

博士論文

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

2021年2月

兵庫県立大学大学院環境人間学研究科
環境人間学専攻

菅 尚子

目次

略語一覧.....	3
第1章 序論.....	5
1-1. はじめに.....	5
1-2. 慢性炎症関連疾患と酸化ストレス.....	6
1-3. ミエロペルオキシダーゼ (MPO).....	9
1-4. セロトニン.....	10
1-5. フラボノイドによる炎症抑制効果.....	11
第2章 培養細胞に対するセロトニン酸化物 TD の毒性と保護作用.....	13
2-1. 緒言.....	13
2-2. 実験方法.....	15
2-3. 結果.....	22
2-4. 考察.....	30
第3章 DSS 投与モデルマウスの大腸炎に伴うセロトニン酸化物 TD の生成.....	32
3-1. 緒言.....	32
3-2. 実験方法.....	34
3-3. 結果.....	39
3-4. 考察.....	47
第4章 腸炎の緩和を目指した食品成分によるセロトニン制御.....	50
4-1. 緒言.....	50
4-2. 実験方法.....	52
4-3. 結果.....	57
4-4. 考察.....	63
第5章 総括.....	66
引用文献.....	70
謝辞.....	81
APPENDIX.....	81
A-1. 緒言.....	82

A-2. 実験方法.....	84
A-3. 結果.....	87
A-4. 考察.....	91
APPENDIX の略語	94
APPENDIX の引用文献	95
業績目録.....	97

略語一覽

5HT	5-hydroxytryptamine
5HIAA	5-hydroxyindoleacetic acid
BSA	bovine serum albumin
CH ₃ CN	acetonitrile
CH ₃ OH	methanol
CHO	Chinese hamster ovary
C _t	threshold cycle
DAI	disease activity index
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DSS	dextran sodium sulfate
EC	enterochromaffin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPO	eosinophil peroxidase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HCOOH	formic acid
HO-1	heme oxygenase-1
HOB _r	hypobromous acid
HOCl	hypochlorous acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IBD	inflammatory bowel disease
IgG	immunoglobulin G
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry
LUT	luteolin
M-PER	mammalian protein extraction reagent

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MEM	minimum essential media
MPO	myeloperoxidase
MRM	multiple reaction monitoring
NQO1	NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1
Nrf2	nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
OPD	<i>o</i> -phenylenediamine
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PI	propidium iodide
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SERT	serotonin transporter
<i>t</i> -BHQ	<i>tert</i> -butylhydroquinone
TCEP	Tris 2-carboxyethylphosphine
TD	tryptamine-4, 5-dione
TPH	tryptophan hydroxylase
TTBS	Tween Tris buffered saline

第1章 序論

1-1. はじめに

1950年の日本における高齢者人口は5%に満たなかったが、高齢化社会を迎えた1970年以降、年々増加の一途を辿り、2007年には超高齢社会を迎えた。2020年現在、65歳以上の高齢者人口割合は28.7%と世界の中で最も高い割合となっている⁽¹⁾。加えて、出生率の低下などによる総人口の減少に伴い、高齢者の占める比率は今後もさらに高くなると予想される。このような人口割合の急激な変化は、医療や介護費など社会保障に関する給付と負担のバランスを崩し、経済や社会保障制度などに深刻な影響を与えるため、社会全体でその解決に向けて取り組むべき大きな課題の一つとなっている。

日本において高齢者人口が増加した要因の一つには平均寿命の延伸が挙げられる。寿命の延伸は医学の進歩や看護・介護の充実等によりもたらされたものであり、多くの人が恩恵を受けてきた。一方で、医療の進展のみによる寿命延伸は、寝たきりや介護を必要とする高齢者の増加につながる可能性もあろう。このため医学的な治療法などの発展に合わせて高齢者が自立した状態で主体的に日常生活を営むことのできる寿命、つまり「健康寿命」を延ばすことが重要な課題であり、現在、国や自治体はその実現に向けて医療・食・運動などに関連した計画の立案や評価、見直しを進めている。

健康寿命延伸に向けた取り組みの一つに、特定健診・特定保健指導が挙げられる。この指導に関わる専門家として平成19年厚生労働省令第157号の第5条では「保健指導に関する専門的知識及び技術を有する者は、医師、保健師又は管理栄養士」と定めており、食・健康・栄養に関する豊富な知識を有する管理栄養士の貢献が期待されている。この制度の目的は、将来、寝たきりや認知症などになるリスクを高める肥満、糖尿病や高血圧症などといった生活習慣病を早期発見するためである。現代社会においては、様々な技術や人工知能(AI)の進化により家事や仕事が自動化されつつあること、また交通手段も発達していることに伴い身体活動量が低下傾向にあり、今後もさらにその傾向は続くと考えられる⁽²⁾。加えて、食事内容についても若・中年層での動物性脂質の摂取が多い⁽³⁾。このような運動習慣および食事習慣の変化、複雑化した社会の中でのストレス要因増大は、たとえば生活習慣病の若年化にも影響を与えていると考えられている。健康に対する意識付けがまだ明確でない若年から健康に年齢を重ねていくためには、運動や食生活の重要性について十分な認知を広めることで未病対策を継続的に行う必要があると考える。

以上のことより、健康寿命延伸の実現には病気を治す医学分野のみならず全世代を対象とする未病予防的な観点から、生命・食品科学分野での関連研究も推進させる必要があると考える。本研究では、多くの疾患が生体内で炎症と関連していることに着目し、セロトニンに焦点をあて、健康寿命延伸の阻害要因となりうる炎症の機序や、日常的に摂取する食品成分による炎症抑制効果について検討した。本章 1-2 以降では、本研究を実施するに至った研究背景について概説する。

1-2. 慢性炎症関連疾患と酸化ストレス

慢性炎症は先に述べた健康寿命を阻害する一つの要因と考えられており、低レベルの炎症が長期に渡って遷延することを特徴とする。慢性炎症は加齢に伴いリスクが上昇する動脈硬化や悪性腫瘍、神経変性に関連した様々な疾患に共通する基盤病態であるため、疾患の治療法確立や予防解明に向けて、多方面から慢性炎症の機序解明や制御をターゲットにした研究が進められている^(4,5)。

1-2-1. 神経変性疾患と慢性炎症

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、慢性炎症が病態に深く関与していることが示唆されている⁽⁶⁾。アルツハイマー病は脳皮質や海馬が萎縮していく疾患であり、認知機能低下や人格変化などを主な症状とする認知症の一種である。日本において、高齢者人口の増加に伴い、アルツハイマー病の患者数も増加しており、2025年には700万人を超えることが予想されている⁽⁷⁾。アルツハイマー病は、患者自身が記憶障害により本人らしさを失うことに加え、介護する家族が肉体的、精神的、経済的に大きな負担を抱えるなど、様々な問題が生じる。加えて、日本においては、介護の担い手が不足している事や、医療費・介護費の急騰に繋がることから、アルツハイマー病は、国全体として関連する諸問題を解決すべき喫緊の課題といえる。

パーキンソン病は、中脳のドーパミン分泌細胞の変性が主な原因となり、ドーパミン不足とアセチルコリンの増加が生じる疾患である。身体の一部が規則的に一定の方向にふるえる安静時振戦、動作の開始や動作自身が遅くなるアキネジア（無動）などが症状として知られている。日本での患者数は、おおよそ16万人と、アルツハイマー病と比較すると多くはないものの、アルツハイマー病と同様に加齢が発症の危険因子であるため、今後も高齢化とともに患者数は増加することが予想される⁽⁸⁾。

いずれの神経変性疾患も長い年月を経て発症・進展するものであり、かつ、ヒトを対象とした研究は倫理的な面も含めて困難なことが多い。そのような背景から、発症機構

解明や治療法の確立のために疾病モデル動物が用いられている。アルツハイマー病やパーキンソン病の研究例は枚挙にいとまがないが、炎症との関連では、例えば慢性脳炎症の抑制がアルツハイマー病モデルマウスの学習および記憶障害を抑制することが報告されている⁽⁹⁾。パーキンソン病モデルマウスにおいては、誘導型一酸化窒素合成酵素 (Inducible nitric oxide synthase: iNOS) 遺伝子のノックアウトや Cyclooxygenase-2 の不活性化による神経変性の改善が確認されている⁽¹⁰⁾。このように炎症とアルツハイマー病やパーキンソン病は深くつながっているが、発症機序については未解明な点が多く、神経変性疾患の発症予防を実現するために、慢性炎症関連疾患の発症や進展に関して培養細胞レベルから基礎的研究を進める事は重要である。

1-2-2. 炎症性腸疾患

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) は、主にクローン病と潰瘍性大腸炎があり、クローン病は小腸から大腸まで、潰瘍性大腸炎は大腸において粘膜のびらんや潰瘍ができる原因不明の慢性炎症関連疾患である。両疾患とも若年齢で発症が多く、長期的な治療を必要とするため、生産年齢層の QOL (Quality of life、生活の質) を大きく下げることが問題となっている。2018 年度の統計では、日本全国で潰瘍性大腸炎の特定医療費 (指定難病) 受給者証所持者数は 124,961 人 (人口 10 万人あたり 100 人程度)、クローン病では 42,548 人 (人口 10 万人あたり 27 人程度) と報告されており⁽¹¹⁾、近年日本において急激に増加してきている。加えて、高齢化の影響により、高齢での IBD 発症率も高くなっている。高齢で発症した場合には、入院率や手術率が増加する傾向にあり、他の疾患との合併による重症化しやすくなるなど、より深刻な症状をもたらす可能性が高い⁽¹²⁾。

前述のように、IBD 発症の原因は未解明であるが、民族や地域による発症率の差から遺伝的および環境的要因の双方が関与していることが予想される⁽¹³⁾。IBD 患者には 5-アミノサリチル酸製剤やステロイドなどを用いた薬物療法が主に選択される。5-アミノサリチル酸製剤は、再燃 (再び症状が悪化すること) を予防するために長期的に服用することもあり得るが、不耐症が生じるリスクもある⁽¹⁴⁾。また、副作用は少ないものの、腹痛、発熱、関節痛、血便などの原因となることも報告されている⁽¹⁵⁾。IBD の炎症増悪期においては、ステロイド (短期間での使用が推奨) が有効であるが、IBD は再燃と緩解 (一時的・継続的に症状が軽減されること) のサイクルを繰り返すため、結果的にステロイドを長期間繰り返して使用することになる。ステロイドには、糖尿病、白内障、骨粗鬆症、血糖値の上昇など、様々な副作用を示すことが報告されていることから、その使用には注意が必要である⁽¹⁶⁾。これらの背景より、副作用が少なく、より効果的な薬

の出現が望まれている。加えて、薬ほどは効かなくても、IBDの予防や緩和につながる食品成分を見出すことで、日々の食生活から少しでも患者のQOLを高めることが期待される。

1-2-3. 炎症と酸化ストレス

好気性生物の生体内では酸素を用いて多くのエネルギーを産出している。このようにヒトの生命を維持する上で酸素は必要不可欠なものであるが、呼吸により取り込まれた数パーセントの酸素分子から活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が生じる。このROSは高い反応性のために我々 (宿主) のDNAやタンパク質、脂質などに酸化的障害を与えうる。ただし、体内には抗酸化酵素系 (スーパーオキシドジスムターゼやグルタチオンペルオキシダーゼなど) が存在し、ビタミンEやCなど酸化を防ぐ低分子成分もある。生体は、ROSにより引き起こされる生体にとって有害な作用を起こす作用と、そのROSを除去する「抗酸化能」を示す抗酸化システム (抗酸化酵素や抗酸化成分など) による防御機能のバランスとで成り立っており、この均衡が崩れた状態を「酸化ストレス」と言う。近年増加傾向にある紫外線、また、大気中微小粒子状物質 (PM2.5) に代表される大気汚染物質、その他、日常生活における様々な要因は、生体内でのROS生成を促進させる。そして、加齢もまたROSを増大させる因子であることから、年齢を重ねるにつれて酸化ストレスが亢進されると予想される。一方で、我々は細菌やウイルスからの生体防御にも積極的にROSを利用していることも指摘されるべきである。

慢性炎症関連疾患の病変部位では酸化ストレスレベルが上昇すると言われている⁽¹⁷⁾。例えば、炎症によって刺激を受けたサイトカインである Interferon- γ や Tumor Necrosis Factor- α は、過剰なROSを産生して酸化ストレス状態に陥らせる。さらに、増加したROSは、転写因子 Nuclear factor- κ B や Activator protein 1、Extracellular signal-regulated kinase (ERK)などを活性化させ、炎症が増悪化する⁽¹⁷⁾。これにより、タンパク質のカルボニル化、脂質酸化、DNA損傷 (水酸化) が起き、慢性炎症を基盤として、種々の関連疾患が誘発される。先に述べたIBD患者の腸では、好中球に由来する活性酸素産生の亢進、抗酸化機構の低下、酸化的DNA損傷マーカーの増加が報告されている⁽¹⁸⁾。また、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では酸化ストレスマーカーが上昇する⁽¹⁹⁾。このように、酸化ストレスと神経変性疾患やIBDなど慢性炎症の関連が示唆されていることから、慢性炎症関連疾患の機構解明や予防法の確立を図る上で、酸化ストレスは着目すべき重要な因子の一つと言える。

1-3. ミエロペルオキシダーゼ

好中球アズール顆粒に含まれるミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase : MPO) は過酸化水素 (H_2O_2) および塩化物イオンあるいは臭化物イオンを基質として次亜塩素酸 (HOCl) や次亜臭素酸 (HOBr) などといった強力な活性酸素種を産生し、病原微生物の殺菌作用を担うヘム酵素である (Fig. 1)。この MPO の欠損は免疫不全を引き起こすため、生体防御機構において重要な役割を担っていることがわかる。一方で、後述するように、炎症において MPO が増悪因子としても捉えられることが明らかになってきている。

慢性炎症疾患に関連している動脈硬化症の病巣で見られる不安定プラークでは、好中球の活性化や MPO の細胞外放出などが起き、局所的に酸化ストレスが増大している⁽²⁰⁾。また、アテローム性大動脈瘤壁に出現するマクロファージには MPO が発現していることから⁽²¹⁾、マクロファージ由来の MPO がアテローム形成に関与している可能性も考えられる。アルツハイマー病患者の血液では、血漿中の MPO 濃度が顕著に増加し⁽²²⁾、アルツハイマー病患者およびパーキンソン病患者の神経変性が生じている脳領域では MPO 陽性細胞が増加していることから⁽²³⁾、MPO が神経変性疾患のバイオマーカーや治療標的の一つになる可能性がある。加えて、炎症性腸疾患などにおいても、炎症組織での MPO の浸潤・局在化や炎症レベルと MPO 活性の相関性が示されている⁽²⁴⁾。

MPO (酵素量あるいは酵素活性) が炎症状態に相関して増加することから、MPO は有用な炎症マーカーの一つとなるが、単に指標としてではなく慢性炎症の発症や増悪化との関連についての研究もなされている。MPO の酵素活性に由来する HOCl や HOBr などのハロゲン化活性種 (次亜ハロゲン酸) も化学反応性に富み、組織障害の原因になることが予想される。このように、MPO は生体防御機構の重要な因子である一方で、炎症時には組織障害を誘発しうる。しかしながら生体での作用や動態は十分に理解・研究されていない現状にある。慢性炎症の発症・抑制やその機序解明を進めていくには、局所での MPO の作用や動態を知ることが必須である。MPO から生じる HOCl や HOBr は反応性が高く安定に捉えにくいのが、MPO の活性・作用の痕跡としてその産物であるハロゲン化チロシンなどの特異的な修飾物や後述するセロトニン由来のキノン体など、MPO のペルオキシダーゼ活性により生じる二次的な酸化物は HOCl などに比べれば安定であり、その痕跡をバイオマーカーとして追跡することで、生体内での MPO の作用についての究明につながると考えられる。

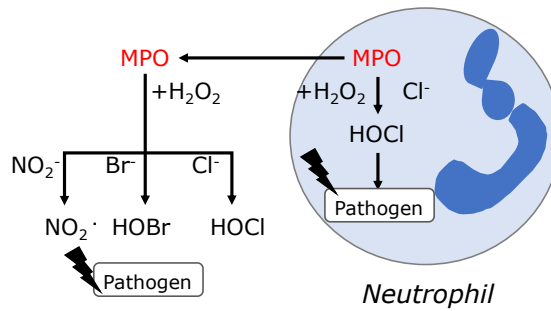


Fig. 1. Reactive intermediates formed by neutrophil MPO

1-4. セロトニン

セロトニン（別名、5-Hydroxytryptamine: 5HT）は生理活性アミンの一種であり、生体内では、おおよそ 90%が腸管に存在しており、8%が血小板に、残りの 2%が中枢神経に存在する⁽²⁵⁾。脳における 5HT は、気分や運動などを調節する重要な神経伝達物質であり、末梢に存在する 5HT も血管平滑筋に対する収縮作用、胃腸管機能調節作用、血小板凝集促進作用などの生理活性アミンとして重要な役割を有する。

うつ病の発症メカニズムについては未明であるが、患者の脳においては 5HT 量が低下していることから、5HT を含むモノアミンが不足し、その機能が低下することによって脳内の神経細胞間の情報伝達が阻害され、うつ病が発症するというモノアミン仮説が提唱されている⁽²⁶⁾。一方で、IBD 患者の腸では、過剰な 5HT 放出や、疼痛などに関与する 5HT 受容体の発現増加などが明らかになっている⁽²⁷⁾。加えて、5HT は肺高血圧症や骨粗鬆症などの増悪因子であることも指摘されている^(28, 29)。

5HT と同じモノアミンであるドーパミンは、その酸化型がパーキンソン病の発症に関連していることが明らかになっている⁽³⁰⁾。詳細は第 2 章で論じるが、5HT についても、慢性炎症関連疾患が生じる脳や腸においてその酸化型であるトリプタミン 4,5 ダイオン（Tryptamine-4, 5-dione: TD）が生成することが予想される。Fig. 2 に示すように、TD は、システインチオール基（SH 基）への高い反応性を示す^(31, 32)。TD は、タンパク質のチオール基と反応すると、一旦キノン骨格が水酸基に還元されるが、速やかに自動酸化して、キノン骨格を有する TD とタンパク質との付加体になる^(33, 34)。これまでの *in vitro* における先行研究では神経毒と示唆されてきたが^(34, 35)、その動態や作用については明らかにされていない。

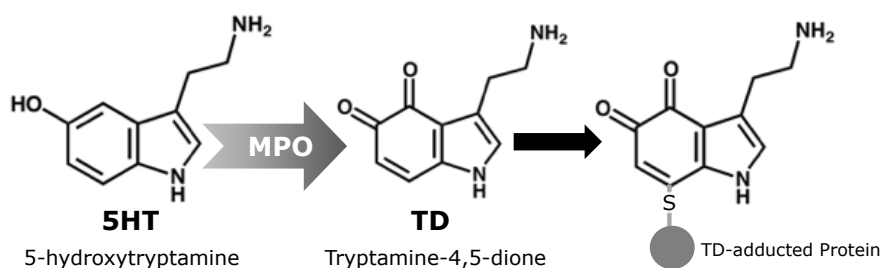


Fig. 2. Adduct formation of a protein with TD mediated by MPO

1-5. フラボノイドによる炎症抑制効果

食品は、私たちが生きるためにエネルギーや栄養素を供給する役割（一次機能）、また、匂いや味、見た目や歯応えなど、私たちの嗜好に影響を及ぼす機能（二次機能）がある。さらに、生体調節機能（三次機能）は、日々の食事から疾病の発症を予防したいという健康志向の高まりとともに年々耳目が集められている。これまでに述べてきた慢性炎症等、健康寿命延伸の阻害要因となる種々の疾患発症や増悪化の抑制を目指す上で、食品成分の機能性に関する科学的論拠を示す研究は、今後よりその重要性が増していくと考えられる。以下に本研究で着目したフラボノイドについて簡単に紹介する。

フラボノイドはポリフェノールの一種であり、2つのベンゼン環が炭素3つで結合された基本構造をもつ芳香族化合物である（Fig. 3）。さらに、C環の酸化状態などの違いにより、フラボン、フラボノール、アントシアニンなどに分類される。フラボノイドは様々な機能性を有し、多くの植物に含まれることから、日常的な食事を通して健康増進効果が期待できる成分の一つである。フラボノイドが高い生理活性を示す理由の一つとしてフェノール性水酸基による還元性が挙げられ、不対電子を有するラジカル種（ラジカル性の活性酸素種）に対し、水素原子や電子を供与することでラジカル種を消去する。加えて、C環上に環上のオルト位に2個の水酸基を有するカテコールは金属イオンのキレート能を有し、ROSを生じる遷移金属イオンを捕捉することで抗酸化活性に寄与する。このような特性から、抗動脈硬化や発がん予防など、慢性炎症抑制に関連する研究が基礎的研究から疫学調査まで多岐にわたり進められている⁽³⁶⁾。本研究で特に着目したフラボノイドの一種であるルテオリンは、パセリやハーブなど様々な植物にアグリコンや配糖体として含まれており、伝統薬としても用いられてきた。実際に、ルテオリンを摂餌させたマウスでは、脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が見られるなど⁽³⁷⁾、炎症関連疾患の発症予防や遅延に効果ができる食品成分の一つとして期待されている。炎症関連疾患に対するルテオリンなどのフラボノイド類の新規な作用を見出すことが

できれば、野菜・ハーブによる健康増進効果の一端の解明につながり、消費者の行動変容につながる可能性がある。

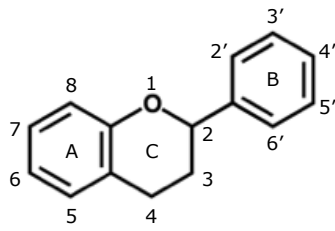


Fig. 3. Basic structure of flavonoids

第2章 培養細胞に対するセロトニン酸化物 TD の毒性と保護作用

2-1. 緒言

脳内において、神経伝達物質である 5HT は脳幹のニューロンから放出され、感情、認知、攻撃性、満足感、眠気などの様々な生物学的プロセスに関与する^(38,39)。これまでに、5HT はスーパーオキシドアニオンラジカルや好中球 MPO などペルオキシダーゼの基質となり酸化され、反応性に富むキノン体である TD となることが明らかになっており^(40,41)、実際に、メチル水銀を腹腔に投与したゼブラフィッシュの脳内において TD が検出されている⁽⁴²⁾。また、TD はヒトアテローム性動脈硬化病巣においても、その 5HT 代謝物 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-Hydroxyindoleacetic acid: 5HIAA) のキノン体 (Quinone-5HIAA) とともに、付加タンパク質の陽性染色が確認されている⁽⁴³⁾。脳の炎症性細胞から MPO が放出されることや、アルツハイマー神経病理を示している脳組織で MPO 発現上昇が明らかになっており^(44,45)、脳内での MPO による 5HT の酸化にともなう TD 生成が神経変性疾患の発症や進展に関与している可能性も考えられる。

これまでに当研究室では、神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞の α -チューブリンや β -チューブリン、ビメンチン、ニューロフィラメント-L などの細胞骨格タンパク質を TD が修飾することを明らかにしてきた⁽³¹⁾。神経細胞は樹状突起や軸索といった突起構造を有し、これらを介して情報を伝達することで脳の機能を制御している。この突起構造を支持する微小管は、 α -および β -チューブリンが規則的に重合することによって形成されている⁽⁴⁶⁾。TD の存在下では、チューブリンの自己重合の初期段階反応が促進され、一方で、その後の伸長反応が阻害されるという結果も得られている⁽³¹⁾。2002 年の Jiang と Dryhurst の研究では、TD は解糖系関連酵素であるピルビン酸脱水素酵素を阻害することも示している⁽⁴⁷⁾。5HT と同じ神経伝達物質であるドーパミンも酸化物としてドーパミンキノンを生じてミトコンドリアの機能異常を誘発することや、パーキンソン病の発症に関連する α -シンクレインなどのタンパク質を修飾することが報告されている⁽⁴⁸⁾。先に述べたように TD が *in vitro* でチューブリンの自己重合に影響を与えたこととも考え合わせると⁽³¹⁾、神経細胞内で TD によるタンパク質修飾を介して細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。一方で、TD は神経毒と予想されているが、実際の細胞毒性作用はほとんど調べられておらず、加えて TD が細胞内の遺伝子発現に与える影響については未だ全く検討されていない。

TD は o -キノン構造を有し、高い親電子性を示す。例えば、同じ親電子性物質であるディーゼル排気ガス中に含まれる 1,2-ナフトキノンや食品成分イソチオシアネートは

強い毒性を示す一方で、低濃度では細胞生存のための抗酸化活性を高めるなどの適応応答を誘導することが報告されている^(49,50)。類推すれば、TDは上述した親電子性物質と同様の生物作用を有することが予想される。テトラクロロベンゾキノンやドーパミンキノンなど、TDと同じくキノン骨格を持つ物質は、タンパク質やDNAのアルキル化やROSの産生を介して毒性作用を示すことが報告されている^(51, 52)。しかしその一方で、いくつかのキノン体では、比較的低濃度においては酸化ストレスに対する保護作用を有することも報告されている⁽⁵³⁾。TDに関しては先行研究において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未解明である^(34,47)。そこで、本章では、TDがSH-SY5Y神経細胞の生存率およびROSの産生に与える影響を調べるとともに、TDによる神経細胞の適応応答の誘導作用について検討した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

Polymerase chain reaction (PCR) 用プライマーおよび 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCF-DA) は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 nutrient mixture 培地、Cell Count Reagent SF、シグナル増強剤 HIKARI (Immunostain Solution B)、Chemi-Lumi One L および Protein Bicinchoninate assay (BCA) キット は ナカライテスク (Kyoto, Japan) より入手した。Mammalian protein extraction reagent (M-PER)、プロテアーゼ阻害剤カクテルおよび ProLong[®] Gold は Thermo Fisher Scientific (MA, USA) から購入した。Block Ace は大日本住友製薬 (Osaka, Japan) から入手した。ウサギ由来 NQO1 抗体は Abcam (ab34173; Cambridge, UK)、ウサギ由来 HO-1 抗体は Enzo Life Sciences (BML-HC3001; New York, USA)、ウサギ由来 β -actin 抗体は Medical and Biological Laboratories. (PM053; Nagoya, Japan)、HRP 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体は DAKO Japan (P0448; Tokyo, Japan)、ウサギ由来 Nrf2 抗体 Santa Cruz Biotechnology (sc-722; CA, USA)、FITC 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体はシグマアルドリッチジャパン (F-9887; Tokyo, Japan) から入手した。Propidium iodide (PI) solution は Dojindo (Kumamoto, Japan) より購入した。tert-butylhydroquinone (t-BHQ) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より入手した。Potassium nitrosodisulfonate、0.4% (w/v) トリパンブルー溶液、5H-HCl、H₂O₂ および ISOGENI は和光純薬 (現、富士フイルム和光純薬) (Osaka, Japan) より購入した。

2-2-2. 細胞培養

SH-SY5Y 細胞は、10%非働化ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS)、100 units/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを含む DMEM/Ham's F12 を用いて、37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。

継代では、培養上清を取り除いたのち、0.25% (w/v) トリプシン-1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)・2Na 溶液 (以下、トリプシン溶液) を添加し、室温で 1-2 分反応させ、血清入り培地を添加して回収し、遠心後に新しい培地に置きかえた。実験には、細胞を解凍後 2-3 週間程度のもを用いた。また、樹状突起が増えてきた時点で細胞の使用を中止し、新たに凍結保存していた細胞を解凍して実験に用いた。

なお、6 well プレートを用いる場合には、ポリ-D-リジン臭化水素酸塩を滅菌水で 50 μ g/ml に希釈してプレートの底面が覆われるように適量入れて 20 分置き、2 ml の滅菌水で 3 回 wash してクリーンベンチ内で乾燥させたものを、ポリ-D-リジンコーティング

プレートとして用いた。

PCR およびウエスタンブロットに用いる場合は、SH-SY5Y 細胞 (2.5×10^5 cells/well) を 6 well プレートに播種し、24 時間かけて定着させた後、血清を添加していない培地（以下、無血清培地）に置き換え、TD あるいは 5HT を添加し、30 分、37°C、5% CO₂ 条件下にて培養した。その後、血清入りの新しい培地に置き換えてインキュベートし、RNA の抽出およびタンパク質の回収を行った。また、ROS 検出定量および転写因子の細胞内分布の陽性コントロールとして *t*-BHQ (50 μM) を用いた。

2-2-3. 細胞生存率の測定

1) トリパンブルー染色による生細胞計数法

SH-SY5Y 細胞 (1.0×10^4 cells/well) は 96 well プレートに 200 μl ずつ播種し、24 時間かけて定着させた後、無血清培地で 12.5–200 μM まで段階希釈した試料を添加し、30 分、37°C、5% CO₂ 条件下にて培養した。その後、血清入りの培地に置き換え、さらに 24 時間培養した。再び培地を取り除いた後、トリプシン溶液 (10 μl/well) を 1–2 分処理し、次いで血清入り培地を 50 μl 加えてトリプシンの活性を抑え、軽くピペッティングしながら各 well の細胞懸濁液を回収した。細胞懸濁液とトリパンブルー溶液が 1:1 となるように混合し、生細胞数を測定した。なお、SH-SY5Y 細胞はプレートから剥がれやすいため、96 well プレートでの培地の吸引操作にはオクタピペットを用いた。

2) 水溶性テトラゾリウム塩発色法による細胞生存率の測定

上記のトリパンブルー染色に記載の方法と同様に試料を細胞に添加し、血清入り培地に置き換えて 24 時間培養した後、無血清培地により最終濃度 100 μM とした H₂O₂ に置き換え、さらに 12 時間培養した。その後、無血清培地と Cell Count Reagent SF の混合液 (10:1) に置き換え、CO₂ インキュベーター内に 1–2 時間静置し、呈色後にマイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、生存率を算出した。

2-2-4. 定量 PCR (real-time RT-PCR)

1) RNA 抽出

総 RNA の抽出は既報⁽⁵⁴⁾ に従い、試薬および器具はすべて RNase-free のものを使用した。具体的には、以下の手順で実施した。

細胞培養後、PBS で洗浄した細胞を ISOGEN I 750 μl で溶解し、マイクロチューブに回収した後に攪拌した。この細胞溶解液 750 μl に対し、150 μl のクロロホルムを加えて攪拌した後に、遠心分離 (10,000 g, 5 min, 4°C) した。この上層 (水層) を 300 μl 回

取し、等量の 2-プロパノールを入れたマイクロチューブに移して約 1 分攪拌し、10 分室温で静置した。その後、遠心 (10,000 g, 10 min, 4°C) によって RNA を沈殿させた。沈殿物以外の液体を除去し、氷上で冷却しておいた 75%エタノール 1 ml を加え、転倒混和および遠心 (6,000 g, 5 min, 4°C) で沈殿物を洗浄した。エタノールを十分に除去した後、沈殿物が透明になるまでチューブの蓋をあけて自然乾燥させ、冷却した 30–50 µl の滅菌水を加えてピペティングした。得られた溶液は -80°C で保存した。使用時に、滅菌水で 60 倍に希釈し、60 µl 程度を trUView キュベット (Bio-Rad) に移し、紫外可視分光光度計 (ダブルビーム型 U-2010、日立社製) を用いて以下の式から総 RNA 量および純度を測定した。

$$\cdot \text{RNA 量 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{吸光度}_{\lambda 260} \times 40 \times \text{希釈倍率} \times 1/1,000$$

2) 逆転写反応

抽出した総 RNA を用いて、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit のマニュアルに従い cDNA を合成した。具体的には、RNA 2 µg となるように RNase free H₂O で希釈したもの 8 µl、Oligo-dT Primer および dNTP Mixture を各 1 µl を 0.2 ml PCR tube (アズワン、8 連タイプ、ドーム型キャップ) に加えて、65°C で 5 分加熱し、氷上で冷却した。

同キットに含まれる PrimeScript II RTase 1 µl、5×PrimeScript II Buffer 4 µl、RNase Inhibitor 0.5 µl、RNase free H₂O 4.5 µl を加熱・冷却処理後のチューブに加え 20 µl とし、ピペティングした。この試料全量を C1000™ サーマルサイクラー (Bio-Rad) を用いて、42°C (60 min) → 95°C (5 min) → 4°C (∞) の条件で反応させ、cDNA を得た。

3) PCR 反応

定量 PCR の検出にはインターカレーター法を用いた。2-2-4 に従って作成した cDNA 1 µl を用いて、Power SYBR® Green Master Mix (11 µl)、滅菌水 (11 µl)、Table 1 に示す 10 pmol センスセンスプライマー (1 µl)、10 pmol アンチセンスプライマー (1 µl) を混合した溶液中で、リアルタイム PCR 装置 (Applied Biosystems 7500) を用いて Table 1 に示す条件で PCR 反応を行い、増幅産物をモニタリングした。

Table 1. List of primer sequences and amplification conditions used in the PCR.

