

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580182

研究課題名(和文) ケンフェロール分解物による薬物代謝第 相酵素活性化機序の解明

研究課題名(英文) Study on the activation of drug-metabolizing phase II enzymes by the consumption of the kaempferol glycoside derived from horseradish leaves

研究代表者

橋本 堂史 (HASHIMOTO, TAKASHI)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90362764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ICRマウスおよびIqI/Jic(ICR)無菌マウスを用いた研究で、西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の経口摂取による肝臓薬物代謝第 相酵素の活性化には腸内細菌が関与することを明らかにした。また、その活性本体は本ケンフェロール配糖体の分解産物である4-ヒドロキシフェニル酢酸であることを明らかにした。ケルセチン配糖体であるルチンを投与した場合でも、その分解物である3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸が肝臓の薬物代謝第 相酵素を活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The study with ICR mice and IqI/Jic(ICR) germ-free mice demonstrated that the intestinal flora was involved in the activated drug-metabolizing phase II enzymes by the consumption of 3-O-[2-O-(-D-xylopyranosyl)- -D-galactopyranosyl]-kaempferol derived from horseradish leaves. 4-Hydroxyphenylacetic acid, which is a catabolite from the kaempferol glycoside, played an important role in the activation of drug-metabolizing phase II enzymes. The consumption of rutin, one of quercetin glycosides, also activated drug-metabolizing phase II enzymes in mice, and the active compound was 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, which is a catabolite of rutin.

研究分野：栄養化学

キーワード：薬物代謝第 相酵素 ケンフェロール配糖体 西洋ワサビ葉 ICRマウス IqI/Jic(ICR)無菌マウス 4-ヒドロキシフェニル酢酸 ルチン 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸

1. 研究開始当初の背景

(1) フラボノイドを多く含む野菜の摂取量と生活習慣病の発症には負の相関があることが報告されており、その機序を明らかにするために、多くの研究がフラボノイドの様々な生体調節機能を明らかにしてきた。しかし、これまでの体内動態研究や機能性評価研究は、フラボノイドアグリコンを対象とするものがほとんどであった。一方、食事性(食べ物に含まれる)フラボノイドの多くは、配糖体として存在し、単糖が結合した一部のフラボノイド配糖体が加水分解を受けアグリコンとして小腸で吸収される。言いかえると、多くのフラボノイド配糖体は小腸で吸収されず、大腸へ運ばれると考えられる。

(2) 西洋ワサビ葉抽出物の経口投与はマウス肝臓の薬物代謝第 相酵素を活性化し、この活性化にはフラボノイドの一種であるケンフェロール-3-O-(2-O-β-D-キシロピラノシル-β-D-ガラクトピラノシド(西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体)が関与していることが明らかとなっている。しかし、このケンフェロール配糖体またはケンフェロールアグリコンをそれぞれ等モル量経口投与した時、血中のケンフェロール抱合体量はアグリコン投与グループの方が約 10 倍高かったのに対し、薬物代謝第 相酵素の活性は配糖体投与グループの方が高かった。このことは、ケンフェロール抱合体(あるいはアグリコン)が薬物代謝第 相酵素の活性を上昇させているのではないことを示唆している。

(3) また、西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体を投与したマウス血漿中には *p*-クレゾール抱合体や 4-ヒドロキシフェニル酢酸(抱合体および非抱合体)が著しく増加している。つまり、西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体は小腸で吸収されず、腸内細菌によってその C 環が開環し、B 環由来の 4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒドが生成し、その後、4-ヒドロキシフェニル酢酸、さらに *p*-クレゾールへと変換し、生体内に吸収されたのではないかと考えられる。また、薬物代謝第 相酵素の活性化には、これらの分解物が関わっているのではないかと考えられた。特に抱合を受けていない 4-ヒドロキシフェニル酢酸はマイクロモルレベルで検出できていることから、その活性本体ではないかと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の経口投与が薬物代謝第 相酵素を活性化することは既に明らかである。

本ケンフェロール配糖体の経口投与が薬物代謝第 相酵素を活性化するにあたり、腸内細菌の関与を明らかにする。

本ケンフェロール配糖体の分解物であり、かつ抱合を受けていない 4-ヒドロキシフェ

ニル酢酸が薬物代謝第 相酵素の活性化に関与することを明らかにする。

本ケンフェロール配糖体を経口投与した後の 4-ヒドロキシフェニル酢酸の血中動態を明らかにする。

(2) 西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体と同様に小腸で吸収されず、大腸で分解を受けることが報告されているルチン(ケルセチン配糖体:ケルセチン-3-ルチノシド)についても、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸へと分解された後、吸収され、薬物代謝第 相酵素を活性化することが想定される。

