

|           |   |                                   |   |                                   |   |         |
|-----------|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|---------|
| 申請者       | 学科名   | 栄養学科                              | 職名  | 教授                                | 氏名  | 高橋 吉孝 印 |
| 調査研究課題    | アラキドン酸代謝経路を標的とする慢性疾患治療法ならびに予防法の開発を目指した研究  |                                   |   |                                   |   |         |
| 交付決定額     | 1,400,000円  |                                   |   |                                   |   |         |
| 調査研究組織    | 氏名  | 所属・職                              |   | 専門分野                              | 役割分担  |         |
|           | 代表  | 高橋 吉孝                             | 栄養学科・教授   | 病態生化学                             | 研究総括・酵素活性測定   |         |
|           | 分担者   | 山本 登志子<br>川上 祐生<br>大槻 朱美<br>木下 麻衣 | 栄養学科・准教授<br>栄養学科・助教<br>栄養学専攻・修士2年生<br>栄養学専攻・修士2年生 | 分子組織化学<br>食品機能学<br>基礎栄養学<br>基礎栄養学 | 免疫染色、細胞培養実験<br>成分分析、動物実験<br>機能性成分有効性評価<br>変異型単鎖抗体作成 |         |
| 調査研究実績の概要 | <p>本研究では、アラキドン酸代謝経路の慢性疾患との関わりを明らかにしていくとともに、これらの経路を修飾することにより作用する新たな疾患治療薬や機能性食品を見出すことを目的とする。動脈硬化、神経変性疾患、癌や肺線維症のような慢性疾患には、これまで確実な予防法や治療法が知られておらず、本研究のようなこれまでにないアプローチにより、これらに有効な治療薬や食品機能性成分が発見されれば、その医学的ならびに学術的意義は極めて大きいと考えられる。本年度は以下の4つの研究について実施した。</p> <p><b>1. 12-リポキシゲナーゼが関わる慢性疾患の予防を目指した機能性食品の探索</b></p> <p>12-リポキシゲナーゼは動脈硬化の発症に重要な酸化LDL生成に関わる酵素であり、その阻害により動脈硬化発症の予防が期待される。今回、中国茶に含まれる白血球型12-リポキシゲナーゼを阻害する新規成分の解明に向けて研究を行った。12種類の中国茶の50%エタノール抽出物による白血球型12-リポキシゲナーゼの阻害効果を検討したところ、7種類がIC<sub>50</sub> 20 μg/ml以下で阻害した。この中で、本酵素を阻害することが知られているカテキン類の含有量が最も少ない青山緑水についてさらに調べた。本酵素の阻害活性を指標として、逆相HPLCにより抽出物に含まれる成分の精製を行い、2種類の化合物を単離した。これらの化合物は、光照射によって相互に変換する新規のモノテルペン配糖体であることが、各種の分光化学的解析結果から明らかとなり、それぞれLiguroside AおよびLiguroside Bと命名した。Liguroside AおよびLiguroside Bの白血球型12-リポキシゲナーゼに対するIC<sub>50</sub>はそれぞれ1.7 μMおよび0.7 μMであった。今後は、青山緑水中に含まれる白血球型12-リポキシゲナーゼ阻害成分をさらに明らかにするとともに、その阻害メカニズムの解明、酸化LDL生成抑制作用、モデル動物を用いた動脈硬化抑制作用についても検討していく必要がある。</p> |                                   |   |                                   |   |         |

|                  |   |
|------------------|---|
