

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25504015

研究課題名(和文)食品由来硫化水素ドナー化合物を用いたアルツハイマー病予防法開発に関する研究

研究課題名(英文)A study of hydrogen sulfide donor to prevent alzheimer's disease

研究代表者

細野 崇 (HOSONO, Takashi)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80445741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は食品成分によるアルツハイマー病予防効果について研究を行った。ガーリック香気成分のDiallyl trisulfide (DATS)が硫化水素ドナー化合物であることを見出した。アミロイド $\beta$ は神経成長因子で分化誘導されたPC12細胞や初代培養のラット神経細胞に神経細胞傷害を誘導した。DATSや他の硫化水素ドナーはアミロイド $\beta$ による神経細胞傷害に対して保護作用を示さなかった。一方、DATSに抗炎症作用があること、その作用メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the protective effect of food factor on Alzheimer's disease. We found that diallyl trisulfide (DATS) derived from garlic is hydrogen sulfide donor compound. Amyloid  $\beta$  induced neuronal cell death in primary neuronal cell cultures and neuronal cell line PC12. DATS and other hydrogen sulfide donor compounds had little effects on neuronal cell death induced by amyloid  $\beta$ . We revealed that DATS has anti-inflammatory activity.

研究分野：食品科学、神経科学、細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病 硫化水素 ガーリック 神経細胞 アミロイド

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、認知機能低下や人格の変化を主な症状とする認知症の一種であり、主なリスクファクターは加齢である。脳の神経細胞の減少や脳の萎縮、脳への老人斑・神経原線維変化の出現を特徴としている。脳の中にアミロイドβと呼ばれるタンパク質が脳内に蓄積することが原因の一つとされており、その結果、神経細胞が変性・脱落することで、脳の機能が低下し、認知機能が低下すると考えられている。しかしながら、アルツハイマー病の明確な原因は不明である。

硫化水素(H<sub>2</sub>S)は噴火口や温泉地で鼻につく卵の腐ったにおいの正体であり、一般には毒ガスとして知られている。一方、生体内では一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第3のガス性シグナル伝達物質として働くことが注目されている。1989年から1990年にかけてヒトやラットの脳に硫化水素が存在することが確認され(Goodwin *et. al.*, 1989)、含硫アミノ酸の代謝で硫化水素が生じることが明らかにされた。その意義として、硫化水素が生理的な血管拡張因子であること、硫化水素が抗酸化物質グルタチオンレベルを高めること、それを介して神経細胞を保護することなどが報告されている(Kimura and Kimura, 2004)。そのため、硫化水素の生理活性と医学応用への可能性に関心が高まり、NaHS製剤や硫化水素放出型アスピリンなどの硫化水素ドナー製剤の開発と臨床試験が行われている(Kodela *et. al.*, 2012, Predmore and Lefer, 2010)。

これまでに申請者らはガーリック香気成分の diallyl trisulfide (DATS, CH<sub>2</sub>=CHCH<sub>2</sub>-SSS-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>) に強いがん細胞の増殖抑制活性があること、細胞分裂に必要なタンパク質であるβ-tubulin のシステイン残基を S-allyl 修飾することで紡錘糸の形成を阻害し、細胞分裂を阻害することを報告している(Hosono *et. al.*, 2005, Hosono *et. al.*, 2008)。DATS が生体内のタンパク質やペプチドのSH基と反応する際、その副生成物として硫化水素を生じることが報告されており、DATS が食品由来の硫化水素ドナー化合物であることが示唆されている(Benavides *et. al.*, 2007)。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病の原因はまだ分かっていない。しかし、臨床的には脳内でアミロイドβが凝集してアミロイド斑として沈着し、やがて神経細胞が死滅することから、アミロイドβがアルツハイマー病の原因物質と考えるアミロイド・カスケード仮説が有力となっている。本研究では、ガーリック香気成分の DATS が硫化水素ドナーとなりえるか、硫化水素ドナーがアミロイドβによる神経細胞傷害を抑制することによりアルツハイマー病を予防できるか検証することを目的に研究を行った。また、アミロイドβはミクログリアを活性化す

