

有効活用を目的とした  
ワサビの葉と根茎に含まれる成分の機能性に関する研究

Study of the functional effects of wasabi  
toward the efficient utilization of its leaf and rhizome components

2018年 7月

加藤 朋恵

# 目次

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 略語一覧                        | 7  |
| 試薬一覧                        | 11 |
| 使用機器                        | 14 |
| 序論                          | 15 |
| 第1章 ワサビ抽出物による抗肥満効果          |    |
| 第1項 ラットを用いた予備試験（根茎抽出物、葉抽出物） |    |
| 1-1-1 背景と目的                 | 22 |
| 1-1-2 方法                    | 23 |
| 1-1-2-1 試料                  | 23 |
| 1-1-2-2 動物試験                | 23 |
| 1-1-2-3 血清成分評価              | 25 |
| 1-1-2-4 統計解析                | 25 |
| 1-1-3 結果                    | 25 |
| 1-1-3-1 摂取量、体重、組織重量評価       | 25 |
| 1-1-3-2 血清成分評価              | 25 |
| 1-1-4 考察                    | 28 |
| 第2項 ラットを用いた本試験（葉抽出物）        |    |
| 1-2-1 背景と目的                 | 29 |
| 1-2-2 方法                    | 30 |
| 1-2-2-1 試料                  | 30 |
| 1-2-2-2 動物試験                | 30 |
| 1-2-2-3 血清成分評価              | 32 |
| 1-2-2-4 組織学的評価              | 32 |
| 1-2-2-5 糞乾燥重量と糞中脂質濃度評価      | 32 |
| 1-2-2-6 mRNA 発現量評価          | 32 |
| 1-2-2-7 統計解析                | 32 |
| 1-2-3 結果                    | 32 |
| 1-2-3-1 摂取量、体重、組織重量評価       | 32 |
| 1-2-3-2 組織学的評価              | 33 |

|          |                                  |    |
|----------|----------------------------------|----|
| 1-2-3-3  | 血清成分評価                           | 33 |
| 1-2-3-4  | mRNA 発現量評価                       | 33 |
| 1-2-3-5  | 糞乾燥重量と糞中脂質濃度評価                   | 33 |
| 1-2-4    | 考察                               | 39 |
|          |                                  |    |
| 第3項      | 3T3-L1 細胞を用いた脂肪分化阻害成分の探索         |    |
| 1-3-1    | 背景と目的                            | 42 |
| 1-3-2    | 方法                               | 43 |
| 1-3-2-1  | 試料                               | 43 |
| 1-3-2-2  | NMR 法                            | 43 |
| 1-3-2-3  | 細胞培養と脂肪分化                        | 43 |
| 1-3-2-4  | 細胞毒性評価                           | 43 |
| 1-3-2-5  | 脂肪蓄積量評価                          | 44 |
| 1-3-2-6  | mRNA 発現量評価                       | 44 |
| 1-3-2-7  | ウエスタンブロット分析                      | 45 |
| 1-3-2-8  | LC-MS 定量評価                       | 45 |
| 1-3-2-9  | 5-HFA ester (1) と類縁体の合成          | 46 |
| 1-3-2-10 | 統計解析                             | 47 |
| 1-3-3    | 結果                               | 48 |
| 1-3-3-1  | 構造決定                             | 48 |
| 1-3-3-2  | 5-HFA ester (1) の細胞毒性と脂肪細胞分化阻害評価 | 50 |
| 1-3-3-3  | LC-MS 定量評価                       | 51 |
| 1-3-3-4  | mRNA 発現量評価                       | 51 |
| 1-3-3-5  | ウエスタンブロット分析                      | 51 |
| 1-3-3-6  | フェニルプロパノイド類の脂肪細胞分化阻害評価           | 51 |
| 1-3-4    | 考察                               | 58 |
|          |                                  |    |
| 第4項      | 褐色脂肪細胞を用いた脂肪蓄積抑制成分の探索            |    |
| 1-4-1    | 背景と目的                            | 61 |
| 1-4-2    | 方法                               | 61 |
| 1-4-2-1  | 試料                               | 61 |
| 1-4-2-2  | HPLC 定性評価                        | 61 |
| 1-4-2-3  | 細胞毒性評価                           | 62 |
| 1-4-2-4  | mRNA 発現量評価                       | 62 |
| 1-4-2-5  | 脂肪蓄積量評価                          | 63 |

|   |                                   |    |
|---|-----------------------------------|----|
| 1-4-2-6   | 統計解析                              | 63 |
| 1-4-3   | 結果                                | 63 |
| 1-4-3-1   | HPLC 定性評価                         | 63 |
| 1-4-3-2   | 細胞毒性評価                            | 64 |
| 1-4-3-3   | mRNA 発現量評価                        | 64 |
| 1-4-3-4   | 脂肪蓄積量評価                           | 64 |
| 1-4-4   | 考察                                | 70 |
| 第2章 ワサビ根茎成分 6-MSITC による抗酸化効果                          |                                   |    |
| 第1項 分化 HL-60 細胞からの O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 産生阻害効果 |                                   |    |
| 2-1-1   | 背景と目的                             | 73 |
| 2-1-2   | 方法                                | 75 |
| 2-1-2-1   | 試料                                | 75 |
| 2-1-2-2   | 細胞培養                              | 75 |
| 2-1-2-3   | 分化                                | 76 |
| 2-1-2-4   | 細胞毒性評価                            | 76 |
| 2-1-2-5   | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 産生量評価 | 76 |
| 2-1-2-6   | NADH 消費量評価                        | 76 |
| 2-1-2-7   | SOD 様活性評価                         | 77 |
| 2-1-2-8   | 統計解析                              | 77 |
| 2-1-3   | 結果                                | 77 |
| 2-1-3-1   | 細胞毒性評価                            | 77 |
| 2-1-3-2   | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 産生量評価 | 78 |
| 2-1-3-3   | NADH 消費量評価                        | 78 |
| 2-1-3-4   | SOD 様活性評価                         | 83 |
| 2-1-4   | 考察                                |    |
| 第2項 HepG2 細胞での Nrf2/Keap1 系を介した NQO1 産生促進効果           |                                   |    |
| 2-2-1   | 背景と目的                             | 86 |
| 2-2-2   | 方法                                | 88 |
| 2-2-2-1   | 試料                                | 88 |
| 2-2-2-2   | 細胞培養                              | 88 |
| 2-2-2-3   | NQO1、Nrf2、Keap1 の産生量評価            | 88 |
| 2-2-2-4   | Nrf2 半減期評価                        | 88 |
| 2-2-2-5   | 細胞溶解液中のタンパク質のユビキチン化阻害評価           | 88 |

