

学 位 論 文 の 要 旨

■論文題目

セロトニン動態に関連した慢性炎症に関する基礎的研究と食品成分によるその抑制

1. **N Suga**, A Murakami, Y Nakamura, A Ishisaka, N Kitamoto, M Ito, Y Kato, Cytotoxic and cytoprotective effects of tryptamine-4,5-dione on neuronal cells: a double-edged sword. *Free Radic Res.* **51**, 545-553, 2017
2. **N Suga**, A Murakami, H Arimitsu, K Shioyama, S Tanaka, M Ito, Y Kato, Elevation of the serotonin-derived quinone, tryptamine-4,5-dione, in the intestine of ICR mice with dextran sulfate-induced colitis. *J Clin Biochem Nutr.* In press
3. **N Suga**, A Murakami, H Arimitsu, T Nakamura, Y Nakamura, Y Kato, Luteolin suppresses the elevation of 5-hydroxytryptamine in stimulated RBL-2H3 cell and experimental colitis in mice. *J Clin Biochem Nutr.* In press

菅 尚子

■緒言

超高齢社会を迎えた昨今の日本において、健康寿命の延伸は、高齢者のQOL維持・向上や、安定した社会を形成する上で大きな課題である。その実現のためには、健康寿命延伸の阻害要因と言われる慢性炎症に着目し、慢性炎症の発症機序や治療・予防法の解明に向けた基礎研究を進展させることが重要である。また、薬剤による治療は副作用や不耐性などの問題が生じるため、日々の食事を通じて摂取できる食品成分による慢性炎症の抑制・予防について検討することは意義深い。

そこで、本研究では、主に、脳や腸において存在量が多い生理活性アミンであるセロトニン及びその関連物質による炎症に伴う組織傷害に着目し、研究を進めるとともに、慢性炎症関連疾患の一つである潰瘍性大腸炎での食品成分による炎症抑制に関する検討を行った。

好中球ミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase: MPO) は生体防御機構において重要な役割を担っている一方で、慢性炎症とも関係することが明らかになっている。例えばアルツハイマー病、潰瘍性大腸炎などにおいて、MPOは炎症組織に浸潤・局在化することや、炎症マーカーとして有用であることが示されている。一方、先行研究において、セロトニン (別名 5-hydroxytryptamine: 5-HT) がMPOの基質となり、反応性に富むセロトニン酸化物 (Tryptamine-4,5-dione: TD) を生じることが報告されている (図1)。しかし、TDの細胞応答に与える影響やその生理的な意義についての報告はこれまでほとんどなされていない。またヒト動脈硬化病巣における陽性染色像の報告はあるが、遊離のTDを測定しておらず、炎症との関連も不明である。セロトニンの多くは腸で合成されることから、慢性炎症疾患である大腸炎ではセロトニンの酸化物が組織傷害などに寄与している可能性も考えられる。また、セロトニン自体に関しても、セロトニン受容体や免疫細胞を活性化することにより炎症性疾患の増悪因子として機能することが示唆されている¹⁾。

そこで、(1) TDの培養細胞に対する生理作用を解明し、(2) 潰瘍性大腸炎モデルの大腸組織からのTD検出を行うことで、セロトニンが関与する慢性炎症の予防・治療に向けた基盤研究の発展に有益な情報を提供することを目指した。加えて、(3) セロトニンを大腸炎の増悪因子としてとらえ、過剰なセロトニン産生を制御する食品成分の探索とその機序解明を試みた。

研究1. 培養細胞に対するセロトニン酸化物TDの生理的作用

■研究目的

セロトニン酸化物であるTDは*in vitro*における先行研究では神経毒と示唆されてきたが、細胞や生体レベルでの生理的意義は明らかになっていない。一方で、アブラナ科植物に含まれるイソチシアネートは、TDと同様に親電子性を有する。この親電子性の食品成分は、高濃度では毒性を示す一方で、低濃度では有益な効果をもたらすことが報告されている。後者の作用機序として、酸化ストレスへの適応応答能を増加させるKeap1-Nrf2経路の活性化が挙げられる (図2)。この経路は、親電子性物質あるいはそれによって生成する活性酸素種 (ROS) により活性化されることから、TDにも同様の作用が予想された。そこで、神経芽細胞腫SH-SY5Yを用いて、TDの作用を毒性と機能性の両面から検証した。

■研究方法

化学合成したTDを細胞へ処理し、蛍光プローブを用いてROSを半定量した。TDを前処理し、過酸化水素処理による酸化ストレス誘発時に細胞保護作用を示すかを評価した。TD処理によるNrf2の核内移行と抗酸化酵素の発現解析は、細胞染色、遺伝子およびタンパク質量測定により行った。TDによる細胞生存率の変動についても検討した。

