

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870681

研究課題名(和文) 脂肪肝形成抑制効果を有するいんげん豆抽出物中の生理活性成分の同定と有効性の検証

研究課題名(英文) Identification and investigation the efficacy of biologically active substances inhibiting effect for hepatic steatosis formation in common bean extract

研究代表者

瀬尾 誠 (SEO, Makoto)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：10406473

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)：これまでの研究過程において、顕著な脂肪肝形成抑制効果を示したいんげん豆抽出物中に含まれる生理活性成分の単離・同定を試みた。研究期間中に様々な抽出方法を試したのであるが、以前のように顕著な脂肪肝形成抑制効果を有する分画を得ることができなかった。原因として、収穫年度や収穫地によって、抽出物に含まれる成分に違いがあったことが考えられた。よって、本研究課題では生理活性成分の同定後、動物実験により有効性を検証する予定であったが、動物実験は中止して残りの研究費は返納することにした。

研究成果の概要(英文)：I tried to isolate and identify physiologically active substances in common bean extract that showed remarkable inhibitory effect of hepatic steatosis formation in our previous research process. While I tried various extraction methods during the research period, it was impossible to obtain a fraction having remarkable inhibitory effects of hepatic steatosis formation as before. Due to the harvest year and harvest site of common beans, I thought that there was a difference in ingredients contained in the common bean extract. Therefore, in this research project, after the identification of physiologically active ingredients, we plan to verify the effectiveness by animal experiments, but we decided to stop animal experiments and returned the remaining research fund.

研究分野：衛生薬学、生活科学

キーワード：いんげん豆 リノール酸 肝臓細胞 脂肪滴蓄積 生理活性成分

1. 研究開始当初の背景

近年、食事由来の過剰な脂質摂取による脂質代謝異常を起因とする肥満や動脈硬化症など生活習慣病発症率は、我が国のみならず欧米の先進諸国においても顕著に増加しており、それらの発症予防および改善方法の確立が急務となっている。

伝統的な日本食材である豆類は、良質なタンパク質、ミネラルや栄養素を豊富に含んでおり、ヘルシーで栄養価が高い食物である。数多くある食用豆の中でも、特に大豆に含まれる生理活性成分として注目されているβ-コングリシニンのような難溶性ポリペプチドやイソフラボン類は、以前から研究対象となっており、抗腫瘍作用や抗酸化・抗炎症作用など数多くの生体機能調節作用を有することが国内・国外で数多く報告されてきた。また大豆は、血中コレステロールやトリグリセリド濃度低下作用を有することが、動物実験だけでなくヒトにおいても実証されている。一方、大豆以外の食用豆が有する生体機能調節作用、特に脂質代謝調節作用に関する報告は、ほとんどなされていないのが現状である。

これまでに研究代表者は、「ある種のいんげん豆」抽出物が、肝臓細胞内への脂肪滴蓄積を顕著に抑制することを見出してきた。また、その作用機構として、いんげん豆抽出物は、脂質代謝関連酵素群の発現を転写活性レベルで調節することで脂質ホメオスタシス改善効果を示すことを *in vitro* 実験および *in vivo* 実験によって明らかにしてきた。

しかしこれまでの研究過程において、当該いんげん豆抽出物中の脂質ホメオスタシス改善効果を示した生理活性成分を同定するまでは至っていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者がこれまでに得てきた研究成果より、「ある種のいんげん豆」抽出物には、脂肪肝形成抑制効果を有する生理活性成分が含まれていることが明らかであると考えられた。

そこで本研究課題では、脂肪肝形成抑制効果を有するいんげん豆抽出物中の生理活性成分の同定をヒト培養肝臓細胞による *in vitro* 脂肪肝形成モデルにて行い、さらに最終的に同定した生理活性成分が *in vivo* 脂肪肝モデル実験においても有効性を示すことを実証することを本研究課題の目的とした。

生理活性成分の同定に用いる *in vitro* 脂肪肝形成モデルは、研究代表者がこれまでの研究過程において確立し、数多くあるいん

げん豆の中でも、本研究課題で研究対象として選定した「ある種のいんげん豆」抽出物の絞り込みを行った手法である。

まずは、上記 *in vitro* 脂肪肝形成モデルに対して、いんげん豆抽出物から得た分画を添加した際に、顕著な脂肪滴蓄積抑制効果を示す分画の精製とスクリーニングを繰り返し、最終的には LC-MS などの分析手法を用いて単一成分として同定まで行うこととした。

3. 研究の方法

(1) いんげん豆抽出物の分画調製

クルードないんげん豆抽出物は、従来調製してきた通り、乾燥いんげん豆をミルで破碎し、含水エタノールで一晩静置した後、上清をフィルター濾過して調製した。

固相抽出では、前述したいんげん豆の粗抽出物を Bond Elut (Agilent Technologies, USA) を用いて、いんげん豆抽出物を数種類の有機溶媒それぞれを 10%, 30%, 60%, 90% 抽出液にて溶出した分画を作製し、濾過滅菌した。

これらと別に限外濾過法では、VIVASPIN (Sartorius Stedim biotech, Germany) を用いて 3,000, 5000, 10,000, 30,000 kDa カットオフの各カートリッジでペプチド成分を分子量ごとに細かく抽出した分画を濾過滅菌した。