Genes		Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing °C (sec)
GAPDH* ¹	Forward	CTGCACCACCAACTGCTTAGC	40	60
	Reverse	CTTCTGGGTGGCAGTGATGGC		(60)
NQO1* ²	Forward	TTCCATCACCCTGGTGGCAG	40	60
	Reverse	TCCTGCCTGGAAGTTTAGGTC		(60)
HO-1* ³	Forward	AGCTTGGTCTAGAGTGAAAA	40	60
	Reverse	GAGGCAGAATCATGAGATAT		(60)

*1. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

*2. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1

*3. Heme oxygenase-1

4) 比較 C_t 法の計算解析

目的遺伝子の C_t (Threshold Cycle) 値を内在性コントロール C_t 値で補正し、相対値を算出して試料間の比較を行った。相対値の算出は以下のように行った。

- ・ ΔC_t 値 = ターゲット C_t 値 - 内在性コントロール C_t 値
- ・ $\Delta\Delta C_t$ 値 = ターゲット ΔC_t 値 - 内在性コントロール ΔC_t 値
- ・ 相対値 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$

2-2-5. TD の合成

TD は 5HT を用いて用事調製した⁽⁵⁵⁾。簡単には、1 mg の 5HT 塩酸塩を 500 μ l の純水に溶解し、6.3 mg の Potassium nitrosodisulfonate (Fremy 試薬) と混合し、溶液が紫色になるまで室温で反応させた。なお、Fremy 試薬は -20°C で小分け分注して保存し、使用後は窒素ガスを封入し、蓋およびパラフィルムで密栓して再度冷凍保存した。また、試薬のオレンジ色が退色した段階で失活していると判断して別の分注品を使用した。あらかじめカラム (Discovery[®] DSC-18 SPE Tube, 500 mg) を固相抽出装置 (GL-SPE Vacuum Manifold ; GL Sciences) にセットし、3 ml の Methanol (CH₃OH) と 2 ml の純水でプレコンディショニングした。このカラムに反応液 500 μ l を流し、3 ml の純水で洗浄した後、1% Formic acid (HCOOH) / 70% Acetonitrile (CH₃CN) 溶液 1.5 ml で溶出し、濃い紫色の抽出液のみを約 100 μ l 回収した。一部をとり 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 100 倍に希釈し、吸光度計 (UV mini 1240 ; SHIMADZU) を用いて波長 350 nm で測定し、濃度を算出した (モル吸光係数 : 1100)。

なお、各実験で用いた溶媒コントロール (Vehicle) は、TD 合成液の代わりに同量の水を添加し、同様に固相抽出処理した際の溶出液 (1% HCOOH/ 70% CH₃CN) を用いた。

2-2-6. 電気泳動およびウエスタンブロッティング

SDS-PAGE 電気泳動およびウエスタンブロッティングは、主に既報^[30]に基づいて行った。2-2-1 に従い処理した細胞を、氷冷 PBS で洗浄し、M-PER と HALT protease inhibitor (100 : 1) 混合液を用いて可溶化し、遠心分離 (10,000 g, 10 min, 4°C) 後、上清を回収し、細胞溶解液とした。細胞溶解液のタンパク質濃度は、ビシンコニン酸 (BCA) 法によって調整した。タンパク質の濃縮が必要な場合には、10 K アミコンウルトラ-0.5 PLGC ウルトラセル (遠心式限外濾過フィルター) を用いて、遠心 (10,000 g, 15 分, 4°C) し、フィルター上の高分子を回収した。細胞溶解液は 2% SDS、10%グリセロール、および少量の Bromophenol blue を含む 62.5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) (以下、Loading buffer とする) および、5% β-mercaptoethanol と混和し、3 分間煮沸したものを泳動試料とした。なお、各レーンには NQO1 および β-actin 検出には 6 μg、HO-1 の場合は 18 μg となるようにタンパク質を加えた。TD 付加タンパク質の検出では、濃度調整した細胞抽出液に、1/50 量となる 0.5 M TCEP (Tris 2-carboxyethylphosphine hydrochloride) を添加し、室温で 5 分還元処理した後、1 M トリス溶液を滴下することにより中和した。さらに同量の Loading buffer と混合し、泳動試料とした。1 レーンのタンパク質は 5 μg とした。

調製した泳動試料を 10% (w/v) SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、PVDF メンブレンにブロッティングした。転写したメンブレンは純水で調製した 4% スキムミルク (Block Ace) 中に移し、室温で 1 時間振盪した。ブロッキング後、メンブレンを 0.1% Tween 20 を含むトリス塩酸緩衝液 (Tween Tris Buffered Saline) (以下、TTBS) で 3 回洗浄し、Table 2 に示す条件で希釈した 1 次抗体とメンブレンを 4°C 条件下一晩反応させた。TTBS で 3 回洗浄後、希釈した 2 次抗体 (Table 2 参照) とメンブレンを室温下で 1 時間振盪させた。さらに TTBS で 3 回洗浄し、メンブレンに化学発光試薬である Chemi-Lumi One L を添加し、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000 plus ; FUJIFILM) を用いて化学発光モード (Chemiluminescence) によりタンパク抗原を検出した。画像の解析は、Image Gauge software (ver. 3.4, Fujifilm) を用いた。なお、抗 HO-1 抗体の場合は、抗体の希釈にシグナル増強剤 (Signal Enhancer HIKARI) を用いた。

ゲル染色の場合は、7.5% (v/v) 酢酸溶液に 1/5000 量の SYPRO Orange protein gel stain を混合した液体にゲルを浸し、遮光しながら 1 時間振盪した。7.5% (v/v) 酢酸溶液で 15 分振盪させ、染色液を洗浄した後、ルミノイメージアナライザーで励起光を照射し

て蛍光像を撮影し、同様にして解析した。

Table 2. List of reaction conditions for western blot.

	1st Antibody	Dilution	2nd Antibody	Dilution	Solvent
TD-adduct	1B7 ⁽³¹⁾	2,000	Anti-mouse IgG ^{*1} /HRP ^{*2}	10,000	TTBS
NQO1	Anti-NQO1 antibody	2,000			TTBS
HO-1	Anti-HO-1 antibody	1,000	Anti-rabbit IgG/HRP	10,000	Signal Enhancer HIKARI Solution A/ B
β-actin	Anti-β-actin antibody	2,000			TTBS

*1. Immunoglobulin G

*2. Horseradish peroxidase

2-2-7. 細胞内 ROS 産生の観察

SH-SY5Y 細胞 (2.7×10^4 cells) をチャンバースライド (Nunc Cover RS Glass Slide Sterile, 8 well) に播種し、24 時間培養して定着させた。各 well を無血清培地に溶解した CM-H₂DCF-DA (Invitrogen) (5 μM) に置き換えて 30 分培養した後、さらに TD あるいは 5HT を添加した無血清培地に置きかえ 30 分培養した。CM-H₂DCF-DA は光の影響を受けるため、クリーンベンチにおいて暗下での操作とした。細胞内の ROS レベルは、落射蛍光顕微鏡 (OLYMPUS CKX41、励起フィルター BP460-490C、吸収フィルター BA520 IF) を用いて観察した。

TD および 5HT の前処理による細胞保護作用の検討では、細胞を 24 時間培養して定着させた後、TD/5HT を添加した無血清培地で 30 分培養し、血清入り培地に交換してさらに 24 時間培養した。その後、細胞を無血清培地で希釈した 100 μM の H₂O₂ で刺激し、6 時間培養した。培地を無血清培地に溶解した CM-H₂DCF-DA (5 μM) と交換し、30 分処理した後、同様にして細胞内の ROS 産生を評価した。

2-2-8. 細胞染色

SH-SY5Y 細胞 (2.7×10^4 cells) をチャンバースライド (8 well) に播種し、24 時間培養して定着させた。各 well は TD あるいは 5HT (100 μM)、もしくは陽性コントロール

である *t*-BHQ (50 μ M) を添加した無血清培地に置き換え、30分培養した。その後、血清入り培地に交換してさらに3時間培養した。各 well を PBS で3回洗浄したのち、-20°Cに冷却しておいた CH₃OH 溶液に10分間、次いで室温で0.5% Triton 入り PBS 溶液に10分間つけ込んだ。PBS で3回洗浄後、3%ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA) 入りの PBS でスライド上の細胞を覆い、室温で1時間ブロッキングした。さらに PBS で3回洗浄した後、0.5% BSA-PBS で50倍に希釈した抗 Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) 抗体を加え、スライドガラス上に滴下し、湿度を保ったまま2時間静置した。スライドを洗浄後、PBS で100倍に希釈した FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体と 60 ng/ml に調整した PI を細胞に滴下し、さらに1時間遮光し湿度を保ったまま静置した。その後 PBS で洗浄し、退色防止剤 (ProLong Gold) をガラス面に滴下し、カバーガラスをかぶせマニキュアで封入した。その後、励起 488 (抗体) および 543 nm (核) による共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad, Radiance 2000) で観察した。

2-2-9. 統計学的解析

n=3 以上で実験を行ったものは、ANOVA に続いて Tukey もしくは Games-Howell の二重検定を SPSS (ver. 22.0) を用いてデータ解析した。p < 0.01 である場合に統計学的に有意であると判断した。

2-3. 結果

2-3-1. TD が SH-SY5Y 細胞の生存率および細胞内 ROS 産生に与える影響

TD を SH-SY5Y 細胞に添加し、細胞タンパク質への TD の付加修飾について検討を行った。TD はわずか 1 分程度で細胞タンパク質と反応し、スメア状の染色像が認められた (Fig. 1A)。TD は低分子から高分子まで様々な細胞タンパク質を修飾したが、培養時間 1 時間をピークにして、時間依存的に TD 修飾タンパク質のバンドが減弱したことから、付加した TD が不安定であるか、あるいは、修飾タンパク質の分解機構が働いていることが予想された。

そこで、TD の細胞に対する生理作用を検討するため、TD およびその対照試料として用いた 5HT を様々な濃度で SH-SY5Y 細胞に加え、細胞生存率を測定した。なお、生存率の測定に用いた水溶性ホルマザン (WST) 法は、ROS の存在によって吸光度が高くなり、実際の細胞生存率よりも高い数値が出るのが予想されたため、生細胞計数法と合わせて細胞生存率の測定を行った。実際に ROS を生じさせる濃度である TD150–200 μM 処理において、WST 法で測定した細胞生存率は生細胞計数法と比較して高い値を示したため、ここでは生細胞計数法の結果を示した。Fig. 1B に示すように、TD は 25 μM において、細胞増殖促進作用を示した。一方で、150–200 μM の高濃度領域では、細胞生存率を有意に低下させた。また、比較に用いた 5HT は生存率に影響を与えなかった。

次に、TD 処理による SH-SY5Y 細胞内の ROS 産生を、酸化還元感受性を有する蛍光試薬 CM-H₂DCF-DA を用いて調べた (Fig. 1C)。陽性コントロールとして用いた H₂O₂ (200 μM) では顕著な細胞内 ROS 産生が認められた。100 および 200 μM の TD を 30 分処理した細胞では、細胞内の ROS 産生が TD 濃度依存的に亢進していることが明らかになった。一方で、同濃度の 5HT を 30 分処理しても細胞内 ROS 産生は観察されなかった。

このことから、TD は低濃度では細胞増殖、高濃度では細胞内 ROS 産生と細胞生存率の低下を誘導することが示された。

Fig. 1. The effect of TD or 5HT on SH-SY5Y proteins, viability, and cellular ROS ⁽⁵⁶⁾.

(A) SH-SY5Y cells were treated with TD (100 μ M) for indicated time (0-12 h), then lysed for gel stain and western blot analysis using anti-TD-adducts Ab. The symbol “*” in the upper the gel means that the sample was rapidly collected after the addition of TD. The process approximately took one minute to complete.

(B) The effect of TD or 5HT exposure on cell viability in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were exposed to the indicated concentrations of samples (TD/5HT) or vehicle in FBS-free medium for 30 min, and the medium was then replaced with fresh medium containing 10% FBS to remove any unreacted TD. “Vehicle” indicates a solvent only control. After a 24 h incubation, the cells were subjected to a cell viability assay. The data are expressed as mean \pm standard deviation (n=5) and represent percentage control. Statistical significance was set at ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. vehicle using the one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

(C) The effect of TD or 5HT exposure on intracellular ROS generation in SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were pre-loaded with CM-H₂DCF-DA for 30 min, and then treated with vehicle (a), 200 μ M H₂O₂ (b), 100 μ M TD (c), 200 μ M TD (d), 100 μ M 5HT (e), or 200 μ M 5HT (f) for 30 min. H₂O₂ served as a positive control. This experiment was repeated three times and similar results were achieved. Scale bar in the image (f) as a representative indicates 70 μ m. DCF-derived fluorescent intensity of each image was quantified using ImageJ and expressed as relative to the control (a); values are means \pm standard deviation from 50 cells in triplicate experiments. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.01$ indicate significant difference vs. vehicle using the one-way ANOVA and Games-Howel post-hoc test.

2-3-2. 過酸化水素が誘導する細胞毒性に対する TD の抑制作用

細胞は親電子性物質による付加修飾や ROS による刺激などの適度なストレス負荷を受けることで、二次ストレスに対し抵抗性を獲得する⁽⁵³⁾。Fig. 1 に示すように、TD は毒性および ROS 産出誘導能を有しており、適度な条件下では細胞の適応応答を誘導する可能性がある。そこで、細胞に細胞生存率を有意に低下させない濃度の TD (100 μ M) を選択し、TD 暴露後に H₂O₂ で刺激した時の細胞生存率および細胞内 ROS 産生を測定した。Fig. 2A に示す通り、H₂O₂ による細胞生存率の低下は、100 μ M TD の前処理によって有意に抑制された。また、H₂O₂ の処理によって誘導される細胞内 ROS 産生も、TD を前処理することで抑制されることが明らかになった (Fig. 2B)。一方で、比較対照に用いた 5HT は、細胞生存率の低下および ROS 産生を抑制する作用は認められなかった。これらの結果から、事前の TD 100 μ M 暴露は H₂O₂ が誘導する細胞毒性を抑制することが示された。

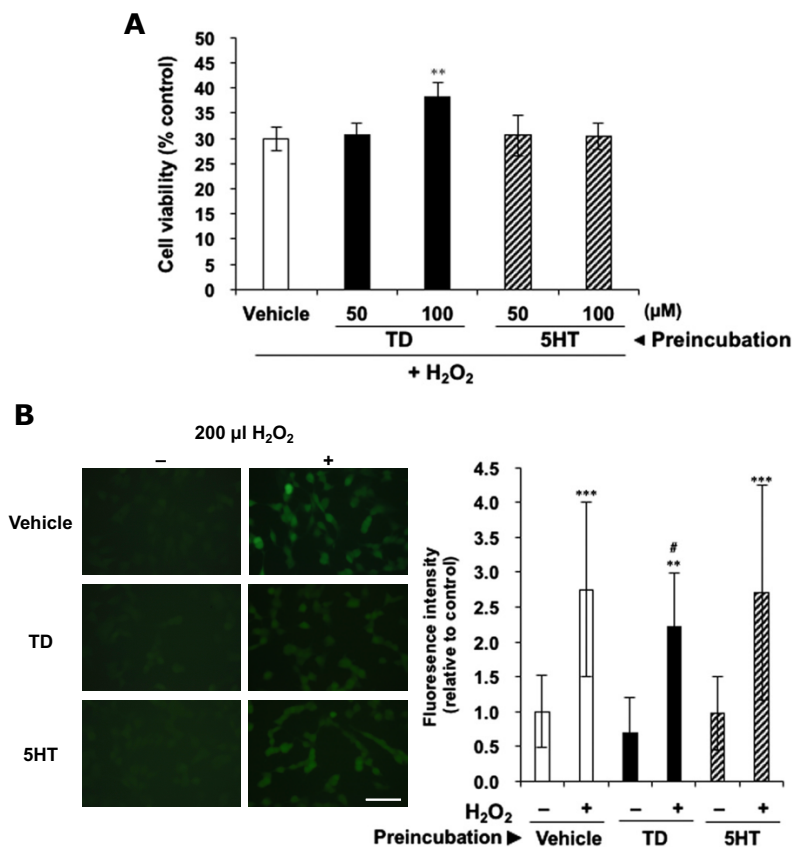


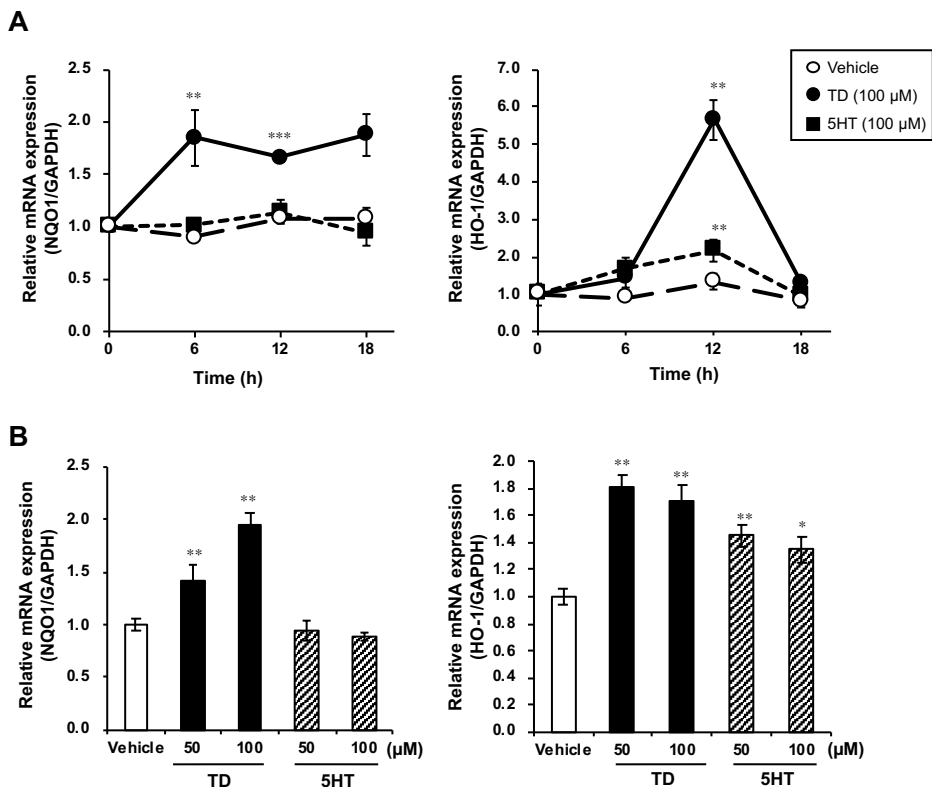
Fig. 2. The effect of pre-treatment with TD or 5HT on H₂O₂-induced cytotoxicity (A) and ROS generation (B) ⁽⁵⁶⁾.

A: SH-SY5Y cells were treated with either vehicle or samples (TD/5HT) in FBS-free medium for 30 min, and then the medium was replaced with fresh medium containing 10% FBS. After incubation for 24 h, the cells were further incubated for 12 h in the presence or absence of 100 μ M H₂O₂, and then subjected to a cell viability assay. Vehicle indicates the same as in Figure 1. The values presented are means \pm standard deviation (n=6) and are expressed as percentages relative to H₂O₂-untreated control cells. Significantly different (the one-way ANOVA and Tukey post-hoc test) from vehicle, $**p < 0.01$. B: The cells were treated with either vehicle or 100 μ M samples (TD/5HT) in the same way as the above and incubated for 24 h. After the medium was refreshed, 200 μ M H₂O₂ was added, and the cells were incubated for a further 6 h. CM-H₂DCF-DA (5 μ M) was added to the treated cells for 30 min. Images: The fluorescent signal was photographed using a fluorescence microscope. The results shown are representative images of experiments performed in triplicate. Scale bar indicate 70 μ m. Graph: Quantification of ROS in cells pre-treated with or without TD followed by H₂O₂. Intracellular ROS generation was determined by DCF fluorescence and the intensity was then calculated as described in Figure 1(B) legend. The data is expressed as relative to vehicle control without H₂O₂. $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ indicate significant difference vs. vehicle without H₂O₂; $#p < 0.05$ indicates significant difference vs. vehicle with H₂O₂ using the one-way ANOVA and Games-Howell post-hoc test.

2-3-3. TD 処理による解毒代謝・抗酸化関連酵素の発現誘導

2-3-2 で示したように、100 μM の TD 処理により細胞の適応応答が誘導される可能性が示唆された。TD は親電子性物質であり生体内や細胞内のタンパク質を含む種々の成分と反応することが予想されたが、実際に Fig. 1A に示したように TD は細胞内タンパク質を付加修飾した。親電子性物質は転写因子 Nrf2 を介し、第 2 相酵素群および抗酸化酵素群の遺伝子発現を誘導することがすでに報告されている⁽⁵³⁾。そこで、TD が細胞内の Nrf2 下流遺伝子およびタンパク質の発現に影響を与えるかを検討した。

TD および 5HT を 30 分処理して培地を交換し、更に経時的に培養したときの各遺伝子の発現変動を調べた。Fig. 3A に示すように、NQO1 および HO-1 は、溶媒コントロール (Vehicle) に比べて有意に遺伝子の発現が上昇した。さらに、NQO1 および HO-1 の遺伝子発現に対する TD および 5HT の濃度依存性について検討したところ、TD では両遺伝子とも 50 および 100 μM で有意に発現が上昇したのに対し、5HT で有意な発現上昇が見られたのは HO-1 のみであった (Fig. 3B)。TD 処理によって、遺伝子レベルでの抗酸化遺伝子の発現上昇が示されたことから、さらにタンパク質レベルでの発現について検討した。その結果、どちらのタンパク質も 100 μM TD 処理によって発現が上昇することが確認された (Fig. 3C)。



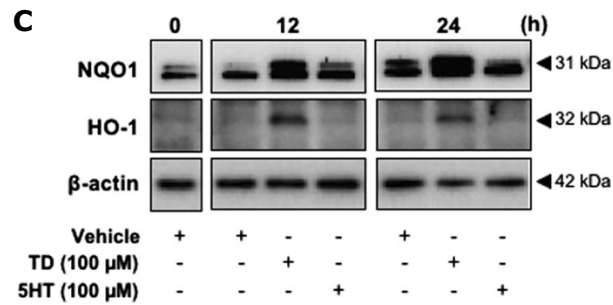


Fig. 3. Time- and concentration-dependent changes in the expression of the NQO1 and HO-1 in SH-5Y5Y cells exposed to T or 5HT⁽⁵⁶⁾.

A: The cells were treated with either TD (closed circles), 5HT (closed squares) or vehicle (open circles) in FBS-free medium for 30 min, and the medium was then replaced with fresh medium containing 10% FBS. After incubation for the indicated time intervals, NQO1 and HO-1 expression in the cells was analyzed using real-time PCR. B: The cells were treated in the same way as the above, and incubated for 6 h in medium containing 10% FBS. The expression of NQO1 and HO-1 was calibrated by measuring GAPDH expression, as described in the Materials and Methods. C: The cells were treated with 100 μM TD/5HT or vehicle for 30 min in FBS-free medium, and the medium was replaced with fresh medium containing 10% FBS. After incubation for the indicated time intervals, the cell extracts were analyzed by Western blotting. The results shown are representative of at least two independent experiments. The values are presented as mean ± standard deviation (n=3) and represent percentage control. Statistical significance was set at **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 vs. vehicle using the one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

2-3-4. Nrf2 の細胞内分布に対する TD の影響

TD が誘導する NQO1 および HO-1 に対する Nrf2 の関与を調べるために、TD (100 μ M) 処理による Nrf2 の局在性に与える影響を調べた。溶媒コントロールおよび 5HT 処理した細胞では Nrf2 の多くは細胞質での染色が観察された一方で、TD を処理した細胞では核において Nrf2 の染色が認められた (Fig. 4)。Nrf2 の核内移行を誘導することが知られている陽性コントロールの *t*-BHQ を処理した細胞でも同様の現象が認められた⁽⁵⁷⁾。このことから、TD は Nrf2 の核内移行を誘導することが確認された。

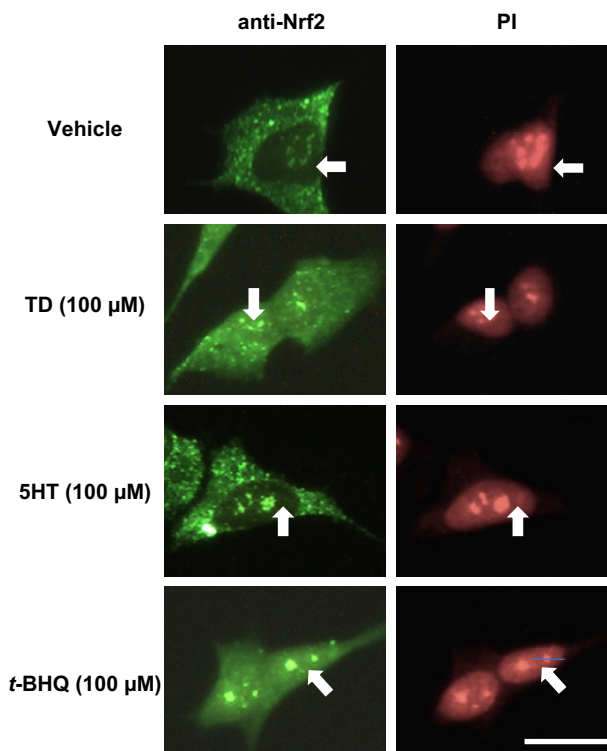


Fig. 4. Effect of TD on the subcellular distribution of Nrf2 in SH-SY5Y cells⁽⁵⁶⁾.