|                             |                            |     |
|-----------------------------|----------------------------|-----|
| 2-2-2-6                     | Nrf2 のユビキチン化阻害評価           | 89  |
| 2-2-2-7                     | Keap1 修飾体形成に関する評価          | 89  |
| 2-2-2-8                     | Nrf2 核局在化評価① (ウエスタンブロット分析) | 89  |
| 2-2-2-9                     | Nrf2 核局在化評価② (免疫細胞化学染色)    | 90  |
| 2-2-2-10                    | EMSA                       | 90  |
| 2-2-2-11                    | レポーター遺伝子アッセイとトランスフェクション    | 91  |
| 2-2-2-12                    | siRNA のトランスフェクション          | 92  |
| 2-2-2-13                    | 統計解析                       | 92  |
| 2-2-3                       | 結果                         | 93  |
| 2-2-3-1                     | NQO1、Nrf2、Keap1 の産生量評価     | 93  |
| 2-2-3-2                     | Nrf2 半減期評価                 | 93  |
| 2-2-3-3                     | Nrf2 のユビキチン化阻害評価           | 93  |
| 2-2-3-4                     | Keap1 修飾体形成に関する評価          | 94  |
| 2-2-3-5                     | Nrf2 核局在化評価① (ウエスタンブロット分析) | 94  |
| 2-2-3-6                     | Nrf2 核局在化評価② (免疫細胞化学染色)    | 94  |
| 2-2-3-7                     | EMSA                       | 94  |
| 2-2-3-8                     | レポーター遺伝子アッセイとトランスフェクション    | 94  |
| 2-2-3-9                     | siRNA のトランスフェクション          | 95  |
| 2-2-4                       | 考察                         | 107 |
|                             |                            |     |
| 第3章 ワサビ根茎成分 6-MSITC による育毛効果 |                            |     |
| 3-1                         | 背景と目的                      | 110 |
| 3-2                         | 方法                         | 111 |
| 3-2-1                       | 試料                         | 111 |
| 3-2-2                       | 細胞培養                       | 111 |
| 3-2-3                       | 細胞毒性評価                     | 111 |
| 3-2-4                       | 細胞賦活活性評価                   | 112 |
| 3-2-5                       | mRNA 発現量評価                 | 112 |
| 3-2-6                       | 統計解析                       | 113 |
| 3-3                         | 結果                         | 113 |
| 3-3-1                       | 細胞毒性評価                     | 113 |
| 3-3-2                       | 細胞賦活活性評価                   | 113 |
| 3-3-3                       | mRNA 発現量評価                 | 113 |
| 3-4                         | 考察                         | 118 |

|      |     |
|------|-----|
| 総括   | 120 |
| 参考文献 | 122 |
| 謝辞   | 140 |

## 略語一覽

|            |   |
|------------|---|
| ACC        | : acetyl-CoA carboxylase                    |
| ADORA1     | : adenosine A1 receptor                     |
| ADORA2     | : adenosine A2 receptor                     |
| ADORA2b    | : adenosine A2b receptor                    |
| Adrb3      | : $\beta$ 3-adrenergic receptor             |
| AITC       | : allyl isothiocyanate                      |
| ALT        | : alanine aminotransferase                  |
| ARE        | : <i>cis</i> -antioxidant response element  |
| AST        | : aspartate aminotransferase                |
| ATF        | : activating transcription factor           |
| BAT        | : brown adipose tissue                      |
| BITC       | : benzyl isothiocyanate                     |
| BITC-OMe   | : <i>O</i> -methybenzyl thiocarbamate       |
| BSA        | : bovine serum albumin                      |
| BTB        | : broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac |
| C/EBP      | : CCAAT/enhancer binding protein            |
| CfA ester  | : caffeic acid methyl ester                 |
| CHX        | : cycloheximide                             |
| CNC        | : Cap 'n' Collar                            |
| CREB       | : cAMP response element binding protein     |
| Cul3       | : Cullin3                                   |
| DAPI       | : 4',6-diamidino-2-phenylindole             |
| DEX        | : dexamethasone                             |
| DHT        | : dihydrotestosterone                       |
| DMCA ester | : dimethoxycinnamic acid methyl ester       |
| DMEM       | : Dulbecco's modified eagle's medium        |
| DMSO       | : dimethyl sulfoxide                        |
| DPCs       | : dermal papilla cells                      |
| DTT        | : dithiothreitol                            |
| ECL        | : enhanced chemiluminescence                |
| EDTA       | : ethylenediaminetetraacetic acid           |
| EGCg       | : epigallocatechin-3-gallate                |
| EMSA       | : electrophoretic mobility shift assay      |

|                  |  |
|------------------|--|
| FAS              | : fatty acid synthase  |
| FBS              | : fetal bovine serum   |
| FFA              | : free fatty acid  |
| GAPDH            | : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                               |
| GC               | : gas chromatography   |
| GLUT4            | : glucose transporter type 4   |
| HE               | : hematoxylin and eosin  |
| 5-HFA            | : 5-hydroxyferulic acid  |
| 5-HFA ester      | : 5-hydroxyferulic acid methyl ester                                     |
| HPLC             | : high performance liquid chromatography                                 |
| HRP              | : horseradish peroxidase   |
| HSL              | : hormone-sensitive lipase   |
| HSP90 $\beta$    | : heat shock protein 90 $\beta$  |
| IBMX             | : 3-isobutyl-1-methylxanthine  |
| IC <sub>50</sub> | : half maximal inhibitory concentration                                  |
| IFA ester        | : isoferulic acid methyl ester   |
| ITC              | : isothiocyanate   |
| Keap1            | : Kelchlike ECH-associating protein 1                                    |
| LC-MS            | : liquid chromatography-mass spectrometry                                |
| LC-MS/MS         | : liquid chromatography-tandem mass spectrometer                         |
| LPL              | : lipoprotein lipase   |
| MITC             | : methyl isothiocyanate  |
| MG132            | : carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal                              |
| 4-MSITC          | : 4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate                                   |
| 6-MSITC          | : 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate                                   |
| 6-MTITC          | : 6-methylthiolhexyl isothiocyanate                                      |
| NA               | : noradrenaline  |
| NAC              | : <i>N</i> -acetyl-L-cysteine  |
| NADH             | : nicotinamide adenine dinucleotide                                      |
| NADPH            | : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate                            |
| NBT              | : nitroblue tetrazolium  |
| NMR              | : nuclear magnetic resonance   |
| NQO1             | : NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1                                       |
| Nrf2             | : nuclear factor E2-related factor 2                                     |
| Nrf2/Keap1       | : nuclear factor E2-related factor 2/Kelchlike ECH-associating protein 1 |