ることで脳内炎症を引き起こし、アルツハイマー病態の進行に関与することから、抗炎症作用についてもあわせて検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) DATS の硫化水素ドナー活性の評価

DATS とグルタチオンやシステインを反応させ、硫化水素が生成するか、反応溶液をメチレンブルー吸光度法により硫化水素が生成されるか検討した。また、DATS の側鎖が異なる dipropyl trisulfide (DPTS, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-SSS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) の反応性の比較を行った。

### (2) DATS がアミロイドβによる神経細胞の細胞死に及ぼす影響

神経成長因子で分化誘導された PC12 細胞や初代培養のラット神経細胞に DATS とアミロイドβを作用させ、その後の細胞生存率やアポトーシスについて LDH assay や Caspase-3 の活性化で評価した。

### (3) DATS がマクロファージの炎症応答に及ぼす影響

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に DATS を作用させた後、Lipopolysaccharide (LPS) 刺激を行い、炎症性サイトカインやケモカイン産生と炎症シグナルに及ぼす影響について評価した。

## 4. 研究成果

### (1) DATS の硫化水素ドナー活性の評価

DATS とグルタチオンやシステインを混合することで、硫化水素の生成が確認された。また、DATS の側鎖が異なる DPTS とグルタチオン、システインとの反応性を比較したところ、その反応性は DATS が DPTS と比べて高いことが明らかとなった。以上の結果から、DATS はグルタチオンやシステイン、あるいはタンパク質の SH 基と反応することで微量の硫化水素を生成し、硫化水素ドナーとなることが明らかとなった。

### (2) DATS がアミロイドβによる神経細胞の細胞死に及ぼす影響

PC12 細胞と初代培養のラット神経細胞にアミロイドβを 24 時間作用させ、その後の培地中の LDH 活性を測定したところ、アミロイドβ処理によって神経細胞が傷害されることを確認した。さらに、Caspase-3 の活性化を Western blotting により評価したところ、Caspase-3 の活性化が認められ、アミロイドβは神経細胞にアポトーシスを誘導することを確認した。

その条件下において、DATS を前処理することで神経細胞の細胞死が抑制されるか検討した。DATS を前処理した神経細胞においても、未処理の神経細胞と同程度のアミロイドβによる細胞死、Caspase-3 の活性化が観察され

た。また、硫化水素ドナーである硫化ナトリウム  $\text{Na}_2\text{S}$  や硫化水素ナトリウム  $\text{NaHS}$  を用いて同様の検討を行ったが、DATS 同様、アミロイド $\beta$ による細胞死からの保護作用は見られなかった。これらの結果から、硫化水素ドナーはアミロイド $\beta$ による神経細胞の細胞死に対して保護作用を示さないことが明らかとなった。

### (3) DATS がマクロファージの炎症応答に及ぼす影響

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に LPS を作用させることで、炎症性サイトカインの Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やケモカインの Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) の遺伝子発現が誘導される。DATS の前処理によって、TNF- $\alpha$  や MCP-1 の遺伝子発現が抑制されることを確認した(下図)。また、LPS による炎症シグナルを解析したところ、DATS は NF $\kappa$ B の核内移行を抑制した。さらに DATS は LPS 受容体の TLR4 の活性化を阻害した。DATS による抗炎症作用はグルタチオンやシステインと DATS を予め反応させることで見られなくなった。また、硫化水素ドナーの硫化水素ドナーである硫化ナトリウム  $\text{Na}_2\text{S}$  や硫化水素ナトリウム  $\text{NaHS}$  に抗炎症活性は認められなかった。このことから、DATS は硫化水素ドナーとして抗炎症作用を示したのではないと考えられる。