ルチン経口投与による薬物代謝第 相酵素の活性に及ぼす影響を調べる。

ルチン経口投与後の 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の血中動態を明らかにする。

ルチン経口投与後の薬物代謝第 相酵素の活性化における 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の薬物代謝第 相酵素活性化に関する機序について以下の順に研究を行った。

本ケンフェロール配糖体を IQI/Jic (ICR) 無菌マウスまたは通常飼育状態の ICR マウスに投与し、肝臓中の薬物代謝第 相酵素を活性化に腸内細菌が関与しているのかどうかについて調べた。

培養細胞(ヒト肝がん由来 Hepalclc7 細胞)を用い、薬物代謝第 相酵素の活性およびタンパク質発現に及ぼす 4-ヒドロキシフェニル酢酸の関与を調べた。

ICR マウスにケンフェロール配糖体を経口投与し、4-ヒドロキシフェニル酢酸の体内動態について動物個体レベルで調べた。

(2) ルチン経口投与後の薬物代謝第 相酵素活性への影響について以下の順に研究を行った。

ICR マウスにルチンを一週間経口投与した後、肝臓の薬物代謝第 相酵素の活性について調べた。

ICR マウスにルチンを経口投与したのち、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の血中動態を経時的に調べた。また、一週間投与時の蓄積量についても明らかにした。

培養細胞(ヒト肝がん由来 Hepalclc7 細胞)を用い、薬物代謝第 相酵素の活性に及ぼす 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の関与を調べた。

4. 研究成果

(1) 西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の経口摂取による肝臓中の薬物代謝第 相酵素(グルタチオン S-転移酵素およびキノンレダクターゼ)の活性化に腸内細菌による分解物が関与しているのかどうかを明らかにするため、IQI/Jic(ICR)無菌マウスに本ケン

フェロール配糖体を一週間摂取させた。その結果、無菌マウスでは薬物代謝第 相酵素の活性化は見られなかった。また、分解物である 4-ヒドロキシフェニル酢酸、ケンフェロール、*p*-クレゾールなどの増加も見られなかった。また、本ケンフェロール配糖体は小腸において糖部分が消化酵素による加水分解を受けてケンフェロール（アグリコン状態）として吸収されないことが明らかとなっている。これらのことから本ケンフェロール配糖体の経口摂取による薬物代謝第 相酵素の活性化には腸内細菌が関与していることを明らかにした。

ICR マウスに本ケンフェロール配糖体を飲水に混ぜて一週間自由摂取させると抱合を受けていない 4-ヒドロキシフェニル酢酸が 5 μ M から 10 μ M の濃度で血漿中に確認された。このことから、これらの濃度の 4-ヒドロキシフェニル酢酸を Hepalclc7 に作用させ、薬物代謝第 相酵素であるキノンレダクターゼ活性に及ぼす影響を調べた。4-ヒドロキシフェニル酢酸で処理した細胞では、6 時間後にキノンレダクターゼのタンパク量および活性が増加しており、その活性増加は濃度依存的なものであった。一般的に抱合体は抱合を受けていないものと比べ、生体調節機能が低下すると考えられている。これらのことから抱合を受けていない 4-ヒドロキシフェニル酢酸が薬物代謝第 相酵素の活性化に関わる重要なケンフェロール配糖体由来の活性物質であると考えた。

また、本ケンフェロール配糖体を経口投与したときの 4-ヒドロキシフェニル酢酸の体内動態を明らかにするため、ICR マウスに 100 mg/kg 体重の本ケンフェロール配糖体を単回投与し、抱合を受けていない 4-ヒドロキシフェニル酢酸量を測定することで血中動態パラメーターを解析した。最高血中濃度到達時間は 2.0 時間で、その時の濃度は 100 μ M、また AUC ∞ は 2.0 mmol/L \cdot h であった。