■結果

①TDが細胞内ROS産生に与える影響

100 μM以上のTD処理により細胞中のROS産生が誘導された。次に、同濃度のTDを24時間処理したのち、過酸化水素によって酸化ストレスを誘発したところ、TDを前処理した細胞では、細胞のROS産生が有意に抑制された。

②細胞内抗酸化機構に対する作用

TD(100 μM)を処理した細胞では、Nrf2の核内移行が認められた。また、それにともない、酸化ストレス適応応答能を上昇させる抗酸化酵素（キノキシドレダクターゼ及びヘムオキシゲナーゼ）のmRNA及びタンパク質発現量が増加した。

③TDが細胞生存率に与える影響

TD低濃度（25 μM）処理では、細胞増殖を有意に促進する一方で、高濃度（150 μM以上）では生存率を有意に低下させた。また、TD(100 μM)を24時間処理したのち、過酸化水素によって酸化ストレスを誘発したところ、生存率の低下が有意に抑制された。

■結論

セロトニン酸化物であるTDは高濃度では毒性を示す一方で、適度な濃度では、細胞の増殖作用を促進させ、抗酸化的に作用することが明らかになった。このことから、炎症部位でTDが生じた場合、その生成量によっては、細胞内の抗酸化能上昇作用などを介して抗炎症的に作用する可能性が示唆された。

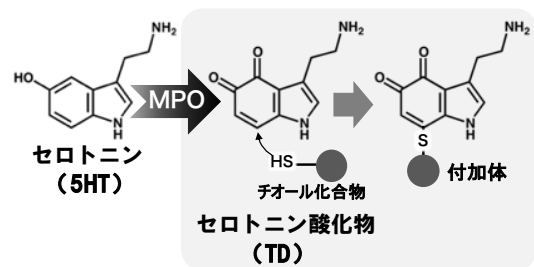


図1. セロトニン酸化物 (TD) の生成と付加反応

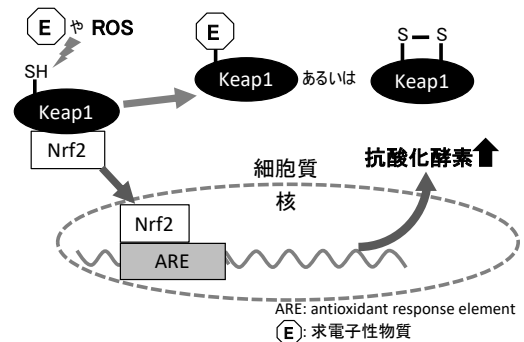


図2. 親電子性物質によるNrf2活性化機構

研究2. 潰瘍性大腸炎モデルマウスからのTDの検出

■研究目的

潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患患者の腸粘膜では、炎症を惹起するMPOの増加が認められている。加えてセロトニンは、その90%以上が消化管に存在し、セロトニン産生細胞の数およびセロトニン量の増加も報告されている¹⁾。このことから、腸炎症部位でのTDの生成が予想される。前述した研究1の検討から、TDは細胞内シグナル伝達機構に作用することで潰瘍性大腸炎の抑制あるいは増悪に関与する可能性がある。そこで大腸炎モデルマウスを用いてTDの検出を試みた。

■研究方法

8週齢の雌性ICRマウスに5%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を7日間自由飲水させ、大腸炎を惹起した。飲水開始から解剖まで体重測定および炎症レベルの評価を毎日行い、安楽死後、大腸の長さ、脾臓重量を測定し、腸粘膜中のMPO活性を測定した。腸粘膜中に存在する遊離のTDを測定するため、*o*-フェニレンジアミン (OPD) を用いて誘導体化した。その後、

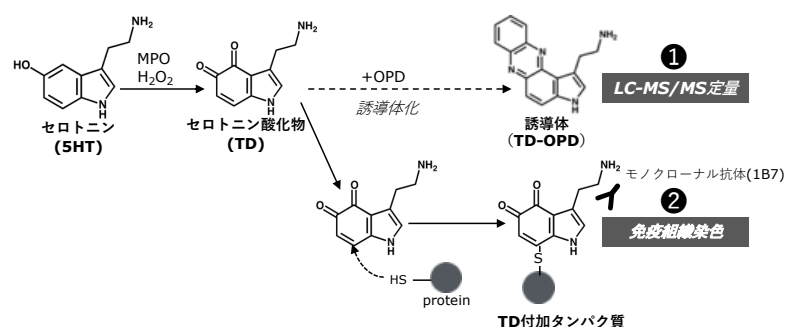


図3. TDの誘導体化およびタンパク質付加体の生成スキーム

固相抽出法により誘導体を部分精製し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析器 (LC-MS/MS) を用いてTD量を測定した。また、TD付加タンパク質に対するモノクローナル抗体等を用いて、大腸組織の免疫組織染色を行った。