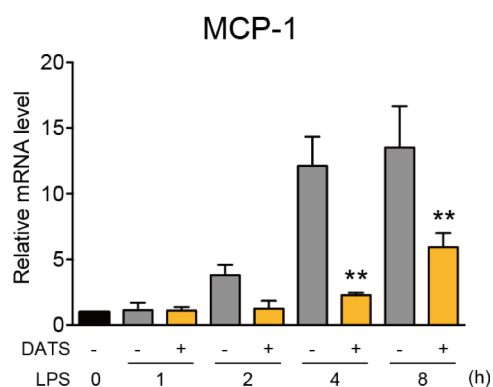


図 DATS は LPS によって誘導される MCP-1 遺伝子発現を抑制する

以上、本研究の結果、ガーリック香気成分の DATS に硫化水素ドナーとなることを見出したものの、アミロイド $\beta$ による神経細胞傷害を抑制することはできなかった。一方、LPS による炎症応答を抑制すること、そのメカニズムについて明らかとした。タンパク質の SH 基は、ジスルフィド結合の形成を介して立体構造が大きく変化し、活性が調節される。システイン残基を酸化修飾することはジスルフィド形成を阻害し、タンパク質の機能を阻害することにつながる。硫化水素による生理機能発現の一端は、ポリサルファイドによると考えられていることから(Miyamoto *et. al.*, 2017)、DATS と硫化水素は共通した生理機能発

現メカニズムが存在すると予想される。今後は DATS が標的とするタンパク質 SH 基を探索することで、DATS がどのような生理機能を発揮するかについて検討する必要がある。

### 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 3 件)

① Seki T, Hosono T. Prevention of Cardiovascular Diseases by Garlic-Derived Sulfur Compounds. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* (査読有) 61 Suppl (2015) S83- S85

② Watanabe K, Hosono T, Watanabe K, Hosono-Fukao T, Ariga T, Seki T. Diallyl trisulfide induces apoptosis in Jurkat cells by the modification of cysteine residues in thioredoxin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) 78(8), 2014, 1418-1420.

③ Suda S, Watanabe K, Tanaka Y, Watanabe K, Tanaka R, Ogihara J, Ariga T, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T. Identification of molecular target of diallyl trisulfide in leukemic cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (査読有) 78(8), 2014, 1415-1417.

[学会発表] (計 25 件)

① 細野 崇、奥江 紗知子、飯塚美玖、増澤(尾崎)依、関 泰一郎、ガーリック由来有機硫黄化合物 diallyl trisulfide は LPS によって誘導される TLR4 活性化を阻害する、第 71 回日本栄養・食糧学会、2017 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

② 奥江 紗知子、今井孝俊、日吉滉平、飯塚美玖、横山令奈、増澤(尾崎)依、細野 崇、関泰一郎、ガーリック由来有機硫黄化合物の抗炎症作用メカニズムの解明、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学(京都府・京都市)

③ 奥江 紗知子、今井孝俊、日吉滉平、横山令奈、増澤(尾崎)依、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来有機硫黄化合物 diallyl trisulfide の抗炎症作用メカニズムの解明、第 21 回日本フードファクター学会、2016 年 11 月 19 日、富山国際会議場大手町フォーラム(富山県・富山市)