The cells were treated with TD (100 μ M) or vehicle in FBS-free medium for 30 min, and the medium was then replaced with fresh medium containing 10% FBS. Cells treated with 50 μ M *t*-BHQ were used as positive control. After incubation for 3 h, cells were fixed with methanol and permeabilized with 0.5% Triton X-100 and then blocked with PBS containing 3% BSA. The cells were then incubated with antibody (anti-Nrf2), followed by secondary antibody (FITC labelled). The nuclei were stained with propidium iodide (PI). Arrows indicate nucleus. Scale bar shows 20 μ m. This experiment was repeated three times and similar results were achieved.

2-4. 考察

ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞において、TD は 150 μM 以上の濃度では有意に細胞生存率を低下させること、また 100–200 μM 処理によって細胞内 ROS 産生を誘導することが明らかになった (Fig. 1B, C)。先行研究において TD は神経毒と報告されているが^(34, 47)、それを支持する結果であり、TD は脳内において高濃度で生じた場合に毒性物質として作用する可能性が示唆された。一方で、TD を低濃度 (25 μM) 処理した細胞においては細胞生存率が有意に上昇した。先行研究では細胞表面に存在する上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) に EGF などのリガンドが結合すると、MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 経路や PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) -AKT 経路などが活性化され、細胞増殖が促進されることが報告されている^[34]。SH-SY5Y 細胞にも EGFR が存在することから⁽⁵⁸⁾、増殖作用が認められた理由の一つとして TD が EGFR を介して増殖シグナルを活性化した可能性が推察される。また、5HT はウシの肺動脈平滑筋細胞やチャイニーズハムスターの卵巣 (Chinese hamster ovary: CHO) 細胞を用いた実験において 5HT 受容体を介して細胞内 ROS を産生させることが報告されているが^(59, 60)、本研究では細胞毒性や ROS 産生に対して、5HT の有意な作用は認められなかった。この理由は、先行研究とは細胞への処理時間や濃度が異なるためであると推察している。

H_2O_2 は好氣的代謝の毒性産物であり、高濃度では SH-SY5Y 細胞のアポトーシスを誘導する⁽⁶¹⁾。TD を前処理した細胞では、 H_2O_2 による ROS 産生が抑制された (Fig. 2A)。なお、 H_2O_2 で処理後、30 分における ROS 生成量に違いが認められなかったため、 H_2O_2 処理後 6 時間での ROS 生成量を観察および測定している。CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ については、長時間のインキュベーションによる分解を避けるため、 H_2O_2 を 6 時間処理した後で添加し、その時の ROS 産生量を測定した。この場合、前処理と H_2O_2 という二段階のストレス負荷が与えられた状態で、CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ を取り込ませているため、細胞の CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 取り込み量や、DCFH に脱アセチル化するエステラーゼの活性などを考慮すると、ROS そのものを正確に定量できていない可能性もある。しかし、細胞生存率の低下についても、TD を前処理した細胞での抑制が認められた (Fig. 2B)。TD (100 μM) を細胞に処理することで細胞内タンパク質が修飾され、また生存率に影響せずに ROS 産生を誘導することから、TD が細胞に対して適度なストレス負荷をかけたことで細胞の適応応答が誘導された可能性が考えられる。

実際に、本章で述べたように、細胞での恒常性維持において重要な役割を担う Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)-Nrf2 経路の下流遺伝子である NQO1 および HO-1 の発現および同酵素のタンパク質レベルでの発現上昇が確認された (Fig. 3)。Keap1 はセン

タンパク質であり、Keap1のチオール基の化学修飾に伴い、転写因子Nrf2が活性化される。先行研究において、親電子性を有する化学物質1,2-ナフトキノロンや1,4-ベンゾキノロン、また、食品成分であるイソチオシアネートやゼルンボンには、Keap1のシステイン残基を修飾し、Nrf2を活性化することや、NQO1やHO-1などの発現が誘導されることが報告されている^(49,50,62,63)。このためTDもKeap1に付加修飾することが予想されるが、その予想を証明するには、免疫沈降法などによりTDが付加修飾したKeap1を検出する必要がある。また、ROSによっても、Keap1-Nrf2経路は活性化される⁽⁶⁴⁾。実際に、TDを処理した細胞では、Nrf2の核内移行が確認されたことから (Fig. 4)、TDは細胞内に取り込まれた後にKeap1を修飾する、もしくはTDによって誘導産生された細胞内ROSがKeap1-Nrf2システムを活性化することにより、NQO1およびHO-1の発現が誘導することが予想された。加えて、NQO1やHO-1はシステインを有するPI3K-Akt経路の活性化などによっても発現が増加する^(65,66)。TDにより誘導される応答反応に関する詳細な機構解明は今後の課題である。

以上、本章をまとめると、TDは150 μM 以上の濃度で存在する場合には、神経細胞に対して毒性物質として生存率を低下させる一方で、適度にストレス負荷を与える濃度(100 μM)ではNrf2の核内移行を誘導し、細胞内の抗酸化酵素の遺伝子およびタンパク質レベルでの発現を増加させた。TDの100-200 μM という濃度は、内因性物質とはいえかなり高いと考えるが、5HTやMPOが集積した場所において生成した場合には、局所的に一過性に高濃度に達する可能性もある。本章では、TDは細胞に対し、保護的にも毒性分子としても作用することを初めて明らかにした。このことから、炎症部位においてTDが生成する場合、単に増悪因子として作用するだけでなく、その濃度によっては炎症を抑制する方向にも転じる可能性が示唆された。TDは内因性物質であることから、炎症などに伴い恒常的に生体内で生成し、周辺のタンパク質に作用し、細胞の機能性に影響を及ぼすことが予想される。今後、5HTに関連する炎症疾患の機序を解明する上で、重要な因子となる可能性もある。

第3章 DSS 投与モデルマウスの大腸炎に伴うセロトニン酸化物 TD の生成

3-1. 緒言

酸化ストレスの増加は、核酸やタンパク質、脂質などのさまざまな生体分子の修飾をもたらす⁽⁶⁷⁾。これらの修飾された生体分子の蓄積は、クローン病や潰瘍性大腸炎を含む IBD などのさまざまな炎症性疾患に関連していることが予想される⁽¹⁸⁾。このような酸化修飾された生体分子は疾病の指標ともなり得るため、「酸化ストレスマーカー」とも呼ばれる。

IBD は、下痢や腹痛などの症状を呈し、寛解と再燃を繰り返す慢性炎症関連疾患である⁽⁶⁸⁾。IBD 患者の腸では免疫細胞の腸粘膜への浸潤など、炎症の組織学的特徴が見られ⁽⁶⁹⁾、免疫調節メカニズムに異常が生じていると考えられる。これらの免疫細胞の中で、好中球と単球は MPO 酵素を合成・放出する⁽⁷⁰⁾。また、MPO は IBD 患者の粘膜で発現増加する⁽⁷¹⁾。序論 1-3 にも示したように、MPO は塩化物イオンや臭化物イオン、ヨウ化物イオン、チオシアン酸イオンなどのさまざまな基質と反応し、次亜ハロゲン酸である HOCl や HOBr など、反応性に富む分子の生成を触媒する⁽⁷²⁾。さらに、次亜ハロゲン酸はアミノ基と反応してクロラミンやブロラミンを生じ、また、タンパク質チロシン残基と反応してハロゲン化チロシン (3-クロロチロシン、3,5-ジクロロチロシン、3-ブロモチロシン、および 3,5-ジブロモチロシン) 残基を生成する。これらチロシン修飾物は炎症を伴う様々な疾病で生成増加するが、腸炎との関係では、実験的大腸炎モデルで 3-クロロチロシンが増加することが報告されている^(71,73)。さらに MPO は、いわゆるペルオキシダーゼとして働き、5HT や尿酸などの他の内因性化合物も MPO の基質となりうる⁽⁷²⁾。特に腸は 5HT が合成される器官であり、MPO が共存すればその基質となりうる。

5HT の 90% 以上は胃腸クロム親和性 (Enterochromaffin: EC) 細胞で生成される⁽²⁵⁾。また、先行研究では、健康な対照群と比較して IBD 患者の大腸組織で EC 細胞が増加し、それに伴い 5HT 含有量も増加することが報告されている⁽²⁷⁾。これらの増加は齧歯類を用いた大腸炎動物モデルにおいても観察されている^(74,75)。すなわち、上述したように、腸における炎症時に過剰に生じた 5HT が MPO の基質となり、その産物として反応性に富むキノン体 TD が形成されることが予想される^(40,41)。

1990 年代から、Dryhurst らにより TD の安定性や反応性など、化学的特性が明らかにされてきた^(40,76)。当研究室においても、*in vitro* での MPO による TD の形成と、チオール基を有するモデルタンパク質である GAPDH に対する TD の部位特異的な付加反応に

ついて報告している⁽⁵⁵⁾。SH-SY5Y 神経芽細胞腫細胞の α -および β -チューブリン、ビメンチン、ニューロフィラメント-L などのいくつかの細胞骨格タンパク質が TD によって優先的に修飾されることも報告してきた⁽³¹⁾。その中の一つである β -チューブリンに着目した検討では、*in vitro* ではあるが、TD が β -チューブリンの自己重合を調節することを明らかにした⁽³¹⁾。このように TD は高い反応性を有することから、生体内で生じた TD は生体分子に対して付加反応を起こし、さらには生体分子の機能に何らかの影響を及ぼすことが予想される。特にチオール部分への付加反応は、第 2 章でも示したように親電子シグナル伝達を介した様々な生体応答を引き起こし得ることから⁽⁷⁷⁾、TD が大腸の炎症に関与するシグナル経路に影響を与える可能性がある。

一方で、*in vivo* で TD の生成・存在に関する報告は極めてわずかである。第 1 章でも述べたように、これまでに当研究室で作製された TD 修飾タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を使用し、ヒトアテローム性動脈硬化症プラークにおけるタンパク質結合型 TD が検出されている⁽⁴³⁾。また、*in vivo* での遊離型の TD は、水銀メチルで処理されたゼブラフィッシュの脳で電気化学的方法により確認されているのみである⁽⁴²⁾。しかしながら電気化学的検出は特異性に欠け、かつ、生じた TD は非常に不安定であるため⁽³⁴⁾、電気化学的な手法だけで TD の存在を証明することは困難と考える。その生理的な意義を知るためにも、生体サンプルから遊離の TD を特異的に検出するための新たな分析方法の構築が必要である。

上述したように、腸では 5HT が恒常的に産生されており、IBD 患者の腸ではさらに高値を示す^(27,78)。5HT を酸化しうる好中球 MPO も IBD 患者の炎症活動期の患者の腸で特に増加し、炎症部位に集積する。このため、TD が患者の炎症組織で生成され、炎症に何らかの影響を与えることも予想される。しかし、これまでのところ 5HT が多く存在する消化管での TD の生成やその局在性に関する報告はない。本章では、潰瘍性大腸炎のモデルとなるデキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sodium sulfate: DSS) 誘導性大腸炎モデルマウスを用いて、遊離 TD および TD 付加タンパク質の検出を化学的および組織学的に検討し、酵素 MPO やハロゲン化チロシンなどの関連マーカーと比較した。また、その目的を達成するため遊離 TD を誘導体化して安定化してから部分精製し、高感度な質量分析器で測定する手法もあわせて構築した。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

BCA キット、Protease 阻害剤カクテルおよびシグナル増強剤 HIKARI (Immunostain Solution B)、Potassium nitrosodisulfonate、5HT、H₂O₂ は第 2 章と同様である。抗 TD 付加タンパク質マウスモノクローナル抗体 (1B7) および 抗ジハロゲン化チロシンマウスモノクローナル抗体 (3A5) については既報において作製されたものを使用した^(31, 79)。ウサギ由来抗 MPO 抗体、HRP 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体および液体 DAB 基質/発色剤は DAKO Japan (Tokyo, Japan) より購入した。ヒストファインマウスステインキットはニチレイバイオサイエンス (Osaka, Japan) より入手した。DSS (MW:36,000–50,000) は MP Biomedicals (Santa Ana, CA, USA) より購入した。*o*-phenylenediamine (OPD)、Hexadecyltrimethylammonium bromide、ImmunoStar® LD および Isoflurane は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) より入手した。5-Hydroxytryptamine-*d*₄ (5HT-*d*₄) は Medical Isotope Inc. (Pelham, NH, USA) より購入した。*o*-dianisidine dihydrochloride は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より入手した。ヘマトキシレンおよびエオジン溶液は武藤化学 (Tokyo, Japan) より購入した。

3-2-2. 実験動物

16 匹の雌性 ICR マウス (7 週齢) を日本エスエルシーから入手した。飼育室は恒温恒湿で管理し、12 時間の明/暗サイクル (9:00 から 21:00) の条件下でマウスを飼育した。飼育および実験の実施にあたっては、動物実験の適正実施に関するガイドライン (日本学術会議) を遵守した。なお、本研究は、兵庫県立大学の倫理委員会による承認後に実施した (No : 171、236)。

3-2-3. 大腸炎モデルの作製およびサンプルの回収

1 週間の馴化期間を経て、マウス (n=16) をランダムに 2 つの群 (n=8) に分けた。一方の群には、0 日目から 7 日目まで 5% (w/v) DSS を含む蒸留水を自由に与えた (DSS 群)。もう一方の群には、コントロールとして蒸留水を与えた (コントロール群)。各溶液は 2 日おきに新しい溶液と交換した。マウスの体重は毎日計測した。体重減少、便の硬さ、および便の出血に基づく疾患活動性指数 (Disease activity index: DAI) スコアは Table 3 に従い計算した⁽⁸⁰⁾。7 日目に、イソフルランを使用してマウスを安楽死させ、下大静脈から血液を採取した。その後、結腸から直腸までを切除し、大腸として長さを測定した。各群 3 匹のマウスの大腸を免疫組織化学染色に使用した。残りの各群 5 匹の

マウス大腸は、以下の処理を行い、MPO 活性の測定など、その他の実験に使用した。まずマウスの大腸を氷冷した PBS で洗浄した後、縦方向に開き、大腸粘膜をかきとり、氷冷しながら直腸から盲腸までの粘膜を均一化した。得られた粘膜は 1 匹につき 3 等分して液体窒素で急速凍結し、使用するまで -80°C で保存した。脾臓については、解剖時に重量を測定した。

Table 3. DAI scoring system.

Score	Weight loss (%)	Stool consistency	Visible blood in feces
0	none	normal	no bleeding
1	1-5%	-	-
2	5-10%	loose stools	slight bleeding
3	10-15%	-	-
4	more than 15%	watery diarrhea	gross bleeding

3-2-4. MPO 活性の測定

MPO 活性は、既報に準じて測定した⁽⁸¹⁾。具体的には、大腸粘膜 (50 mg/ml) を 50 mM 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム緩衝液 (pH 6.0) 中で、Branson Ultrasonics Sonifier 150 を使用して氷上で超音波処理した。遠心分離後、上清を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で *o*-ジアニシジン二塩酸塩 (0.53 mM) および H₂O₂ (0.2 mM) と混合した。吸光度 450 nm の変化を測定し、MPO 活性の 1 単位を 25°C で 1 分あたり 1 μmol の過酸化物を分解するのに必要な量として定義した。測定結果は、タンパク質 1 mg あたりの MPO 活性として示した。

3-2-5. TD の測定

1) 安定同位体 TD に由来するフェナジン誘導体の調製

5HT の安定同位体 5HT-*d*₄ を用いて TD-*d*₄ を作製し、さらに *o*-phenylenediamine (OPD) と反応させて TD-*d*₄-OPD 誘導体 (フェナジン誘導体、内部標準 I.S.) を調製した。TD-*d*₄ の作製は 2-2-5 と同様にして行った。作製した TD-*d*₄ を含む溶出液は、2% 酢酸-エタノールに溶解した 0.2% OPD 溶液と等量で混合し、37°C で 30 分間反応させた。得られた TD-*d*₄-OPD を 0.1% 酢酸水溶液/CH₃CN (Combi-RP, 20 × 100 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.) を用いた高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography: HPLC) により、フェナジン誘導体に特徴的な UV スキャン波形を示す主要なピークを分取・濃縮し、更に HPLC により精製した⁽²⁰⁾。構造確認は液体クロマトグラフィーの

四重極型タンデム質量分析計 (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry: LC-MS/MS, API3000, AB Sciex) により行った。

2) 腸粘膜サンプル中の TD 誘導体化および LC-MS/MS による測定

検量線および回収率を確認するための TD は、2-2-5 と同様にして用事調製した。大腸粘膜サンプル (20 mg) は、PBS (80 μ l) と混合し、氷上で超音波処理した。サンプルを遠心分離して回収した上清または調製した TD 標品 (0–1 μ M) を 0.2%OPD 溶液と等量で混合し、30 分間 37°C で保温反応させた。得られたサンプル中の TD-OPD フェナジン誘導体をホモジネートから部分精製するために、内部標準 I.S. と混合し、さらにポリマーベースの逆相固相抽出カラム (Phenomenex Strata-X, 30 mg) によって、夾雑物を除去した。具体的には、CH₃OH および 0.1% HCOOH でコンディショニングした固相抽出カラムに誘導体化処理後のホモジネートを添加し、0.1% HCOOH/CH₃OH (95/5) 溶液 3 ml で洗浄した後、0.1% HCOOH 溶液 (H₂O/CH₃CN (1/1)) 1 ml で溶出した。溶出した TD-OPD フェナジン誘導体を含むサンプルおよび検量線用の標品は、LC-MS/MS を用いて分析した。分離には、カラム Develosil ODS-HG-3 (2 \times 150 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.) を接続した HPLC (Agilent HP1100) を用いた。サンプルおよび検量線用の標品の注入量は 5 μ l、流速は 0.2 ml/min とし、移動相は 0.1% 酢酸水溶液 (溶媒 A) および CH₃CN (溶媒 B) を用いた。グラジエントプログラムは 0 分 B0%、12 分 B80%、13 分 B0%、および 30 分 B0% とした。ポジティブイオン化での多重反応モニタリング (Multiple reaction monitoring: MRM) は、分子イオン [M+H]⁺ をプリカーサーとしたときの生成物イオン m/z (TD-OPD 263.4/246.2; I.S. 267.0 /250.2) を測定した。

3-2-6. 組織切片の調製およびヘマトキシリンおよびエオジン染色

摘出した大腸を PBS で洗浄し、縦方向に切り開いた後、10%ホルマリンで濾紙に挟んだ状態で固定した。固定された大腸は腸管全体を観察できるよう「スイスロール」構成にし、パラフィンワックスに埋め込んだ。組織切片 (3 μ m) をアミノプロピルトリエトキシシランでコーティングしたスライドガラスにのせた。組織学的特徴を確認するために、既報に従いヘマトキシリンおよびエオジン染色を行った⁽⁸²⁾。

3-2-7. 組織染色

切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール溶液で再水和した。内因性ペルオキシダーゼ活性は、室温で 30 分間、0.3% H₂O₂/CH₃OH 溶液に浸漬することでブロック (失活化) した。抗ジハロチロシン抗体 (3A5) および抗体 F4/80 ラットモノクローナル抗

体のための切片については、抗原を賦活化するために、圧力鍋（Delicio 6L, T-FAL）を使用し、0.01 M クエン酸バッファー（pH 6.0）中で 10 分間賦活化した。圧力をかけた後、切片はそのまま 30 分間放冷した。抗 TD 付加タンパク質抗体 1B7 および抗 MPO ウサギポリクローナル抗体の免疫染色に関しては、賦活化処理を行わなかった。マウス組織にマウス由来の一次抗体を使用した場合の内因性マウス IgG に対する染色（偽陽性）を減らすために、モノクローナル抗体 1B7 および 3A5 を用いる切片については NICHIREI-Histofine Mousestain Kit を使用し、1 次抗体と 2 次抗体の前にブロッキング操作を製造元のプロトコルに準じて行なった。1 次抗体は、それぞれの切片を、1B7（1.0 $\mu\text{g/ml}$ ）、3A5（10 $\mu\text{g/ml}$ ）、抗 MPO 抗体（1:200 希釈）、または抗 F4/80 抗体（1.0 $\mu\text{g/ml}$ ）と室温で一晩インキュベートした。次に 10 mM PBS（pH 7.2）で洗浄し、1B7 または 3A5 抗体については、ブロッキング後、Goat 由来抗 Mouse IgG -HRP 標識（Histofine Simple Stain MAX-PO）とインキュベートした。MPO 抗体で処理した切片は Goat 由来抗 Rabbit IgG-HRP 標識（Dako）（1:100 希釈）と、F4/80 抗体で処理した切片は Histofine Simple Stain MAX-PO（Rat）と、室温で 30 分間インキュベートした。最後に、Liquid DAB + Substrate Chromogen System を使用し視覚化した。その後、核をメイヤーのヘマトキシリンで薄く染色し、流水および PBS で色出しした。スライドをエタノールおよびキシレンを用いて脱水した後、封入および乾燥させた。

3-2-8. *In vivo* での TD 付加タンパク質生成試験

3-2-3 で回収した大腸粘膜が 100 mg/ml となるように、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む M-PER を加え、Branson Ultrasonics Sonifier 150 を使用して氷上で超音波処理した。遠心分離後、上清のタンパク質濃度が 4.0 mg/ml となるように 0.01 M リン酸緩衝液（pH 7.4）で調整し、このサンプルを Loading buffer と混合し、TCEP（10 mM）を加え、沸騰水浴中で 3 分間加熱し、1 M Tris 水溶液により中和したものを泳動サンプルとした。

3-2-9. 粘膜ホモジネートを用いた TD 付加およびハロゲン化タンパク質生成試験

3-2-3 で回収した大腸粘膜が 25 mg/ml となるようにプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む CelLytic MT Cell Reagent（Sigma-Aldrich）を加え、3-2-8 と同様にして超音波処理した。遠心分離後、上清のタンパク質濃度が 1.7 mg/ml となるように PBS で調整し、さらに、5HT（100 μM ）、4-aminobenzoic acid hydrazide（1 mM）、 H_2O_2 （500 μM ）を添加し、37°C で 15 分間反応させた。 H_2O_2 は 5 分おきに添加した。最後にカタラーゼ（最終濃度 0.1 mg/ml）を添加することにより反応を停止した。このサンプルに 4×Laemmli サンプ

ルバッファー (Bio-Rad) を添加し、TCEP (10mM) を加え、沸騰水浴中で3分間加熱し、1 M Tris 水溶液により中和したものを泳動サンプルとした。

3-2-10. 電気泳動およびウエスタンブロットティング

電気泳動およびウエスタンブロットは 2-2-6 に準じて行った。1 レーンのタンパク質量は、*in vivo* での TD 付加タンパク質の確認には 20 μg 、*in vitro* での TD 付加タンパク質の確認には 2.5 μg (タンパク染色) および 5 μg (ウエスタンブロット) とした。ゲル染色には、Flamingo ゲルステイン (Bio-Rad) を用いて、製造元のプロトコル通りに行った。ウエスタンブロットのブロッキングには EzBlock Chemi (ATTO) を用いた。1 次抗体は TTBS で調製した 1B7(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で室温 2 時間、2 次抗体は Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B で調製した Mouse TrueBlot® ULTRA (1:2,000; Anti-Mouse Ig Horseradish Peroxidase) (Rockland Immunochemicals) で室温 1 時間反応させた。メンブレンの化学発光には、ImmunoStar® LD を用いた。検出は 2-2-6 に準じて行った。

3-2-11. 統計処理

統計的な有意性は、SPSS ver. 25.0 (IBM, Somers, NY) ソフトウェアを使用し、Student の *t* 検定を使用して決定した。0.05 未満の *p* 値は統計的に有意であると見なした。

3-3. 結果

3-3-1. DSS による大腸炎誘発

ICR マウスに 5%DSS 溶液を 7 日間自由飲水させ、大腸炎モデルを作製した。滅菌水を与えたコントロール群と比較して、DSS 群の体重は 7 日目に有意に減少した ($p < 0.05$) (Fig. 1A)。DAI スコアは DSS 群では徐々に有意に増加したが、コントロール群では増加しなかった (Fig. 1B)。これらより、DSS 群の大腸において炎症の誘導が確認された。DSS 群の大腸の長さはコントロール群に比べて短くなり、組織化学的にも粘膜上皮の喪失、肉芽腫の形成といった炎症の特徴を示した (Fig. 1C)。DSS 群ではコントロール群と比べて体重 1 g あたりの脾臓重量も増加した (Fig. 1D)。

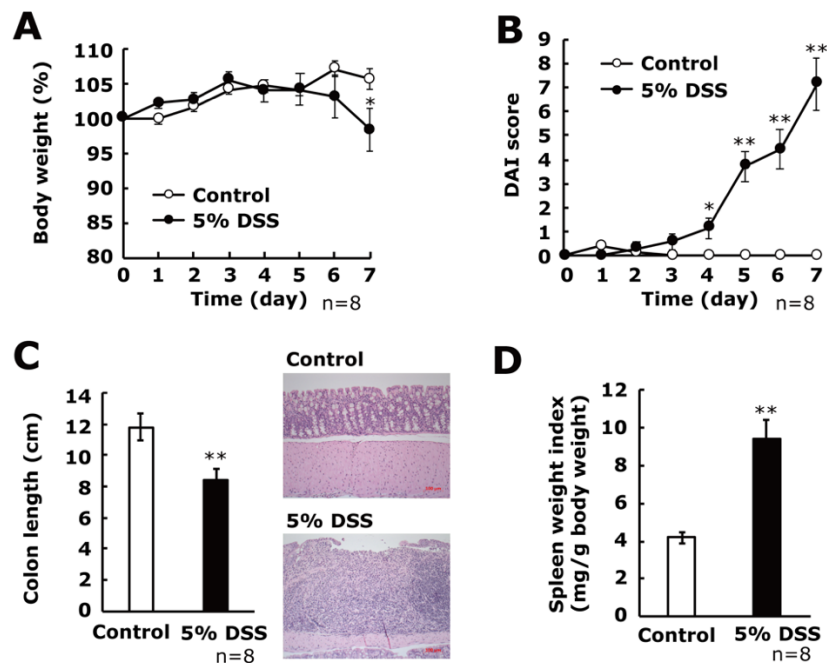


Fig. 1. Biological scores and macroscopic appearance of the large intestine of mice administrated 5% w/v dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water for 7 days in ICR mice. Data represent the means \pm SEM, and statistical analysis was performed using a Student's *t*-test between control and DSS-treated mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (A) Percent body weight changes in control and DSS-induced mice. Open circle, control mice. Closed circle, DSS mice. (B) Disease activity index (DAI) score. DAI was calculated as shown in the Materials and Methods section. Open circle, control mice. Closed circle, DSS mice. (C) Quantitative measurement of colon length. White bar, control mice. Filled bar, DSS mice. Representative images of hematoxylin and eosin-stained colon sections are also shown. Scale bars, 100 μ m. (D) Spleen weight index. White bar, control mice. Filled bar, DSS mice.