|                  |   |
|------------------|---|
| Opi-MEM          | : Opi-Minimum essential medium eagle                        |
| PBS              | : phosphate-buffered saline                                 |
| PCR              | : polymerase chain reaction                                 |
| PEITC            | : phenethyl isothiocyanate                                  |
| PKA              | : protein kinase A  |
| PKC              | : protein kinase C  |
| PL               | : phospholipid  |
| PMA              | : phorbol 12-myristate 13-acetate                           |
| PPAR             | : peroxisome proliferator-activated receptor                |
| PVDF             | : polyvinylidene difluoride                                 |
| qNMR             | : quantitative nuclear magnetic resonance                   |
| QOL              | : quality of life   |
| RIPA             | : radio-immunoprecipitation assay                           |
| RLU              | : relative light units                                      |
| ROS              | : reactive oxygen species                                   |
| RPMI-1640        | : Roswell park memorial institute medium 1640               |
| SA ester         | : sinapic acid methyl ester                                 |
| SDS-PAGE         | : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| siRNA            | : small interfering RNA                                     |
| SOD              | : superoxide dismutase                                      |
| SREBP-1c         | : sterol regulatory element binding protein-1c              |
| SUL2B            | : sulfonyleurea receptor 2B                                 |
| <i>t</i> BHQ     | : <i>tertiary</i> -butylhydroquinon                         |
| $t_{1/2}$        | : half-life   |
| TC               | : total cholesterol   |
| TG               | : triglyceride  |
| 3,4,5-THCA       | : 3,4,5-trihydroxycinnamic acid                             |
| 3,4,5-THCA ester | : 3,4,5-trihydroxycinnamic acid methyl ester                |
| TLC              | : thin-layer chromatography                                 |
| 3,4,5-TMCA ester | : 3,4,5-trimethoxy cinnamic acid methyl ester               |
| TMSD             | : trimethylsilyldiazomethane                                |
| TRPA1            | : transient receptor potential ankyrin 1                    |
| UCP1             | : uncoupling protein 1                                      |
| VEGF             | : vascular endothelial growth factor                        |
| VEGFR2           | : vascular endothelial growth factor receptor 2             |

WAT : white adipose tissue  
WLE : wasabi leaf extract  
WRE : wasabi rhizome extract  
WST-8 : 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfonyl)-  
2*H*-tetrazolium

## 試薬一覧

|  |   |
|--|---|
| AIN-76   | : オリエンタル酵母工業(株)                         |
| apigenin   | : 和光純薬工業(株)                             |
| L(+)-ascorbic acid                               | : キシダ化学(株)                              |
| [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP (5000 Ci/mmol) | : Amersham Biosciences                  |
| BITC   | : シグマアルドリッチジャパン(同)                      |
| boron tribromide                                 | : 和光純薬工業(株)                             |
| caffeic acid                                     | : シグマアルドリッチジャパン(同)                      |
| CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR           | : タカラバイオ(株)                             |
| Cell Counting Kit-8                              | : (株)同仁化学研究所                            |
| Cell Count Reagent SF                            | : ナカライテスク(株)                            |
| Cholesterol E-test Wako                          | : 和光純薬工業(株)                             |
| Creatinine test Wako                             | : 和光純薬工業(株)                             |
| DMEM   | : 和光純薬工業(株)                             |
| Dula-Luciferase Reporter Assay System            | : Promega Corporation                   |
| FastLane Cell cDNA kit                           | : (株)キアゲン                               |
| FBS  | : (株)ニチレイバイオサイエンス<br>Equitech Bio, Inc. |
| ferulic acid                                     | : シグマアルドリッチジャパン(同)                      |
| 3D-Gene human oligo chip 25k                     | : 東レ(株)                                 |
| Hair follicle DPC growth medium<br>(TMTPGM-250)  | : 東洋紡(株)                                |
| HepG2 ヒト肝がん由来細胞                                  | : 東北大学加齢医学研究所医用細胞<br>資源センター・細胞バンク       |
| hexane   | : 東京化成工業(株)                             |
| HL-60 ヒト骨髓性白血病細胞<br>(RCB3683)                    | : 理化学研究所バイオリソース<br>センター                 |
| HRP 標識抗ウサギ二次抗体                                   | : Cell Signaling Technology, Inc.       |
| HRP標識抗マウス二次抗体                                    | : Cell Signaling Technology, Inc.       |
| HRP 標識抗ヤギ二次抗体                                    | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.        |
| isoorientin                                      | : Toronto Research Chemicals            |
| isovitexin                                       | : EXTRASYNTEHSE SAS                     |
| LipofectAMINE 2000                               | : Invitrogen                            |
| lucigenin  | : シグマアルドリッチジャパン(同)                      |

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| luteolin   | : 関東化学(株)                       |
| MG132  | : Calbiochem                    |
| minoxidil  | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |
| 6-MTITC  | : 小川香料(株)                       |
| NA   | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |
| $\beta$ -NADH-2Na                                | : 和光純薬工業(株)                     |
| NEFA C-test Wako                                 | : 和光純薬工業(株)                     |
| pGL4-TK-エンコーディングウミシイタ<br>ケルシフェラーゼプラスミド           | : Promega                       |
| Phospholipid C-test Wako                         | : 和光純薬工業(株)                     |
| PMA  | : 和光純薬工業(株)                     |
| PrimeScript RT reagent Kit                       | : タカラバイオ(株)                     |
| Prolong Gold antifade reagent with DAPI          | : Invitrogen                    |
| Protein assay kit                                | : Bio-Rad Laboratories          |
| QIAzol   | : (株)キアゲン                       |
| retinoic acid                                    | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |
| RIPA バッファー                                       | : ナカライテスク(株)                    |
| RNeasy Mini Kit                                  | : (株)キアゲン                       |
| RPMI-1640  | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |
| sinapinic acid                                   | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |
| SOD Assay Kit-WST                                | : (株)同仁化学研究所                    |
| super-dehydrated CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | : 和光純薬工業(株)                     |
| SuperScriptIII                                   | : Invitrogen                    |
| SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit              | : Thermo Fisher Scientific      |
| SYBR Premix DimerEraser                          | : タカラバイオ(株)                     |
| SYBR <i>Premix Ex Taq</i> (Tli RNaseH Plus)      | : タカラバイオ(株)                     |
| TaqMan Gene Expression Assays                    | : Applied Biosystems Japan Ltd. |
| TaqMan Universal PCR Master Mix                  | : Applied Biosystems Japan Ltd. |
| TMSD   | : 東京化成工業(株)                     |
| Transaminase CII-test Wako                       | : 和光純薬工業(株)                     |
| Triglycerides E-test Wako                        | : 和光純薬工業(株)                     |
| TRI Reagent                                      | : Molecular Research Center     |
| T4 ポリヌクレオチドキナーゼ                                  | : タカラバイオ(株)                     |
| Wistar ラット                                       | : 日本クレア(株)                      |
| オイルレッド O   | : シグマアルドリッチジャパン(同)              |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 3 MM クロマトグラフィーペーパー                    | : Whatman                                    |
| 抗 Keap1 抗体                            | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗 Nrf2 抗体                             | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗 PPAR $\gamma$ 抗体                    | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗 $\beta$ -アクチン抗体                     | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗 $\alpha$ -チューブリン抗体                  | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗ユビキチン抗体                              | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 抗ラミン B 抗体                             | : Santa Cruz Biotechnology, Inc.             |
| 脂肪細胞維持培地 (BATMM)                      | : コスモ・バイオ(株)                                 |
| 初代褐色脂肪細胞 (BAT02)                      | : コスモ・バイオ(株)                                 |
| スクランブル siRNA                          | : Ambion                                     |
| セファデックス G-25 スピнкаラム<br>増殖用培地 (BATGM) | : Amersham Biosciences Corp<br>: コスモ・バイオ(株)  |
| ヒト毛乳頭細胞 (CA60205a)                    | : Cell Applications, Inc.                    |
| フッ化フェニルメチルスルホニル<br>プロテアーゼ阻害剤カクテル      | : ナカライテスク(株)<br>: ナカライテスク(株)                 |
| プロテイン A-セファロースビーズ<br>分化誘導用培地 (BATDM)  | : Amersham Pharmacia Biotech<br>: コスモ・バイオ(株) |
| リピッドアッセイキット                           | : コスモ・バイオ(株)                                 |

