

《農芸化学奨励賞》



抗酸化食品因子の生体内標的部位と酸化ストレス制御機構に関する研究

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部食品機能学分野 助教 河合 慶 親

はじめに

酸化ストレスは、がん・心血管疾患・糖尿病などの生活習慣病や神経変性疾患への関与が示唆されており、酸化ストレスを抑制する「抗酸化物質」の積極的な摂取が、これら疾病の予防や健康維持に有効であると考えられている。「食品」は安全性の観点からも良い抗酸化物質の摂取源と考えられることから、食品（天然物）から有効な抗酸化物質を探索する試みが幅広く行われてきた。「酸化ストレスの疾病への関与」「抗酸化物質による疾病予防」いずれも広く受け入れられる事実となりつつあるが、メカニズム（分子機構）という点ではまだまだ不明点が多い。抗酸化物質は“両刃の剣”といわれ、高濃度では逆に活性酸素生成を促すプロオキシダント作用を引き起こすことが懸念されるなど、その適切な摂取・利用法は議論の最中である。本研究では、酸化ストレス産物や抗酸化食品因子をプローブとした新規モノクローナル抗体の開発・応用を通じて、これらの病態組織における動態・作用メカニズムを明らかにすることを目的とし検討を行ってきた。

1. 酸化修飾 DNA/タンパク質の免疫化学的解析

生体内で生じると考えられている酸化反応は、部位（臓器や細胞の種類）や由来する活性種などによってさまざまである。酸化反応の標的もタンパク質、核酸、脂質、糖質と多岐にわたる。そこで酸化ストレス反応の詳細を評価するために有効な活性種特異的バイオマーカーの確立を目指した。まず細胞膜やリポタンパク質の主成分である脂質に着目し、脂質過酸化産物の探索を試みたところ、リノール酸など $\omega 6$ 系不飽和脂肪酸の過酸化に共通して生成するアルデヒド 4-oxo-2-nonenal(ONE)が非常に高い反応性を有しており、DNA のグアニン残基に付加結合することが明らかとなった。そこで ONE-グアニン付加体(図 1) をエピトープとするモノクローナル抗体を作製し、生体内からの検出を試みた。その結果、ラット肝がん組織やヒト ALS 患者脳組織などにおいて ONE 付加体の生成が認められた。ONE による DNA あるいはタンパク質の修飾反応は自己免疫疾患への関与も示唆されており、病態と密接に関連した酸化ストレスマーカーとして有効であると期待される。一方で、

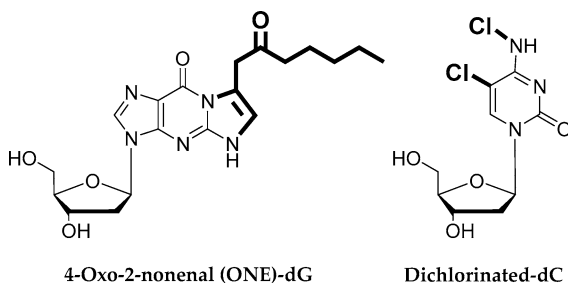


図 1 モノクローナル抗体を作製した酸化修飾 DNA の化学構造
酸化修飾部分を太字・太線で示した。

炎症部位に浸潤が認められる好中球由来の酸化酵素・ミエロペルオキシダーゼ (MPO) が触媒するハロゲン化反応に着目し、ハロゲン化 DNA に特異的なモノクローナル抗体を作製した。この抗体は 2 分子の塩素（あるいは臭素）が付加したジハロゲン化シトシン残基(図 1) を特異的に認識し、炎症誘発マウスの肝・肺で顕著な陽性染色像を示した。このように活性種特異的な新規酸化ストレスマーカーを確立することができ、これらの解析に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫化学的検出法が非常に有効であることが示された。