■結果

DSS自由飲水開始から7日目において大腸炎モデルマウスでの顕著な体重減少、4日目から顕著な炎症症状が認められた。解剖後の大腸を比較した結果、顕著な大腸の短縮と、脾臓の肥大化を確認した。

①遊離TD量の検出定量

大腸粘膜中の遊離のTD量を測定するため、粘膜試料 (ホモジネート) を誘導体化した後、LC-MS/MSで測定した。この結果、DSS処理群では、TD量が有意に増加することが明らかになった (図4)。MPO活性も同様にDSS処理群において有意に上昇し、炎症の進行とそれに伴う好中球の組織への浸潤が示唆された。遊離状態のTD量は、セロトニンそのものに対しておおよそ0.03%程度であったことから、生成量が少ないか、あるいは生成しても速やかにグルタチオンやタンパク質チオール基と付加反応して消失することが考えられた。

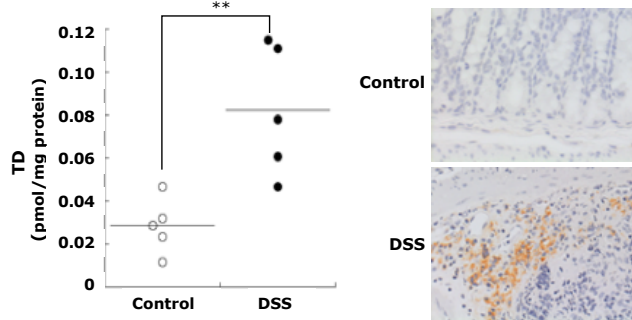


図4. マウス腸粘膜中のTD増加

図5. 組織染色によるTD付加タンパク質の検出

②TD付加タンパク質の検出

上述したようにTDはチオール基との反応性が高く、周辺の細胞タンパク質に付加修飾することが予想される。そこで、TDに特異的に結合するモノクローナル抗体を用いて、免疫組織染色によるTD付加修飾タンパク質の検出を試みた。コントロール群の大腸では、付加タンパク質の陽性染色はほとんど認められなかった一方で、DSS処理群では、炎症部位において、顕著な陽性反応が確認された (図5)。さらにTD付加修飾タンパク質が生成した部位では、MPOによるタンパク修飾の指標として用いられるジハロゲン化チロシンに対する抗体染色も増強された。加えて、TD付加タンパク質は、MPO陽性染色細胞の周辺で陽性染色が認められた。また、*in vitro*において、MPO阻害剤が、大腸粘膜におけるTD付加タンパク質の生成を抑制したことから、大腸炎モデルの腸組織において、セロトニンはMPOによって酸化され、組織のタンパク質と付加体を形成していることが示唆された。

■結論

本研究では、化学的定量および免疫組織学検出の2つの手法を用い、生体の腸組織から初めてTDを検出・定量した。その結果、大腸炎モデルの腸において遊離のTD量が有意に増加しており、組織タンパク質に結合する現象を見出すことができた。

研究3. 腸炎の緩和を目指した食品成分によるセロトニン制御

■研究目的

炎症性腸疾患の基本的な治療法は薬物療法であるが、長期服用による副作用の問題があるため、日々の食事を通じて摂取できる食品成分による大腸炎の抑制・予防法の開発が望まれる。セロトニンは重要な生理活性物質であるが、大腸炎においては過剰な産生放出とセロトニン受容体や免疫細胞の活性化を介した増悪作用が報告されている。また、酸化ストレス下での過度なセロトニンはTDの生成につながり、このTDを介して増悪因子として機能する可能性もある。そこで、本研究では、大腸炎がセロトニン量の制御不全に起因して増悪化すると作業仮説を立て、食品成分によるセロトニン量の制御を介した大腸炎抑制の可能性を検討した。

