

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500989

研究課題名(和文) 主食食材中の AhR 活性成分の探索と大腸がん発症予防効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Exploration of AhR activity-inducing staple food components and their preventive effects against colorectal cancer

研究代表者

天倉 吉章 (AMAKURA, Yoshiaki)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：50321857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：主食食材のアリル炭化水素受容体(AhR)活性を評価し、それらに含まれる天然由来のAhR活性化成分について精査した。穀類、野菜エキスについて、AhR活性を検討した結果、穀類では米等に、野菜ではブロッコリー、ほうれん草等に比較的強い活性が認められた。活性を示した試料の活性画分について、含有成分の単離精製を試みたところ、米の活性画分からsinapoyl配糖体等、6種の化合物を単離することができた。またブロッコリーの活性画分から11種の化合物を得、neoscrobigenやsinapoyl配糖体に顕著なAhR活性化作用が認められ、新たな天然AhRリガンド候補成分を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：To characterize aryl hydrocarbon receptor (AhR)-activating substances in staple foods, the effects of the respective food extracts on AhR were studied. Among the extracts of grains and vegetables, those of rice, broccoli, and spinach markedly induced AhR activity. From active fractions of the rice extract, six compounds, including sinapoyl glycoside, were isolated. Chromatographic separation of an active fraction of the broccoli extract yielded eleven compounds, of which neoscrobigen and sinapoyl glycosides induced AhR activity. Thus, new natural AhR ligand candidates were characterized.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

## 1. 研究開始当初の背景

食品中のダイオキシン類量を、その毒性メカニズムを応用したバイオアッセイにより評価する中で、ダイオキシン以外のアрил炭化水素受容体 (AhR) アゴニスト候補物質の存在を確認し、当初リスク対象として天然 AhR リガンドを検討してきた。AhR は別名ダイオキシン受容体とも呼ばれ、そのリガンドはいわばダイオキシン様物質であることから健康影響が懸念されたが、ハーブや果物、健康食品含有の AhR 活性成分を精査していくと、ワインポリフェノールのレスベラトロール、プロポリス成分テクトクリシンなど、共通してヒトの健康維持に寄与する機能性成分であるという予想に反した結果を見出している。これらとダイオキシンの大きな違いは蓄積性がないことなどがあげられ、ダイオキシンは近年生じた負の人工産物であることから、AhR は元来、天然リガンド (またはその代謝物) の受容体として健康維持に大きな役割を果たしているのではないかと考察している。ダイオキシンと AhR の関連に関するリスク面での報告はこれまで多数存在するが、このベネフィット (健康維持) としての従来機能に向けたアプローチはほとんど行われていなかった。最近、この考察を裏付けるような AhR の潜在的機能に関する研究報告が見られるようになった。AhR 欠損マウスを用いた報告では、大腸に腺がんが高頻度に発生し  $\beta$ -カテニンの異常蓄積が観察されたことに着目し、AhR を活性化させることで大腸がんの原因となる  $\beta$ -カテニンの分解を促進することが解明された。すなわち、AhR リガンドは大腸がん予防因子である可能性が示唆された。大腸がんは 2020 年頃には罹患率 1 位の胃がんを超えることが予測されている。さらに発症が 30~40 歳代の若年層にも 5~10% の頻度で見られ、低年齢化も懸念されている。それゆえ、早急にその一次予防対策に向けた様々なアプローチが、検討、提案されるべき疾病である。これまでの罹患率と食生活の関係からみると、その原因として主食である穀類や野菜類の摂取減少による“日本古来の主食を軸としなくなった食生活バランスの変化”が一因としてあげられるが、食物繊維摂取と大腸がん予防の因果関係が否定されている。昨今、それを支持する科学的データは乏しい。このような背景から、大腸がん発症予防に関する様々なアプローチによる基礎データの構築は重要な研究課題になると考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはこれまで、天然由来 AhR 活性成分の共通特性として、ワインポリフェノールのレスベラトロールのような健康維持に寄与する有効成分であることを見出している。またごく最近、AhR を介した新規な大腸がん発症予防機序が解明された。そこで本研究では、研究対象に日々長期にわたり摂取