## 使用機器

|               |   |
|---------------|---|
| HPLC          | : Nexera-i LC-2040C 3D (株島津製作所)   |
| LC-MS         | : Accela LC system<br>(Thermo Fisher Scientific, Inc.)  |
|               | : Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Inc.)   |
| NMR           | : Bruker AVANCE III 400 spectrometer<br>(Bruker BioSpin International AG)   |
| 発光検出器         | : Berthold Technologies GmbH & Co.  |
| フルオロイメーリアライザー | : FLA-2000 machine (富士フイルム株)  |
| マイクロプレートリーダー  | : Precision microplate reader<br>(Molecular Devices Corporation)  |
| リアルタイム PCR    | : ABI Prism 7000 Sequence Detection System<br>(Applied Biosystems Japan Ltd.)<br>Thermal Cycler Dice Real Time System II<br>(タカラバイオ株) |
| レーザー走査共焦点顕微鏡  | : Laser scanning confocal microscopy<br>(株キーエンス)  |

## 序論

日本は、世界で最も高齢化が進んでいる国で、平均寿命も他国に比べて長い。それに伴い、健康寿命を平均寿命に近づけようとする機運が高まっている。健康寿命を延ばすには、食事のバランスや適度な運動等の生活習慣を整える必要がある。食品の摂取は、健康な体づくりのために欠かせない。食品には三つの基本的な機能があり、その一つが栄養機能（一次機能）、次が感覚・嗜好機能（二次機能）、三つ目が健康の維持や向上に關与する生体調節機能（三次機能）である。現在までに三次機能に関する研究が精力的に行われ、平成 27 年には機能性表示食品制度も開始され、生体調節機能を有する商品が次々に開発されている。食事のバランスを整えることは言及するまでもないが、外食の多い現代人にとって完璧な食生活は不可能である。食生活で生じた不足分を補うため、生体調節機能を有する食品の摂取が提案されている [1]。

ワサビ [*Wasabia japonica* (Miq.) Matsum. syn. *Eutrema japonicum* (Sieb.) Maxim.] は日本原産の植物である [2]。ワサビは、ブロッコリー、キャベツ、ハクサイ、ダイコン等と同じくアブラナ科に属する野菜であり、その特有の刺激的な辛味から、主に薬味として用いられている。ワサビは主に葉、葉柄（茎）、根茎、根から構成される（Fig. 1）。葉は鋸歯状の葉縁を有する心形である。茎は長く、根茎は太く円柱形をしており葉跡がある。3-5 月が日本での花期であり、総状花序に白色の十字状の花弁をつける（Fig. 2）。



Fig. 1. Wasabi (after it harvest).



Fig. 2. Flowers of wasabi.

ワサビは北海道から九州、屋久島に至る各地の山間溪流に自生している [3]。栽培方法の違いから、ワサビ田で栽培されているものを沢ワサビ (Fig. 3)、溪流沿いの傾斜地、桑園地、湿気が多い山間畑地等で栽培されているものを畑ワサビ (Fig. 4) と区別しているが、植物学上はまったく同じものである。これらのワサビの主要産地は静岡県、長野県、岩手県等であり、全国では根茎で約 600 トン、茎で約 1,600 トン生産されている [4]。



Fig. 3. Water cultivation of wasabi.



Fig. 4. Soil cultivation of wasabi.

一般的に薬味として用いられている部位は根茎である。鮫皮おろしやおろし金ですりおろされた根茎は、その特有の刺激的な辛味から刺身や寿司、蕎麦に添えて食されており、日本人の食文化に欠かせない伝統食材である。一方、ワサビは薬草として用いられていたことも明らかとなっている。奈良県明日香村



の苑池遺構では、薬草名や処方を記したと思われる木簡が数種類出土しており、その中には、「委佐俾三升（わさびさんしょう）」（Fig. 5）と記したのも含まれていた [5]。その後、平安時代の「本草和名」[6] [6] や江戸時代の「本朝食鑑」[7]、「大和本草」[8] 等の本草書（薬草の解説書）にもワサビの記載がある。現代の薬用植物の事典には、ワサビ根茎による食欲増進効果やリウマチ、神経痛、扁桃炎に対する鎮痛効果等が記されており [9]、一方で刻んだワサビ葉を袋に詰めて浴槽にいれると保湿性浴料になるとの記載がある [10]。以上の知見から、ワサビによる機能性効果が期待される。将来、ワサビの消費量を維持または増加させるためには、さらなる付加価値をつける必要があり、その一案として機能性原料としての用途開発が考えられる。



Fig. 5. 木簡 [5].

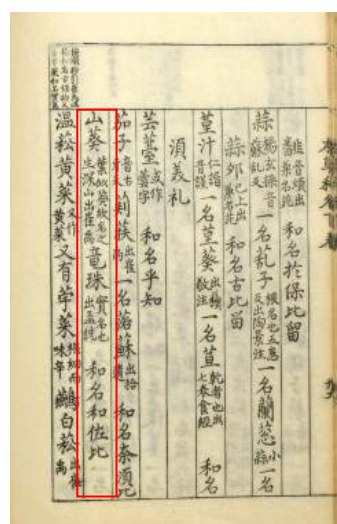


Fig. 6. 本草和名 [6].

