



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Differential Cell-Protective Function of Two Resveratrol (Trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) Glucosides against Oxidative Stress (2種類のレスベラトロール配糖体の異なる細胞保護効果)
Author(s) 著者	細田, 隆介
Degree number 学位記番号	甲第 2753 号
Degree name 学位の種類	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2014-03-31
Original Article 原著論文	
Doc URL	
DOI	
Resource Version	

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 2753 号	氏 名	細田 隆介
<p>Differential Cell-Protective Function of Two Resveratrol (<i>Trans</i>-3,5,4'-trihydroxystilbene) Glucosides against Oxidative Stress 2種類のレスベラトロール配糖体の異なる細胞保護効果</p> <p>研究目的</p> <p>Resveratrol (<i>Trans</i>-3,5,4'-trihydroxystilbene; RSV) は、ブドウの果皮や赤ワインに含まれるポリフェノールの一種であり、実験動物レベルでは糖尿病など様々な疾患の治療に有用性を示すことが知られている。RSV は抗酸化物質として知られているが、NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 を活性化し、活性酸素を分解する manganese superoxide dismutase (SOD2) の発現を亢進させ、酸化ストレスから細胞を保護すること、そして慢性心不全や筋ジストロフィーのモデル動物に対して治療効果をもたらすことが当研究室により明らかにされている。</p> <p>自然界では生理活性物質には配糖体（糖修飾化合物）が存在する。配糖化修飾は物質の活性を変化させることや、水溶性を増加させる事が良く知られている。RSV も自然界では配糖化修飾を受け、特に RSV の第 3 位の水酸基が配糖化された <i>Trans</i>-resveratrol-3-O-β-D-glucoopyranoside (3G-RSV)として存在することが報告されている。我々は最近、<i>Phytolacca americana</i> 植物培養細胞を用いて RSV から 3G-RSV と RSV の第 4'位が配糖化された <i>Trans</i>-resveratrol-4'-O-β-D-glucoopyranoside (4'G-RSV) の合成抽出に成功した。しかし、いずれの RSV 配糖体も細胞での生理活性は検討されていない。本研究の目的は、RSV 配糖体の SIRT1 活性化能と酸化ストレス抑制効果を検討することである。</p> <p>研究方法</p> <p>[実験 1] RSV と RSV 配糖体の化学的な抗酸化活性の測定</p> <p>DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)ラジカル消去活性試験と Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)法で RSV と RSV 配糖体のラジカル消去能を測定した。</p> <p>[実験 2] 培養細胞における RSV と RSV 配糖体の Histone 脱アセチル化活性と SOD2</p>			

誘導能の評価

本実験ではマウス筋芽 (C2C12)細胞を用いた。細胞を RSV と RSV 配糖体 (100 μM)に 24 時間処置後回収した。Histone H3 の脱アセチル化活性を Western blotting (WB)法で評価した。また、RSV と RSV 配糖体 (100 μM)を C2C12 細胞に 12 時間処置し、定量 PCR 法で SOD2 の mRNA 発現量を検討した。SOD2 の誘導能は 24 時間処置細胞を用い WB 法、免疫染色法でも検討した。なお、酸化ストレス条件下での活性を確認する目的で、定量 PCR による検討では各 RSV 処置後 9 時間の時点で、WB 法と免疫染色法による検討では 18 時間の時点で、ミトコンドリア電子伝達系を阻害して活性酸素を発生させるアンチマイシン A (AA, 100 μM)を処置した。

[実験 3] RSV と RSV 配糖体の作用における SIRT1 の関与

siRNA を用いて SIRT1 をノックダウンした C2C12 細胞に RSV と 4G'-RSV (100 μM)を 12 時間処置した。Histone H3 の脱アセチル化活性を WB で評価した。また、siRNA を用いて SIRT1 をノックダウンした C2C12 細胞に[実験 2]と同一条件で RSV と RSV 配糖体を処置し、SOD2 の誘導活性がノックダウンにより遮断されるかを WB 法を用いて評価した。

[実験 4] RSV と RSV 配糖体による酸化ストレス誘導性細胞死抑制効果の検討

Serum free 条件下で C2C12 細胞を AA (50 μM)で 8 時間処置し細胞死を誘導した。RSV と RSV 配糖体 (30 μM) の 4 時間前処置による効果を評価した。細胞死の評価には Hoechst 33342 核染色による核の凝集、及び活性化カスパーゼ 3 染色を用いた。新生仔ラット心筋細胞 (Neonatal Rat Cardiomyocytes, NRVM) に AA (100 μM)を 24 時間処置により細胞死を誘導した。RSV と RSV 配糖体 (40 μM)の 12 時間前処置による効果を評価した。細胞死の評価には TUNEL 染色法を用いた。