これらの各分画は、使用時まで常温で遮光保存した。

(2) *in vitro* 脂肪肝形成モデルによる活性分画のスクリーニング

各分画における脂肪肝形成に対する改善効果の評価は、ヒト初代培養肝臓細胞 (ACBRI1601 細胞) またはヒト肝臓がん細胞 (HepG2 細胞) を用いた *in vitro* 脂肪肝形成モデルを用いた。すなわち、各培養肝臓細胞を 4 穴チャンバースライド (Falcon, Corning Inc., USA) に播種した後、高濃度長鎖脂肪酸として 0.5 mM リノール酸 - 0.5 % BSA (Sigma-Aldrich Co. LLC, Germany) を添加すると同時に各分画を添加した。24 時間後、PBS で洗浄した後、Oil Red O 染色して細胞内への脂肪滴蓄積の程度を BZ-X710 (KEYENCE 社) により形態観察して評価した。

また別に 24 well プレート (Falcon, Corning Inc., USA) に播種した肝臓細胞にも同様に 0.5 mM リノール酸 - 0.5 % BSA を添加すると同時に各分画を添加した。24 時間後、PBS で洗浄した後、Oil Red O 染色した。PBS で洗浄後、100 % イソプロパノールで細胞内の脂肪滴を染めた色素を抽出し、吸光度 (測定波長 490 nm) を測定し

た。吸光度の数値の減少を脂肪滴減少の指標とし、脂肪滴蓄積の変化の程度を評価した。

(3) 細胞内脂質濃度の測定

ヒト初代培養肝臓細胞 (ACBRI1601 細胞) またはヒト肝臓がん細胞 (HepG2 細胞) を 10 cm ディッシュ (TPP, Switzerland) に播種した後、0.5 mM リノール酸 - 0.5 % BSA (Sigma-Aldrich Co. LLC, Germany) を添加すると同時に各分画を添加した。24 時間後、PBS で洗浄した後、細胞を回収してソニケーションして細胞破砕液を調製した。Folch 法により細胞内脂質を抽出し、クロロホルム層を蒸発させた後、10 % TritonX 100-イソプロパノール溶液にて脂質を溶解して試験溶液とした。

細胞内脂質の測定は、トリグリセライドテスト-E ワコー、コレステロール E-テストワコーなど市販の測定キットを用いて、各種細胞内脂質濃度を測定した。

4. 研究成果

これまでに研究代表者は、クルードないんげん豆抽出物を用い、*in vitro* 脂肪肝形成モデルに対する脂肪滴蓄積抑制効果並びに細胞内脂質減少効果を見出し、さらに高脂肪食負荷マウスによる *in vivo* 脂肪肝形成モデルにおいても、同様にクルードないんげん豆抽出物の継続的な摂取により体重増加に対する抑制効果、脂肪肝形成抑制効果ならびに血清中脂質濃度低下効果が認められることを実証してきた。よって、本研究課題では、まず *in vitro* 脂肪肝形成モデルにに対する抑制効果を示す分画を絞り込み、いんげん豆抽出物中の生理活性成分の単離・同定を目指し、さらに *in vivo* 高脂肪食負荷実験による有効性の検証を試みる研究計画を立案した。そこで、まずはクルードないんげん豆抽出物中の生理活性成分を含んでいる可能性が高い分画を得ることを第一目標とし、分画の調製を行なった。

本研究課題の初年度には、クルードないんげん豆抽出物から各種クロマトグラフィーや固相抽出法により分画を作製し、脂肪滴蓄積に対して「顕著」までは至らなかったが、脂肪滴蓄積を抑制することが期待できる分画を複数見出すことができ、同様に細胞内脂質濃度も低下する分画をいくつか見出すことができたのであるが、当該研究期間途中で所属研究機関を移動し、新たに購入したいんげん豆を用いて従来通りクルードないんげん豆抽出物を調製して分画を作製したのであるが、以前までのような脂肪肝形成抑制効果をもつ抽出物を得ることができなくなった。

原因の一つとして、収穫年度や収穫地域が

異なるいんげん豆を用いて抽出物を作製したため、抽出物に含まれる成分などが異なっているのではないかと考えられた。研究期間中に何度かいんげん豆を購入し直し、抽出物の作製を行なったのであるが、最終的に *in vitro* 脂肪肝形成モデルにおける脂肪滴蓄積抑制効果を有するいんげん豆抽出物中の生理活性成分の単離・同定まで遂行できなかった。よって、*in vivo* 実験は中止して未使用の研究費を返納することとした。

本研究課題の研究期間内では、残念ながらクルードないんげん豆抽出物中の脂質ホメオスタシス改善効果を有する生理活性成分の単離・同定には至らなかった。

しかし、これからも引き続きいんげん豆抽出物の作成と *in vitro* 脂肪肝形成モデルによる脂肪滴蓄積抑制効果の評価を継続し、脂肪滴蓄積抑制効果を認めるいんげん豆抽出物入手することができれば、まず原材料の確保と生理活性成分の同定を早急に行なうこととする。

また今後、生理活性成分を単離・同定した後、有機化学や分析化学の専門家の方々とタイアップして組織的な研究体制を構築し、本研究を推進していきたいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

瀬尾 誠 (SEO, Makoto)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：10406473