前述の通り、ワサビには特有の辛味や香りがある。その正体は、 $-N=C=S$  の構造を有するイソチオシアネート (isothiocyanate; ITC) 類である [11, 12]。これらの ITC 類は配糖体の形で組織に存在しており、ワサビをすりおろすことでその組織が物理的に破壊されると、内在するミロシナーゼとの加水分解反応が起こり、ITC 類が生成する (Fig. 7)。ワサビには様々の側鎖の ITC 類が含有されており、21 種類存在することが報告されている [13, 14]。アリルイソチオシアネート (allyl isothiocyanate; AITC) (Fig. 8) は、3 個の炭素鎖の末端に不飽和結合を有しており、ワサビの辛味の主成分である。AITC は抗菌効果 [15] に関する報告が多いが、抗炎症効果 [16] や抗アレルギー [17] 等の機能性効果も報告されている。しかし、その刺激的な辛味のため、日常的に摂取するのは困難である。一方、6 個の炭素鎖の末端にスルフィド基を有する 6-メチルスルフィニルヘキシル

イソチオシアネート (6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate; 6-MSITC) (Fig. 8) は主に根茎に含まれる ITC 類であり、ワサビ特有の辛味や香りにほとんど寄与しておらず、比較的芳香性が弱いことが報告されているため [13]、ITC 類の中では安定性が高いことが考えられる。ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography; GC) の分析データによると、ワサビ根茎に含まれる ITC 類の相対含有量は、内部標準であるカプリン酸エステルと各ピークとの面積比で、AITC が 370、6-MSITC が 26、4-ペンテニルイソチオシアネートが 13 と続くため、6-MSITC は AITC に次いで含有量が高いことが伺える [13]。

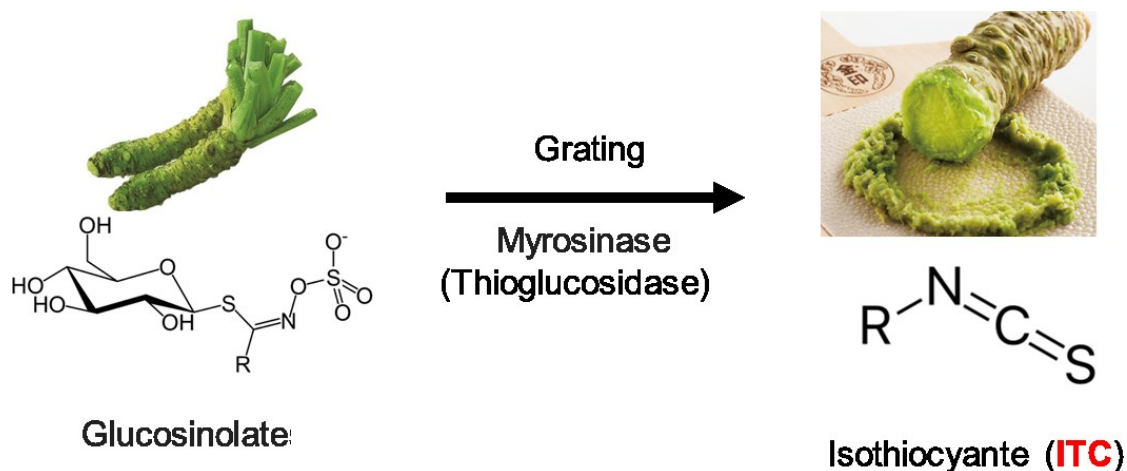


Fig. 7. Enzyme reaction of wasabi.

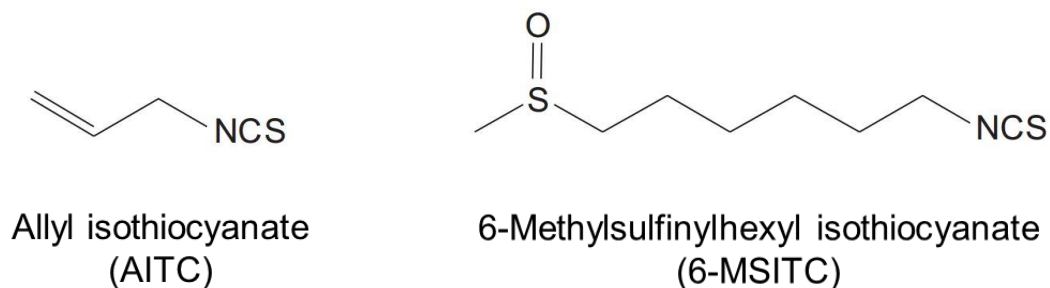


Fig. 8. Chemical structures of AITC and 6-MSITC.

細胞や動物等を用いた試験により、6-MSITC は今まで様々な機能が報告されてきた。例えば、抗血栓 [18]、抗がん [18, 19]、解毒 [18, 20]、抗炎症 [21]、抗糖尿病 [22, 23]、抗アレルギー [17, 24] 等の効果である。Morimitsu ら [25] は、6-MSITC を経口投与させた Wistar ラットにおいて、6-MSITC が吸収されて循環器系に入ったことを報告している。6-MSITC のヒトでの吸収性は報告されていない。しかし、6-MSITC の類縁体である 4-メチルスルフィニルブチルイソチオシアネート (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate; 4-MSITC = スルフォラファン) (Fig. 9) は、ヒト体内に吸収されることが報告されているため [26]、6-MSITC もヒトにおいて吸収されうると考えられる。

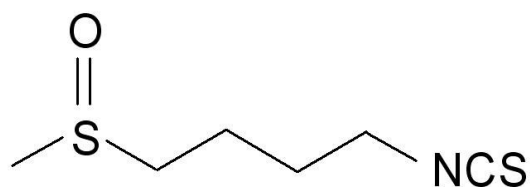


Fig. 9. Chemical structure of 4-MSITC.