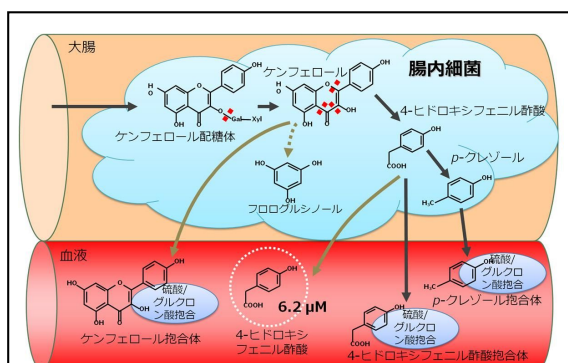


図 1 西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の分解・経路

以上のことから西洋ワサビ葉由来ケンフェロール配糖体の経口摂取による肝臓薬物代謝第 相酵素の活性化には腸内細菌が関

与し、その活性本体は本ケンフェロール配糖体の分解物である 4-ヒドロキシフェニル酢酸であることを明らかにした（図 1）。

（2）ルチン経口摂取時における肝臓の薬物代謝第 相酵素におよぼす影響を明らかにするため、ルチンを飲水に混ぜ、ICR マウスに一週間自由摂取させた後、肝臓中のキノンレダクターゼ活性を測定した。ルチン経口投与はキノンレダクターゼ活性を増加させた。また、ルチンの分解物であると考えられる 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の肝臓蓄積量が上昇していた。ルチン投与後の 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の血中動態を明らかにするために、ICR マウスに 50 mg/kg 体重となるようにルチンを経口投与後、経時的に解剖し、血中 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸およびその抱合体濃度を測定したところ、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸および 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸抱合体の最高血中濃度到達時間はそれぞれ 4 時間および 3 時間で、その際の濃度は 47 nM および 327 nM であった。

さらに 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸がキノンレダクターゼ活性の上昇に関与していることを明らかにするため、ICR マウスにリン酸緩衝生理食塩水（コントロール）または 7.5 μ M 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸水溶液を一週間尾静脈より投与した後、肝臓のキノンレダクターゼ活性及び 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸量を測定した。コントロール群と比較して、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸投与群では肝臓のキノンレダクターゼ活性が上昇傾向にあり（ $p=0.05$ ）、肝臓に存在する 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸量とキノンレダクターゼ活性には相関関係があることを明らかにした（寄与率 $r^2=0.698$ ）（図 2）。

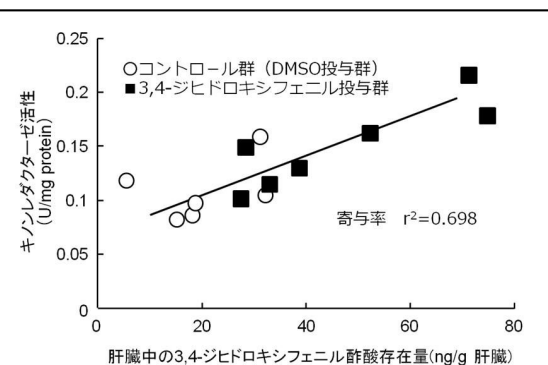


図 2 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸の肝臓蓄積量とキノンレダクターゼ活性の相関

最後に、細胞レベルにおいて 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸がキノンレダクターゼ活性に及ぼす影響を調べるため、マウス肝臓由来 Hepalclc7 細胞を 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸で処理、培養した後、キノンレダクターゼ活性の測定を行った。1 μ M 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸処理後 48 時間でコントロ

ール群 (0.01% DMSO) に比べ、有意にキノ
ンレダクターゼ活性が上昇した。

以上のことから、ケルセチン配糖体である
ルチンを投与した場合でも、その分解物である
3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸が肝臓の薬
物代謝第 相酵素を活性化することを明らか
にした。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

岩見志歩、橋本堂史、下秋智寛、金沢和
樹、ケンフェロール-3-O- (2-O-β-D-キシ
ロピラノシル)-β-D-ガラクトピラノシ
ドによる薬物代謝第二相酵素の活性化に
関する研究、第 67 回 日本栄養・食糧学
会大会、2013.5.24-26、名古屋大学(愛知
県)

Shiho Iwami, Takashi Hashimoto, Tomohiro
Shimoaki, Kazuki Kanazawa, Activation
mechanism of drug- metabolizing phase II
enzymes by 3-O-
[2-O-(β-D-xylopyranosyl)-β-D-galactopyran
osyl]-kaempferol, IUNS 20th International
Congress of Nutrition, 2013.9.15-20,
Granada, (Spain)

岩見志歩、橋本堂史、藍原祥子、水野雅
史、ルチン経口投与によるマウス薬物代
謝第 相酵素に及ぼす影響、第 68 回 日
本栄養・食糧学会大会、2014.5.30.-6.1、
酪農学園大学(北海道)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 堂史 (HASHIMOTO, Takashi)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：90362764

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

水野 雅史 (MIZUNO, Masashi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：

(4)研究協力者

岩見 志歩 (IWAMI, Shiho)
下秋 智寛 (SHIMOAKI, Tomohiro)
岡本 真弓 (OKAMOTO, Mayumi)
金沢 和樹 (KANAZAWA, Kazuki)
藍原 祥子 (AIHARA, Yoshiko)