and its glucuronide metabolites upon 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage in neuro-2a cells *Free Radical Research* Vol. 46, No. 8, 2012, 1019-1028
doi:10.3109/10715762.2012.763720

⑤ Ishisaka A, Ichikawa S., Sakakibara H., Piskula M., Nakamura T., Kato Y., Ito M., Miyamoto K., Tsuji A., Kawai Y., Terao J. Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radicals Biology and Medicine* Vol.51, No. 7, 2011, pp.1329-1336.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017

⑥ S. Yoshino, Hara A, Sakakibara H, Kawabata K, Tokumura A, Ishisaka A, Kawai Y., Terao J. Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *Nutrition* Vol.27, No.7-8, 2011, pp.847-852.
doi:10.1016/j.nut.2010.09.002

⑦ Terao J. Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food and Function* Vol. 2, No.1, 2011, 11-17
doi:10.1039/c0fo00106f

[学会発表] (計 11 件)

① Mukai R., Horikawa H., Fujikura Y., Murota K., Kawamukra T., Nemoto H., Terao J. Effect of prenylation on the bioavailability of dietary flavonoids. International Society for Nutraceuticals and Functional Foods Annual Conference 2012 年 12 月 3 日 米国ハワイ (コナ市) Kona Beach Hotel

② 水口八重子 向井理恵 寺尾純二 筋管細胞における遊離脂肪酸ヒドロペルオキシド誘導ユビキチンリガーゼ発現に対するケルセチンの抑制作用: 第 66 回日本栄養食糧学会総会中国・四国支部大会 2012 年 11 月 18 日 松山市 愛媛大学

③ Terao J. A role of dietary flavonoids on oxidative stress in the central

nervous system: attenuation of monoamine oxidase-A activity The 1st International Conference on Pharma and Food 2012 年 11 月 15 日 静岡市 日本平ホテル

④ 三角和広 平井夕貴 寺尾純二 マウス大腸粘膜の脂質ヒドロペルオキシド消去作用とルチン摂取の効果 第 66 回日本栄養食糧学会総会 2012 年 5 月 20 日 仙台市 東北大学

⑤ J. Terao, A. Ishisaka, Y. Kawai entral nervous system: a possible target of dietary flavonoids ICoFF (Food Factors) 2011 年 11 月 21 日 Taipei, Taipei International Convention Center

⑥ J. Terao Potential of dietary flavonoids for the prevention of muscle atrophy ISNFF (Neutraceuticals and Funtional Foods) 2011 年 10 月 16 日 札幌 ロイトンホテル

⑦ Terao J. Dietary flavonoids as antioxidants and beyond antioxidants in target tissues. Eurofood 2011 年 7 月 6 日 Gdansk, POAND Gdansk Institute of Technology

⑧ Terao J. Functional food factors for the prevention of muscle atrophy 2nd NAPA meeting 2011 年 2 月 17 日 Gyeongyu, KOREA Gyeongju Hilton Hotel.

⑨ Terao J. Multitargets of dietary flavonoids inmodulation of oxidative stress International Symposium on Free Radical Research 2011 年 1 月 22 日 Kyoto, JAPAN 京都市 京都パークホテル

⑩ Terao J. Central nervous system as a possible target of dietary quercetin and its metabolites International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods 2010 年 10 月 14 日 Bali, INDONESIA Inna Grand Bali Beach Hotel

⑪ Terao J. Processing and cooking effects on bioavailability and bioefficacy of dietary flavonoids Korean Society of Nutrition International Symposium 2010 年 6 月 3 日 Seoul, KOREA Yonsei University

[図書] (計 3 件)

① Piskula MK., Murota K., Terao J.

Bioavailability of Flavonols and Flavones (in
Flavonoids and Related Compounds) CRC
press 2012 pp.93-107.

②寺尾純二 フラボノイド (Functional Food
第 19 号) フジメディカル出版

③M. Piskula, K. Murota, J. Terao. Flavonoid
and related compounds (Chapter 4.
Bioavailability of Flavonols and Flavones
CRC press 2012 pp.173-186.

6. 研究組織

(1)研究代表者 寺尾 純二 (TERAO JUNJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：60093275

(2)研究分担者
河合慶親 (KAWAI YOSHICHIKA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：50380027

向井理恵 (MUKAI RIE)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：90547978

(3)連携研究者
()
研究者番号：