■研究方法

セロトニン合成能を有するラット好塩基性白血病細胞 (RBL-2H3) を用いた。本細胞はホルボール-12-ミリストート-13-アセタート (PMA) を処理することで、細胞内外のセロトニン量が増加する。この実験系を用いて細胞内外セロトニン量を抑制する食品成分をスクリーニングした。セロトニン抑制機序については細胞モデルを用いて生化学・分子生物学的な手法により検討した。In vivoにおける抑制成分の炎症及びセロトニン量の抑制評価としては、DSS大腸炎モデルマウスを用いた。7週齢の雄性C57BL/6マウスを、0.1%Luteolin混餌食群及び通常食の群に分け7日間飼育し、次いで、2.5%DSS溶液を7日間自由飲水させ、腸炎を誘導した。炎症の評価は、研究2と同様に実施した。また、大腸組織中のセロトニンはLC-MS/MSにより定量した。

■結果

①セロトニン量を抑制する食品成分スクリーニング

PMA刺激に伴い細胞内外でのセロトニン量は経時的に増加したが、これに対し、20種の食品成分を事前にそれぞれ投与したところ、いくつかのフラボノイドのうち、QuercetinやLuteolinにより、細胞内外のいずれにおいてもセロトニン量を抑制する効果が認められた。

②Luteolinによるセロトニン抑制機構の解明

Luteolinの前処理により、セロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (TPH-1) 発現の上昇が、遺伝子およびタンパク質レベルで顕著に抑制された。腸のセロトニン産生細胞においてセロトニン量に影響を及ぼすことが報告されている細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) のリン酸化についてもウェスタンブロット法により解析した結果、LuteolinはPMA刺激によるERKのリン酸化も抑制した。プロテインキナーゼC (PKC) およびMEK-ERKの阻害剤処理により、細胞外セロトニン量の増加およびTPH-1の発現の抑制作用が認められたことから、Luteolinの抑制機序の一部として、PKC-MEK-ERK経路の抑制が関与する可能性が示唆された。結果から推定されるLuteolinのセロトニン抑制機序の一部を図6に示した。

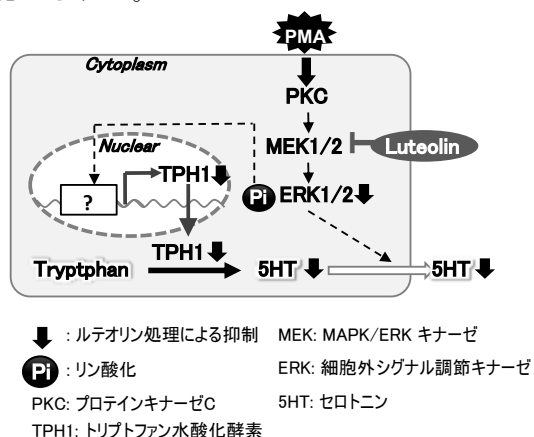


図6. PMA刺激したRBL-2H3細胞におけるLuteolinのセロトニン(5HT)抑制機序

③Luteolinによる大腸炎モデルマウスでの腸粘膜中セロトニン量の抑制

0.1%Luteolin食を摂取したマウスでは、DSSにより誘導される炎症の進行が低減され、大腸粘膜でのセロトニン量の増加も有意に抑制された。

■結論

フラボノイドの一種であるLuteolinは、細胞および動物レベルで、セロトニンの増加抑制作用を有することが明らかになった。

■総括

本研究では全身性の生理活性アミンであるセロトニンの動態に着目し、慢性炎症部位で生じるセロトニン由来の酸化物 (TD) や過剰産出が問題となるセロトニンの生成抑制について検討を行うことで、セロトニンが関連し得る慢性炎症の制御に新たな知見をもたらすことを目的とした。

研究1では、炎症関連酵素であるMPOにより生じると予想されるTDの細胞に対する生理作用を分子・遺伝子レベルで明らかにした。TDは、高濃度では親電子性物質としての特性を示し細胞内の活性酸素種産出により毒性を示す一方で、低濃度では抗酸化遺伝子およびタンパク質を発現させ、細胞防御作用を示した。神経毒と報告されているTDが、濃度によっては細胞に対して防御的に作用することは、セロトニンおよび炎症に関連する疾患の解明において重要な知見になると考えている。

研究1では神経細胞モデルに対するTDの生理作用の一部が明らかになった。しかし、脳を含め、生体におけるTDの局在性に関する報告例は少なく、TDの濃度についても明らかになっていないため、実際に生体内でTDがどのように生理作用を示すか議論することは困難である。そこで、生体