- ④ 中口夏美、佐藤 明日香、増澤(尾崎) 依、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分の血小板凝集抑制作用、第21回日本フードファクター学会、2016年11月19日、富山国際会議場大手町フォーラム(富山県・富山市)
- ⑤ 中口夏美、佐藤 明日香、増澤 依、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック香氣成分による血小板凝集の抑制効果について、第31回日本香辛料研究会、2016年10月9日、長濱勤労者福祉会館「臨湖」(滋賀県・長浜市)
- ⑥ 奥江 紗知子、今井孝俊、日吉滉平、船戸里香、中口夏美、林 浩和、横山令奈、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来有機硫黄化合物の抗炎症作用とその作用メカニズムに関する研究、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016年5月14日、武庫川女子大学 中央キャンパス(兵庫県・西宮市)
- ⑦ 荒木彩花、矢口真実、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分 diallyl trisulfide によるタンパク質分解系を介した第一相薬物代謝酵素 CYP2E1 発現抑制機構の解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑧ 奥江 紗知子、今井孝俊、日吉滉平、荒木彩花、矢口真実、船戸里香、林 浩和、小島 貴之、横山令奈、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分 diallyl trisulfide の抗炎症作用メカニズムの解明、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑨ 矢口真実、荒木彩花、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分が外因系凝固に及ぼす影響、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- ⑩ 荒木 彩花、矢口 真実、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分による CYP2E1 タンパク質発現抑制機構の解明、第30回日本香辛料研究会、2015年12月11日、龍谷大学 響都ホール(京都府・京都市)
- ⑪ 奥江 紗知子、今井 孝俊、荒木 彩花、矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック香氣成分 diallyl trisulfide の抗炎症作用メカニズムの解明、第30回日本香辛料研究会、2015年12月11日、龍谷大学 響都ホール(京都府・京都市)
- ⑫ 矢口 真実、荒木 彩花、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分が血液凝固因子 Tissue Factor に及ぼす影響、第30回日本香辛料研究会、2015年12月11日、龍谷大学 響都ホール(京都府・京都市)
- ⑬ Sayaka Araki, Koji Kimura, Manami Yaguchi, Rika Funado, Sachiko Okue, Takashi Hosono, Taiichiro Seki. Diallyl trisulfide prevents the acetaminophen-induced liver injury through the posttranslational regulation of CYP2E1 protein expression. ICoff2015, 2015.11.23. (Seoul, South Korea)
- ⑭ Sachiko Okue, Takatoshi Imai, Kohei Hiyoshi, Sayaka Araki, Manami Yaguchi, Takashi Hosono, Taiichiro Seki. Anti-inflammatory activity of allyl sulfide derived from garlic. ICoff2015, 2015.11.23. (Seoul, South Korea)
- ⑮ Manami Yaguchi, Asuka Sato, Sayaka Araki, Sachiko Okue, Takashi Hosono, Satoshi Nishimura, Taiichiro Seki. Diallyl trisulfide inhibits thrombus formation through the inhibition of both platelet aggregation and extrinsic coagulation pathway. ICoff2015, 2015.11.23. (Seoul, South Korea).
- ⑯ 矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来スルフィドの抗血栓作用とそのメカニズムの解明、第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月23日、甲府市総合市民会館(山梨県・甲府市)
- ⑰ Sayaka Araki, Koji Kimura, Ayano Kugu, Takashi Hosono, Taiichiro Seki. Diallyl trisulfide protects the liver from acetaminophen induced intoxication. ACN2015, 2015.5.16. Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama)
- ⑱ Manami Yaguchi, Asuka Sato, Takashi Hosono, Nishimura Satoshi, Taiichiro Seki. The effect of flavor compounds derived from garlic on thrombus formation. ACN2015, 2015.5.16. Pacifico Yokohama (Kanagawa, Yokohama)
- ⑲ 日吉滉平、細野 崇、関 泰一郎、Diallyl trisulfide の LPS/D-GaIN 誘導性劇症肝炎予防効果、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)
- ⑳ 矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分の抗血栓作用の解明、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)
- ㉑ 矢口真実、細野 崇、西村 智、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分の抗血栓作用とそのメカニズム、第19回日本フードファクター学会、2014年11月8日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

② 荒木彩花、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分 diallyl trisulfide による第一相薬物代謝酵素 CYP2E1 ならびに CYP3A4 発現調節機構の解明、第 29 回日本香辛料研究会 学術講演会、2014 年 10 月 25 日、札幌ガーデンパレス（北海道・札幌市）

③ 矢口真実、細野 崇、関 泰一郎、ガーリック由来香氣成分が外因系血液凝固に及ぼす影響、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、酪農学園大学（北海道・江別市）

④ 細野 崇、佐藤明日香、関 泰一郎、ガーリック香氣成分 diallyl trisulfide は $\alpha$ IIb $\beta$ 3 と P-selectin 発現と血小板凝集を抑制する、第 36 回日本血栓止血学会 学術集会、2014 年 5 月 30 日、大阪国際交流センター（大阪府・大阪市）

⑤ 荒木彩花、久宮彩乃、秋葉知奈、山口花梨、細野 崇、関 泰一郎、第 1 相薬物代謝酵素シトクロム P450 2E1 の発現の特徴と diallyl trisulfide による抑制メカニズム、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県・川崎市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~eiyo/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細野 崇 (HOSONO, Takashi)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80445741