一方、ワサビ葉もその機能性効果が報告されている。例えば、抗菌 [27]、抗酸化 [28–30]、抗がん [31]、抗炎症 [32]、抗インフルエンザウイルス [33]、コラーゲン産生促進効果 [34] 等である。成分同定に関する研究も進んでおり、フラボノイド類 [35]、フェニルプロパノイド類 [28]、テルペノイド類 [32]、および、カロテノイド類 [32] の存在が示されている。ワサビ葉は一部が醤油漬けや天ぷら等として使用されているものの、そのほとんどが廃棄されている。そのため、その有効活用は未利用資源の産業化の観点からも重要である。

本研究では、ワサビの有効活用を目的としたワサビの機能性研究を実施した。肥満はエネルギー摂取が消費を上回ることで生じ、高血圧 [36]、脂質異常症 [37]、II 型糖尿病 [38] 等の生活習慣病のリスクファクターである。ワサビに抗肥満効果が確認されれば、生活習慣病の発症リスクを減らせることが期待される。そこで、本研究ではワサビにおけるこれらの効果を検証することとした。一方で、生体内で活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) が過剰に発生すると、タンパク質や脂質、DNA 等の生体分子は酸化障害を受ける。この酸化障害は生体の機能低下を促し、アルツハイマー病、動脈硬化、がん等の疾病の原因となる [39]。そのため、ワサビに抗酸化効果が確認されれば、ワサビ摂取による疾病予防が期待される。さらに本研究では、ワサビの育毛効果も評価した。加齢等による

頭髪の退行は外観が大きく変わるため、心理的・社会的に強い影響を及ぼし、男女を問わず多くの人が悩んでいる。そのため、何らかの機能性食品の摂取で、毛の退行を遅らせることができれば、**quality of life (QOL)** の改善となり、快適な生活が得られることが期待される。この点においても、ワサビの効果を検証した。

第 1 章ではワサビの抗肥満効果を、培養細胞と実験動物を用いて検討した。第 1 項では、根茎抽出物または葉抽出物を含む高脂肪食を **Wistar** ラットに摂取させ、抗肥満効果を検討した。第 2 項では、第 1 項で効果のあった葉抽出物を用いて詳細な検討を実施した。第 3 項と第 4 項では、ワサビ葉に含まれる有効成分を探索した。前駆脂肪細胞からの脂肪細胞への分化が肥満を誘導するため、分化阻害化合物が抗肥満成分となる可能性がある。そこで、マウス **3T3-L1** 前駆脂肪細胞の分化を阻害する成分を探索した。一方、有効成分が褐色脂肪組織 (**brown adipose tissue; BAT**) に作用する可能性もある。そこで、ラット初代褐色脂肪細胞を用いて、脂肪蓄積量を検証した。

第 2 章では、ワサビの根茎成分 **6-MSITC** の抗酸化効果を、培養細胞を用いて検証した。**ROS** による障害を防ぐためには、**ROS** 産生そのものを阻害するか、生体内の抗酸化性を高める必要がある。生体において好中球は **ROS** の主な産生源である。**HL-60** ヒト骨髄性白血病細胞は好中球に分化するが [40]、第 1 項では、ホルボール **12-ミリステート 13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA)** で刺激した分化 **HL-60** 細胞から産生されるスーパーオキシドアニオン (**superoxide anion; O<sub>2</sub><sup>-</sup>**) の阻害効果を検証した。一方、**nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)** は酸化ストレス刺激を受けると、抗酸化剤応答配列 (**cis-antioxidant response element; ARE**) を誘導しての抗酸化酵素群を発現する。そこで第 2 項では、肝臓の代謝モデルである **HepG2** ヒト肝がん由来細胞を用いて、**nuclear factor E2-related factor 2/Kelchlike ECH-associating protein 1 (Nrf2/Keap1)** 系における **6-MSITC** の抗酸化効果を明らかにした。

第 3 章では **6-MSITC** の育毛効果を、ヒト毛乳頭細胞 (**dermal papilla cells; DPCs**) を用いて検討した。**DPCs** は毛包の基部に存在しており、成長因子等の分子メディエーターを分泌することで、毛髪の成長やヘアサイクルを調節している。**6-MSITC** を **DPCs** に添加し、**DPCs** に対する細胞賦活効果や分子メディエーターの 1 つである血管内皮細胞増殖因子 (**vascular endothelial growth factor; VEGF**) の発現量を増やすかどうか検証した。

以上、本研究では、有効活用を目的としたワサビの様々な機能性研究を実施した。現在、ワサビの使用用途は専ら薬味ばかりである。薬味以外の付加価値を

高めるため、機能性原料として取り扱いが可能か否か、培養細胞や実験動物を用いての効果の解明を試みた。

## 第1章 ワサビ抽出物による抗肥満効果

### 第1項 ラットを用いた予備試験（根茎抽出物、葉抽出物）

#### 1-1-1 背景と目的

肥満はエネルギー摂取が消費を上回ることで生じ、高血圧 [36]、脂質異常症 [37]、II 型糖尿病 [38] 等の生活習慣病のリスクファクターである。肥満は、脂肪細胞に過剰な脂肪が蓄積した状態となるため、脂肪吸収阻害や脂質代謝改善等の肥満予防剤が研究され [41–43]、商品開発がされている。

ワサビは根茎、葉とともに抗肥満効果が報告されている。Thomaz ら [44] は、高脂肪かつ高炭水化物食を摂取させた Wistar ラットにおいて、根茎がコントロール群に対して BMI を 13 % 低下させ、脱共役タンパク質 1 (uncoupling protein 1; UCP1) の発現を有意に上昇させることを報告した。試験に供したワサビの部位が記載されていなかったため、おそらく根茎を供したことが考えられる。6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate; 6-MSITC) は主に根茎に含まれるイソチオシアネート (isothiocyanate; ITC) 類であり、その含有量はワサビ ITC 類の中では、アリルイソチオシアネート (allyl isothiocyanate; AITC) に次いで高い [13]。Tanaka ら [45] は、高脂肪食を摂取させた野生型マウスにおいて、6-MSITC が脂肪肝への誘導を阻害することを報告した。

一方、Ogawa ら [46] はワサビ葉熱水抽出物により 3T3-L1 前駆脂肪細胞分化抑制効果を報告した。さらに、Yamasaki ら [47] は C57BL/6J マウスを、Oowatari ら [48] は SHRSP/ZF ラットを用い、ワサビ葉熱水抽出物の摂取による抗肥満効果を報告した。葉の処理方法は明記されていないものの、Lee ら [29] は Sprague-Dawley ラットにおけるワサビ葉パウダーの抗コレステロール効果を報告した。これらの報告は、ワサビ葉に抗肥満成分が含まれていることを示唆する。

Ogawa ら [46]、Yamasaki ら [47]、および、Oowatari ら [48] は、試料に熱水抽出物を用いたため、実用化の際、ワサビ葉を湯で煮出した健康茶を作ることを見込まれたことが考えられる。本研究では、抽出粉末を健康食品として摂取することを想定し、50 % エタノール抽出物に抗肥満効果があるか検証することとした。本項では、根茎と葉を用いて予備試験を実施した。