3-3-2. LC-MS/MS による大腸粘膜からの TD 検出定量

TD は親電子性物質であり反応性が高いため⁽³⁴⁾、生体中の TD を安定に検出定量することが困難であった。そこで、大腸粘膜のホモジネート中の TD を OPD により誘導体化し、得られた安定なフェナジン誘導体 TD-OPD を LC-MS/MS を用いて検出定量した。Fig. 2A および 2B に示すように、標準の TD-OPD 誘導体と内部標準 (I.S.) として用いた安定同位体 TD-*d*₄-OPD は、10.7 分の保持時間に検出された。内因性 TD-OPD はコントロール群の大腸粘膜および粘膜下組織のホモジネートからも検出定量されたが (Fig. 2C)、DSS 群の TD はコントロール群の量と比較して約 3.2 倍高値であった ($p < 0.01$)。遊離の TD は反応性が高いことから、定量された TD は生じたもののごく一部である可能性がある。実際、コントロール群の大腸粘膜に合成 TD (250 μ M) を添加しホモジナイズしたものは、大腸粘膜を加えていない対照サンプルと比較して、TD-OPD のピーク面積がおおよそ 1/500 まで減少したことから (Fig. 2D, E)、生体内で生じた TD は速やかに腸粘膜タンパク質などと付加反応することが推定された。すなわち、今回粘膜から誘導体化して定量された TD は、組織タンパク質などと未反応のごくわずかに残存している遊離 TD を見ている可能性が高い。TD はチオール基に対して高い反応性を有することから、生体内で生じた TD の多くはタンパク質チオール基あるいはグルタチオンと反応するなどして、遊離体としては微量にしか存在しない可能性が示唆された。

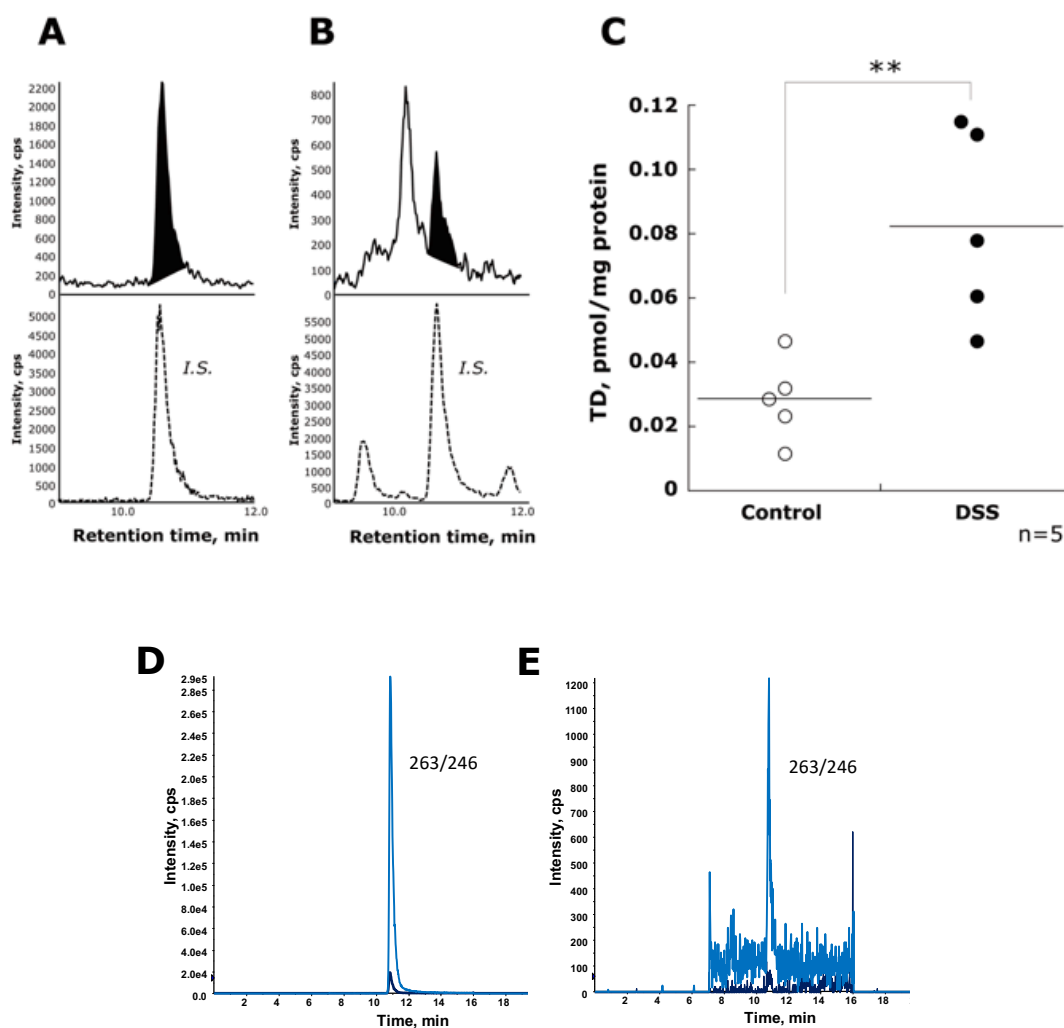


Fig. 2. Chromatograms of multiple-reaction monitoring (MRM) for the TD-OPD derivative and free TD levels in the colorectal mucosa and submucosa from control and DSS-challenged mice. Standard synthetic TD and samples were reacted with OPD reagent, and the resulting TD-OPD was analyzed by LC-MS/MS. (A) The MRM chromatogram of the standard TD-OPD (30 nM of TD) is shown. The dotted line shows stable isotopic TD- d_1 -OPD used as the internal standard (I.S.). (B) Representative MRM chromatogram of TD-OPD originating from the homogenate of the colorectal mucosa and submucosa from DSS-treated mice (7 days). Each mouse mucosa was homogenized, and the supernatant was incubated with an OPD solution. TD-OPD, solid line. TD- d_1 -OPD, dotted line. (C) TD quantitation in the colorectal mucosa and submucosa. TD-OPD from samples were quantified by comparison with the TD-OPD standards. The values were corrected by the protein concentration and expressed as pmol/mg protein. Groups were compared by a Student's t -test ($n=5$, $**p < 0.01$). The significance was compared with the control group. (D, E) MRM chromatogram of TD-OPD supplemented in homogenate. Reaction solution of TD (250 μ M) without colorectal mucosa/submucosa (D) and with colorectal mucosa/submucosa (E). Blue and black lines mean TD-OPD and TD- d_1 -OPD, respectively.

3-3-3. 大腸粘膜からの TD 付加およびハロゲン化タンパク質の検出

3-3-2 で示したように、遊離の TD として定量したものはごく一部であり、多くが組織中のタンパク質などと付加反応している可能性がある。そこで、コントロールおよび DSS 群の大腸粘膜を用いて、ウエスタンブロット法による付加タンパク質の検出を試みた。Fig. 3 に示すように、TD 付加タンパク質は炎症の有無による差異は認められなかった。一方で、ジハロゲン化チロシンを認識する抗体で染色したハロゲン化されたタンパク質については、DSS 処理群においてバンドの染色がわずかながら増強傾向が認められた。

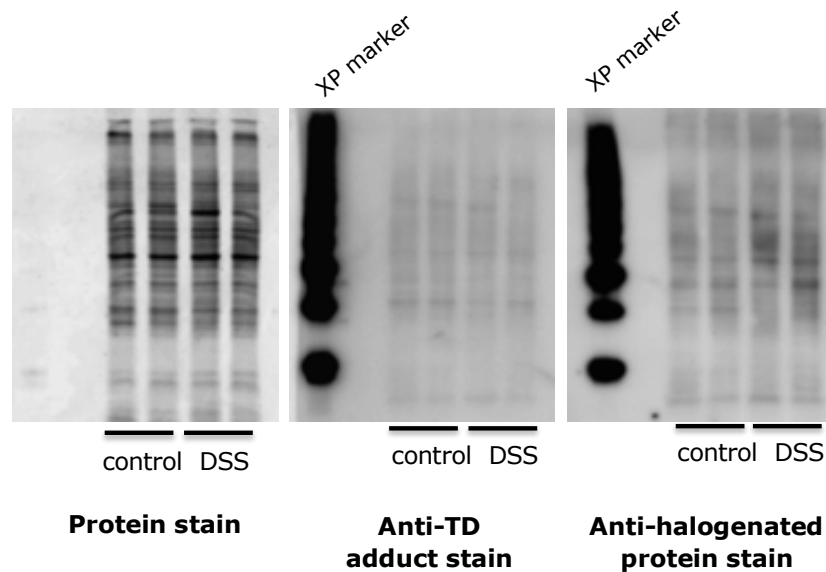


Fig. 3. Western blotting analysis of colorectal mucosa and submucosa samples using monoclonal antibodies against TD-adduct proteins and halogenated proteins.

Proteins in the colorectal mucosa and submucosa were separated by SDS-PAGE and subjected to Western blotting analysis with anti-TD-adducts antibody (1B7) and anti-dihalogenated tyrosine antibody (3A5). Total protein was stained with Flamingo fluorescent gel stain.

3-3-4. 組織染色による TD 付加タンパク質および酸化ストレスマーカーの検出

前述したように、タンパク質チオールは遊離 TD の主要な標的と考えられる⁽³¹⁾。TD 修飾タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を用いて大腸組織の免疫組織化学染色を行ったところ、コントロール群の大腸全体でほとんど染色が観察されなかったが、DSS 群の大腸組織、特に損傷が認められる粘膜部位では広範な陽性染色が見られた (Fig. 4)。また、MPO (あるいは好酸球ペルオキシダーゼ) により生成される HOCl または HOBr によって形成される 3,5-ジハロゲン化チロシン (3,5-ジクロロチロシンおよび 3,5-ジブromoチロシン) に特異的な抗体⁽⁷⁹⁾を使用して、TD 同様に組織局在性を調べた。その結果、次亜ハロゲン酸に由来する 3,5-ジハロゲン化チロシン残基を有するタンパク質の染色は DSS 群で顕著に増強され、TD 修飾タンパク質の染色で観察された部位と局在性はほぼ一致した。

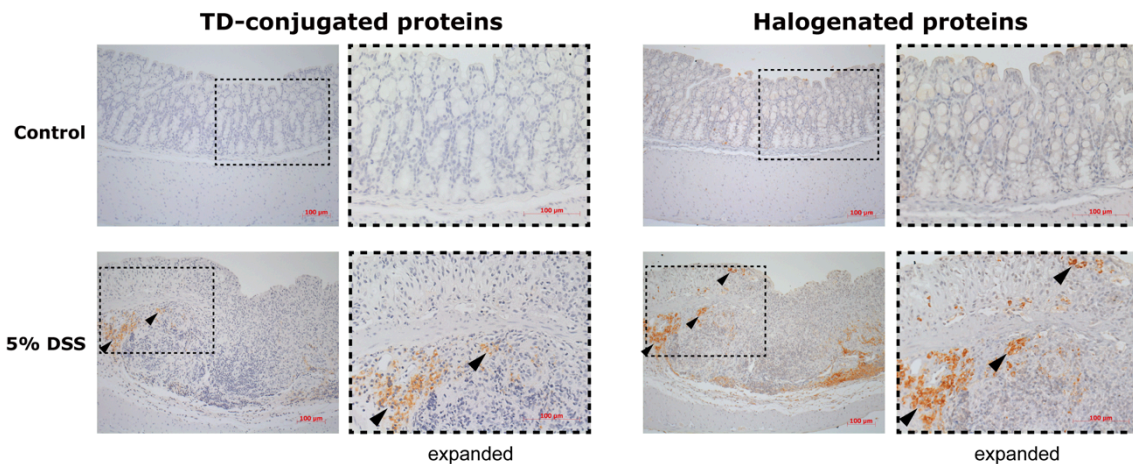


Fig. 4. Immunohistochemical staining of TD-modified and hypohalous acid-modified proteins in the colorectal tissue from control and DSS-challenged mice.

On day 7, the colorectal tissues from the control and DSS-treated mice were washed and fixed in 10% formalin. After deparaffinization of the sections, immunohistochemical staining was performed using anti-1B7 (for TD-modified proteins) or 3A5 antibody (for hypohalous acid-modified proteins). Scale bars, 100 μm .

3-3-5. 大腸炎組織における MPO 活性および炎症部位での MPO の集積

MPO の酵素活性は、コントロール群と比べて DSS 群の大腸粘膜で有意に上昇した ($p < 0.01$, Fig. 5A)。この酵素 MPO 活性レベルの増加とともに、DSS 群の大腸組織では腸粘膜への免疫細胞の浸潤が観察された (Fig. 5B)。MPO は TD やハロゲン化タンパク質を生じることから、3-3-4 で認められた TD およびハロゲン化タンパク質の検出と一致した結果と言える。

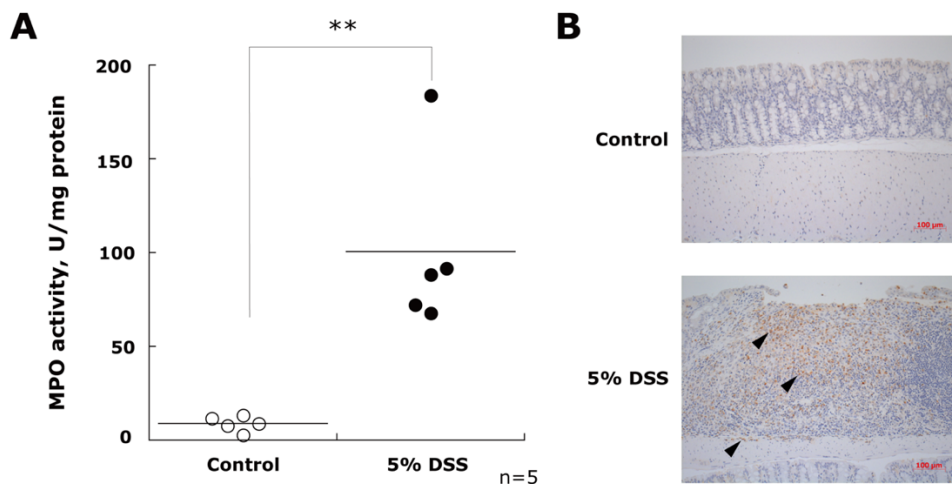


Fig. 5. Myeloperoxidase (MPO) activity and expression in colorectal mucosa and submucosa from control and DSS-challenged mice.

(A) MPO activity in colorectal samples from control mice and DSS-treated mice (7 days). The measurement of MPO activity in the homogenate was performed as described in the Materials and Methods section. Groups were compared by a Student's *t*-test ($n=5$, $**p < 0.01$). The significance was compared with the control group. (B) Representative immunohistochemical staining of MPO in colorectal tissues. On day 7, the colorectal tissues from the control and DSS-treated mice were washed and fixed in 10% formalin. After deparaffinization of the sections, immunohistochemical staining was performed using anti-MPO antibody. Scale bars, 100 μm .

3-3-6. 組織染色による TD 付加タンパク質の局在性に関する検討

3-3-4 および 3-3-5 により、炎症部位における MPO および TD 付加タンパク質の集積が認められた。より詳細に MPO と TD 生成の関連性・局在性を調べるため、DSS 群の大腸組織のミラー切片を作成し、TD 付加タンパク質と MPO、TD 付加タンパク質と F4/80 (マウスマクロファージの指標) に対する免疫組織染色をそれぞれ行った。DSS 群の炎症部位では、3-3-4 と同様に TD 付加タンパク質のスメアな陽性染色が認められ、その周辺で MPO のスポット的な染色が観察された (Fig. 6A)。また、TD 付加タンパク質は粘膜下層の一部分でも染色が認められ、マウスマクロファージのマーカである F4/80 の陽性染色の一部と一致した (Fig. 6B, Arrow heads)。

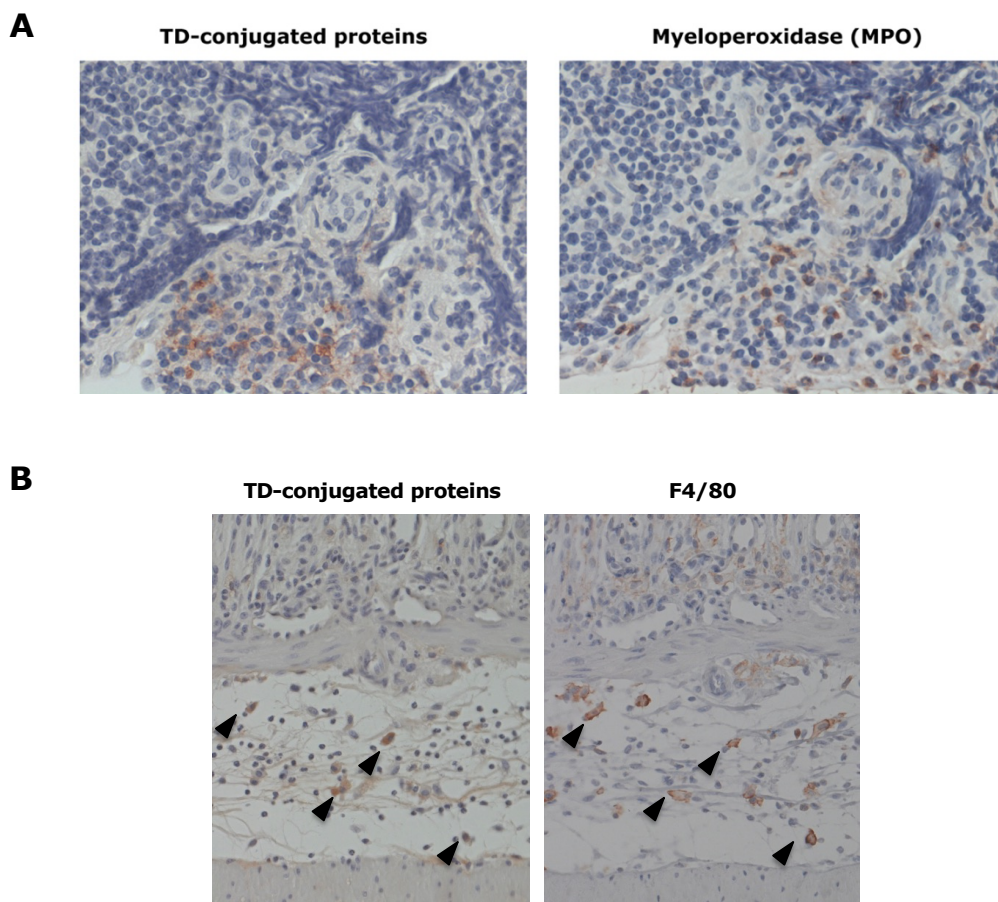


Fig. 6. (A) Comparison of the localization between TD-modified proteins and MPO in the mirror specimen of colorectal tissue from DSS-challenged mice. (B) Comparison of the localization between TD-modified proteins and F4/80 in the mirror specimen of colorectal tissue from DSS-challenged mice. The specimens of colorectal sections from DSS-treated mice on day 7 were prepared. The serial tissue sections were stained by TD-modified proteins, MPO, or F4/80 respectively.

3-3-7. TD 生成に対する MPO 活性の寄与に関する検討

組織染色により MPO が TD の染色部位と共存していることが明らかとなった。MPO の関与をより詳細に調べるため、DSS 群から得られた大腸粘膜ホモジネートに含まれている内因性 MPO に対し、MPO の基質となる 5HT および H_2O_2 を添加し、TD 付加タンパク質の生成を確認した。また、同時に MPO の作用を明らかにするために MPO 阻害剤の影響も調べた。Fig. 7 に示すように TD 付加タンパク質は 5HT を添加するだけでも生じたが、さらに H_2O_2 の添加により TD 付加タンパク質のバンド染色が増強した。一方で、MPO 阻害剤である 4-aminobenzoic acid hydrazide の添加により TD 付加タンパク質の染色が抑制されたことから、陽性染色バンドの生成について、少なくとも一部は MPO の酵素活性に由来することが示唆された。バンドの染色はスメアに（広い分子量領域で）認められたが、特に 45kDa に強いシグナルが観察された。このバンドがどのようなタンパク質に由来するのかは明らかになっておらず、今後の課題である。

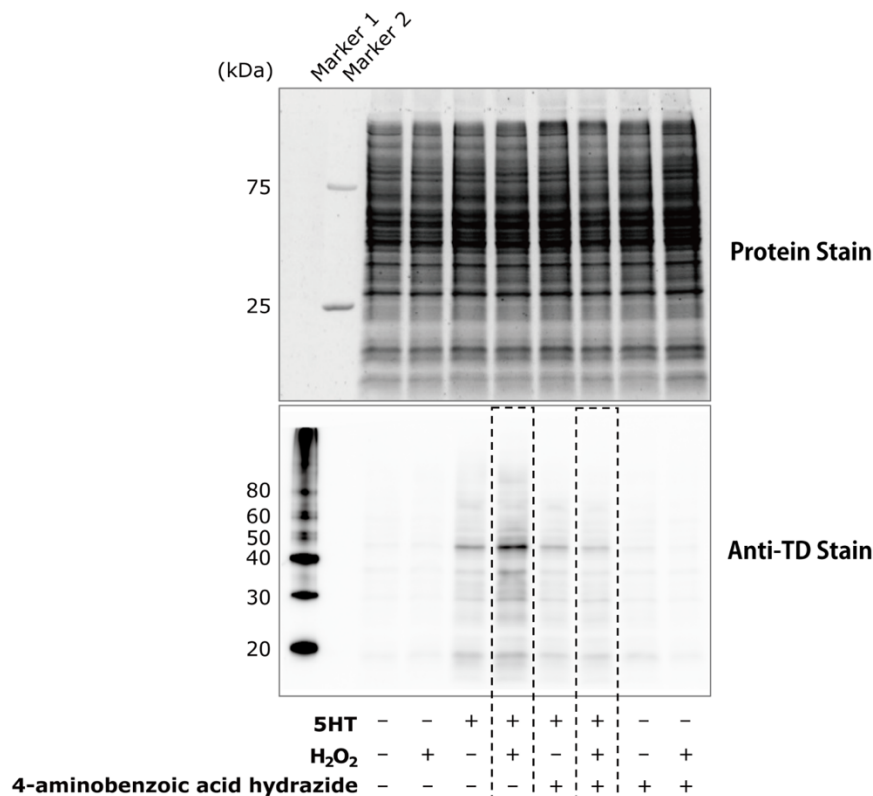


Fig. 7. The effect of endogenous MPO activity on TD formation in the homogenate of DSS-challenged mice in vitro. The homogenate of the DSS-challenged mice mucosa/submucosa was incubated with/without 5HT, hydrogen peroxide, and/or MPO inhibitor (4-aminobenzoic acid hydrazide). The proteins in the sample were separated by two gels and the one gel was then stained with Flamingo™ fluorescent dye. The proteins in another gel were blotted onto a membrane and synthetic TD-modified proteins were then detected by the specific antibody 1B7. Abbreviations: Marker 1, XP MagicMark™ marker (ThermoFisher Scientific); Marker 2, Dual stain marker (Bio-Rad).

3-4. 考察

DSS を含む水をマウスに自由飲水させ、大腸炎モデルマウスを作製したところ、DSS 群では大腸炎が誘発され、組織損傷が生じた (Fig. 1)。*In vivo* で大腸粘膜およびマウスの粘膜下組織からの遊離 TD を検出定量するため、化学的に不安定な物質である TD を OPD と反応させて安定なフェナジン誘導体 (TD-OPD) ⁽⁴³⁾ に変換し、この誘導体を LC-MS/MS により分析した。その結果として、コントロール群の生体試料からも TD を高感度に測定することに成功した。TD の検量線を作成して組織の TD を定量したところ、コントロール群の大腸と比較して DSS 群の大腸粘膜サンプルにおいて TD が有意に増加していた。

遊離 TD はグルタチオンまたはチオール含有タンパク質と迅速に反応することが知られている⁽³¹⁾。本研究においても 3-3-2 で示したように大腸粘膜の存在により人為的に添加した TD の検出が 1/500 程度まで減少したことから、LC-MS/MS により定量された遊離 TD は、*in vivo* で生じた TD のごく一部の可能性がある。なお、本研究により、消化管 (胃腸管) から内因性 TD を世界で初めて検出および定量することに成功した。

すでに述べているように、TD はタンパク質チオール基と素早く結合することが明らかになっている。遊離の TD 検出定量だけでは生じた TD の多くが検出されない可能性がある。そこで、TD 検出のもう一つのアプローチとして特異抗体による検出を試みた。TD を認識する特異モノクローナル抗体はすでに作成されているが⁽³¹⁾、ウエスタンブロットや組織染色への応用例はごくわずかである。最初に大腸粘膜のタンパク質を電気泳動により分離し、ウエスタンブロットによる検出を行ったところ、コントロール群と DSS 群において、TD 付加タンパク質の違いは認められなかった。このことから、大腸粘膜ホモジネートにおける TD 付加タンパク質の存在量は、ウエスタンブロット法では検出限界以下であることが示唆された。

同じ特異抗体を用いた免疫組織染色では、DSS 群の大腸組織で TD 付加タンパク質の陽性染色が認められた (Fig. 4)。ウエスタンブロット法では検出できず、組織染色では検出された理由として、ウエスタンブロットでは修飾されたタンパク質がゲル内で分離されて拡散してしまうのに対して、組織染色では抗原が局所的に集積しているために明瞭に検出されたと考えられる。また、組織内に遊離および結合した TD が存在することは、生体内で特に炎症部位において 5HT が酸化されて TD になることを示唆している。前述のように、EC 細胞での 5HT の産生は、IBD 患者や実験モデル動物の大腸において増加することが報告されている^(27, 74, 75, 78)。また、炎症が生じると、好中球が組織に浸潤し、好中球アズール顆粒に存在する MPO が細胞外に放出される。H₂O₂ の存在下で MPO は次亜ハロゲン酸を生成することがよく知られている。加えて、*in vitro* での検討から、

MPOにより触媒される5HTからTDへの酸化反応は、スーパーオキシド存在下にて促進されることが報告されている⁽⁴¹⁾。本研究ではMPOの粘膜損傷部位での集積や、TD付加タンパク質の陽性染色の付近でMPOの陽性染色、DSS群の大腸粘膜ホモジネートでのMPOの酵素活性の有意な増加を確認した(Figs. 5-7)。また、組織ホモジネートを用いた*in vitro*試験ではあるが、MPO阻害剤の存在により、TD付加タンパク質生成が抑制されることも明らかになった。これらの結果は、MPOが*in vivo*でTDを生成し得ることを示唆している。ただしTDはMPOだけでなく、他の好酸球ペルオキシダーゼ(Eosinophil peroxidase: EPO)のようなペルオキシダーゼ酵素によっても生成する可能性がある⁽³²⁾。また、スーパーオキシド処理でも5HTからTDが生じることから⁽⁷⁶⁾、MPOに加え、内因性の他の酵素やROSも大腸炎などの炎症部位でTDを生成することが予想される。実際に、組織ホモジネートを使った*in vitro*の検討では、MPO阻害剤を加えても陽性バンドの生成は完全には防げないことも別経路の存在を示唆している(Fig. 7)。

MPOは次亜ハロゲン酸の生成を触媒し、タンパク質チロシン残基をハロゲン化チロシンに変換する。MPOは炎症時に組織に浸潤した好中球などに由来することから、産物であるハロゲン化チロシンは炎症部位で増加することが考えられる。実際、大腸炎動物モデルでは組織タンパク質の酸加水分解物から3-クロロチロシンの増加が確認されている⁽⁸³⁾。大腸炎に罹患したヒト大腸サンプルからも、3-ニトロチロシンおよび5-クロロ-2'-デオキシシチジンとともに3-クロロチロシンがLC-MS/MSにより検出および定量されている⁽⁷³⁾。これまでに塩素や臭素などのハロゲン分子が1つのチロシン残基に導入されたジハロゲン化チロシンに対する特異的なモノクローナル抗体(3A5)が作製され、炎症性肝組織⁽⁷⁹⁾および老化したヒト皮膚の免疫組織化学的染色⁽⁸⁴⁾に用いられている。また、同じ抗体3A5は、インドメタシンによって損傷を受けたラット腸粘膜のハロゲン化タンパク質の検出(ウエスタンブロット法)にも使用された⁽⁸⁵⁾。本研究により、3A5抗体を用いてDSS処理したマウス大腸組織からハロゲン化タンパク質を免疫組織化学的に初めて検出した(Fig. 4)。その際、ハロゲン化タンパク質の存在は、TD修飾タンパク質の存在部位と多くが重複していることも明らかになった。

TDは非常に反応性が高く、神経毒素であると考えられてきた^(76, 86)。一般に、キノン化合物はチオール基と共有結合し、付加体を形成する⁽⁸⁶⁾。これらの反応は疾患の発症または細胞に対するストレスへの適応・応答に関与している可能性がある。第2章で述べたように、TDを処理したSH-Y5Y細胞は、NQO1やHO-1酵素の発現が増加した。この「プライム」(TD前処理)された細胞は、その後のH₂O₂によって誘導される細胞内ROS生成をキャンセル(抑制)し、かつ、細胞生存率も維持した⁽⁵⁶⁾。本研究において、炎症部位でTD形成およびその増加が確認されたことから、内因性TDは大腸炎におい

て炎症誘発性または抗炎症性の因子となる可能性がある。しかし、その詳細はほとんど明らかになっておらず、さらなる研究の進展が必要である。

以上の結論として、大腸内の遊離内因性 TD を安定な誘導体として検出・定量することに成功した。DSS 処理によって大腸炎を誘発した大腸組織で TD 付加タンパク質を免疫組織化学的に検出し、MPO やハロゲン化チロシンと局在性の一致を確認した。遊離型、およびタンパク質付加型のいずれの TD 量についても、DSS 誘発性大腸炎モデルの腸組織で増加することが明らかになった。今回の結果は動物実験によるものであるが、今後さらに組織・細胞・分子レベルで TD の果たす役割を解析し、さらにはヒト IBD 患者にまで研究対象を広げることで、大腸炎における 5HT の増加や MPO の集積が IBD などの疾病に与える影響の解明につながることを期待したい。

第4章 腸炎の緩和を目指した食品成分によるセロトニン制御

4-1. 緒言

序論および第3章でも述べたように、5HTは胃腸の運動性を調節する重要な神経伝達物質である一方で、炎症に伴い生じる過剰な5HTがIBDの発症や炎症の増悪化に関与していると考えられている⁽⁸⁷⁾。5HTの多くは腸管に存在するEC細胞が産出するが、肥満細胞も量は少ないものの5HTを合成し放出する細胞の一つである⁽⁷⁸⁾。実際にIBD患者や大腸炎モデル動物の結腸においてEC細胞や肥満細胞が増加する^(74, 75)。さらに、5HTはマクロファージやT細胞などの免疫細胞を直接的または間接的に刺激するため^(87, 88)、5HTが炎症性サイトカイン放出の促進を介して腸の炎症悪化に関与することが予想される^(89, 90)。加えて、第3章で示したように、炎症部位での5HT過剰生成は、同じく炎症部位に集積する好中球に由来するMPOによるTD産出を誘導し、ひいてはTDによる組織障害などにつながる可能性もある。