2. 抗ポリフェノール抗体の開発と応用

抗酸化食品因子として幅広く知られている「ポリフェノール」に着目し、その酸化ストレス制御機構の探索を試みてきた。ポリフェノールは動脈硬化症をはじめとする種々の疾病の予防・抑制作用が知られているにもかかわらず、その体内動態は不明点が多い。ポリフェノールをはじめとするほとんどの抗酸化食品因子は分子量 1,000 以下の低分子化合物であることから、これまで生体内からの検出は HPLC などの化学分析に限られてきた。そこで、上述の酸化ストレスマーカーの評価法として用いたモノクローナル抗体の作製手法を食品ポリフェノールに応用することで、生体内での詳細な作用部位の解析が可能になると考え、抗ポリフェノール抗体の開発を試みた。ヒトが日常摂取する主要なポリフェノールとしてケルセチンおよび茶カテキンについて抗体作製を試みた。ケルセチンは血中ではほとんどが抱合体代謝物であるため、ケルセチングルクロン酸抱合体(Q3GA)を、カテキンは一部アグリコンとして血中に見いだされることから非抱合体を出発物質として抗体作製を試みた(図 2)。その結果、Q3GA とエピカテキンガレート(ECg)をそれぞれ特異的に認識する 2 種のモノクローナル抗体の作製に成功した。得られた抗体はいずれも ELISA 法と免疫組織染色に応用可能なものであった。これらのポリフェノールの動脈硬化への作用を検討するため、ヒト大動脈組織を用いた免疫組織染色を行ったところ、動脈硬化病巣の泡沫化マクロファージに特異的な陽性染色が認められた。すなわち、マクロファージがポリフェノールの標的細胞の一つであることが示された(図 3(A))。一方、正常血管部位ではポリフェノール抗体による陽性染色は見られなかった。よって、抱合体代謝された血中ポリフェ

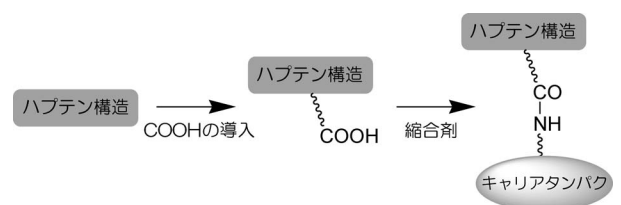


図 2 低分子ハプテンを用いた免疫抗原作製スキーム
“ハプテン構造”として酸化修飾核酸塩基やポリフェノールを用いた。

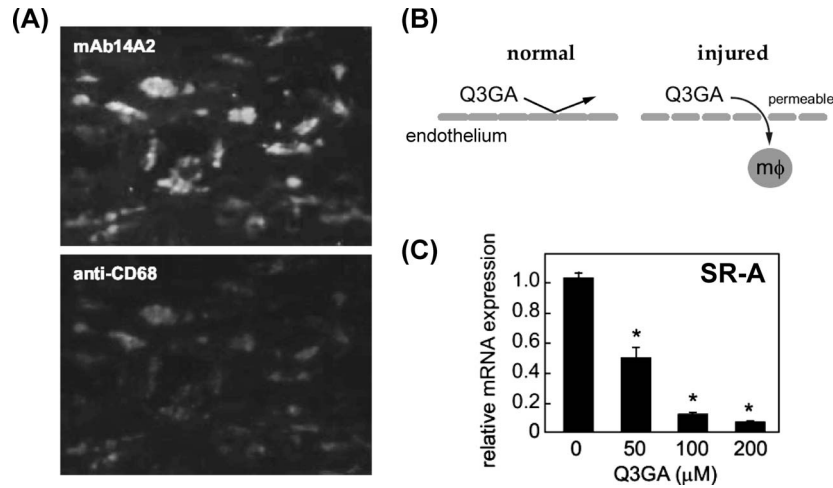


図3 Q3GA抗体(mAb14A2)を用いた抗動脈硬化機構の解析
 (A) ヒト動脈硬化病巣組織染色 (CD68はマクロファージ指標)
 (B) 血管壁におけるQ3GAの動態スキーム
 (C) Q3GAによるSR-A発現抑制(RAW264細胞)

ノールは大部分が排泄に向かうが、動脈硬化病巣のような炎症局所(傷害部位)において効率よく標的細胞(あるいは標的分子)に作用することで機能性を発揮する可能性が示唆された(図3(B))。傷害部位では血管透過性が亢進することが知られているが、受容体など特異的な分子による積極的な取り込み機構が存在するのか、など残された検討課題は多い。このように、酸化ストレス産物を評価するために培ったモノクローナル抗体開発技術が、食品ポリフェノールの生体内評価にも有効であることが示された。