## 1-1-2 方法

### 1-1-2-1 試料

ワサビ根茎 30 kg を凍結粉碎し、水を加えて 37°C で 3 時間インキュベートした。減圧蒸留により蒸留液を除去し、残渣に 50 % エタノールを加えて常温で 1 時間攪拌した。ろ過により抽出液を得て、減圧濃縮した後、濃縮液にデキストリンを加えた。スプレードライヤーにて粉末化し、根茎 50 % エタノール抽出物 (wasabi rhizome extract; WRE) を 2.48 kg 得た。ワサビ葉の 50 % エタノール抽出物は、Okamoto ら [31] の方法に従って作製した。ワサビ葉の 50 % エタノール抽出物を WLE (wasabi leaf extract) と表現した。その他試薬類は、試薬一覧の通り入手した。

### 1-1-2-2 動物試験

4 週齢の雄性 Wistar ラットを、ステンレスのケージで個別飼育した。動物室の温度は  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は 50 % に保ち、明期 08:00 am–08:00 pm で飼育した。2 週間順化させた後、ラットの平均体重が均等になるよう、普通食群、高脂肪食群、WRE 群、および、WLE 群の 4 群に群分けした (各  $n = 10$ )。Table 1-1-1 の通り、普通食群に AIN-76 を、高脂肪食群にコーンオイル 20 g/100 g diet を含む高脂肪食を、WRE 群に 5 % WRE を含む高脂肪食を、WLE 群に 5 % WLE を含む高脂肪食を、4 週間 (28 日間) 与えた。水は自由摂取とし、体重と飼料摂取量は週に 3 回測定した。4 週間後、ラットを一晩絶食し、その後、麻酔下で、断頭により屠殺後、頸動脈から血液を採取した。血液を 3,000 rpm で 15 分間、4°C で遠心分離することで血清を得て、分析まで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した。腎周囲、精巣上体、および、鼠蹊部の白色脂肪組織 (white adipose tissue; WAT)、肩甲骨間の褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT)、肝臓、腎臓、膵臓、腓腹筋をすみやかに摘出し、分析まで  $-80^\circ\text{C}$  で保管した。動物試験全般に関して、その扱いはガイドライン (national institutes of health guide for the care and use of laboratory animals) を遵守した。

Table 1-1-1. Composition of experimental diets.

| Ingredient (g/100 g diet) | Standard group<br>(AIN-76) | High-fat group | WRE group    | WLE group    |
|---------------------------|----------------------------|----------------|--------------|--------------|
| Casein                    | 20.0                       | 20.0           | 20.0         | 20.0         |
| DL-Methionine             | 0.3                        | 0.0            | 0.0          | 0.0          |
| Corn starch               | 15.0                       | 0.0            | 0.0          | 0.0          |
| Sucrose                   | 50.0                       | 48.3           | 43.3         | 43.3         |
| Corn oil                  | 5.0                        | 20.0           | 20.0         | 20.0         |
| Cellulose powder          | 5.0                        | 7.0            | 7.0          | 7.0          |
| Mineral mix (AIN-76)      | 3.5                        | 3.5            | 3.5          | 3.5          |
| Vitamin mix (AIN-76)      | 1.0                        | 1.0            | 1.0          | 1.0          |
| Choline bitartrate        | 0.2                        | 0.2            | 0.2          | 0.2          |
| WRE                       | 0.0                        | 0.0            | 5.0          | 0.0          |
| WLE                       | 0.0                        | 0.0            | 0.0          | 5.0          |
| <b>Total</b>              | <b>100.0</b>               | <b>100.0</b>   | <b>100.0</b> | <b>100.0</b> |

Abbreviations: WRE, wasabi rhizome extract; WLE, wasabi leaf extract

The WRE and WLE groups were fed a high-fat diet containing 5% WRE and 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.



### 1-1-2-3 血清成分評価

市販のキットを用い、血清中の総コレステロール (total cholesterol; TC)、トリグリセリド (triglyceride; TG)、リン脂質 (phospholipid; PL)、遊離脂肪酸 (free fatty acid; FFA)、クレアチニン (creatinine)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase; AST)、および、アラニンアミノトランスアミナーゼ (alanine aminotransferase; ALT) を測定した。

### 1-1-2-4 統計解析

結果は、平均値 ± 標準偏差で表現した。ANOVA による検定後、Fisher's 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。統計解析は、Stat View version 5.0 (Abacus Concepts) を用いて実施した。

## 1-1-3 結果

### 1-1-3-1 摂取量、体重、組織重量評価

4 群間で全摂食量に有意な差はなく、最終体重は、高脂肪食群に対して WRE 群で有意な差はなかったものの、WLE 群で有意に低かった (Table 1-1-2)。WRE 群、WLE 群と高脂肪食群間で、各 WAT と肩甲骨間 BAT の重量に有意な差はなかった (Table 1-1-2)。肩甲骨間 BAT の重量は、高脂肪食群に対して WRE 群で有意な差はなかったものの、WLE 群で有意に高かった (Table 1-1-2)。WRE 群、WLE 群と高脂肪食群間で、肝臓、腎臓、膵臓、および、腓腹筋の重量に有意な差はなかった (Table 1-1-2)。

### 1-1-3-2 血清成分評価

4 群間において、TC、TG、PL、FFA、クレアチニン、AST、および、ALT 濃度に有意な差は見られなかった (Table 1-1-3)。

Table 1-1-2. Total food intake, body weight, and tissue weight.

|                          | Standard group           | High-fat group            | WRE group                 | WLE group                |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Total Food intake (g)    | 371.6 ± 3.9              | 369.6 ± 1.7               | 365.0 ± 6.2               | 372.2 ± 5.3              |
| Initial body weight (g)  | 230.0 ± 5.5              | 229.7 ± 3.0               | 229.4 ± 3.4               | 229.5 ± 4.6              |
| Final body weight (g)    | 266.0 ± 9.1 <sup>a</sup> | 296.7 ± 5.4 <sup>b</sup>  | 294.7 ± 8.5 <sup>b</sup>  | 283.0 ± 8.7 <sup>c</sup> |
| WAT                      |                          |                           |                           |                          |
| Perinephric (g)          | 4.09 ± 0.70 <sup>a</sup> | 6.32 ± 0.87 <sup>b</sup>  | 6.73 ± 0.75 <sup>b</sup>  | 6.33 ± 1.39 <sup>b</sup> |
| Epididymal (g)           | 5.28 ± 0.61 <sup>a</sup> | 7.38 ± 0.95 <sup>b</sup>  | 7.14 ± 0.80 <sup>b</sup>  | 6.90 ± 1.28 <sup>b</sup> |
| Inguinal (g)             | 2.14 ± 0.67              | 3.24 ± 1.50               | 2.76 ± 0.71               | 3.08 ± 0.96              |
| Interscapular BAT (g)    | 0.25 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.29 ± 0.07 <sup>ab</sup> | 0.31 ± 0.07 <sup>ab</sup> | 0.34 ± 0.09 <sup>b</sup> |
| Liver (g)                | 7.16 ± 0.54              | 7.80 ± 0.96               | 7.80 ± 0.49               | 7.62 ± 0.57              |
| Kidney (g)               | 1.78 ± 0.12              | 1.90 ± 0.10               | 1.91 ± 0.11               | 1.89 ± 0.08              |
| Pancreas (g)             | 0.58 ± 0.08              | 0.57 ± 0.09               | 0.56 ± 0.07               | 0.56 ± 0.09              |
| Gastrocnemius muscle (g) | 3.35 ± 0.25              | 3.60 ± 0.20               | 3.45 ± 0.13               | 3.43 ± 0.12              |