Tryptophan hydroxylase (TPH)はトリプトファンから5HTを合成する経路における重要な律速酵素である⁽³⁸⁾。ヒトにおけるTPHは、TPH-1とTPH-2の2つのアイソフォームで存在し、中枢神経系の5HTは主にTPH-2⁽⁹¹⁾、末梢組織の5HTは主にTPH-1により合成される。末梢組織で合成されて細胞外に放出された5HTは、5HT受容体への結合を介して胃腸機能や免疫を調節する^(89, 90)。また、細胞外5HTの一部は5HT輸送体であるSerotonin transporter (SERT)によって上皮細胞に取り込まれ、Monoamine oxidaseによって脱アミノ化された後、さらに酸化されて5HIAAとなり代謝される。TPH-1およびSERT発現の変化は、IBDにおける5HTレベルの増加と関連していることが先行研究によって明らかにされている^(92, 93)。TPH-1遺伝子の多型は、IBDといくつかの類似点を有する過敏性腸症候群患者の胃腸症状に影響を与えていることも報告されている⁽⁹⁴⁾。このことは、TPH-1が下痢などといった消化器症状の重要な要因であることを示唆している。

現在行われているIBDの基本的な治療法は5-アミノサリチル酸製剤を中心とした薬物療法である。IBDは寛解と再燃を繰り返すことから、薬の服用は長期にわたり、副作用や不耐性などが生じる可能性がある^(14, 15, 95)。一方で、食品には様々な機能性成分が含まれ、長い食経験から判断して副作用も少ないと考えられる。食品成分による大腸炎の炎症発症や悪化抑制についても、多くの研究がなされている⁽⁹⁶⁾。食品成分のなかでもフラボノイド類は、果物や野菜、ハーブなどに幅広く含まれており、抗アレルギー、抗炎症、抗がん作用などの様々な生物学的機能を有している⁽⁹⁷⁾。実際に、フラボノイドは大

腸炎の炎症症状を改善する可能性が示唆されている⁽⁹⁸⁾。たとえば、ケルセチンの3位に二糖であるβ-ルチノースがグリコシド結合したフラボノイド配糖体であるルチンは、炎症性サイトカイン Interleukin-1β 発現の抑制を介して、DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの炎症症状を緩和するとされる⁽⁹⁹⁾。また、マウスにフラボン骨格を有するアピゲニンを経口投与すると、炎症性疾患の発症と密接に関わる Nod-like receptor protein-3 インフラマソームの活性化が抑制され、DSS 誘発性の大腸炎発症が予防できることも明らかになっている⁽¹⁰⁰⁾。アピゲニンと同じくフラボンの一種であるルテオリンの経口投与は DSS 誘発性大腸炎モデルマウスの炎症を抑制することも示されている⁽¹⁰¹⁾。以上のように多くの研究が行われるなか、大腸炎組織や細胞における 5HT 調節に対するフラボノイドの作用はこれまでに報告されていない。

そこで本章では、ラット好塩基球様細胞株 RBL-2H3 細胞を 5HT 産生細胞モデルとして使用し、5HT 調節作用を持つフラボノイドを探索した。さらにその抑制メカニズムを明らかにするために、5HT 量の抑制作用が高く認められたルテオリンに焦点をあて、5HT を合成・調節する TPH-1 や SERT などの遺伝子/タンパク質の発現とそのシグナル伝達経路について細胞レベルで検討した。加えて、ルテオリンによる 5HT 量の調節作用を生体レベルで示すために、DSS により大腸炎を誘導したマウスにルテオリンを摂取させ、*in vivo* における大腸炎組織 5HT 量の増加を抑制するか検証した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

Chemi-Lumi One L、ISOGEN I、M-PER、Protease 阻害剤カクテル、HRP 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体およびウサギ由来抗 β -actin 抗体は第 2 章と同じ会社から購入した。DSS、5HT- d_4 hydrochloride および EzBlock Chemi は第 3 章と同じ会社より入手した。Minimum Essential Media with Earle's salts (MEM) はナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。抗体は以下のとおりである。ウサギ由来抗 TPH 抗体は Abcam (Cambridge, United Kingdom)、ウサギ由来抗 SERT (extracellular) 抗体は Allomone Labs (Jerusalem, Israel) より購入した。その他の抗体 (ウサギ由来抗 p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体、ウサギ由来抗 Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体、ウサギ由来抗 MEK 1/2 抗体およびウサギ由来抗 Phospho-MEK 1/2 抗体) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から入手した。Phosphatase 阻害剤カクテル II および III はシグマアルドリッチジャパン (F-9887; Tokyo, Japan) から購入した。動物実験に用いたルテオリン (純度 98%) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。細胞実験に用いたルテオリン (純度 99%)、Kaempferol、Cyanidin chloride および Myricetin は Extrasynthese (Lyon, France) より入手した。Apigenin、Rutin、Quercetin dihydrate、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、ImmunoStar LD[®]、PD98059 は富士フイルム和光純薬 (Osaka, Japan) より購入した。

4-2-2. 細胞培養

RBL-2H3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンク (Osaka, Japan) より入手した。10% FBS、100 units/ml ペニシリン、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを含む Minimum Essential Media (MEM) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

4-2-3. 細胞生存率の測定

RBL-2H3 細胞を 96 well プレートに 3.0×10^4 cells/well となるように播種し、一晩かけて定着させた。各 well を無血清 MEM 培地で洗浄したのち、4–100 μ M まで段階希釈した各フラボノイド入りの無血清培地に置き換えた。なお、結果に示すフラボノイド、阻害剤および PMA は DMSO に溶解してストックしたものを実験前に無血清培地により希釈して用いたが、全ての実験において、細胞に対する DMSO の最終濃度が 0.2% 以下となるようにした。さらに 30 分後、PMA 濃度が 25 nM となるように添加し、さらに 10 時間培養した。その後、細胞生存率を Cell Count Reagent SF を用いてメーカーの指示に従い測定した。

4-2-4. リアルタイム PCR 法による mRNA の測定

細胞は 12 well プレートに 4.5×10^5 cells/well となるように播種して一晩置き、定着させた。各 well を無血清培地に置き換え、ルテオリンもしくは阻害剤を添加した。さらに 30 分後、濃度が 25 nM となるように PMA を添加し、結果 (4-3) で示すように経時的に培養した。RNA の抽出については 2-2-4 に準じて行ったが、ISOGEN I の液量は 400 μ l とし、ISOGEN I の液量に応じて用いる他の試薬等のスケールを調節した。また、RNA 量の測定には、Synergy H1 ハイブリッドマルチモードプレートリーダーを用いた。抽出した RNA は iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad) を用いて逆転写し、cDNA を合成した。リアルタイム PCR 増幅試薬として MyGo Green Mix Universal (IT-IS Life Science Ltd, Mahon, Cork, Ireland) を使用し (Table 4)、リアルタイム PCR 装置として MyGO Pro (IT-IS Life Science) を用いて cDNA 中の各遺伝子を増幅させた。具体的な TPH-1 および SERT の増幅条件については、Table 5 に示した。GAPDH のプライマー配列および増幅条件、比較 Ct 法の解析については 2-2-4 と同様に実施した。

Table 4. Reaction mixture for PCR using MyGO Green mix.

Component	20 μ l reaction	Final concentration
2 \times MyGo Green Mix	9 μ l	0.9 \times
Forward primer (10 μ M)	0.5 μ l	250 nM
Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ l	250 nM
Template DNA	0.1–1 μ g cDNA	Variable
PCR grade water	Up to 20 μ l total volume	

Table 5. List of sequences and amplification conditions for PCR.

Genes	Sequence (5' to 3')	Cycles	Annealing, °C (sec)	Denaturing, °C (sec)
TPH-1	Forward AACAAAGACCATTCCCTCCGAAAG	40	60	90
	Reverse TGTAACAGGCTCACATGATTCTC		(60)	(5)
SERT	Forward GGTGTGGGTAGATGCCGCCG	40	60	90
	Reverse GCTGGGGCCTGCGTCTTTGG		(60)	(15)

4-2-5. ウェスタンブロットティング

細胞は 12 well プレートに 4.5×10^5 cells/well となるように播種し、一晚置き、定着させた。各 well を無血清培地で洗浄したのち、無血清培地でルテオリンもしくは阻害剤 PD98059 を添加した。さらに 30 分後、PMA 濃度が 25 nM となるように添加した。培養後、冷却した PBS で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (Protease inhibitor cocktail) およびフォスファターゼ阻害剤 (Phosphatase inhibitor cocktails II および Phosphatase inhibitor cocktails II) を細胞溶解試薬 M-PER に各 1% となるようにあらかじめ混合した溶液 75 μ l で細胞を溶解した。スクレーパーで回収した細胞溶解液は氷上に 10 分間置き、よく攪拌した後、遠心した (14000 g, 15 min, 4°C)。上清を 65 μ l 回収し、その一部はタンパク質定量に用いた。SDS-PAGE およびウェスタンブロットは 2-2-6 と同様にして行った。各抗体を検出するために用いたタンパク質量および抗体の反応条件は、Table 6 に示した。タンパク質抗原は化学発光検出器 GeneGnome および制御・解析ソフト GeneSys software version 1.6.9.0 (SYNGENE, Bangalore, India) を用いて検出した。MAPK および ERK のリン酸化については、ImageJ software version 1.41 (National Institutes of Health; Bethesda, MD USA) を使用して定量化した。

Table 6. List of reaction conditions for western blot.

	1 st Antibody	Dilution	2 nd Antibody	Dilution	Detection	Protein amount (μ g)
Pi-MEK*	Rabbit anti-phospho-MEK 1/2	1,000				
MEK	Rabbit anti-MEK 1/2	1,000				
Pi-ERK	Rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	1,000			ImmunoStar [®] LD	6
ERK	Rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2)	1,000	Anti-rabbit IgG/HRP	2,000		
TPH-1	Rabbit anti-tryptophan hydroxylase	500				30
SERT	Rabbit anti-SERT (extracellular)	500			Chemi-Lumi One L	6
β-actin	Rabbit anti- β -actin	2,000		10,000		

*. MAPK/ERK kinase

4-2-6. 5HT 定量法

組織中の 5HT は、既報⁽¹⁰²⁾に従い若干の変更を加えて測定した。具体的には、大腸粘膜 (10 mg) を 140 μ l の氷冷 0.1% HCOOH 水溶液でホモジナイズし、14,000 g、4°C で 20 分間遠心分離した。上清 (75 μ l) を 25 μ l の内部標準 5HT-*d*₄ (I.S., 25 μ M) と混合し、

さらに除タンパク質のために CH₃CN を 4:1 の比率 (v/v) で加え、遠心分離した (14,000 g, 10 min, 4°C)。上清を逆相固相抽出カラム (Discovery DSC-18, 500 mg) に通し、夾雑物を除去した。固相抽出は以下の通りとした。3 ml の CH₃OH と 2 ml の純水を用いて固相抽出管をコンディショニングした後、サンプルをアプライした。さらに、2 ml の CH₃OH/0.1% HCOOH 水溶液 (5:95, v/v) で洗浄した後、3 ml の 0.1 M 酢酸アンモニウム水溶液でサンプルを溶出した。溶出したサンプルは遠心エバポレーターを使用して乾固し、残留物を 200 µl の移動相 (0.1% HCOOH 水溶液/CH₃CN [9:1, v/v]) で再溶解し、遠心後、上清をバイアルに移した。

細胞培養培地 (細胞外) サンプルについては、4-2-2 に従い細胞を処理し、培地 (200 µl) を回収した。これに対し、100 nM I.S.を含む CH₃CN (800 µl) を加えて遠心分離し (14,000 g, 10 min, 4°C)、タンパク質を除去し、上清を測定サンプルとした。一方、細胞内 5HT は、処理した細胞を冷却した PBS で洗浄した後、400 µl の 0.1 M NaOH で溶解した。その内、ライセート 200 µl に HCl を加えておおよそ pH 3 となるように調整し、次に 100 nM I.S.を含む CH₃CN (800 µl) を加えてタンパク質を除去した。遠心分離した後、上清をバイアルに移した。

サンプル中の 5HT 量はタンデム四重極型 LC/MS/MS (Xevo TQD, Waters または API3000, AB Sciex) に接続した HPLC (Acquity UPLC H-class または Agilent HP1100) を用いて測定した。分離カラムは、COSMOSIL PBr (2 × 150 mm, 5 µm, Nacalai Tesque) を使用した。標準溶液あるいは試料の注入量は 5 µl、流速は 0.2 ml/min とし、移動相は、0.1% HCOOH 水溶液 (溶媒 A) と CH₃CN (溶媒 B) を用いた。グラジエントプログラムは 0 分 B10%、1 分 B10%、10 分 B55%、14 分 B90%、15 分 B10%、30 分 B10% とした。MRM は、ポジティブイオン化で分子イオン [M+H]⁺ をプリカーサーとしたときの生成物イオン m/z (5HT 177.1/160.2; I.S. d₄-5HT 181.2/164.4) を測定した。

4-2-7. 動物実験

20 匹の雄性 C57BL/6N マウス (6 週齢) を日本エスエルシーより入手し、3-2-1 と同じ条件にて飼育を行った。1 週間の馴化期間を経て、マウスをランダムに 3 つの実験群に分けた。コントロール群 (n=5) と DSS 群 (n=10) には標準食 AIN93G を 14 日間与えた。DSS+LUT 群 (n=5) には、実験期間中、AIN93G 食餌を含むルテオリン (0.1% w/w) を与えた。本実験は、兵庫県立大学の倫理委員会によって承認後に実施した (No: 171, 236)。

4-2-8. 大腸炎モデルの作製およびサンプルの回収

実験開始7日目から、DSS 群および DSS+LUT 群のマウスには、2.5% (w/v) DSS を含む蒸留水を7日間自由飲水させ、対照群には蒸留水を与えた。ボトルに入った飲料水は、2日ごとに新しく調製したものと交換した。体重の測定、炎症の指標、また、大腸粘膜の回収方法等については、3-2-3 に準じて行った。

4-2-9. MPO 活性の測定

3-2-4 に準じて行った。

4-2-10. 統計処理

全てのデータは、Student の t 検定もしくは、一元配置分散分析 one way ANOVA に続く多重比較により統計処理を行った。統計処理ソフトは、SPSS version 25.0 (IBM, Somers, NY) を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

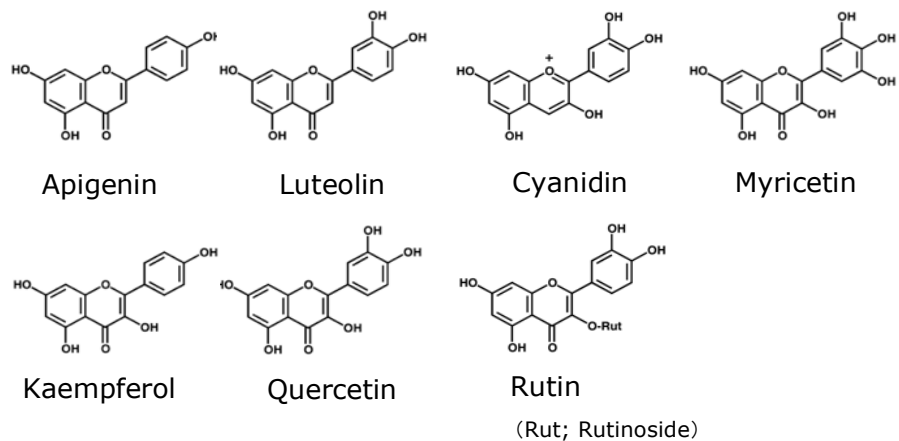
4-3. 結果

4-3-1. ルテオリンによる RBL-2H3 細胞の細胞内外 5HT 量の増加抑制

予備検討において、RBL-2H3 細胞の細胞内外 5HT 量が PMA 処理によって時間依存的に増加することを確認した（データ示さず）。この PMA 刺激による 5HT の増加を利用し、Fig. 1A に示す 7 種のフラボノイドを細胞に添加し、刺激した細胞内外 5HT 量について比較した。なお、事前に細胞毒性を有意に引き起こさないフラボノイドの最大濃度を検討して用いた（データ示さず）。この結果、使用したフラボノイドの中で、ルテオリンとケルセチンのみが細胞内、細胞外、総 5HT 量の全てを有意に抑制した (Fig. 1B-D)。

In vivo での検討を想定して、以後の実験では動物モデルで炎症抑制の報告のあるルテオリン^(101, 103)を分子レベルでの解析に用いた。PMA 刺激後に細胞内外の 5HT 量は時間依存的に増加するが、ルテオリンの前処理により、8-12 時間の増加分についてはいずれも顕著に抑制されることを確認した (Fig. 1E-G)。

A



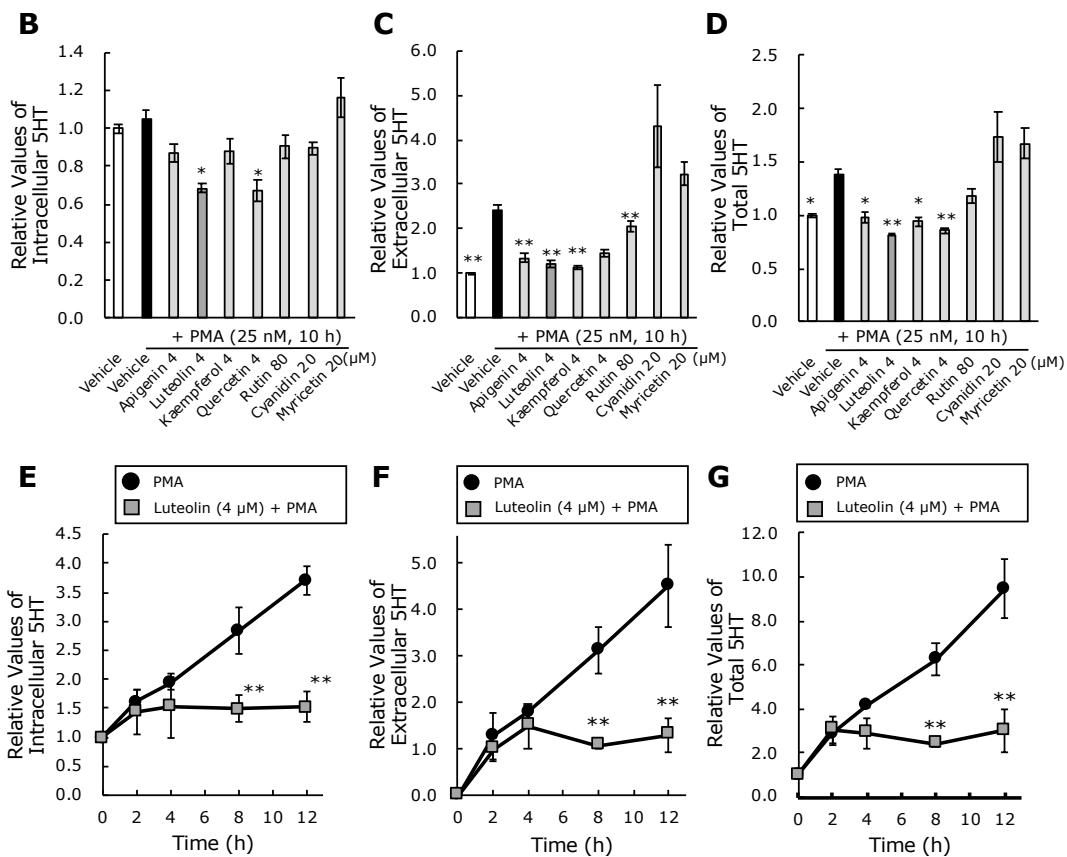


Fig. 1. The flavonoid effects on extracellular and intracellular 5HT levels in RBL-2H3 cells. Cells were treated with a vehicle or the respective seven flavonoids for (A) 30 min followed by 25 nM PMA stimulation for the indicated time. Intracellular 5HT (B), extracellular 5HT (C), and total 5HT (D) were quantified as described in the Materials and Methods. Time-dependent changes in intracellular, extracellular, and total 5HT levels by luteolin or vehicle are shown in (E–G). Control was 0 h with fresh serum-free medium. The 5HT concentrations were adjusted to the relative control. Data represent the means \pm standard error. Statistical significance was set at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. vehicle with PMA using Tukey's multiple-comparison posthoc test (B–D) or Student's *t*-test (E–G).

4-3-2 RBL-2H3 細胞における TPH-1 および SERT 発現に対するルテオリンの効果

5HT の増減機序については、5HT 合成と細胞外からの再取り込みの両面から考える必要がある。そこで、ルテオリンが、RBL-2H3 細胞中の TPH-1 (5HT 合成酵素) および SERT (5HT 輸送体) 発現に与える影響について調べた。Fig. 2A に示すように、ルテオリン (0–4 μM) は濃度依存的に TPH-1 mRNA の発現を抑制した。また、ルテオリン 4 μM では、PMA 処理後、0–12 時間において TPH-1 mRNA の発現を抑制した (Fig. 2B)。さらに、PMA によって誘導された TPH-1 タンパク質の発現についてもルテオリンの濃度依存的に抑制しており (Fig. 2E)、ルテオリンによる TPH-1 遺伝子発現の抑制効果と対応していた。一方で、ルテオリンは、PMA 刺激の 12 時間後の mRNA 発現量を除いて、SERT の mRNA およびタンパク質発現に有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 2C-E)。

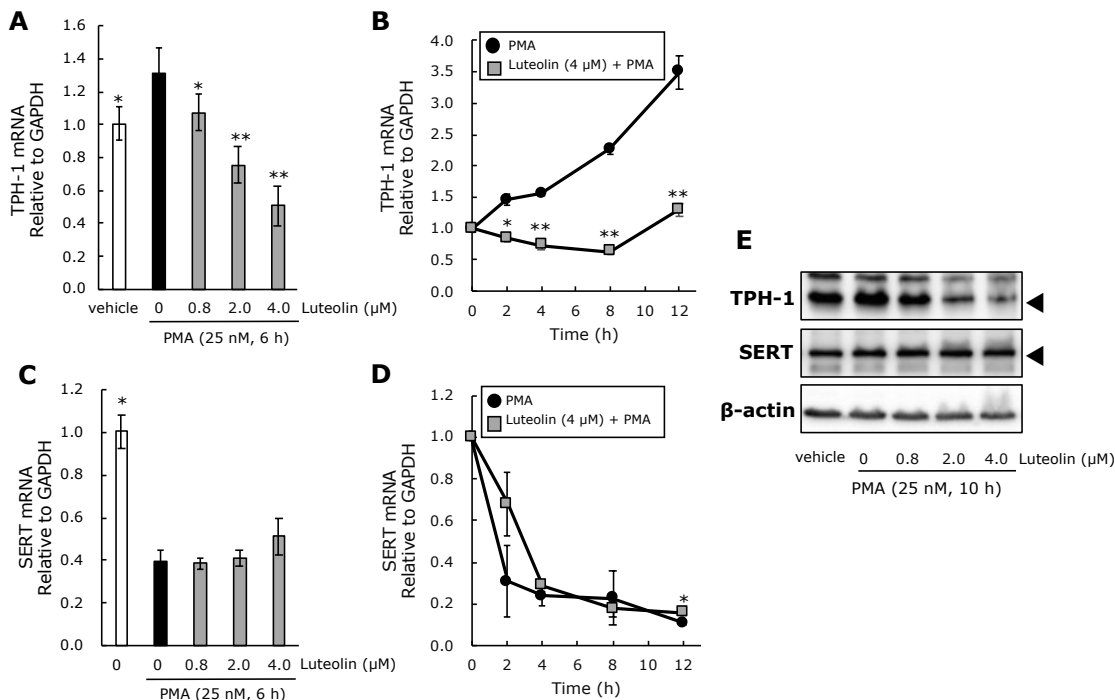


Fig. 2. The luteolin effect on TPH-1 and SERT expression in RBL-2H3 cells. Cells were treated with luteolin (0–4.0 μM) for 0–12 h and then stimulated by PMA for 6 h (for genes) or 10 h (for proteins). The dose-dependent or time-dependent changes of TPH-1 or SERT mRNA expression are shown (A–D). GAPDH mRNA was the internal control. After incubation with PMA, proteins were isolated and probed using western blotting with anti-TPH-1, anti-SERT, or β -actin antibody (E). Representative results from three independent experiments are shown. The black triangle means the location of the TPH-1 or SERT. Data represent the means \pm standard error. Statistical significance was set at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs. vehicle+PMA using Games-Howell multiple-comparison posthoc test.

4-3-3. 細胞内外 5HT 量と細胞内 TPH-1 発現に対するルテオリンの効果

先行研究では、細胞外シグナル関連キナーゼ (ERK) のリン酸化が、5HT を含む小胞の成熟や EC 細胞からの 5HT の合成・分泌に影響を与えることが報告されている^(104,105)。そこで、PMA 刺激による RBL-2H3 細胞の 5HT 量の調節について、MEK/ERK シグナル伝達経路の関与を調べた。RBL-2H3 細胞に MAPK/ERK キナーゼ (MEK) に対する特異的阻害剤 (PD98059) を前処理し、その後、PMA 刺激を行った。その結果、細胞内 5HT の濃度については PD98059 処理による影響は認められなかった (Fig. 3A-C)。一方で、PD98059 は PMA 処理によって増加する細胞外および総 5HT 量を顕著に低下させ、細胞内での 5HT 生成に関係する TPH-1 mRNA およびタンパク質の発現も抑制した (Fig. 3D, E)。

次に、MEK/ERK シグナル伝達分子に対するルテオリンの作用について検討した。Fig. 3F に示したように、PMA 刺激による MEK および ERK の活性化の程度は、ルテオリンでの前処理によって抑制された。さらに、ルテオリンは MEK と比較して ERK の活性化をより強く抑制する傾向が見られた。

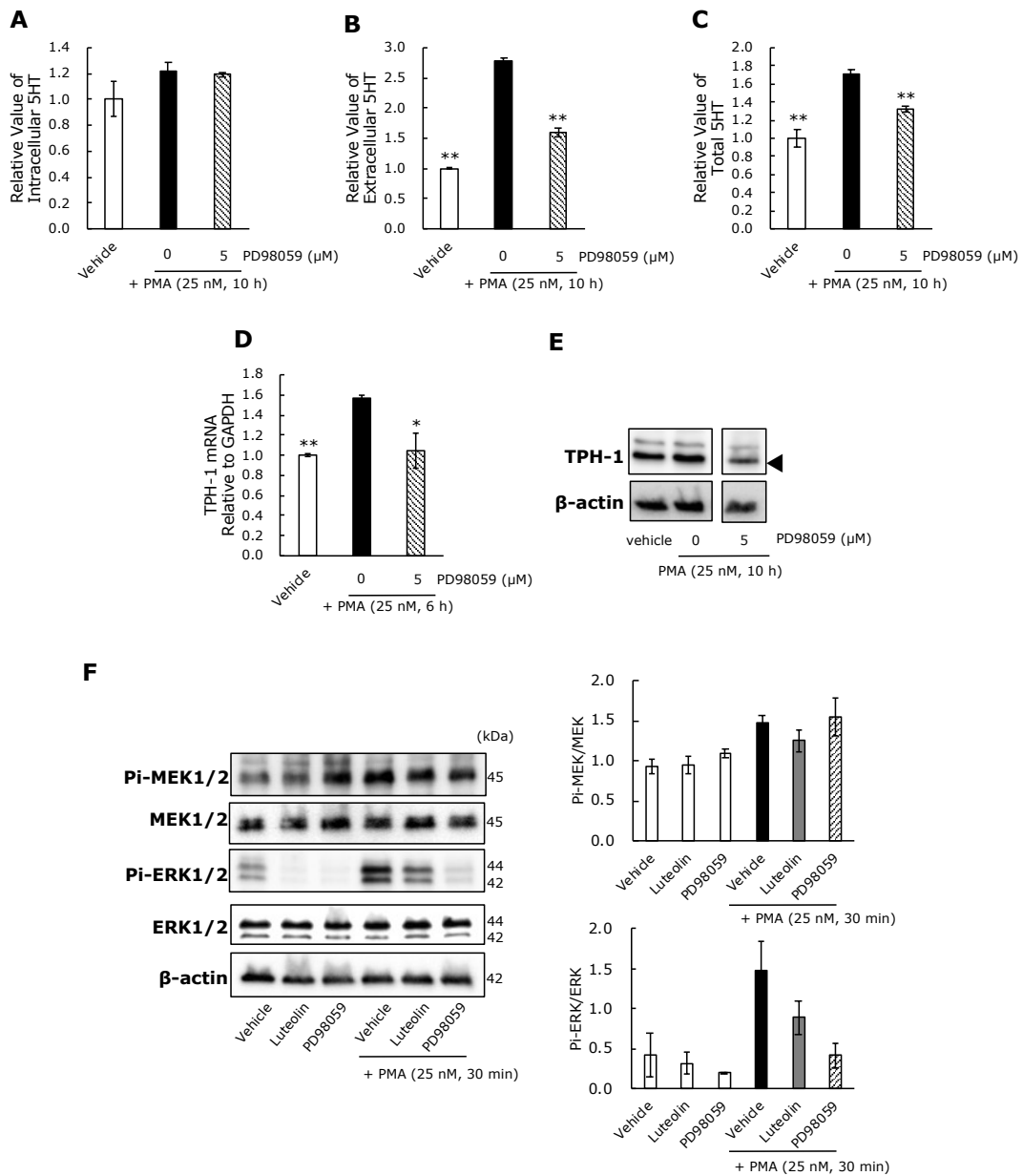


Fig. 3. The MEK/ERK signal pathway contribution to PMA-stimulated 5HT regulation in RBL-2H3 cells. Cells were treated with the MEK inhibitor, PD98059 (5 μM), for 30 min followed by PMA stimulation for 10 h. The relative intracellular 5HT (A), extracellular 5HT (B), and total 5HT (C) levels are shown. The PD98059 effect on TPH-1 mRNA expression in PMA-stimulated cells for 10 h is shown (D). Cells were treated with PD98059 for 30 min and then stimulated by PMA for 10 h. After the PD98059 treatment and PMA stimulation, TPH-1 protein levels were analyzed (E). The black triangle indicates the TPH-1 band. (F) The luteolin suppresses the MEK/ERK signal pathway which may contribute to 5HT increase in RBL-2H3 cells by PMA stimulation. Cells were treated with luteolin (4 μM) or PD98059 (5 μM) for 30 min and then stimulated by PMA for 30 min. Proteins were isolated, separated, and blotted with anti-phosphorylated MEK, anti-MEK, anti-phosphorylated ERK, anti-ERK, or anti- β -actin antibody. The relative semiquantitative analysis was based on optical density by ImageJ software, version 1.41 (National Institutes of Health; Bethesda, MD USA).