[実験 5] RSV と RSV 配糖体による細胞増殖抑制効果

C2C12 細胞に RSV と RSV 配糖体 (30 μM)を 24 時間処置した後、Hoechst 33342 染色を用いて細胞数を評価した。

[実験 6] マスクロマトグラフィー(ESI-MS)と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による RSV と RSV 配糖体の細胞内取り込みの評価

C2C12 細胞に RSV と RSV 配糖体 (100 μM)を 12 時間処置後、細胞抽出物を得、ESI-MS と HPLC により細胞内の RSV と RSV 配糖体の有無を評価した。また、培地抽出物における RSV と RSV 配糖体の有無を HPLC により評価した。

研究成績

[実験 1]

DPPH ラジカル消去活性試験では RSV と RSV 配糖体は濃度依存的にラジカル消去活性が増強した。RSV と 3G-RSV がほぼ同等なラジカル消去活性を示したのに対し、4'G-RSV のラジカル消去活性は RSV の半分以下であった。ORAC 法を用いた評価でも DPPH ラジカル消去活性試験と同様な結果が得られた。

[実験 2]

RSV と 4'G-RSV 処置群では Histone H3 の脱アセチル化が促進されたが、3G-RSV 処置群では脱アセチル化は見られなかった。また、RSV 配糖体と RSV による SOD2 の発現量の変化は、定量 PCR 法、WB 法、免疫染色法のいずれにおいても、4'G-RSV 処置群で RSV 処置群と同等に有意な増加が見られた。しかし、いずれの評価法においても 3G-RSV 処置群では SOD2 の発現量は増加していなかった。

[実験 3]

RSV と 4'G-RSV 処置での脱アセチル化能と SOD2 誘導能は SIRT1 をノックダウンすることによって有意に減弱した。

[実験 4]

C2C12 細胞では、RSV と 4'G-RSV の前処置で AA により誘導される細胞死が有意に抑制された。しかし、3G-RSV 処置群では細胞死抑制効果が見られなかった。NRVM でも AA 誘導性の細胞死は RSV と 4'G-RSV の処置により有意に抑制されたが、3G-RSV 処置群で細胞死抑制作用は見られなかった。

[実験 5]

RSV と 4'G-RSV 処置群で有意な細胞増殖抑制作用が見られた。しかし、3G-RSV 処置群ではそのような効果は認められなかった。

[実験 6]

RSV と RSV 配糖体を処置した C2C12 細胞の細胞抽出物を ESI-MS で分析したところ、RSV 処置細胞では RSV が検出された。3G-RSV 処置細胞では RSV と 3G-RSV ともに検出されなかった。一方、4'G-RSV の処置細胞では、4'G-RSV は検出されなかったが、脱糖化された RSV が検出された。HPLC による分析でも同様な結果が得られた。

C2C12 細胞に RSV と RSV 配糖体を処置した培地抽出物の HPLC 分析では、RSV 処置で RSV のみが検出され、3G-RSV 処置では 3G-RSV のみが検出された。4'G-RSV 処置では糖鎖が外れた RSV と 4'G-RSV の両方が検出された。

考察

本研究で、3G-RSV のラジカル消去活性は RSV と比較しても同等であったが、4'G-RSV のラジカル消去活性は RSV の半分以下であった。一方、C2C12 細胞への作用の比較では4'G-RSV は RSV と同様に SIRT1 の活性化を介して Histone H3 の脱アセチル化を促進し SOD2 の発現を増加させる作用が見られたが、3G-RSV では、そのような作用が見られなかった。さらに、細胞死抑制効果と細胞増殖抑制作用においても同様の結果であった。したがって、物質自体の持つラジカル消去活性が、生体内での抗酸化活性に直接反映されるという訳ではない事が示された。

3G-RSV と 4'G-RSV の細胞への作用が異なった機序として、ESI-MS と HPLC の結果から 4'G-RSV は糖鎖が外れて非糖化 RSV として細胞内に取り込まれ生理活性を示したのに対し、3G-RSV は糖鎖がはずれず、配糖体としては細胞内に取り込まれなかったために生理活性を示さなかったことが挙げられる。糖鎖の切断は β -glucosidase によって生じている可能性がある。