におけるTDの存在に関する知見を増やす必要性があると考え、**研究2**では、大腸炎モデルからのTD定量および定性解析を試みた。

研究2において、組織サンプルから、遊離のTDを安定的に測定する方法が構築できた。TDの遊離体は、大腸炎の炎症症状を呈さないコントロールマウス群及び症状を呈するDSS処理マウス群の両群において検出定量されたことから、酸化ストレスにさらされ続けている我々の生体中で、TDは恒常的に生じることが示唆された。また、大腸炎モデルでは、酸化ストレスが上昇しており、TDの遊離体およびTDのタンパク質付加体が増加することが明らかになった。今後、炎症部位におけるTD生理作用の詳細が明らかになれば、これまで原因不明であった潰瘍性大腸炎の機序解明や新しい治療戦略につながる可能性が期待できる。一方で、TDの大腸炎における生理作用は明らかになっていないため、組織・細胞・分子レベルでTDが炎症にどのように関与するか解析することは今後の課題と考えている。

研究2を進めていく中で、TDの元となる分子セロトニンが大腸炎の増悪因子として作用するという報告に関心を持った。そこで、**研究3**では、食による大腸炎の緩和を目指し、食品成分によるセロトニン量の制御について検討した。

研究3では、まず、RBL-2H3細胞を用いてセロトニン量の増加を抑制するフラボノイドの探索を行った。この結果、フラボノイドの一種であるLuteolinが細胞内外のセロトニン量の増加を顕著に抑制することを見出した。また、Luteolinは、細胞レベルにおいて、セロトニン合成酵素の発現を抑制し、セロトニン放出に関与することが示唆されているERKのリン酸化も抑制することが明らかになった。加えて、LuteolinはDSS誘導大腸炎において増加するセロトニン量を有意に抑制し、炎症レベルも低減させた。一方で、*in vivo*におけるセロトニン抑制機序、また、Luteolinを摂餌させたときの大腸粘膜における遊離TDおよびTD付加タンパク質量の変化については未解明の課題として残されている。

以上、本研究では、生体内の生理活性アミンであるセロトニンの酸化型であるTDの細胞への生理作用や生体内での存在・局在性を明らかにした。また、セロトニンそのものの増加を抑制し得るフラボノイドの探索し、Luteolinに効果を見出しその機序解明を行なった。加えてLuteolin摂餌により大腸炎モデルマウスの大腸粘膜においてセロトニン増加が抑制されることを実証した。今回残された課題はいくつかあるが、今後それらを解明していくとともに、炎症とセロトニン動態に関する基礎的研究を積み重ねることで、セロトニンが関連する炎症性疾患の症状緩和や予防法の確立などに寄与できることを期待したい。

■引用文献

1. N. Suga, A Murakami, Y Nakamura, A Ishisaka, N Kitamoto, M Ito, Y Kato, Cytotoxic and cytoprotective effects of tryptamine-4,5-dione on neuronal cells: a double-edged sword. *Free Radic Res.* **51**, 545-553, 2017
2. N. Suga, A Murakami, H Arimitsu, K Shiogama, S Tanaka, M Ito, Y Kato, Elevation of the serotonin-derived quinone, tryptamine-4,5-dione, in the intestine of ICR mice with dextran sulfate-induced colitis. *J Clin Biochem Nutr.* In press
3. N. Suga, A Murakami, H Arimitsu, T Nakamura Y Nakamura, Y Kato, Luteolin suppresses the elevation of 5-hydroxytryptamine in stimulated RBL-2H3 cell and experimental colitis in mice. *J Clin Biochem Nutr.* In press

■参考文献

1. Y Kato, AV Peskin, N Dickerhof, DT Harwood, AJ Kettle. Myeloperoxidase catalyzes the conjugation of serotonin to thiols via free radicals and tryptamine-4,5-dione. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 2322-2332.
2. Y Kato, S Ono, N Kitamoto, AJ Kettle. Covalent modification of cytoskeletal proteins in neuronal cells by tryptamine-4,5-dione. *Redox Biol* 2014; 2: 983-990.
3. Y Kato, K Oki, N Suga, S Ono, A Ishisaka, Y Miura, S Kanazawa, M Naito, N Kitamoto, AJ A Kettle. novel quinone derived from 5-hydroxyindoleacetic acid reacts with protein: Possible participation of oxidation of serotonin and its metabolite in the development of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 101, 500-510, 2016
4. Y Kato, N Suga. Covalent adduction of endogenous and food-derived quinones to a protein: its biological significance. *J Clin Biochem Nutr.* 62, 213-220, 2018
5. Y Kato, Y Kishi, Y Okano, M Kawai, M Shimizu, N Suga, C Yakemoto, M Kato, A Nagata, N Miyoshi. Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in gaseous form into the headspace on the heating of manuka honey. *Food Chem.* 337, 127789, 2021