4-3-4. DSS による大腸炎の誘発とルテオリン摂餌による各種スコアの比較

実験デザインを Fig. 4A に示した。DSS 群の体重はコントロール群と比較して4日目から著しく減少し、同じく DSS+LUT 群も体重が減少した (Fig. 4B)。DAI スコアについても DSS 群および DSS+LUT 群は増加したが、7 日目において DSS+LUT 群では DSS 群と比較してスコア上昇の抑制作用が見られた (Fig. 4C)。解剖時に測定した大腸の長さは、DSS 群で顕著に短縮が見られたが、DSS+LUT 群は大腸長短縮の抑制作用を示した (Fig. 4D)。MPO 活性については DSS による活性増加がルテオリン摂餌により抑制される傾向にあった (Fig. 4E)。DSS 群大腸粘膜の 5HT 濃度は、コントロール群と比較して有意に増加したが、DSS+LUT 群では 5HT 量の増加が有意に抑制された ($p < 0.05$, Fig. 4F)。なお、予備検討においてはルテオリンのみを与えたマウスでは、体重やその他の指標に影響を与えないことを確認している (データ示さず)。

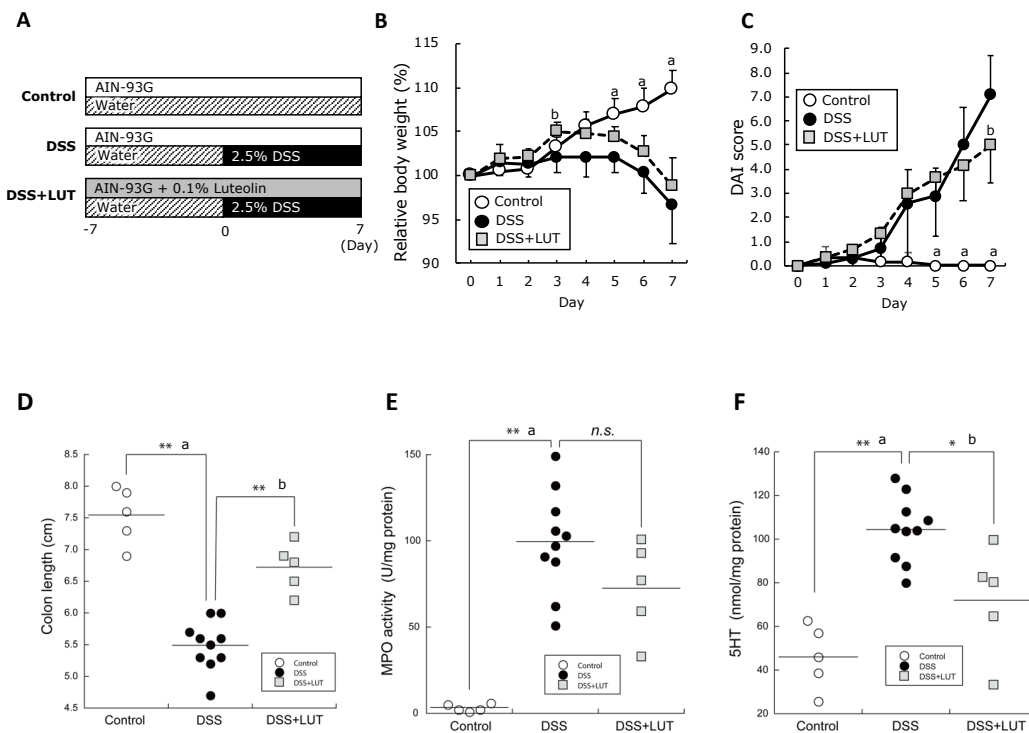


Fig. 4. The dietary luteolin effect on disease manifestations, myeloperoxidase activity, and mucosal 5HT in DSS-induced colitis mice. (A) Experimental design of DSS colitis induction with control or luteolin diet. The animals were split into three groups: control, DSS, and DSS + LUT groups as described in the “Materials and Methods” section. Seven-week old mice were fed with a standard diet (the control or DSS group) or received a diet supplemented with 0.1% luteolin (DSS + LUT group). Colitis was induced by administering 2.5% DSS in drinking water for both DSS and DSS + LUT groups. (B) The body weight change rate. (C) Disease activity index (DAI) score. (D) Colon length. (E) Myeloperoxidase (MPO) activity in colorectal tissue. (F) 5HT contents in colorectal mucosa. Control: open circle, DSS: closed circle, DSS + LUT: light gray square. Groups were compared by Tukey’s or Games-Howell multiple-comparison posthoc test ($n = 5$ mice for control and DSS + LUT groups, $n = 10$ mice for DSS group). Data represent the means \pm SE. Significance was compared with the DSS treatment group. Values designated by different letters (a, b) are significantly different ($p < 0.05$).

4-4. 考察

本章では、PMA 刺激した RBL-2H3 細胞において、ルテオリンが細胞内外 5HT および TPH-1 発現量の増加を抑制することを見出した。また、ルテオリンは、DSS で大腸炎を誘発したマウスの大腸における 5HT の増加についても抑制することを明らかにした。

まず、細胞レベルでの 5HT 制御を解析するため、細胞モデルの選定を進めた。5HT を腸で合成する EC 細胞モデルとしては脾臓由来の BON cell が存在するが⁽¹⁰⁶⁾、ATCC (American Type Culture Collection) や JCRB 細胞バンクにおいて一般的に販売・分譲されていないため、5HT 生成や SERT 活性に関する機序研究にも用いられている RBL-2H3 細胞を選択した⁽¹⁰⁷⁻¹¹⁰⁾。RBL-2H3 は、5HT 合成の律速酵素である TPH-1 や 5HT 輸送体である SERT も恒常的に発現し、これまでに、消化管での 5HT 合成を選択的に阻害する新規 TPH 阻害剤の検討においても用いられている⁽¹¹¹⁾。また、RBL-2H3 細胞内外の 5HT 量を増加させる誘導剤として、PMA、リポ多糖 (LPS) および DSS の三つを比較検討したところ、PMA において 5HT 量および酵素 TPH-1 の顕著な増加が認められたことから (データ示さず)、PMA を選択した。この系を用いて、ルテオリンを含む 7 つのフラボノイドの 5HT 調節効果について評価を行った。用いたフラボノイド類の中では、ルテオリンとケルセチンが細胞内外ともに 5HT 量の増加を抑制したことから、正電荷のないカテコール型フラボノイドに強い抑制作用があることが示唆された (Fig. 1B-D)。しかしながらそれ以外のフラボノイドの構造活性相関の検討については、今後の課題として残されている。既報ではルテオリンが化学的に誘発した大腸モデルマウスの炎症を抑制する作用を有していることが報告されているため^(101,103)、その後の 5HT 制御に焦点をあてた *in vivo* 実験を想定してルテオリンを選択し、合成や取り込みに関する分子レベルでの詳細な解析を進めた。

In vivo および *in vitro* での 5HT 増加には複数の因子が関与しうが、本研究では TPH-1 と SERT に着目した。これまでに、マウスの TPH-1 ノックアウトにより、DSS 誘発性大腸炎が抑制されることが報告されている⁽¹¹²⁾。TPH 阻害剤により末梢 5HT 合成を遮断することで、ジニトロベンゼンスルホン酸で誘発した大腸炎の重症度を軽減することも明らかになっている⁽¹¹³⁾。SERT の発現レベルも、細胞外 5HT 量を調整する重要な因子と考えられている。例えば IBD 患者および DSS 誘発性大腸炎マウスの大腸では SERT の発現が低下すること、SERT をノックアウトしたマウスでは大腸炎が著しく悪化することなどが示されている⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾。

そこで、ルテオリンを RBL-2H3 細胞に添加した時の TPH-1 および SERT の mRNA およびタンパク質発現に与える影響について検証した。細胞を PMA で刺激することにより TPH-1 mRNA およびタンパク質発現が増加したが、ルテオリンはそれらを抑制した (Fig. 2A, B, E)。このことから、ルテオリンの標的となる重要な分子の 1 つとして TPH-1 が考えられた。著者の知る限りでは、フラボノイドの TPH-1 発現抑制作用について

は、今回の結果が初めての報告となる。一方で、ルテオリンは SERT 発現については影響を及ぼさなかった (Fig. 2D-E)。ラット由来 SERT を過剰発現した CHO 細胞ではルテオリンが SERT を活性化する既報⁽¹¹⁷⁾とは異なる結果となった。本研究では SERT 発現量について細胞溶解液を試料として調べたのみであり、SERT の機能に与える影響を正確に評価するためには、細胞膜での局所的発現量や、実際の活性評価法として標識 5HT の取り込み能を検討する必要がある。このため本研究の結果からルテオリンが SERT に与える影響について明確に述べることは難しいが、少なくともルテオリンは細胞全体での SERT の mRNA やタンパク質の発現にほとんど影響を与えないと考えられる。つまり、ルテオリンの前処理によって示された 5HT 抑制は、SERT と比較すると、TPH-1 発現阻害による寄与が大きいことを示唆している。

先行研究において、腸クロム親和性様細胞である KRJ 細胞での ERK の活性化が、細胞外への 5HT の細胞外放出を促進することが報告されている⁽¹⁰⁴⁾。また、RAW 264.7 細胞に対してルテオリンを前処理することにより、LPS によって誘導される ERK のリン酸化が阻害されることも明らかになっている⁽¹¹⁸⁾。実際、本研究によってもルテオリンは PMA によって刺激された RBL-2H3 細胞の MEK および ERK リン酸化を抑制した (Fig. 3F)。しかしルテオリンは、MEK-ERK シグナルに加えて、イオンチャネル、受容体、その他のシグナル伝達経路などのさまざまな分子シグナルに影響を及ぼすことで、細胞内および細胞外の 5HT レベルを抑制する可能性が考えられる^(117,118)。今後、ルテオリンによる 5HT 抑制の正確な分子メカニズムを解明するには、たとえば DNA マイクロアレイやプロテオミクスなど網羅的な解析手段を用いるなど、より詳細な検討が必要であると考えられる。

次に、*in vivo* モデルとして、DSS による大腸炎誘発マウスに対するルテオリンの影響について検討した。DSS 群では、体重減少、大腸長の短縮、および DAI スコアと MPO 活性の増加が示され、大腸粘膜に含まれる 5HT 量についても対照群と比較すると約 2.3 倍増加した。一方で、0.1%ルテオリン食を摂餌した DSS+LUT 群では、DAI スコアの増加および大腸長の短縮が抑制された (Fig. 4)。これまでもルテオリンはゾンデ胃内投与 (20 および 50 mg/kg) によって大腸炎を改善することが報告されているが^(101,103,119)、0.1%ルテオリン食でもその効果が示された。さらに著者は、DSS 処理による大腸粘膜中の 5HT 量の増加がルテオリン食によって有意に抑制されることを見出した (Fig. 4)。なお、0.1%ルテオリン食は、マウスの体重あたりに換算すると約 130 mg/kg/day となり、日本人の 1 日における平均的なフラボノイドの摂取量 1 mg/kg と比較して多い⁽¹²⁰⁾。このため、今後は、より日常的な食事に近い濃度においても、ルテオリン摂餌によって 5HT 量の増加を抑制する作用を有するかどうか、検討する必要があると考えている。

細胞を用いた検討ではルテオリンが 5HT 増加を抑制する作用を示すことを明らかにし、特に TPH-1 発現抑制を重要な 5HT 制御作用機構の一つとして提示した。このため、*in vivo* モデルにおいても、炎症に伴う大腸粘膜中の TPH-1 の発現増加やルテオリン摂

餌による発現抑制が予想された。しかし、DSS 群および DSS+LUT 群ともに、遺伝子およびタンパク質レベルでのコントロール群との差が認められなかった(データ示さず)。SERT の発現についても炎症の有無やルテオリン摂餌による遺伝子およびタンパク質レベルでの有意な影響は観察されなかった(データ示さず)。DSS 大腸炎モデルにおける 5HT の増加は、5HT を合成する EC 細胞の増加や細胞内 5HT 合成に関わる酵素 TPH-1 の発現上昇だけでなく、炎症に伴う Interleukin-13 の発現増加や腸内細菌叢バランスの変化の影響も受けることが知られている^(121, 122)。また、これまでの先行研究において、ルテオリン (20 および 50mg / kg) をゾンデ投与した DSS 大腸炎モデルマウスにおいて、結腸のスーパーオキシドジムスターゼとカタラーゼの活性、および Nrf2 とその下流の標的である HO-1 と NQO1 のレベルが上昇することが報告されている⁽¹⁰¹⁾。このため、本研究においても、Nrf2 活性化による炎症抑制の結果として 5HT 量の増加が抑制された可能性が考えられる。このように、*in vivo* におけるルテオリン摂餌による 5HT 抑制のメカニズムについては複雑であるため、今後は 5HT 増減に関与する因子を網羅的に調べる必要があると考える。本章で用いたマウスの系統は第 3 章のマウスと異なるものの同じく DSS 投与により大腸炎を誘導していることから、同様に TD が腸内で産出されていたと考える。しかしながら、第 3 章で明らかになった遊離 TD および TD 付加タンパク質の生成増加については本研究で検討しておらず、ルテオリン投与による TD 生成の低減化について示すことができなかった。Dryhurst らの *in vitro* における先行研究では、TD が脳内の TPH を不活性化する可能性を示唆していることから⁽³³⁾、生成した TD が 5HT の産生においてネガティブフィードバック的に作用することも予想される。

結論として、本章ではルテオリンが RBL-2H3 細胞の 5HT レベルを低下させることを見出し、その経路の一つとして TPH-1 の阻害作用を提示した。*In vitro* で作用させたルテオリンと、実際に *in vivo* で摂取して腸を介して吸収代謝されて体内に取り込まれ循環するルテオリンについては、大きく作用機序が異なると考えられるが、*in vivo* でもルテオリン摂取が大腸炎粘膜の 5HT 増加を抑制することを初めて見出した。細胞レベルも含め、ルテオリンが 5HT 量を調節する分子機序については未解明なことが多いが、食事からのルテオリン摂取が過剰産生された 5HT を減少させることにより、炎症状態を改善する可能性が示された。

第 5 章 総括

慢性炎症は老化の形質変化の一部として捉えられており、炎症の悪化は動脈硬化や神経変性疾患などの発症リスクを上昇させると言われている。このため、発症機序の解明は、健康寿命の延伸を目指す今日の日本において重要な課題といえる。疾病・老化には生命現象を担う様々な因子、遺伝情報（設計図）を担う遺伝子、その産物であるタンパク質、種々のシグナル分子にもなりうる脂質、細胞接着や相互作用を担う糖鎖、生理活性アミン等などが関わっている。本研究では全身性の生理活性アミンである 5HT の動態に着目し、慢性炎症部位で生じうる 5HT 由来の酸化物（TD）や過剰産出が問題となる 5HT の生成抑制について検討を行うことで、5HT 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。TD については検出定量手法の構築を行い、それを動物実験に応用することで新規な発見につながった。炎症にともなう 5HT の制御については食品成分であるルテオリンに焦点をあて、腸炎を軽減化できる候補分子として検討を進めた。また、腸炎を含め、抗炎症など生体に有益な作用が期待されている食品としてマヌカハニーについても着目し、消費者目線、調理学的な視点も取り入れながら加熱によるマヌカハニー成分の安定性についても検討を行い、補遺（Appendix）として示した。

第 2 章では、TD が細胞毒性を有するだけでなく、抗酸化関連酵素の発現を上昇させ、 H_2O_2 が誘導する細胞毒性に対して抑制的に作用することが明らかになった（Fig. 1）。これまでに様々な親電子性物質により生体内防御能が高められることが報告されてきたが、その多くは食品や環境中に存在する外因性の物質であった。本研究で着目した TD は内因性物質 5HT に由来するものであり、低用量の ROS 等による酸化ストレスと同様に我々にとって常に生体内で生じる可能性がある。本研究で得られた知見は今後、5HT に関連する生理機能性や種々の疾患の基礎研究を進める上で有益な情報になると考える。実際の脳の神経細胞で 5HT から TD が生じうるのか、については今後の課題である。加えて、TD がどのような分子メカニズムで細胞増殖や抗酸化関連酵素の発現上昇を誘導しているかについては解明に至らなかったため、TD の標的分子を探索し、細胞増殖やストレス適応応答の誘導作用に関する機序についてさらなる検討が必要であると考えられる。

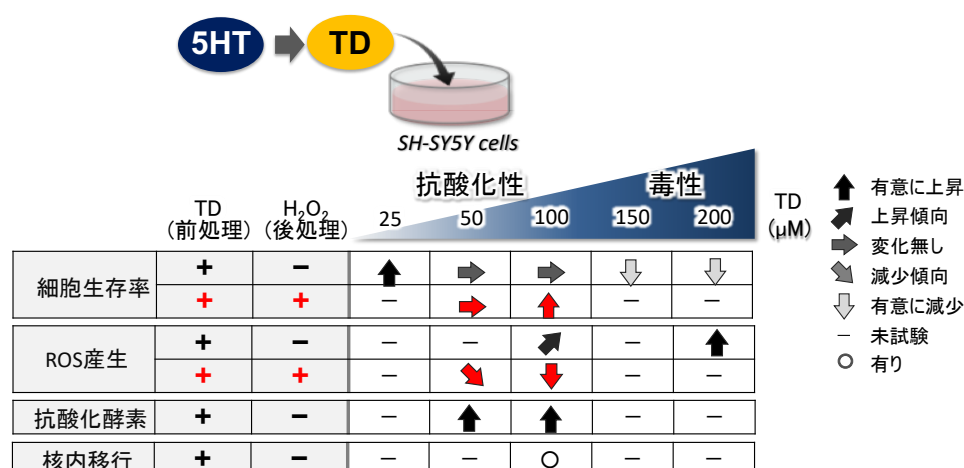


Fig. 1 研究1のまとめ

赤矢印は、H₂O₂による細胞毒性誘発時の細胞の反応を示す。各矢印の意味は右上に示した通り。

続いて第3章では、生体内において最も多く5HTが合成されて存在する腸管に着目した。また、慢性炎症疾患として、炎症性腸疾患の一つである潰瘍性大腸炎に焦点をあてた。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おり、腸の炎症に伴い5HT産生細胞の数および5HT量も増加するとの報告がなされている。炎症時にはMPOが好中球など免疫細胞の集積とともに高い活性を示し、また酸化的なストレスも亢進することから、MPOにより5HTが酸化されて生じるTDが腸炎症部位で産出されていることが予想された。また、第2章の検討から、TDは単なる産物のみならず、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化に関与する可能性もあり、大腸炎の詳細な機序解明を目指す上でTDの生成や局在性について明らかにすることは重要であると考えた。しかし、TDは反応性が高く化学的に不安定な物質でありその動態を捕まえるににくい。そこで、第3章では腸炎を誘導したマウスの粘膜組織から質量分析器を用いた化学的定量によりTD（遊離型）の検出定量を、また免疫組織染色法を用いTD（結合型）の局在性解析を行った。その結果、本研究で生体の腸組織から初めてTDの検出・定量に成功し、大腸炎モデルの腸において遊離のTD量が有意に増加すること、TDが組織タンパク質に結合することを見出した。

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においても検出定量された。このことから、健常な状態でもTDは恒常的に生じていることが示唆された。大腸炎モデルであるDSS処理マウス群では、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炎症性腸疾患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。

大腸炎モデルにおいて、TDの検討を行う中で、5HT そのものが大腸炎において過剰な産生放出と 5HT 受容体や免疫細胞の活性化を介して大腸炎の増悪作用などを誘導する報告がいくつか認められ、実際に薬剤による炎症治療標的になっていることに興味を持った。また、酸化ストレス下での過度な 5HT 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、第 3 章では大腸炎が 5HT 量の制御不全に起因して増悪化すると仮説を立て、食品成分（フラボノイド）による 5HT 量の制御を介した大腸炎抑制の可能性を検討した。

培養細胞を用いて 5HT 量を抑制するフラボノイドの探索を行ったところ、ケルセチンおよびルテオリンが細胞内外の 5HT 量の増加を顕著に抑制することを見出した。ルテオリンに焦点をあてて研究を進めたところ、ルテオリンは細胞内 5HT 合成の律速酵素である TPH-1 の発現を抑制し、5HT 放出に関与することが示唆されている MEK-ERK のリン酸化も抑制することを見出した (Fig. 2)。*In vivo* においてもルテオリンは DSS 誘導大腸炎において 5HT 量の増加を有意に抑制し、炎症スコアも低減させることを明らかにした。このことから、日常的な食事に含まれるルテオリンの摂取は、5HT の増加を抑制し、大腸炎の炎症抑制に有効な成分となる可能性が示された。しかしながら、実験に用いたルテオリンの量はヒトが日常的に食するには多く、その効果を立証するには更なる研究が必要である。加えて、第 3 章において、大腸炎モデルでの TD の増加を明らかにしたが、ルテオリン摂取が大腸における TD 生成（付加修飾）を低減化するかについても今後検討する必要がある。

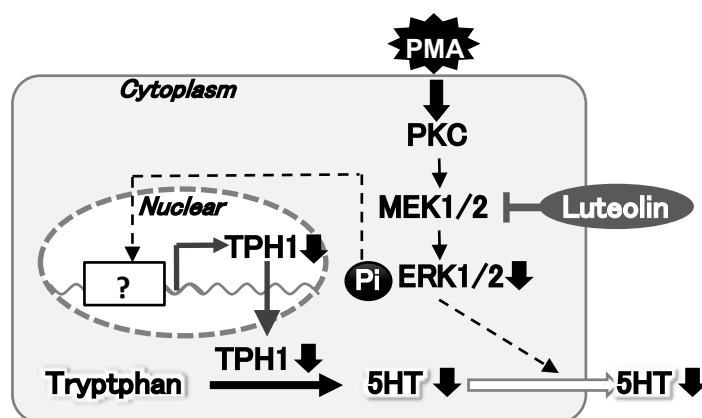


Fig. 2 研究 3 で示唆された RBL-2H3 細胞におけるルテオリンの 5HT 抑制機構

以上、本研究のまとめを Fig. 3 に示す。TD は、その生成量によっては炎症増悪因子または防御因子として、関与する可能性が示唆された。また、大腸炎モデルマウスにおいて、TD 量が増加し、炎症の進展に関与する可能性が予想された。また、5HT そのものの過剰産生を抑制することが大腸炎の治療標的の一つであることが示されてきたが、本研究により、今回試したフラボノイド類の中ではルテオリンが細胞および動物レベルで 5HT 抑制作用を有するということが明らかになった。残念ながら、いくつかの検討

課題は残されているが、今後、それらを一つ一つ明らかにしていくことで、炎症と 5HT 動態との関連に関する知見を増やす必要がある。このような基礎的研究の積み重ねにより、本研究で着目した大腸炎に加え、過剰な 5HT が増悪因子として関与しうる疾患の症状緩和や新規治療法の開発等に役立つことを期待したい。

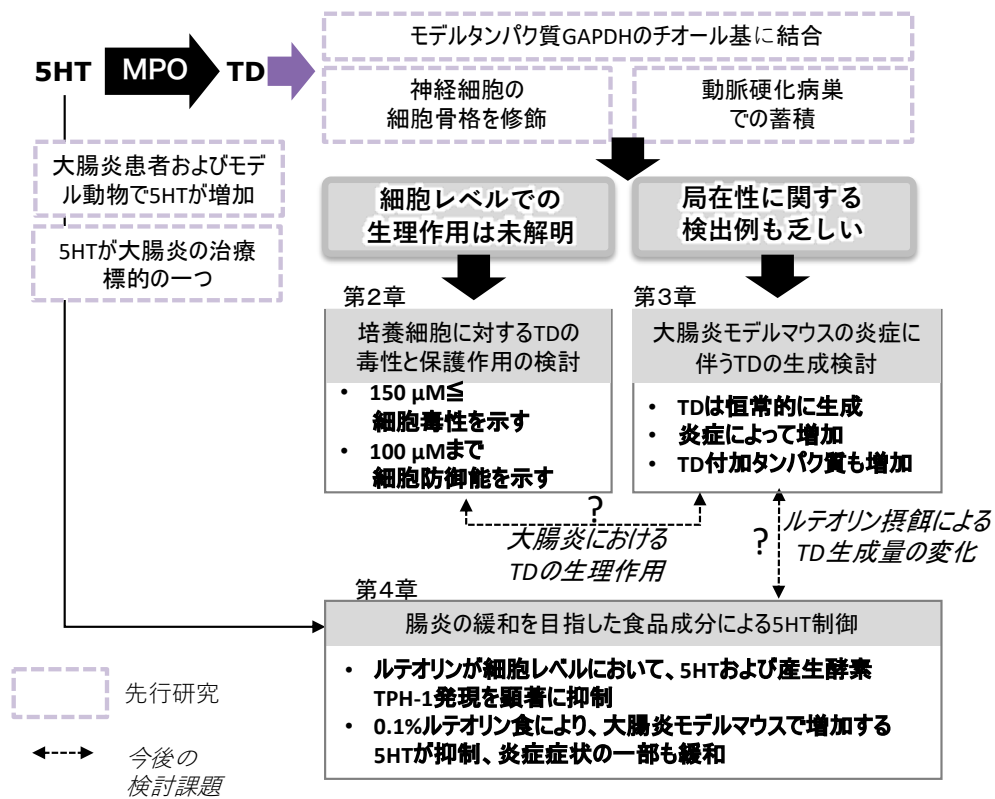


Fig. 3 本論文の総括

引用文献

- 1 総務省. 統計からみた我が国の高齢者(抜粋):「敬老の日」にちなんで: 令和元年9月15日. 共済新報 2019; **60**: 50-57.
- 2 高宮朋子, 小田切優子, 菊池宏幸, 福島教照, 林俊夫, 井上茂. 国民健康・栄養調査データに基づく日本人成人の運動習慣者割合の推移: Joinpointトレンド解析を用いた検討. 東京医科大学雑誌 2019; **77**: 217-225.
- 3 厚生労働省. 平成30年国民健康・栄養調査結果の概要. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000688863pdf>, 2020/12/30 アクセス.
- 4 Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 7432797.
- 5 Orzechowski A, Cywińska A, Rostagno AA, Rizzi FM. Oxidative stress, chronic inflammation, and amyloidoses. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 6024975.
- 6 Cenini G, Lloret A, Cascella R. Oxidative stress inneurodegenerative diseases: from a mitochondrial point of view. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 2105607.
- 7 厚生労働省. 認知症施策推進総合戦略(新オレンジプラン). 認知症地域支援推進員(概要) <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000064084html>, (参照日2017年12月12日) 2015.
- 8 厚生労働省政策統括官付参事官付保健統計室. 統計資料紹介 平成29年(2017)患者調査の概況. 厚生 の 指 標 *Journal of health and welfare statistics* 2019; **66**: 42-47.
- 9 Uruno A, Matsumaru D, Ryoke R, Saito R, Kadoguchi S, Saigusa D, Saito T, Saido TC, Kawashima R, Yamamoto M. Nrf2 suppresses oxidative stress and inflammation in App knock-in Alzheimer's disease model mice. *Mol Cell Biol* 2020; **40**.
- 10 Ferrari CC, Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation. *Parkinsons Dis* 2011; **2011**: 436813.
- 11 中村志郎, 樋田信幸, 渡邊憲治. 炎症性腸疾患治療の最前線—治療指針・ガイドラインを踏まえて—. 日本消化器病学会雑誌 2018; **115**: 233-243.
- 12 Matsumoto S, Miyatani H, Yoshida Y. Ulcerative colitis: comparison between elderly and young adult patients and between elderly patients with late-onset and long-standing disease. *Dig Dis Sci* 2013; **58**: 1306-1312.