3. 抗ポリフェノール抗体の応用から見てきた抗動脈硬化機構

動脈硬化病巣においてマクロファージへのポリフェノールの特異的な蓄積が認められたことから、培養マクロファージ細胞を用いて詳細な検討を試みた。HPLCを用いた化学分析によってQ3GAやECgは確かにマクロファージ系細胞(RAW264, J774-1, THP-1)に蓄積することが明らかとなったが、その一部はβ-グルクロニダーゼによる脱抱合やカテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)によるメチル化などの構造変換を受けることが示された。作製したポリフェノール抗体が実際にどの構造体を認識しうるのかについては今後さらなる検討が必要である。次に、抗動脈硬化作用として病巣形成の鍵分子の一つであるスカベンジャー受容体に対する発現抑制作用を検討したところ、Q3GAはクラスA受容体(SR-A)の発現を有意に抑制した(図3(C))。一方、ECgはSR-Aには作用せずCD36の発現を有意に抑制した。よって、ポリフェノールによる種類によって異なる経路を介した抑制作用が考えられた。また、Q3GAによるSR-A発現抑制作用にはβ-グルクロニダーゼによる細胞外脱抱合とCOMTによる細胞内でのメチル化が必要であることが各酵素の阻害剤を用いた検討から示唆された。少なくとも遺伝子発現を変動させるような細胞内への作用は炎症部位での脱抱合反応と共役すること(すなわち、アグリコンとなり細胞内へ入ること)が必要と考えられる。一方で、MPO活性阻害効果を検討したところ、Q3GAは抱合体の形のままでアグリコンと同様に活性中心へ結合し阻害作用を示すことが明らかとなった。このように血中や細胞外では抱合体のままで作用できる標的

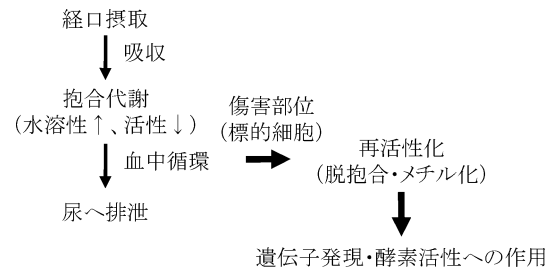


図4 ポリフェノールの生体内での推定作用機構

分子が存在するものと考えられる。このような細胞内外での異なる作用をどのようにポリフェノールが“使い分け”て疾病予防に寄与しているのかについては今後の検討課題である(図4に本研究から推定されたポリフェノールの作用機構を示した)。おわりに

本研究において、酸化ストレス産物を適確に評価するためのモノクローナル抗体作製ストラテジーが食品ポリフェノールにも応用可能であることを示すことができた。特異抗体の免疫組織染色への応用は酸化ストレス産物や食品因子の生体内での“動き”を可視化するという点で非常に強力な評価法である。近年、食品因子の“標的”の存在がクローズアップされてきているが、これは安全性と機能性を十分考慮した食品の開発・利用を考察するうえで今後も重要なテーマとなりうるだろう。抗ポリフェノール抗体を用いたアプローチが微力ながらその一翼を担えるよう検討を継続していく予定である。

本研究成果は、現在所属する徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・食品機能学分野ならびに学生時代を過ごした名古屋大学大学院生命農学研究科・食品機能化学研究分野にて行われたものです。自由な研究環境を与えていただいた徳島大学・寺尾純二教授と名古屋大学・大澤俊彦教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の主たるアプローチである免疫化学的手法をご指導いただくとともに多くの共同研究機会を提供くださった名古屋大学・内田浩二准教授に心より感謝申し上げます。兵庫県立大学・加藤陽二准教授には、学生時代よりご指導・ご協力いただきましたこと厚く御礼申し上げます。貴重なデ

ータを提供いただきました東京女子医科大学・柴田亮行准教授をはじめとする多くの共同研究者の皆様に感謝申し上げます。徳島大学・食品機能学分野と名古屋大学・食品機能化学分野の現・旧スタッフの皆様、貴重な実験データを出すために日々奮

闘してくれた卒業生・在校生に心より御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推挙くださいました日本農芸化学会中四国支部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。