| <p>調査研究実績の概要</p> | <p><b>2. 肺線維症に対する抗体治療薬としての抗ロイコトリエン単鎖抗体の応用</b><br/> ロイコトリエン(LT)受容体ノックアウトマウスにおいて、肺線維症の病態が軽減されることが報告されている。これまで開発してきたLT単鎖抗体を分子生物学的手法により、高い治療効果が期待される変異型LT単鎖抗体の作製を目指す。今回、抗体のL鎖の可変領域上のいくつかのアミノ酸を変異させ、変異型LT単鎖抗体を大腸菌で発現させた。変異型単鎖抗体のLTC<sub>4</sub>に対する結合親和性を酵素免疫測定法により確認したところ、これらの変異体の中に、結合親和性が野生型単鎖抗体と比較して顕著に低下したのが見出された。また、LTC<sub>4</sub>との結合親和性は保たれていたが、LTE<sub>4</sub>への親和性が野生型単鎖抗体と比較して上昇したものがあつた。しかし、大腸菌での発現は、発現量が少ないこと、また元のモノクローナル抗体と比較してLTC<sub>4</sub>との結合親和性が大きく低下するという問題があつたため、酵母を用いた単鎖抗体の発現を試みた。酵母で発現した単鎖抗体の結合親和性は大腸菌で発現した抗体と比較して発現量が増加しただけでなく、結合親和性も上昇した。LTE<sub>4</sub>への親和性が野生型単鎖抗体と比較して上昇した変異体について酵母菌で発現して調べたところ、大腸菌での発現と同様の結果が得られた。今後、種々の変異型単鎖抗体の作成を進めることで、抗体のLT認識機構が明らかとなり、肺線維症に対して高い治療効果が期待される変異型LT単鎖抗体の開発につながるものと期待される。</p> <p><b>3. PGE<sub>2</sub>が関わる癌の治療・予防を目指した食品由来成分の探索</b><br/> PGE<sub>2</sub>は肺癌・皮膚癌・大腸癌などの発症や増悪化に関与する炎症性脂質メディエーターである。これらの病態時には、局所における誘導型COX-2とその下流の膜結合型PGES(mPGES)-1の発現上昇によってPGE<sub>2</sub>が過剰に産生されると考えられている。非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)はCOX阻害剤として、広く臨床応用されているが、胃粘膜障害や心臓血管系障害などのいくつかの副作用が知られているために、長期的・予防的服用は難しい。よって、下流のPGESやPGE<sub>2</sub>受容体をターゲットとした創薬が求められている。私達は、PGE<sub>2</sub>が関わる病態に対して予防効果を有する食品機能性の探索を試みた。本年度は、肺癌あるいは大腸癌モデル細胞や炎症モデルマクロファージをもちいたin vitro実験系において、我が国原産の自然薯粗抽出物に、COX-2とmPGES-1の発現抑制効果を見いだした。さらに、この効果がそれぞれの遺伝子発現において転写活性調節を伴う反応であり、そのシグナル伝達機構の制御を介することを分子レベルで解析した。さらに、炎症細胞でのIL-1β やIL-6などの炎症性サイトカインの低下、肺癌細胞のアポトーシス誘導を確認し、自然薯の抗炎症・抗腫瘍効果を実証した。加えて、皮膚癌モデルマウスを用いたin vivo検証実験において、自然薯含有餌ならびに自然薯抽出物塗布による抗炎症・抗腫瘍効果が確認された。以上の結果より、自然薯はPGE<sub>2</sub>合成系酵素の発現抑制効果を有することが明らかとなり、それによる癌や炎症に対する予防効果が期待されると考えられる。</p> <p><b>4. アラキドン酸代謝系の関わる神経変性疾患の予防に向けた食品機能性の探索</b><br/> PGE<sub>2</sub>がアルツハイマーをはじめとする神経変性疾患に関与することが示唆される。神経変性疾患におけるPGE<sub>2</sub>合成系酵素の役割を明らかにし、それを標的とした食品機能性の探索のために、本年度は、癌や炎症細胞におけるPGE<sub>2</sub>合成系酵素に対して効果の認められた自然薯の経口摂取による脳内への影響を調べるために、マウスへの自然薯含有餌経口投与を行い、脳内のPGE<sub>2</sub>合成系酵素の発現動態を解析した。その結果、少なくともCOX-2とmPGES-1の発現制御がなされ、自然薯の経口摂取による脳内への効果が期待されると考えられる。</p> |
| <p>成果資料目録</p>    | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yuki Kawakami et al., 「Neutralization of leukotriene C4 and D4 activity by monoclonal and single-chain antibodies」 BBA - General Subjects, 2014, 1840, 1625-1633.</li> <li>2. Hideyuki Ito et al., 「Two New Monoterpene Glycosides with Inhibitory Effects on Leukocyte-type 12-Lipoxygenase Activity from Qing Shan Lu Shui Tea」 Molecules, 2013, 18, 4257-4266.</li> <li>3. Toshiko Suzuki-Yamamoto et al., 「Food functionality of the diet containing <i>Dioscorea japonica</i> powder targeting bioactive lipid synthesis pathway」 Bulletin of Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 2013, 20, 37-44.</li> </ol>   |