- 13 Basu D, Lopez I, Kulkarni A, Sellin JH. Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 2254-2261.
- 14 Curkovic I, Egbring M, Kullak-Ublick GA. Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates. *Dig Dis* 2013; **31**: 368-373.
- 15 Wang Y, Parker CE, Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; **2016**: Cd000544.
- 16 Kapugi M, Cunningham K. Corticosteroids. *Orthop Nurs* 2019; **38**: 336-339.
- 17 Okusaga OO. Accelerated aging in schizophrenia patients: the potential role of oxidative stress. *Aging Dis* 2014; **5**: 256-262.
- 18 Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2007; **42**: 787-798.
- 19 Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**: 205-214.
- 20 稲葉真由美 杉憲, 上田真喜子. 動脈硬化症:診断と治療の進歩 トピックス II. 促進因子 病因と病態 2.病理面から:冠動脈を中心に. 日本内科学会雑誌 2013; **102**: 297-304.
- 21 坂田則行. 酸化ストレスと動脈障害. 脈管学 2003; **43**: 685-689.
- 22 Tzikas S, Schlak D, Sopova K, Gatsiou A, Stakos D, Stamatelopoulos K, Stellos K, Laske C. Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2014; **39**: 557-564.
- 23 Gellhaar S, Sunnemark D, Eriksson H, Olson L, Galter D. Myeloperoxidase-immunoreactive cells are significantly increased in brain areas affected by neurodegeneration in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 2017; **369**: 445-454.
- 24 Tomonaga T, Izumi H, Yoshiura Y, Myojo T, Oyabu T, Lee BW, Okada T, Marui T, Wang KY, Kubo M, Shimada M, Noguchi S, Nishida C, Yatera K, Morimoto Y. Usefulness of myeloperoxidase as a biomarker for the ranking of pulmonary toxicity of nanomaterials. *Part Fibre Toxicol* 2018; **15**: 41.
- 25 Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007; **132**: 397-414.
- 26 Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 2000; **61 Suppl 6**: 4-6.

- 27 El-Salhy M, Danielsson A, Stenling R, Grimelius L. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 1997; **242**: 413-419.
- 28 Hood KY, Mair KM, Harvey AP, Montezano AC, Touyz RM, MacLean MR. Serotonin signaling through the 5-HT(1B) receptor and NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; **37**: 1361-1370.
- 29 Yadav VK, Balaji S, Suresh PS, Liu XS, Lu X, Li Z, Guo XE, Mann JJ, Balapure AK, Gershon MD, Medhamurthy R, Vidal M, Karsenty G, Ducy P. Pharmacological inhibition of gut-derived serotonin synthesis is a potential bone anabolic treatment for osteoporosis. *Nat Med* 2010; **16**: 308-312.
- 30 Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2003; **5**: 165-176.
- 31 Kato Y, Ono S, Kitamoto N, Kettle AJ. Covalent modification of cytoskeletal proteins in neuronal cells by tryptamine-4,5-dione. *Redox Biol* 2014; **2**: 983-990.
- 32 Wrona MZ, Dryhurst G. Interactions of 5-hydroxytryptamine with oxidative enzymes. *Biochem Pharmacol* 1991; **41**: 1145-1162.
- 33 Wrona MZ, Dryhurst G. A putative metabolite of serotonin, tryptamine-4,5-dione, is an irreversible inhibitor of tryptophan hydroxylase: possible relevance to the serotonergic neurotoxicity of methamphetamine. *Chem Res Toxicol* 2001; **14**: 1184-1192.
- 34 Wrona MZ, Jiang XR, Kotake Y, Dryhurst G. Stability of the putative neurotoxin tryptamine-4,5-dione. *Chem Res Toxicol* 2003; **16**: 493-501.
- 35 Li HT, Lin DH, Luo XY, Zhang F, Ji LN, Du HN, Song GQ, Hu J, Zhou JW, Hu HY. Inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopamine analogs via reaction with the amino groups of alpha-synuclein. Implication for dopaminergic neurodegeneration. *Febs j* 2005; **272**: 3661-3672.
- 36 Terao J, Kawai Y, Murota K. Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008; **17 Suppl 1**: 291-293.
- 37 Kwon EY, Jung UJ, Park T, Yun JW, Choi MS. Luteolin attenuates hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2015; **64**: 1658-1669.
- 38 McKenna MC, Gruetter R, Sonnerwald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. New York, NY: Elsevier Academic Press, 2011.

- 39 Lu J, Zhong X, Liu H, Hao L, Huang CT, Sherafat MA, Jones J, Ayala M, Li L, Zhang SC. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2016; **34**: 89-94.
- 40 Dunford HB, Hsuanyu Y. Kinetics of oxidation of serotonin by myeloperoxidase compounds I and II. *Biochem Cell Biol* 1999; **77**: 449-457.
- 41 Ximenes VF, Maghzal GJ, Turner R, Kato Y, Winterbourn CC, Kettle AJ. Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione. *Biochem J* 2009; **425**: 285-293.
- 42 Puty B, Maximino C, Brasil A, da Silva WL, Gouveia A, Jr., Oliveira KR, Batista Ede J, Crespo-Lopez ME, Rocha FA, Herculano AM. Ascorbic acid protects against anxiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: action on the serotonergic system. *Zebrafish* 2014; **11**: 365-370.
- 43 Kato Y, Oki K, Suga N, Ono S, Ishisaka A, Miura Y, Kanazawa S, Naito M, Kitamoto N, Kettle AJ. A 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* 2016; **101**: 500-510.
- 44 Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo J, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009; **325**: 612-616.
- 45 Swirski FK, Wildgruber M, Ueno T, Figueiredo JL, Panizzi P, Iwamoto Y, Zhang E, Stone JR, Rodriguez E, Chen JW. Myeloperoxidase-rich Ly-6C⁺ myeloid cells infiltrate allografts and contribute to an imaging signature of organ rejection in mice. *J Clin Invest* 2010; **120**: 2627-2634.
- 46 Olmsted JB. Tubulin pools in differentiating neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 1981; **89**: 418-423.
- 47 Jiang XR, Dryhurst G. Inhibition of the α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase complexes by a putative aberrant metabolite of serotonin, tryptamine-4, 5-dione. *Chem res toxicol* 2002; **15**: 1242-1247.
- 48 Van Laar VS, Mishizen AJ, Cascio M, Hastings TG. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol Dis* 2009; **34**: 487-500.
- 49 Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK. Initial response and cellular protection

- through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1, 2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol* 2011; **24**: 559-567.
- 50 Nakamura Y, Miyoshi N. Electrophiles in foods: the current status of isothiocyanates and their chemical biology. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; **74**: 242-255.
- 51 Attia SM. Deleterious effects of reactive metabolites. *Oxid Med Cell Longev* 2010; **3**: 238-253.
- 52 Dong H, Xu D, Hu L, Li L, Song E, Song Y. Evaluation of N-acetyl-cysteine against tetrachlorobenzoquinone-induced genotoxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Food Chem* 2014; **64**: 291-297.
- 53 Satoh T, McKercher SR, Lipton SA. Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic Biol* 2014; **66**: 45-57.
- 54 菅尚子. 兵庫県立大学大学院環境人間学部卒業論文 2014.
- 55 Kato Y, Peskin AV, Dickerhof N, Harwood DT, Kettle AJ. Myeloperoxidase catalyzes the conjugation of serotonin to thiols via free radicals and tryptamine-4,5-dione. *Chem Res Toxicol* 2012; **25**: 2322-2332.
- 56 Suga N, Murakami A, Nakamura Y, Ishisaka A, Kitamoto N, Ito M, Kato Y. Cytotoxic and cytoprotective effects of tryptamine-4,5-dione on neuronal cells: a double-edged sword. *Free Radic Res* 2017; **51**: 545-553.
- 57 Kraft AD, Johnson DA, Johnson JA. Nuclear factor E2-related factor 2-dependent antioxidant response element activation by tert-butylhydroquinone and sulforaphane occurring preferentially in astrocytes conditions neurons against oxidative insult. *J Neurosci* 2004; **24**: 1101-1112.
- 58 Michaelis M, Bliss J, Arnold SC, Hinsch N, Rothweiler F, Deubzer HE, Witt O, Langer K, Doerr HW, Wels WS. Cisplatin-resistant neuroblastoma cells express enhanced levels of epidermal growth factor receptor (EGFR) and are sensitive to treatment with EGFR-specific toxins. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 6531-6537.
- 59 Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; **287**: L111-L118.
- 60 Mukhin YV, Garnovskaya MN, Collinsworth G, Grewal JS, Pendergrass D, Nagai T, Pinckney S, Greene EL, Raymond JR. 5-Hydroxytryptamine1A receptor/Gbetagamma stimulates mitogen-activated protein kinase via NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species upstream of src in chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochem J* 2000; **347 Pt 1**: 61-67.

- 61 Castino R, Fiorentino I, Cagnin M, Giovia A, Isidoro C. Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol Sci* 2011; **123**: 523-541.
- 62 Kobayashi M, Li L, Iwamoto N, Nakajima-TY, Kaneko H, Nakayama Y, Eguchi M, Wada Y, Kumagai Y, Yamamoto M. The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol cell biol* 2009; **29**: 493-502.
- 63 Ohnishi K, Irie K, Murakami A. In vitro covalent binding proteins of zerumbone, a chemopreventive food factor. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009. 0907061526-0907061526.
- 64 Brady S, Siegel G, Albers RW, Price D. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. Academic press, 2011.
- 65 Kang KW, Cho MK, Lee CH, Kim SG. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by tert-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells. *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 1147-1156.
- 66 Lee J-M, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 20011-20016.
- 67 Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, Knight AR, Taylor EL, Oettrich J, Ruskovska T, Gasparovic AC, Cuadrado A, Weber D, Poulsen HE, Grune T, Schmidt HH, Ghezzi P. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2015; **23**: 1144-1170.
- 68 Bernstein CN. Large registry epidemiology in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2017; **23**: 1941-1949.
- 69 Gramlich T, Petras RE. Pathology of inflammatory bowel disease. *Semin Pediatr Surg* 2007; **16**: 154-163.
- 70 Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; **111**: 383-389.
- 71 Chami B, Martin NJJ, Dennis JM, Witting PK. Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease. *Arch Biochem Biophys* 2018; **645**: 61-71.
- 72 Kato Y. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *J Clin Biochem Nutr* 2016; **58**: 99-104.

- 73 Knutson CG, Mangerich A, Zeng Y, Raczynski AR, Liberman RG, Kang P, Ye W, Prestwich EG, Lu K, Wishnok JS, Korzenik JR, Wogan GN, Fox JG, Dedon PC, Tannenbaum SR. Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: E2332-2341.
- 74 El-Salhy M, Hatlebakk JG. Changes in enteroendocrine and immune cells following colitis induction by TNBS in rats. *Mol Med Rep* 2016; **14**: 4967-4974.
- 75 Oshima S, Fujimura M, Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate. *Histochem Cell Biol* 1999; **112**: 257-263.
- 76 Wrona MZ, Dryhurst G. Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**: 639-650.
- 77 Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; **295**: C849-868.
- 78 Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002; **104**: 185-192.
- 79 Kato Y, Kawai Y, Morinaga H, Kondo H, Dozaki N, Kitamoto N, Osawa T. Immunogenicity of a brominated protein and successive establishment of a monoclonal antibody to dihalogenated tyrosine. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 24-31.
- 80 Pandurangan AK, Mohebbali N, Norhaizan ME, Looi CY. Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Des Devel Ther* 2015; **9**: 3923-3934.
- 81 Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp* 2012; **60**: 3678.
- 82 Onouchi T, Shiogama K, Mizutani Y, Takaki T, Tsutsumi Y. Visualization of neutrophil extracellular traps and fibrin meshwork in human fibrinopurulent inflammatory lesions: III. Correlative light and electron microscopic study. *Acta Histochem Cytochem* 2016; **49**: 141-147.
- 83 Chami B, San Gabriel PT, Kum-Jew S, Wang X, Dickerhof N, Dennis JM, Witting PK. The nitroxide 4-methoxy-tempo inhibits the pathogenesis of dextran sodium sulfate-stimulated experimental colitis. *Redox Biol* 2020; **28**: 101333.
- 84 Ishitsuka Y, Maniwa F, Koide C, Kato Y, Nakamura Y, Osawa T, Tanioka M, Miyachi Y. Increased halogenated tyrosine levels are useful markers of human skin

- ageing, reflecting proteins denatured by past skin inflammation. *Clin Exp Dermatol*2012; **37**: 252-258.
- 85 Takagi T, Naito Y, Okada H, Okayama T, Mizushima K, Yamada S, Fukumoto K, Inoue K, Takaoka M, Oya-Ito T, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Kokura S, Yagi N, Ichikawa H, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Identification of dihalogenated proteins in rat intestinal mucosa injured by indomethacin. *J Clin Biochem Nutr*2011; **48**: 178-182.
- 86 Jiang XR, Wrona MZ, Alguindigue SS, Dryhurst G. Reactions of the putative neurotoxin tryptamine-4,5-dione with L-cysteine and other thiols. *Chem Res Toxicol*2004; **17**: 357-369.
- 87 Wan M, Ding L, Wang D, Han J, Gao P. Serotonin: a potent immune cell modulator in autoimmune diseases. *Front Immunol*2020; **11**: 186.
- 88 León-Ponte M, Ahern GP, O'Connell PJ. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood* 2007; **109**: 3139-3146.
- 89 Herr N, Bode C, Duerschmied D. The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc Med*2017; **4**: 48.
- 90 Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol (Oxf)* 2015; **213**: 561-574.
- 91 Khan WI, Ghia JE. Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin Exp Immunol*2010; **161**: 19-27.
- 92 Minderhoud IM, Oldenburg B, Schipper ME, ter Linde JJ, Samsom M. Serotonin synthesis and uptake in symptomatic patients with Crohn's disease in remission. *Clin Gastroenterol Hepatol*2007; **5**: 714-720.
- 93 Tada Y, Ishihara S, Kawashima K, Fukuba N, Sonoyama H, Kusunoki R, Oka A, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Ishikawa N, Araki A, Harada Y, Maruyama R, Kinoshita Y. Downregulation of serotonin reuptake transporter gene expression in healing colonic mucosa in presence of remaining low-grade inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*2016; **31**: 1443-1452.
- 94 Katsumata R, Shiotani A, Murao T, Ishii M, Fujita M, Matsumoto H, Haruma K. The TPH1 rs211105 gene polymorphism affects abdominal symptoms and quality of life of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Clin Biochem Nutr* 2018; **62**: 270-276.
- 95 Di Paolo MC, Paoluzi OA, Pica R, Iacopini F, Crispino P, Rivera M, Spera G, Paoluzi P. Sulphasalazine and 5-aminosalicylic acid in long-term treatment of

- ulcerative colitis: report on tolerance and side-effects. *Dig Liver Dis* 2001; **33**: 563-569.
- 96 Hossen I, Hua W, Ting L, Mehmood A, Jingyi S, Duoxia X, Yanping C, Hongqing W, Zhipeng G, Kaiqi Z, Fang Y, Junsong X. Phytochemicals and inflammatory bowel disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020; **60**: 1321-1345.
- 97 Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci* 2016; **5**: e47.
- 98 Salaritabar A, Darvishi B, Hadjiakhoondi F, Manayi A, Sureda A, Nabavi SF, Fitzpatrick LR, Nabavi SM, Bishayee A. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 5097-5114.
- 99 Kwon KH, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 395-406.
- 100 Radulovic K, Normand S, Rehman A, Delanoye-Crespin A, Chatagnon J, Delacre M, Waldschmitt N, Poulin LF, Iovanna J, Ryffel B, Rosenstiel P, Chamailard M. A dietary flavone confers communicable protection against colitis through NLRP6 signaling independently of inflammasome activation. *Mucosal Immunol* 2018; **11**: 811-819.
- 101 Li Y, Shen L, Luo H. Luteolin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice possibly through activation of the Nrf2 signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 2016; **40**: 24-31.
- 102 Wojnicz A, Ortiz JA, Casas AI, Freitas AE, López MG, Ruiz-Nuño A. Data supporting the rat brain sample preparation and validation assays for simultaneous determination of 8 neurotransmitters and their metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Data Brief* 2016; **7**: 714-720.
- 103 Nishitani Y, Yamamoto K, Yoshida M, Azuma T, Kanazawa K, Hashimoto T, Mizuno M. Intestinal anti-inflammatory activity of luteolin: role of the aglycone in NF- κ B inactivation in macrophages co-cultured with intestinal epithelial cells. *Biofactors* 2013; **39**: 522-533.
- 104 Chin A, Svejda B, Gustafsson BI, Granlund AB, Sandvik AK, Timberlake A, Sumpio B, Pfragner R, Modlin IM, Kidd M. The role of mechanical forces and adenosine in the regulation of intestinal enterochromaffin cell serotonin secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; **302**: G397-405.

- 105 Kidd M, Modlin IM, Gustafsson BI, Drozdov I, Hauso O, Pfragner R. Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; **295**: G260-272.
- 106 Kim M, Cooke HJ, Javed NH, Carey HV, Christofi F, Raybould HE. D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* 2001; **121**: 1400-1406.
- 107 Baik SY, Jung KH, Choi MR, Yang BH, Kim SH, Lee JS, Oh DY, Choi IG, Chung H, Chai YG. Fluoxetine-induced up-regulation of 14-3-3zeta and tryptophan hydroxylase levels in RBL-2H3 cells. *Neurosci Lett* 2005; **374**: 53-57.
- 108 Zhao R, Wang S, Huang Z, Zhang L, Yang X, Bai X, Zhou D, Qin Z, Du G. Lipopolysaccharide-induced serotonin transporter up-regulation involves PKG-I and p38MAPK activation partially through A3 adenosine receptor. *Biosci Trends* 2015; **9**: 367-376.
- 109 Zhu CB, Steiner JA, Munn JL, Daws LC, Hewlett WA, Blakely RD. Rapid stimulation of presynaptic serotonin transport by A(3) adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **322**: 332-340.
- 110 Kim SW, Park SY, Hwang O. Up-regulation of tryptophan hydroxylase expression and serotonin synthesis by sertraline. *Mol Pharmacol* 2002; **61**: 778-785.
- 111 Liu Q, Yang Q, Sun W, Vogel P, Heydorn W, Yu XQ, Hu Z, Yu W, Jonas B, Pineda R, Calderon-Gay V, Germann M, O'Neill E, Brommage R, Cullinan E, Platt K, Wilson A, Powell D, Sands A, Zambrowicz B, Shi ZC. Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **325**: 47-55.
- 112 Ghia JE, Li N, Wang H, Collins M, Deng Y, El-Sharkawy RT, Côté F, Mallet J, Khan WI. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *J Gastroenterol* 2009; **137**: 1649-1660.
- 113 Kim JJ, Wang H, Terc JD, Zambrowicz B, Yang QM, Khan WI. Blocking peripheral serotonin synthesis by telotristat etiprate (LX1032/LX1606) reduces severity of both chemical- and infection-induced intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; **309**: G455-465.
- 114 Bertrand PP, Barajas-Espinosa A, Neshat S, Bertrand RL, Lomax AE. Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **298**: G446-455.

- 115 Bischoff SC, Mailer R, Pabst O, Weier G, Sedlik W, Li Z, Chen JJ, Murphy DL, Gershon MD. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; **296**: G685-695.
- 116 Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2004; **126**: 1657-1664.
- 117 Zhao G, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Neurochem Int* 2010; **56**: 168-176.
- 118 Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A. Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *Br J Pharmacol* 2002; **136**: 1058-1064.
- 119 Vukelić I, Detel D, Batičić L, Potočnjak I, Domitrović R. Luteolin ameliorates experimental colitis in mice through ERK-mediated suppression of inflammation, apoptosis and autophagy. *Food Chem Toxicol* 2020; **145**: 111680.
- 120 Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 1995; **155**: 381-386.
- 121 Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 2018; **23**: 716-724.
- 122 Shajib MS, Wang H, Kim JJ, Sunjic I, Ghia JE, Denou E, Collins M, Denburg JA, Khan WI. Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS One* 2013; **8**: e72774.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご多忙な中、いつも懇切丁寧に、かつ自主性を尊重していただきながらご指導いただきました加藤陽二先生に深く感謝いたします。また、ディスカッションや研究姿勢を通していつも向上心を与えてくださりました副指導教員の村上明先生に深く厚くお礼申し上げます。

動物試験や日々様々な場面でご指導・ご助言を賜りました有満秀幸先生に深謝いたします。研究のみならず進路など様々なご助言を賜り、また副査も務めて頂きました伊藤美紀子先生、吉村美紀先生に感謝致します。動物試験や組織染色で様々なアドバイスをくださりました田中更沙先生、石坂朱里先生、河原明奈先生（岡山大学）にお礼申し上げます。セロトニン定量など、研究をサポートいただきました中村俊之先生（岡山大学）に感謝いたします。調理学分野での研究についてご指導いただきました坂本薫先生に深謝いたします。学士時代から今日まで研究の考え方についていつも丁寧に指導いただきました中村宜督先生（岡山大学）に心より感謝申し上げます。組織染色において、お忙しい中、多大なお力添えをいただきました塩竈和也先生（藤田医科大学）に感謝いたします。マヌカハニーUMF25+の試料をご提供頂きましたグリーンベイ・堀井慎一郎さまに感謝します。学位審査のために外部委員をお引き受け頂きました芦田均先生（神戸大学）に感謝致します。

本研究の基盤となるデータや抗体を残してくださった卒業生の沖公太さん、小野成輝さん、清水与代さん、森田朱美さんを含め、日々、公私にわたり励ましの言葉を頂いた食品機能・フリーラジカル（FRF2）研究室のみなさま、卒業生のみなさま、本当に感謝いたします。今後、これまで皆様からいただいたことに対する感謝の気持ちを還元できるよう、不肖ながら努めて参りたいと思います。心よりお礼申し上げます。本当にありがとうございました。

Appendix

マヌカハニー特有成分の熱安定性

A-1. 緒言

マヌカハニーは、ニュージーランド (New Zealand: NZ) にのみ植生するマヌカ (*Leptospermum scoparium*) の花蜜に由来するハチミツである。マオリ語で「マヌカ」は「癒しの木」「復活の木」を意味し、古くから先住民族のマオリ族がマヌカの木や葉を治療に用いてきたが、マヌカハニーとして食されるようになったのは西洋ミツバチおよび養蜂技術の導入後とされている⁽¹⁾。現在、欧米や中国、日本において、健康意識の高い消費者層を中心として需要が拡大している食品の一つである。

マヌカハニーに特徴的に含まれるメチルグリオキサール (Methylglyoxal: MGO) は反応性の高い低分子アルデヒドであり、強い抗菌活性を示す^(2,3)。そのため、風邪予防などの効果が期待され、日本でも健康意識の高い消費者層を中心としたマヌカハニーの需要が年々高まっている。MGOは調理過程などでアミノカルボニル反応の産物としても生じることが知られているが、実は細胞内でも解糖系の副産物として常時生じ、グリオキサラーゼ系によりMGOを乳酸に変換して無毒化している。生体内のプロセスに様々な影響を及ぼしうる成分とも言える。さらに、マヌカハニーに含まれるメチルシリングレート (Methyl syringate; MSYR) の代謝物であるシリング酸は、本編の第2章および第3章で用いたものと同じDSSで大腸炎を誘発した大腸炎モデルマウスにおいて、炎症症状の改善効果を示している⁽⁴⁾。また、高品質のマヌカハニー (Unique manuka factor ; UMF値 20+) はプロバイオティクスを増加させる可能性がある⁽⁵⁾。現在までマヌカハニーによる腸炎抑制作用の報告例は少ないが、腸炎に効果的という学会発表もあり⁽⁶⁾、今後、IBDなどの腸疾患の予防や治療、回復において、効果が期待される食品になりうる。

序論でも述べたように、マヌカハニーは、日本は勿論、世界的にも認知度や需要が高まり、ハチミツそのものだけでなく、マヌカハニー入りの飴やグミ、ガムなどの加工品も目にする機会が増えてきている。これらの加工品が実際に機能性を示すかは不明であるが、健康効果などを期待する多くの消費者が高価なマヌカハニーを購入しなくても、その成分を加工品から気軽に摂取できるようになっている。

マヌカハニーはプレミアム商品であり、抗菌活性成分のMGOを含めた特有成分を指標として品質管理が厳密に行われてきている。その理由の一つとして、マヌカハニーの偽装品や粗悪品などが多く流通したことが挙げられる。序論でも述べたが、現在、NZ第一次産業省は、高価値の輸出品 (マヌカハニー) の地位を維持するために、マヌカハニーに特有な4つの化学成分 (Phenyllactic acid: PLA、4-Hydroxyphenyllactic acid: HPA、4-

methoxybenzoic acid: MBA、2'-methoxyacetophenone: MAP) の含量検査とマヌカ (*Leptospermum scoparium*) 花粉に由来する遺伝子の検査を義務づけている⁽⁷⁾。この政府主導の検査に先駆けて、マヌカハニーの純度を示す指標として複数のグレーディングシステムが存在している。その中で代表的なものが、「MGO」(あるいはMG) とユニークマヌカファクター「UMF」である。「MGO」値は、抗菌作用を示すMGOの量に基づき、ハチミツ1 kgあたりのMGO量(下限値)を示している。一方、NZ最大のマヌカハニーを管理する団体UMF協会が採用している指標「UMF」は、MGO量とともに、MSYRのゲンチオビオース配糖体であるマヌカハニー特有成分Leptosperin⁽⁸⁾と、MGOの前駆体でありマヌカの花蜜に特徴的に含まれるジヒドロキシアセトン(DiA)量も含めて認証している⁽⁹⁾。加えて、糖や炭水化物の熱分解により生成されるため過度な熱処理や長期にわたる保存により増加するヒドロキシメチルフルフラール(Hydroxymethylfurfura; HMF)^(10,11)も、UMF認証においてはその上限値を設けている。

このような厳密な品質管理や品質保証の表示がなされている一方で、マヌカハニーを添加した加工品に関しては、特に基準が設けられていない現状にある。実際に、市場で流通しているマヌカハニー入りのど飴やグミなどの食品に、どのグレードのマヌカハニーを使用したかは示していても、MGOなどの成分がどの程度残存しているかについての情報は表示されていない。また、これまでに、マヌカハニーの加熱に伴いMGO量が減少すること⁽¹²⁾も報告されているが、その機構や調理加工を想定した高温での安定性に関する詳細は不明である。

マヌカハニー(加工品含む)は、腸内環境の改善のみならず、高い抗菌作用^(2,13)や抗ウイルス作用^(14,15)が期待されることから、今後さらに需要が高まることが予想される。その際、消費者からすれば、マヌカハニー商品にどのくらいの特有成分が含まれているか(残存しているか)は極めて重要と考える。特に飴については、高温で加工することから成分の損失も考えられる。以上のことから、MGOをはじめとするマヌカハニー特有成分の熱による変動に関する知見を増やす必要があると考えた。

このため、腸炎抑制効果などの機能が期待されているマヌカハニーに着目し、食品加工を想定した温度でのマヌカハニーに特徴的な成分の熱安定性について調べ、マヌカハニー入り食品の品質向上の一助とすることを目指し検討を行なった。

A-2. 実験方法

試薬

マヌカハニーは、「UMF25+」のグレードを用いた。MSYR は Alfa Aesar 社 (Lancashire, UK) から購入した。Leptosperin は既報に従って合成して用いた (Aitken 等, 2013)。また、MGO、HMF、DiA、MAP、PLA、及び MBA はシグマアルドリッチジャパン (Tokyo, Japan) より、また、内部標準である Anisole はナカライテスクより入手した。*o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) 及び Forchlorfenuron (1-(2-chloro-4-pyridyl)3-phenylurea, FCF) は東京化成工業 (Tokyo, Japan) より購入した。

サンプルの作製

1) 加熱による有効成分の熱安定性試験

マヌカハニーを均一にかき混ぜた後、おおよそ 0.1 g となるようにガラス試験管に量りとり、150°C の乾熱器中で 0、10、30、60 分間加熱した。なお、特に示さない限り開放系で実験した。蓋つき容器はネジタイプの試験管を使用した。その際のヘッドスペースはおおよそ 11 cm³ であった。温度の比較実験においては、4、60、90、120、150°C で 10 分間の加熱を行なった。加熱後、サンプルは純水で加熱前の湿重量を基準として 0.1 g/ml となるように調製し、ボルテックスおよび超音波処理によって溶解した。

2) 糖溶液中 MGO の熱安定性試験

スクロース、フルクトースおよびグルコースそれぞれの 30% 溶液に試薬の MGO を 0.5 g/ml となるように溶解した。それぞれの糖溶液は 4°C および 90°C で 60 分間の処理を行なった。

測定方法

1) MGO、DiA および HMF の測定

(1) -2) で調製したハチミツ試料は、0.05 g/ml となるように純水を加え、ボルテックスおよび超音波処理によって溶解した⁽¹⁶⁾。標準液には MGO、DiA および HMF の混合液を用いた。100 µl の試料もしくは標準液を 500 µl の誘導体化試薬 (2% *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride; PFBHA) と混合し、ミキサー (TAITEC Deep-Well Maximizer, M-BR-022UP) で、50°C で 1 時間攪拌した。攪拌後、試料および標準液に対して、内部標準液として 0.27% Anisole 溶液 (水: CH₃CN = 25:75) を 25 µl 加えた。遠心後の上清を超高速液体クロマトグラフ (Ultra high performance liquid chromatography: UHPLC) (UltiMate3000, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。カ