する主食食材を選択し、含有する天然 AhR 活性成分を精査して、それらの大腸がん発症予防に関して考察する。これらを足掛かりに、主食摂取による大腸がん一次予防効果の実証、さらには主食を軸としたバランスのとれた食生活の重要性のエビデンスへと展開させ、AhR シグナル伝達経路の健康維持への役割を明らかにする研究基盤の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 主食および野菜食材の AhR 活性の検討: 試料として、穀類 5 種 [米、胚芽押麦、発芽玄米、玄米 (黒米)、もちきび] および野菜類 13 種 (青ネギ、オクラ、カボチャ、キャベツ、キュウリ、ダイコン、トマト、ニンジン、ハクサイ、ピーマン、ブロッコリー、ホウレンソウ、レタス) を用いた。試料をそれぞれ、エタノール中でホモジナイズし、ろ過後、ろ液を濃縮し、凍結乾燥後、得られた濃縮物を試料抽出物とした。AhR 活性の評価は、レポータージーンアッセイ [ルシフェラーゼ遺伝子を導入した培養細胞を利用したレポータージーンアッセイ] により行った。具体的には、化合物および抽出物を DMSO に溶解して試料溶液とし、4~6 段階の濃度に DMSO で希釈して、96 穴マイクロプレート中の組換え細胞に 1 ウェルずつ暴露し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 20~24 時間培養した。培養後、培地を取り除き、ウェルを洗浄後、顕微鏡下で細胞の生存を確認し、Lysis 試薬で細胞壁を溶解後、基質としてルシフェリンを加え、ルミノメーターにより発光度 (RLU) を測定した。

(2) 主食および野菜食材中 AhR 活性化成分の検討: AhR 活性が認められた食材試料から、AhR 活性に寄与する天然 AhR リガンド候補物質について、単離、構造解析を行った。試料抽出物を *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配し、各分画物を得た。AhR 活性評価結果を指標に、活性画分について各種カラムクロマトグラフィー (Diaion HP-20, MCI-gel CHP20P, YMC gel ODS 等) による分離精製を繰り返し、単離した化合物について、NMR および MS スペクトル解析の結果に基づいて、それぞれの化学構造の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 主食および野菜食材の AhR 活性: 各種食材のエタノール抽出物について、AhR 活性を評価した。その結果、大半の試料は 100 mg/mL の高濃度において若干の AhR 活性を示した。穀類の中では白米、胚芽押麦、野菜の中ではブロッコリー、レタス、ホウレンソウの各抽出物の AhR 活性が比較的強かった。

(2) 主食および野菜食材中 AhR 活性化成分の検討: (1) の結果から、ブロッコリーおよび米の各抽出物について、天然 AhR リガンド候補成分について精査した。ブロッコリ

一抽出物の分画物について AhR 活性を評価したところ、酢酸エチル分画物に顕著な活性が認められた。そこで本分画物について Sephadex LH-20 により 10 フラクションに分け、AhR 活性を評価した。活性フラクションを中心に、各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、8 種の化合物〔adenine (1), uridine (2), neoscorbigen (3), 1-*O*-sinapoylglucose (4), 1,2-di-*O*-sinapoylgentiobiose (5), 1-*O*-sinapoyl-2-*O*-feruloylgentiobiose (6), 1,2,2'-tri-*O*-sinapoylgentiobiose (7), 1,2'-di-*O*-sinapoyl-2-*O*-feruloylgentiobiose (8)〕を単離、同定した。また *n*-ブタノール分画物についても同様に分離精製を行った結果、3 種の化合物〔phenylalanine (9), guanosine (10), neoglucobrassicin (11)〕を単離、同定した。一方、米抽出物の分画物について AhR 活性を評価したところ、酢酸エチル分画物が最も強い AhR 活性を示した。そこで酢酸エチル分画物について Diaion HP-20 による分画を行い、活性の強かった画分についてさらに成分精査を行った。その結果、adenine, adenosine, 6-*O*-sinapoylsucrose  $\beta$ -sitosterol 等を同定した。得られた化合物について AhR 活性を評価した結果、neoscorbigen, neoglucobrassicin や sinapoyl 配糖体に、天然 AhR リガンドとして報告のある indole-3-acetic acid (IAA) と比べ、顕著な活性が認められた。プロッコリーから同定された化合物の構造を図 1 に、AhR 活性の結果を図 2 に示す。

