

福岡大学薬学部 生化学教室・助教 博士（薬学） 落合 敬史	平成 11 年 福岡大学薬学部 製薬化学科 卒業 平成 13 年 福岡大学大学院薬学研究科 薬学専攻博士課程（前期） 修了 平成 13 年 福岡大学薬学部・助教
--	---

## 天然植物サフランによる抗酸化システム活性化を介した メタボリックシンドロームの予防に関する研究

### はじめに

近年、ガン・神経変性疾患・糖尿病など多くの疾患の発症要因の一つとして、フリーラジカルが重要視されるようになった。フリーラジカルは、加齢、ライフスタイルの乱れ、ストレス、喫煙など様々な要因で生体内に蓄積し、細胞膜の過酸化や DNA 損傷などを引き起こすばかりでなく、セカンドメッセンジャーとして様々なシグナル伝達を破綻させることから、生体内の代謝異常を誘導する可能性が示唆されている。また、生体内でのフリーラジカルの発生率は、加齢による抗酸化システムの低下によっても増強されることから、主要老化疾患の発症もしくは進行におけるフリーラジカルの役割を解明することは多くの疾患の総括的な予防・治療ストラテジーの構築に貢献できると考えられている。しかし、これまでにフリーラジカルに対する最適なバイオマーカーが存在しないことに加え、抗酸化システムとのバランスも重要になることから、各疾患における役割は明確にされていない。

そこで、本研究では、主要老化疾患におけるフリーラジカルの役割を解明すると同時に、天然植物の抽出成分から抗酸化システム賦活剤の探索を行い、予防・治療への応用を目指すことを目的とした。

### 高脂血症モデルマウスにおける血中フリーラジカルおよび抗酸化能の変動

メタボリックシンドロームの進展にフリーラジカルが関与していることが定説となりつつあるが、実際の病態の進行との詳しい関連性については未だ明らかにされてい

ない。本研究では、まず、高脂肪飼料を与えることで糖尿病・肥満モデルマウスを作成し、経日的な血中フリーラジカル濃度および抗酸化能の測定を行った。その結果、2ヶ月間高脂肪食を与えたマウスにおいて明らかな体重増加、血中トリグリセリド量およびコレステロールの増加が認められ、そのとき血中フリーラジカル濃度の経日的な上昇および抗酸化能の低下が確認された。また、血中でのフリーラジカルは病態の増悪関連因子群の増加よりも早い段階で上昇する傾向が認められたことから、血中フリーラジカルのモニタリングがメタボリックドミノ進展の良い指標となる可能性が示唆された。

## 細胞内シグナル伝達異常におけるフリーラジカルの役割解明

フリーラジカルは、細胞膜の脂質過酸化を引き起こすことで細胞障害を誘発だけではなく、セカンドメッセンジャーとして機能することでシグナル伝達異常を引き起こす。従来、細胞膜は均一な脂質二重膜で構成された流動モザイクモデルと呼ばれる模式図によって表されてきた。しかし最近、膜上において特徴ある脂質群が集合・分散することによって形成される「マイクロドメイン」と呼ばれる領域が存在することが明らかにされてきている。マイクロドメインには、生理活性物質の受容体やGタンパク質が存在することから、この領域が外部刺激に対しての受け皿となることで様々なタンパク質の機能や細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられている。

一方、生体における老化や外的刺激に対するストレスが、認知症・ガン・生活習慣病など多くの疾患の発症や増悪と密接に関わっていることが示唆されているが、その過程における共通の分子機構の解明に関する検討はほとんどなされていない。我々は、疾患発症・増悪の一連のプロセスにおいて、老化やストレスにより細胞膜脂質の過酸化を引き起こす活性酸素種（Reactive Oxygen Species: ROS）が生体内で過剰に発生することで、細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴミエリンの代謝が促進し、細胞内セカンドメッセンジャーとして機能するセラミドが細胞内に過剰に蓄積することが各疾患での共通の分子機構の一つである、との仮説を立て研究を遂行した。

その結果、培養神経細胞においても酸化ストレス刺激により神経細胞内での顕著なセラミド量の増加および脳虚血モデルマウスでの脳内セラミド量の増加が認められ、神経細胞死の進行とセラミドの蓄積には高い相関性がある可能性が示唆された。また、本研究の過程において、ストレス刺激におけるセラミドの過剰蓄積は、スフィンゴミエリン（SM）水解経路での中性スフィンゴミエリナーゼ（SMase）の活性化を介したものであることも併せて判明した。さらに、生体内での主要な抗酸化物質であるグル