NRVM においても 3G-RSV の作用が見られず、4'G-RSV の効果が認められたことから、NRVM と C2C12 細胞で共通の β -glucosidase により、4'G-RSV が選択的に脱糖化され非糖化 RSV として細胞内に取り込まれることにより細胞保護作用を示した可能性が考えられた。哺乳類の β -glucosidase には、細胞質型の β -glucosidase、小腸上皮細胞の lactase、リソソーム型の β -glucosidase (β -glucocerebrosidase)、膜結合型の β -glucosidase (GBA2) の 4 種類が存在する。このうち GBA2 は、広範囲の組織に発現し、骨格筋や心筋にも分布していることが知られている。したがって、今回の実験では、GBA2 が 4'G-RSV の糖鎖を外す役割を果たした可能性が推測された。一方、3G-RSV は培地中で脱糖化されなかった。GBA2 による脱糖化には部位選択性があるのかもしれないが、部位選択的な脱糖化に関する検討はこれまで十分行われておらず、その機序については明らかではない。

結論

4'G-RSV は物質自体の持つ化学的な抗酸化活性は弱いものの、4'G-RSV は糖鎖がはずれて RSV として細胞内に取り込まれる事により RSV と同等な細胞保護作用を示した。一方 3G-RSV は RSV と同等の抗酸化能を有するものの、細胞内には取り込まれず、細胞では RSV のような効果は見られなかった。したがって、RSV よりも水溶性が高い 4'G-RSV は、適用範囲が広がり有用なプロドラッグとして臨床応用できる可能性が考えられた。

論文審査の要旨及び担当者

平成 25 年 11 月 14 日提出

(平成 26 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 2753 号	氏名	細田 隆介
論文審査 担当者	主査 堀尾 嘉幸	副査 三浦 哲嗣	
	委員 宮本 篤	委員 小船 雅義	

論文題名	Differential Cell-Protective Function of Two Resveratrol (Trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) Glucosides against Oxidative Stress (2種類のレスベラトロール配糖体の異なる細胞保護効果)
------	--

結果の要旨

本研究はレスベラトロール(Trans-3,5,4'-trihydroxystilbene; RSV)の2種類の配糖体 Trans-resveratrol-3-O- β -D-gulucopyranoside (3G-RSV)と Trans-resveratrol-4'-O- β -D-gulucopyranoside (4' G-RSV)について物質自体の持つ抗酸化能、NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性化能、細胞保護効果、細胞増殖抑制効果を調べた。物質自体のラジカル消去能では 3G-RSV が RSV とほぼ同等で一方、4' G-RSV は RSV の半分以下の値であった。C2C12 筋芽細胞において 4' G-RSV は RSV と同等のヒストン H3 の脱アセチル化および活性酸素を分解する manganese superoxide dismutase (SOD2) の発現誘導作用を示し、この誘導能は SIRT1-siRNA を用いた検討から SIRT1 依存性であった。一方、3G-RSV はヒストン H3 と SOD2 に影響を示さなかった。ミトコンドリア電子伝達系を阻害して活性酸素を発生させるアンチマイシン A による細胞死の検討では 4' G-RSV は RSV と同様にカスパーゼ 3 活性化を抑制してアポトーシスを抑えたが、3G-RSV にはこのような作用は見られなかった。C2C12 細胞への誘導体の取込みをマスクロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーで検討したところ、4' G-RSV 処理では細胞内に RSV が検出されたが、4' G-RSV は検出されなかった。一方、細胞培地には 4' G-RSV と RSV が検出された。一方、3G-RSV では細胞内には RSV と 3G-RSV はともに検出されず、培地中では 3G-RSV のみ検出された。以上から、4' G-RSV は細胞外で RSV に変換されて細胞に取り込まれ抗酸化能を発揮したと考えられた。本研究はこれまで全く不明であった RSV の

糖誘導体の機能を初めて科学的に解明し、さらに糖鎖の修飾により細胞への取込みが抑制され、また、糖の修飾部位によって糖鎖の切断が影響されることを示した。近年、RSVは糖尿病をはじめとしていくつかの疾患の治療に応用する臨床研究がおこなわれつつあるが、その疎水性の高さが投与に制限を加える。本研究は水溶性の高いRSVのプロドラッグとして4' G-RSVの可能性を示すとともに、物質が持つ抗酸化能が直接、細胞に対する作用には結びつかないことも示した有意義な研究であると評価をいただいた。