ラムは Hypersil Gold C18 column (2.1 × 100 mm, 1.9 μm, Thermo Fisher Scientific) を用い、カラム温度は 50°C とした。標準溶液あるいは試料を 5 μl 注入し、波長 215 nm (DiA) もしくは 262 nm (MGO および HMF) での成分の溶出をモニタリングした。流速は 0.7 ml/min、移動相は、A 液に 0.1% HCOOH、B 液に CH₃CN を用いた。グラジエントプログラムは初期溶媒 (B20%)、0.6 分 (B20%)、1.3 分 (B70%)、3 分 (B100%)、3.5 分 (B100%)、4 分 (B20%)、10 分 (B20%) とした。MGO、DiA および HMF の検量線 (0–200 μg/ml) を作成し、試料溶液中の濃度を算出した。

2) NZ 政府により定められた化学的成分の測定

4 つの化学的指標は、NZ 第一次産業省による既報 (McDonald 等, 2018) に準じて、LC/MS/MS (API3000, AB Sciex) を用いて測定した⁽¹⁶⁾。(1) で調製したハチミツ試料 (0.1 g/ml) を純水でさらに 100 倍希釈し (1 mg/ml)、エタノールで調製した等量の内部標準 FCF 溶液 (10 ng/ml) と混合し、分析用試料とした。カラムは Develosil C30-UG-5 column (2 × 150 mm, 5 μm, Nomura Chemical. Co.) を用い、HPLC (Agilent HP1100) により分離を行なった。標準溶液あるいは試料の注入量は 5 μL、流速は 0.2 ml/min とし、移動相は、A 液に 0.1% HCOOH、B 液に CH₃CN を用いた。グラジエントプログラムは初期溶媒 (B5%)、1 分 (B5%)、4 分 (B15%)、10 分 (B70%)、12 分 (B98%)、12.5 分 (B92%)、13 分 (B5%)、30 分 (B5%) とした。

MRM は、以下の通りである。ポジティブイオン化では、分子イオン [M+H]⁺ をプリカーサーとしたときの生成物イオン m/z (MBA 153.0/135.0、MAP 151.0/105.1、FCF 248.0/129.1) を測定した。ネガティブイオン化では、分子イオン [M-H]⁻ をプリカーサーとしたときの生成物イオン m/z (PLA 165.0/119.0、4HPA 181.0/135.05、FCF 246.0/127.0) を測定した。4 つの化学的指標の検量線 (0–1000 ng/ml) を作成し、試料溶液中の濃度を算出した。

3) Leptosperin および MSYR の測定

UHPLC として UltiMate3000 を用いて、カラム Hypersil Gold C18 column (2.1 × 100 mm, 1.9 μm) により分離した。標準溶液あるいは試料を 2.5 μl 注入し、カラム温度は 40°C とし、波長 262 nm (Leptosperin) と 275 nm (MSYR) でモニタリングした。流速は 0.4 ml/min、移動相は、A 液に 0.1% HCOOH、B 液に CH₃CN を用いた。グラジエントプログラムは初期溶媒 (B10%)、4 分 (B40%)、5 分 (B10%)、10 分 (B10%) とした。Leptosperin および MSYR の検量線 (0–10 μg/ml) を作成し、試料溶液中の濃度を算出した。

4) 褐変化度の測定

(1)–(2) で温度別に 10 分間加熱して調製した試料 (0.1 g/ml) を 384 well プレートに入れ、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, xMark) を用いて、波長 420 nm を測定した。

統計解析

各測定はサンプル数を 3 として測定し、平均及び標準偏差を求めた。統計解析は、解析ソフトウェア SPSS ver. 25.0 (IBM, Chicago, IL) を用いて、Dunnett 検定による多重比較および 2 試料間の比較には Student の t 検定を行なった。いずれの実験も有意水準を 5%とした。

A-3. 結果

1. 150°C加熱による特有成分の経時変化

本実験で用いたマヌカハニー「UMF25+」はMGOを1200 mg/kg以上、Leptosperinを100 mg/kg以上を含むことが検査時に確認されているものであり、本実験で得られた測定値（加熱0分）は、十分にその条件を満たすものであった。また、Fig. 1Bおよび2Cに示すようにLeptosperin（配糖体）とアグリコンMSYRの存在比は、これまでの先行研究とおおよそ同程度のものであった⁽¹⁶⁾。マヌカハニーを150°Cで加熱すると、MGOは、10分で12%程度まで大きく減少し、30分以降では検出限界以下となった。MGOの前駆体であるDiAは経時的に減少し、1時間で半分程度となった。一方で、加熱の指標であるHMFは経時的に大きく増加した（Fig. 1A）。Leptosperinは、30分までほとんど変化せず、60分後でも約80%残存していた。LeptosperinのアグリコンであるMSYRについても、30分後で85%、60分後で75%残存しており、減少はみられたものの、MGOと比較すると、Leptosperinと同様に熱に安定であることが明らかになった（Fig. 1B）。NZ政府の基準である4つの化学的成分の指標の一つであるMAPは10分間の加熱で有意に減少しており、60分後には32%にまで大きく減少した（Fig. 1C, D）。

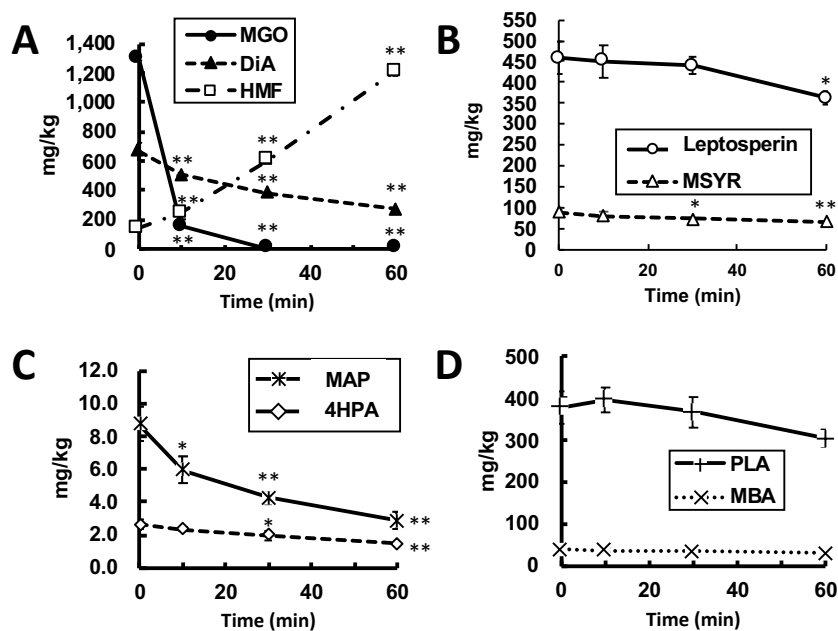


Fig. 1. Time dependency of compositional changes in chemical profile of manuka honey at 150 °C heating.

Each sample was heated for indicate time, then analyzed. The experiments were performed using $n = 3$ samples, and results are expressed as mean \pm standard deviation. The significance of differences was assessed by Dunnett's test using SPSS (version 25.0). The statistical significance was set at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs. control (0 min).

2. 加熱温度による特有成分の変化

ハチミツ成分の残存率を温度別に検討した。加熱前後での重量変化を調べたところ、最も高温の 150°C 加熱では重量が 1 割程度減少した (Fig. 2A-1, 実線)。この減少は、水分などの含有成分の揮発によると考えられる。一方で、加熱によるハチミツ溶解液の着色について調べたところ、120°C 以上で顕著に褐変化が進行しており (Fig. 2A-2)、実際に吸光度の測定によってもその着色が裏付けられた (Fig. 2A-1, 破線)。含有成分を測定したところ、10 分間の加熱では、MGO は 90°C まで減少が認められず、120°C 以上で顕著に減少し、150°C における残存率は 4% であった。DiA についても 150°C において半分程度まで減少した (Fig. 2B)。HMF 量は 120°C から顕著に増加し、150°C 加熱時には 4°C と比較して 3.7 倍に増加した。一方で Leptosperin および MSYR は、120°C 以上で大きく減少したものの、その減少率はわずか 4–7% 程度であった (Fig. 2C)。このことから、短時間処理でも 120°C を越える処理は MGO の残量を大きく減少させ、HMF 量を増加させることが明らかとなった。

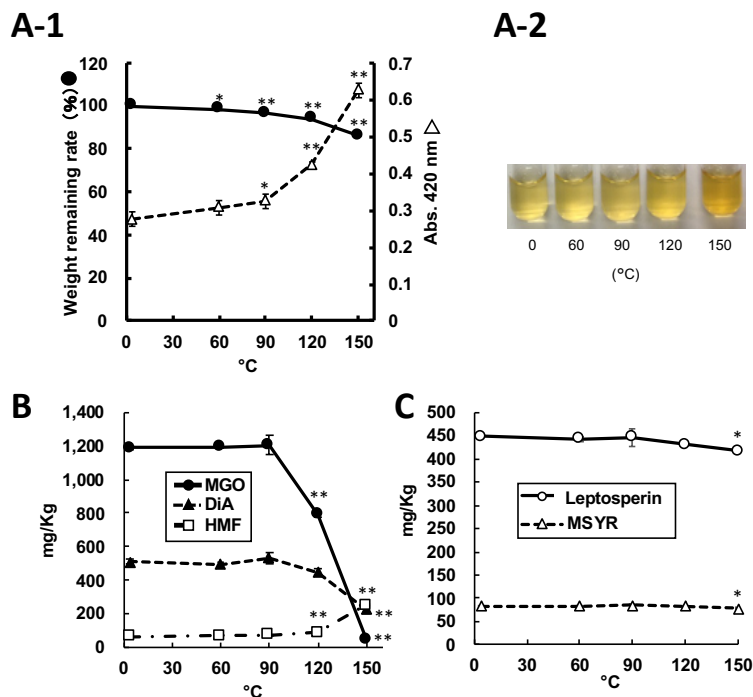


Fig. 2. Effect of heating temperature on coloring and amount of specific components. Each sample was heated at the indicate temperature for 10 min, then analyzed. The experiments were performed using $n = 3$ samples, and results are expressed as mean \pm standard deviation. The significance of differences was assessed in a similar way as Figure 1. The statistical significance was set at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ vs. control (4°C).

3. 揮発による影響の検討

マヌカハニーを4°Cで蓋をしたものをコントロールとして、90°Cで1時間加熱および150°Cで10分間加熱し、蓋の有無でMGO量の回収率を比較した(Fig. 3)。蓋なしでは、蓋ありと比較して重量の減少率が高くなったが、MGOの回収率に違いは認められなかった。

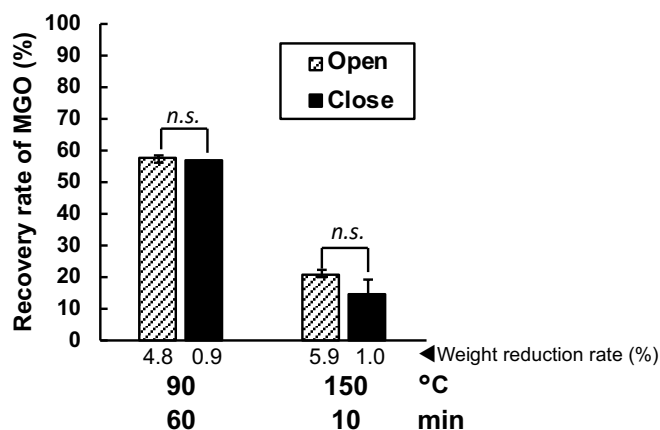


Fig. 3. Effect of volatilization on MGO reduction by heating.

Control was incubated for 60 min at 4°C. Each sample was heated for 60 min at 90°C or 10 min at 150°C, and then analyzed. The weight reduction rate against before heating was indicated below the bar graph. This experiment was performed using $n = 3$ samples, and the significance of differences was assessed by Student's t -test using SPSS (version 25.0). The statistical significance was analyzed between values at the same temperature.

4. MGO の損失に与える糖の影響

MGO 減少の機構解明の一助とするため、3 種の糖（スクロース、フルクトース、グルコース）を用いて 30%糖溶液を調製した。この溶液にはアミノ酸やタンパク質、植物由来のフラボノイドなどは含まれていない。調製した糖溶液に MGO を加え、加熱時の MGO 量への影響を調べた (Fig. 4)。マヌカハニーそのものは、90°Cで 1 時間の加熱により顕著に MGO が減少するのに対して (Fig. 3)、水に溶解して加熱した対照サンプルと各糖溶液で加熱を行なった場合のいずれにおいても、加熱前後で MGO 量に変化は認められなかった。

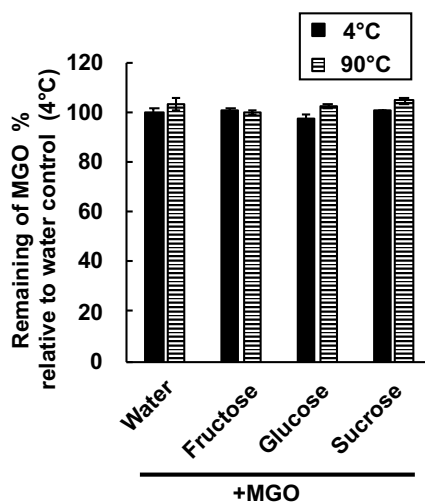


Fig. 4. Effect of sugar on MGO reduction by heating. Each sample was heated for 60 min at 4°C and 90°C, then MGO concentration was analyzed.

A-4. 考察

マヌカハニーは抗炎症効果などが期待される食品の一つであり、現在は、マヌカハニーそのものだけでなく、グミや飴などの加工品も流通している。これら実際に市場で流通しているマヌカハニー入りのど飴やグミなどの食品は、加工の際にその多くが加熱していることが推測される。また、マヌカハニーを調理の際に使用するよう勧めるレシピ等も多く見られるが、マヌカハニーを高温で処理した時の特有成分の変化については十分な知見がなく、加熱加工処理によって貴重な成分を損失している可能性もある。

本研究では、実際の調理加工を想定して、加工温度の違いが特有成分量に与える影響について検討した。測定した成分の中で、マヌカハニーに多く含まれる Leptosperin や MSYR などは熱に比較的安定であった (Figs.1B, 2C)。このことから、これらは熱による変化量の少ない基準値として、加熱加工による減少量を把握するためのマヌカハニーの添加量の指標となりうることが示唆された。一方で、MGO は、わずか 10 分間の加熱であっても 120°C 以上で顕著な減少を示した (Fig. 2B)。このことから、マヌカハニーの機能性成分の減少を抑制できる加工温度としては、120°C よりも低い温度である必要性が示唆された。べっこう飴は、砂糖を 165°C 程度の温度で水分がなくなるまで加熱して製造されていることから、地釜を用いて香ばしさや風味をつけながら高温で焼き上げる場合には、MGO が減少すると考える。現在、マヌカハニー入り食品としてのど飴が多く流通しているが、当研究室において実際に国内外で販売されているマヌカハニーを含有する飴に含まれる MGO 量を測定したところ、検出限界以下から 100 mg/kg 以上 MGO が含まれる飴までその含量は様々であった。原料のマヌカハニーのグレードや添加量にもよるが、これらの商品の加工後の MGO 量については、加工条件によって差が生じる可能性がある。飴の加工においては、100°C まで温度を上昇させずに真空釜を用いて加熱する方法が存在する。MGO の揮発量についても考慮する必要があるが、MGO の損失抑制を重要視すると、減圧条件下での短時間加熱が適していることが示唆された。また、衛生的な観点から考えると、商品としての加工には適していないが、マヌカハニーの抗菌作用等の効果を期待して家庭などにおいて調理するには、ゼリーやグミなどが MGO 量の損失が生じない温度で加工できるものと推測される。

MGO 損失の抑制方法を探索するため、加熱時の揮発および糖の共在による影響についても検討を行った。MGO の沸点は 72°C であり、揮発により損失することが予想されていたが、蓋の有無により残存量 (重量) に差が生じた一方で、MGO 量にはほとんど影響は認められなかった。このことから、MGO 量の減少要因として、加熱時の揮発による影響は低いことが予想された。しかしながら加熱により糖の分解物から生じた MGO が揮発による MGO 損失量を補填する可能性もある。さらに、先行研究では、90°C

1時間の加熱時においては、ヘッドスペースのサイズによるMGO量の変動は認められていないが⁽¹⁶⁾、本研究において加熱した条件（150°C, 10 min）とは異なるため、今後はヘッドスペース容量の影響等を調べる必要がある。

糖の影響については、通常のハチミツ中の成分は約72.5%が糖であることから^(17, 18)、ハチミツに含まれる糖が加熱時のMGOの減少に影響を及ぼすことが予想された。しかし、水とMGOとの混合液および、糖溶液とMGOの混合液のいずれも、加熱によりMGO量は減少しなかった。本実験で用いた人工的に調製した糖の濃度は30%としているため、ハチミツの加熱実験との直接的な比較はできないものの、マヌカハニーの加熱で内因性MGOが大きく減少した因子としては、ハチミツに含まれる糖以外の成分の存在が示唆された。

MGOは低分子のアルデヒド化合物の一つであり、アミノカルボニル反応によりタンパク質のリジンおよびアルギニン残基や遊離のアミノ酸などを付加修飾しうる⁽¹⁹⁾。さらに、マヌカハニーを90°Cで加熱すると、MGO-アルギニン付加体であるアルグピリミジン残基が経時的に増加することが確認されている⁽¹⁶⁾。実際に、加熱したハチミツ溶解液では、120°C以上の温度において顕著に褐変化が進行しており（Fig. 2A-2）、吸光度の測定によっても着色が確認されたが（Fig. 2A-1, 破線）、これらの着色はアミノカルボニル反応によるものと予想され、MGOの減少とも対応していた。なお、本研究ではハチミツ中の糖もアミノ酸やタンパク質のアミノ基などと付加していることが考えられるが、その反応速度はMGOと比べると緩慢であると予想される⁽²⁰⁾。以上のことから、加熱に伴うMGOの損失には、アミノカルボニル反応が関与している可能性が示唆された。今後はグミやその他の加工食品を想定し、ゼラチンや乳成分等が共存した状態での、マヌカハニー特有成分の安定性についても検討する必要があると考える。さらに、加熱加工によるMGO損失の抑制には、アミノカルボニル反応の進行を抑制することが重要であろう。実際にハチミツを限外濾過し、水溶性タンパク質を除去したものを商品加工に応用する研究例があることから^(21, 22)、マヌカハニーの加熱加工においても、タンパク質除去は有効成分減少抑制の面から効果的な可能性が示唆された。

本研究の結果より、マヌカハニーを調理に用いる際には、MGO量が揮発によって減少する可能性は低いことが予想された。一方で、MGOはアミノカルボニル反応によりアミノ基と反応するためその促進因子となる加熱温度と加熱時間については留意することが重要であり、加熱調理の最後に加えるなどの方法を取ることが有効成分の減少を防ぐことにつながると推測された。また、餡の製造など食品加工の場合は、100°C以上の高温領域での加熱は避けることが成分損失を目指す上では望ましいことが示唆された。

本研究では、熱安定性のみを焦点を当てて検討を行なった。マヌカハニーは民間薬としての歴史はあるものの、抗菌作用を除いてその機能性については十分な研究がなされていない。近年、マヌカハニーを大腸炎モデルマウスに摂取させた場合に、摂取群において大腸炎発症による体重減少および生存率が改善することや、腸内細菌叢に影響を及ぼすことも示されている⁽⁶⁾。さらに、マヌカハニー摂取により、いわゆる善玉菌群が腸内フローラにおいて増加し、健康増進に寄与する可能性が示唆されている⁽⁵⁾。このため、マヌカハニーは、種々の疾患における炎症抑制効果が期待できる食素材の一つであり、今後よりその性質や作用機序について検討することが望まれる。このため、今後は、マヌカハニー中の特有成分の性質や炎症抑制作用機序についての知見を増やすとともに、また、調理科学的な観点から、おいしさを求めつつもより効率的な特有（有効）成分の摂取方法の提案を行うことが、今後の課題と言える。加えて、第3章や第4章でも検討してきた大腸炎モデルにおいても、マヌカハニーの炎症抑制作用が示唆されているが、個々の特有成分の抗炎症作用や腸内細菌叢に与える影響については未解明である。このことから、生化学的手法や分子生物学的手法も用いながら、腸疾患の予防や治療、回復への効果が期待されるマヌカハニーの作用機序解明につなげたいと考える。

Appendix の略語

HMF	hydroxymethylfurfural
HPA	4-hydroxyphenyllactic acid
MAP	2'-methoxyacetophenone
MBA	4-methoxybenzoic acid
MGO	methylglyoxal
MSYR	methyl syringate
PFBHA	<i>o</i> -(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine hydrochloride
PLA	phenyllactic acid
NZ	New Zealand
UMF	unique manuka factor
UHPLC	ultra high performance liquid chromatography

Appendix の引用文献

- 1 高橋襄. マヌカ・ハニーの特異性. ミツバチ科学 2003; **24** 巻: 7-14.
- 2 al Somal N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. *J R Soc Med* 1994; **87**: 9-12.
- 3 Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res* 2008; **52**: 483-489.
- 4 Fang W, Zhu S, Niu Z, Yin Y. The protective effect of syringic acid on dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Dev Res* 2019; **80**: 731-740.
- 5 高野美穂. マヌカハニーのマウス腸内フローラにおよぼす影響: マヌカハニーは腸内フローラの悪玉菌をやっつけた. 化学と生物 2016; **55**: 68-71.
- 6 岩本侑也. 蜂蜜摂取による大腸炎抑制メカニズムの解明. 第 41 回日本分子生物学会要旨集 2018; 日本分子生物学会: 2P-0681.
- 7 McDonald CM, Keeling SE, Brewer MJ, Hathaway SC. Using chemical and DNA marker analysis to authenticate a high-value food, manuka honey. *NPJ Sci Food* 2018; **2**: 9.
- 8 Kato Y, Fujinaka R, Ishisaka A, Nitta Y, Kitamoto N, Takimoto Y. Plausible authentication of manuka honey and related products by measuring leptosperin with methyl syringate. *J Agric Food Chem* 2014; **62**: 6400-6407.
- 9 UMF 協会. UMF 基準値. <https://www.umforgnz/grading-system-explained/> 2020/12/28 アクセス.
- 10 Bogdanov S, Ruoff K, Oddo LP. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 2004; **35**: S4-S17.
- 11 Tosi E, Ciappini M, Re E, Lucero H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chem* 2002; **77**: 71-74.
- 12 Atrott J, Haberlau S, Henle T. Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr Res* 2012; **361**: 7-11.
- 13 Alodia G, Wonjae S, Rosemary CS. Antibacterial activity of varying UMF-graded Manuka honeys. *PloS one* 2019; **14**: e0224495.

- 14 Charyasriwong S, Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. In vitro evaluation of synergistic inhibitory effects of neuraminidase inhibitors and methylglyoxal against influenza virus infection. *Arch Med Res* 2015; **46**: 8-16.
- 15 Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza viral effects of honey in vitro: potent high activity of manuka honey. *Arch Med Res* 2014; **45**: 359-365.
- 16 Kato Y, Kishi Y, Okano Y, Kawai M, Shimizu M, Suga N, Yakemoto C, Kato M, Nagata A, Miyoshi N. 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* 2020; **337**: 127789.
- 17 Girma A, Seo W, She RC. Antibacterial activity of varying UMF-graded Manuka honeys. *PloS one* 2019; **14**: e0224495.
- 18 越後多嘉志. ハチミツの科学. 調理科学 1993; **26**: 47-53.
- 19 Sousa SM, Gomes RA, Ferreira AN, A. PF, Cordeiro C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem. J* 2013; **453**: 1-15.
- 20 Hayashi T, Namiki M. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. *Agric Biol Chem* 1986; **50**: 1965-1970.
- 21 伊藤新次, 吉岡薫, 寺川美加, 関口陽子, 小久保謙一, 渡辺敦夫. 限外濾過膜で処理したハチミツの食品への応用. 日本食品科学工学会誌 1999; **46**: 293-302.
- 22 伊藤新次, 寺川美加, 正木孝生, 山崎勝己, 小久保謙一, 渡辺敦夫. ハチミツ限外濾過プロセスの特性評価. 日本食品科学工学会誌 2000; **47**: 431-438.

業績目録

原著論文

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

参考論文

1. **菅 尚子**, 岡野 やや子, 焼本 千里, 坂本 薫, 加藤 陽二, 調理加工への応用を目指したマヌカハニー特有成分の熱安定性に関する検討. (査読中)

共著論文

1. Y Kato, K Oki, **N Suga**, S Ono, A Ishisaka, Y Miura, S Kanazawa, M Naito, N Kitamoto, AJ Kettle. A 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
2. 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
3. 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

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⁹⁾。

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オシアネートは、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

① TD 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（キノンオ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。

③ TD 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。

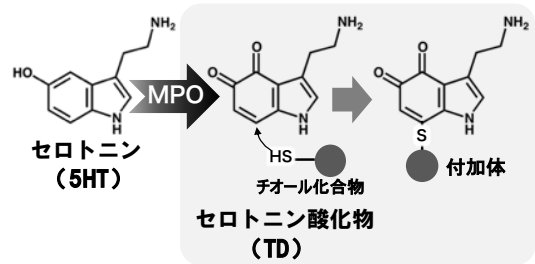


図1. セロトニン酸化物 (TD) の生成と付加反応

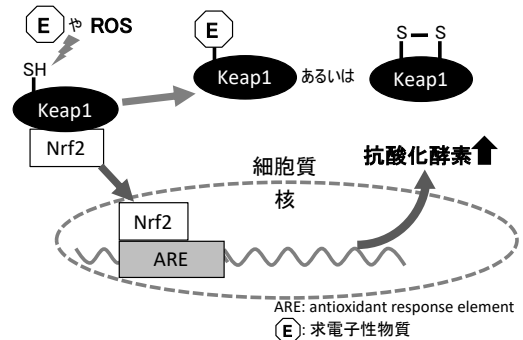


図2. 親電子性物質による Nrf2 活性化機構

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¹⁸⁾。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)

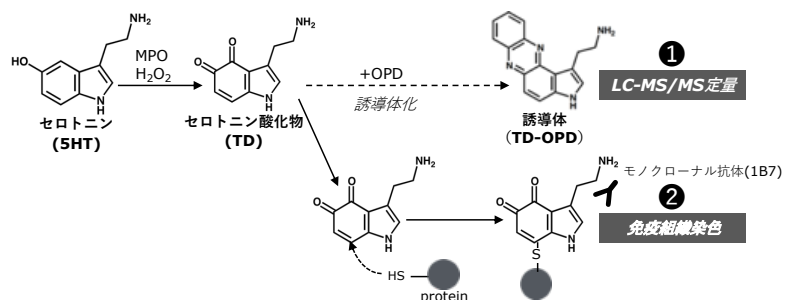


図3. TD の誘導体化およびタンパク質付加体の生成スキーム

を用いて誘導体化した。その後、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。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。

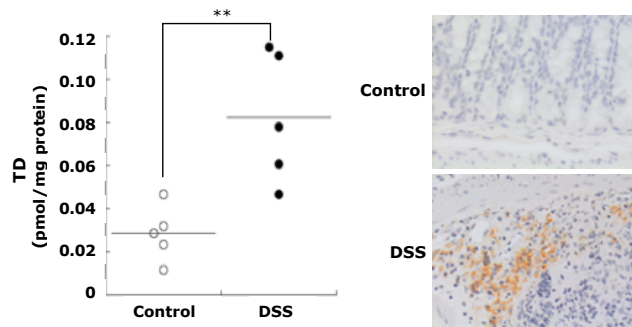


図4. マウス腸粘膜中の TD 増加 図5. 組織染色による TD 付加タンパク質の検出

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

予備検討において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) にホルボール-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とを見出した。そこで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、7 種のフラボノイドを処理したところ、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エ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。

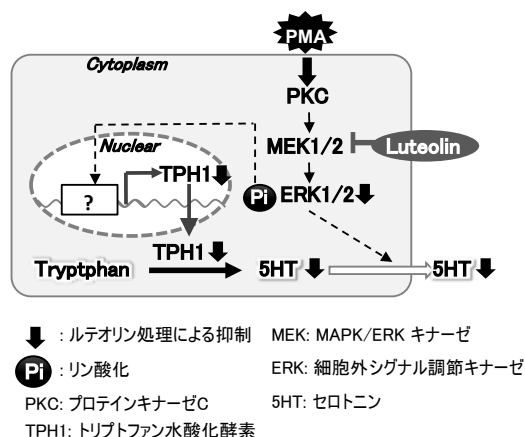


図6. PMA 刺激した RBL-2H3 細胞における Luteolin のセロトニン(5HT) 抑制機序

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質 (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、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。このように、神経細胞モデルに対する TD の生理作用の一部を明らかにすることができた。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。生体における TD の存在に関する知見を増やす必要があると考えた。

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。組織サンプルから、遊離の TD を安定的に測定する方法を構築した。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。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。炎症部位における TD による生理作用発現の機序解明が進み、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ことを期待したい。

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。そのきっかけとなったのは、研究 2 を進めていく中で、TD の供給源ともいえる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ためである。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であり、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の一端を解明した。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。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つなが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.* **25**, 2322-2332, 2012.
2. Y Kato, S Ono, N Kitamoto, AJ Kettle. Covalent modification of cytoskeletal proteins in neuronal cells by tryptamine-4,5-dione. *Redox Biol.* **2**: 983-990, 2014.
3. Y Kato, K Oki, N Suga, S Ono, A Ishisaka, Y Miura, S Kanazawa, M Naito, N Kitamoto, AJ Kettle. A 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.