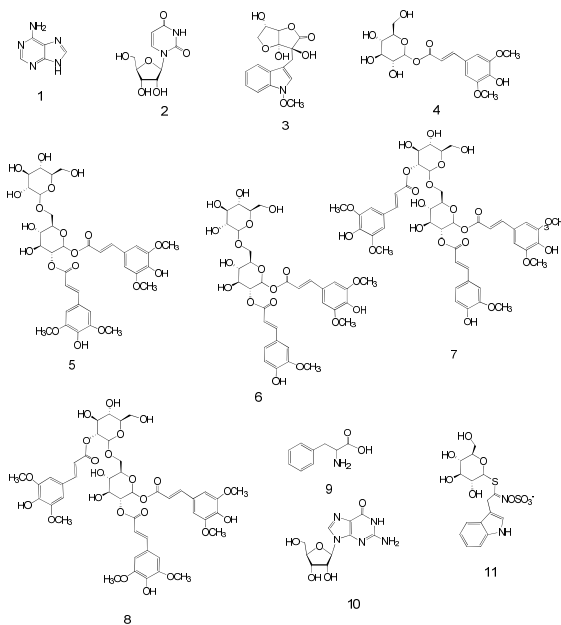


図 1 . 化合物の構造

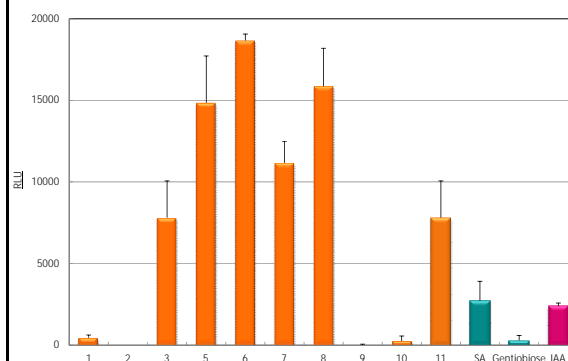


図 2 . 化合物の AhR 活性

これまでの研究から、天然 AhR リガンドの特徴として配糖体化により活性が減弱する傾向が考察されている。今回、sinapoyl 配糖体で活性が認められ、特に sinapoylgentiobiose のように二糖を含む化合物で顕著な活性を示す例ははじめてである。これらは細胞内で代謝され、アグリコンとなって活性を示す可能性もある。そこで、アグリコンの sinapic acid (SA) および構成糖の gentiobiose について、それぞれ AhR 活性を測定した結果、いずれも配糖体よりも活性が弱かった。さらに詳細な検討が必要であるが、本活性には配糖体構造が寄与している可能性が示唆された。一方、sinapoyl 基の数で活性に違いは認められなかった。これらを含めた本活性メカニズムについては今後の検討課題とされる。

米については、糖部分に AhR 活性が強い傾向が示唆されたため、今後、糖の検討が課題としてあげられる。またスクリーニングの結果から、日々食事として摂取している穀類や野菜は、強弱はあるがその大半が AhR 活性を示した。それゆえ、大腸がん発症予防への寄与を含めたこれら活性の健康維持への関与が考察された。今後、食生活におけるこれら食材と AhR 活性に関係の裏付けについても進展が期待される。

## 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 1 件)

Yoshiaki Amakura, Morio Yoshimura, Masashi Takaoka, Haruka Toda, Tomoaki Tsutsumi, Rieko Matsuda, Reiko Teshima, Masafumi Nakamura, Hiroshi Handa, Takashi Yoshida, Characterization of natural aryl hydrocarbon receptor agonists from cassia seed and rosemary, *Molecules*, 査読有, 19, 2014, 4956-4966.

〔学会発表〕(計 7 件)

森末千尋, 好村守生, 山上沙織, 堤 智昭, 松田りえ子, 手島玲子, 中村昌文, 新川菜摘, 吉田隆志, 天倉吉章, カッコに

含まれる天然 AhR リガンドの探索研究，  
第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本  
病院薬剤師会中国四国支部学術大会，  
2013.10.26-27 (愛媛)。

天倉吉章,好村守生,奈須裕樹,堤 智明,  
松田りえ子,手島玲子,中村昌文,半田  
洋士,吉田隆志,ブロッコリーに含まれ  
る AhR 活性化成分,日本生薬学会第 60 回  
年会,2013.9.7-8 (北海道)。

戸田陽香,好村守生,堤 智昭,中村昌文,  
半田洋士,松田りえ子,吉田隆志,天倉  
吉章,ローズマリーエキスに含まれる天  
然 AhR 活性成分,第 51 回日本薬学会・日  
本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国  
支部学術大会,2012.11.10-11 (島根)。

Yoshiaki Amakura, Tomoaki Tsutsumi,  
Masafumi Nakamura, Hiroshi Handa,  
Morio Yoshimura, Rieko Matsuda,  
Takashi Yoshida, Characterization of  
natural AhR ligands in vegetables and  
crude drugs, International Conference  
on Biologically Active Substances,  
Bioactive Okayama 2012, September 13  
-14, 2012 (Okayama, Japan)。

天倉吉章,堤 智昭,中村昌文,半田洋  
士,好村守生,松田りえ子,吉田隆志,  
生薬抽出物の AhR 活性化作用について,  
第 29 回和漢医薬学会学術大会,  
2012.9.1-2 (東京)

天倉吉章,堤 智昭,中村昌文,半田洋  
士,好村守生,松田りえ子,吉田隆志,  
天然食品成分の AhR 活性,第 4 回食品薬  
学シンポジウム,2011.10.28-29 (東京)

Yoshiaki Amakura, Tomoaki Tsutsumi,  
Masafumi Nakamura, Hiroshi Handa,  
Morio Yoshimura, Rieko Matsuda,  
Takashi Yoshida, Characterization of  
natural AhR ligands in health foods  
estimated by in vitro reporter gene  
assay, 31th International Symposium on  
Halogenated Persistent Organic  
Pollutants, August 21-25, 2011  
(Brussels, Belgium)。

〔図書〕

現在のところなし

〔産業財産権〕

現在のところなし

〔その他〕

現在のところなし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天倉 吉章 (AMAKURA YOSHIAKI)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：50321857