タチオンは、中性 SMase の生理的インヒビターとしても機能していることから、酸化ストレスによる細胞内でのグルタチオンの枯渇が、ROS の過剰産生および細胞内でのセラミドの蓄積の引き金となることが考えられた。そこで、抗酸化活性を有することが知られている薬用植物サフランを用いてさらに検討を加えた。サフラン中には様々な成分が含まれているが、その中でアポカロテノイド類に属するクロシンに注目して検討を行ったところ、クロシン処理によって神経細胞内でのグルタチオン枯渇が顕著に抑制され、その分子機構の一つがグルタチオン生合成の律速酵素である $\gamma$ -グルタミルシステインシターゼ ( $\gamma$ -GCS) を転写レベルで促進することが明らかとなった。すなわち、クロシンはグルタチオン量を増加させることで ROS による細胞傷害を抑制するとともに、間接的に中性 SMase 活性化およびセラミドの蓄積を阻害する作用を有していることが示唆された。また、我々は SMase に対する特異的阻害剤 (SMA) を合成し、上記疾患に対する効果を検討したところ、神経細胞内でのセラミド蓄積が抑制され、病態が改善されることが判明した。この結果から、SM からのセラミド産生を抑制することがこれら疾患に対する予防・治療の一つに繋がる可能性が示唆された。

## 細胞内シグナル伝達経路の制御によるメタボリックシンドローム抑制

糖尿病・高血圧・高脂血症などに代表される生活習慣病の第一要因として、食生活の変化や運動不足による肥満が挙げられる。従って、肥満の予防・遅延が生活習慣病の総括的な回避に繋げることができると考えられている。そこで、肥満、すなわち脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性を引き起こすアディポサイトカインの脂肪細胞からの分泌に焦点を当てて検討を行った。脂肪細胞は、その肥大化とともにレジスチンや TNF- $\alpha$  などのアディポサイトカインと呼ばれる因子を過剰に放出し、これら因子群からの異常シグナルが細胞内へのグルコースの取り込みを阻害し、インスリン抵抗性が獲得される。そこで、前駆脂肪細胞を用いて脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、細胞の肥大化および細胞内へのトリグリセリドの蓄積が認められ、レジスチンの過剰放出によるグルコースの取り込み能の低下が惹起された。また、その過程において中性および酸性 SMase の顕著な活性化が認められた。さらに、同条件下において SMase 阻害剤を添加することで、脂肪細胞への分化、トリグリセリドの蓄積、レジスチンの放出など、肥満やインスリン抵抗性に関与する多くの事象が有意に抑制されることが判明した。また、SMase の阻害により、脂肪分化時に亢進する PPAR $\gamma$ 2 mRNA の発現が顕著に抑制されたことから、SM からのセラミドの産生は、PPAR $\gamma$ 2 発現の転写段階に関与している可能性も示唆された。従って、SMase/セラミドシグナルは、肥満を起点とする多くの生活習慣病に対する新しいターゲット分子の一つとなる可能性が示唆

された。

また、近年、難治性特定疾患に指定されている炎症性腸疾患は、QOLを著しく障害することから社会的問題となりつつある。不規則な生活習慣や過度のストレスなど様々な要因が関与しているため、根治療法の確立がなされておらず、その対応が急務とされている。病態の増悪過程においては、フリーラジカルによる腸粘膜細胞の障害が示唆されており、本研究で明らかにしたフリーラジカル/セラミドシグナルによる抑制が考えられたため、本疾患に対しても検討を加えた。その結果、免疫担当細胞であるマクロファージの活性化過程において、SMaseの活性化およびセラミドの産生が認められ、その結果、様々な炎症性サイトカインの放出上昇が確認された。また、腸上皮細胞へのストレス暴露においてもSMase活性化、セラミドの産生が認められ、疾病発症の起点となる免疫応答の異常ばかりでなく、腸への直接的なダメージの蓄積においてもセラミドが関与している可能性が明らかとなった。一方、各種細胞にSMase阻害剤であるSMAを添加することでそれぞれにおける病態の増悪因子の上昇が顕著に抑制された。さらに、炎症性腸疾患モデルマウスを作製し、同時にSMAを添加することで病態の悪化を抑制しうるか検討を加えたところ、SMAを隔日経口投与することで腸での炎症レベルが抑制され、腸切片においても肉眼的に腸粘膜細胞が正常な形態を維持していることが確認された。

以上、本研究において、生活習慣病に属する様々な疾病においてフリーラジカルが関与していること、またセラミドシグナルがシグナル伝達異常を惹起することが示された。これまでの薬物療法として、各疾患に対する一面的な治療が主だっているが、多くの疾患を「シグナル伝達病」と定義し、フリーラジカル/セラミドシグナルをターゲットとすることで様々な疾患に対する総括的な予防・治療に繋げることが可能になるであろう。

#### 【研究業績】

1. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, Shoyama Y, Toda A, Eyanagi R, Soeda S. : Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1770 (4), 578-584 (2007)
2. Soeda S, Ochiai T, Shimeno H, Saito H, Abe K, Tanaka H, Shoyama Y. : Pharmacological activities of crocin in saffron. *J Nat Med*, 61, 102-111 (2007)
3. Sakata A, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, Toda A, Eyanagi R, Soeda S. : Acid sphingomyelinase inhibition suppresses lipopolysaccharide - mediated release of inflammatory cytokines from macrophages and protects against disease pathology in dextran

sulphate sodium - induced colitis in mice. *Immunology*, in press (2007)

4. Sakata A, Yasuda K, Ochiai T, Shimeno H, Hikishima S, Yokomatsu T, Shibuya S, Soeda S. : Inhibition of lipopolysaccharide-induced release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells by SMA, a novel inhibitor of sphingomyelinase and its therapeutic effect on dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Cellular Immunology*, in press (2007)