Data are expressed as mean ± SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WRE, wasabi rhizome extract; WLE, wasabi leaf extract; WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue

The WRE and WLE groups were fed a high-fat diet containing 5% WRE and 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

Table 1-1-3. Serum variables measured.

|  | Standard group | High-fat group | WRE group    | WLE group    |
|--|----------------|----------------|--------------|--------------|
| Total cholesterol (TC) (mg/dL)         | 28.4 ± 7.1     | 20.8 ± 15.5    | 22.9 ± 5.9   | 30.9 ± 14.9  |
| Triglycerides (TG) (mg/dL)             | 137.2 ± 29.7   | 138.5 ± 47.6   | 154.2 ± 24.1 | 150.7 ± 40.5 |
| Phospholipid (PL) (mg/dL)              | 134.6 ± 14.4   | 115.6 ± 14.9   | 132.2 ± 21.7 | 132.3 ± 18.5 |
| Free fatty acid (FFA) (mg/dL)          | 0.60 ± 0.17    | 0.52 ± 0.07    | 0.54 ± 0.06  | 0.48 ± 0.10  |
| Creatinine (mg/dL)                     | 0.78 ± 0.24    | 0.64 ± 0.19    | 0.62 ± 0.39  | 0.77 ± 0.22  |
| Asparate aminotransferase (AST) (IU/L) | 149.8 ± 32.2   | 149.0 ± 20.0   | 164.8 ± 26.8 | 163.1 ± 29.1 |
| Alanine aminotransferase (ALT) (IU/L)  | 37.2 ± 3.1     | 37.3 ± 6.6     | 42.6 ± 7.1   | 37.8 ± 13.0  |

Data are expressed as mean ± SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WRE, wasabi rhizome extract; WLE, wasabi leaf extract

The WRE and WLE groups were fed a high-fat diet containing 5% WRE and 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

#### 1-1-4 考察

本項では、WRE または WLE を含む高脂肪食を摂取させたラットにおける抗肥満効果を検証した。最終体重は、高脂肪食群と WRE 群で有意な差はなかったものの (Table 1-1-2)、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に低かった (Table 1-1-2)。WLE 群は、5 % の WLE を飼料に配合しており、その分をスクロースで置換している (Table 1-1-1)。そこで、WLE 群による体重増加抑制効果の原因として、スクロース置換が該当するか検証するため、ラットに摂取させた飼料のカロリーを修正アトウォーター法により算出した。WLE のカロリーが 310 kcal/100 g であることから (データは示していない)、WLE 群の飼料が 460.5 kcal/100 g、高脂肪食群の飼料が 465.0 kcal/100 g と算出され、約 1 % の違いであることを確認した。さらに、WLE 群と高脂肪食群の全摂食量に有意な差はなかったことから (Table 1-1-2)、ラットの体重増加抑制は WLE 摂取に起因していることが示された。

WLE 群と高脂肪食群で、各 WAT の臓器重量に有意な差はなかった (Table 1-1-2)。BAT、肝臓、腎臓、膵臓、および、腓腹筋の重量に有意な差はなく (Table 1-1-2)、クレアチニン、AST、および、ALT にも有意な差はなかった (Table 1-1-3)。よって、WLE 群の最終体重が高脂肪食群に対して有意に低かったことは、WLE による副作用が原因ではないことが考えられた。

ITC 類は transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) のリガンドである [49–51]。活性化した TRPA1 は交感神経を刺激し、刺激された交感神経は脂肪細胞の  $\beta$ 3-アドレナリン受容体 ( $\beta$ 3-adrenergic receptor; Adrb3) を活性化する。Kumagai ら [12] や Etoh ら [14] により、ITC 類の含有量がワサビ葉よりワサビ根茎の方が多いたことが報告されているが、WRE では抗肥満効果は認められなかった。そのため、WRE には TRPA1 を活性化させるほどの ITC 類が含まれていなかったことが考えられた。一方、ワサビ根茎や根茎成分 6-MSITC の抗肥満効果が報告されている [44, 45]。本項では WRE に抗肥満効果はなかったため、その一因として、6-MSITC の摂取量の違いやワサビの処理方法の違い等による影響が考えられた。

以上、本項では、WLE を含む高脂肪食を摂取させたラットに体重増加抑制効果があることを確認した。そこで第 2 項では、WAT の組織学的評価や mRNA 発現量解析を実施することで、WLE による抗肥満効果を詳細に検討することとした。

## 第2項 ラットを用いた本試験（葉抽出物）

### 1-2-1 背景と目的

食事から摂取した脂肪は、小腸で膵リパーゼにより消化された後、吸収される。エネルギー摂取が消費を上回ると、脂肪が脂肪細胞内に蓄積するが、蓄積した脂肪は以下の経路によりエネルギーに変換される（Fig. 1-2-1）。まず、交感神経刺激により、脂肪細胞に発現している *Adrb3* がプロテインキナーゼ A（protein kinase A; PKA）を活性化する。次に、活性化した PKA は、UCP1 の mRNA 発現を誘導し、熱産生によりエネルギーが消費される。一方、PKA は、ホルモン感受性リパーゼ（hormone-sensitive lipase; HSL）も活性化する。HSL は脂肪細胞に蓄えられた脂肪を分解する。その後、分解によって生じた FFA から、酸化リン酸化や UCP1 を通じて、エネルギーが合成され、消費されるという経路となる。なお、*Adrb3* アゴニストを摂取させた動物が抗肥満作用を示し [52]、抗肥満剤が動物の脂肪組織の *Adrb3* mRNA 発現を上昇させたことから [42, 52–54]、分子メカニズムの1つとして *Adrb3* の評価が抗肥満に有効であると考えられる。

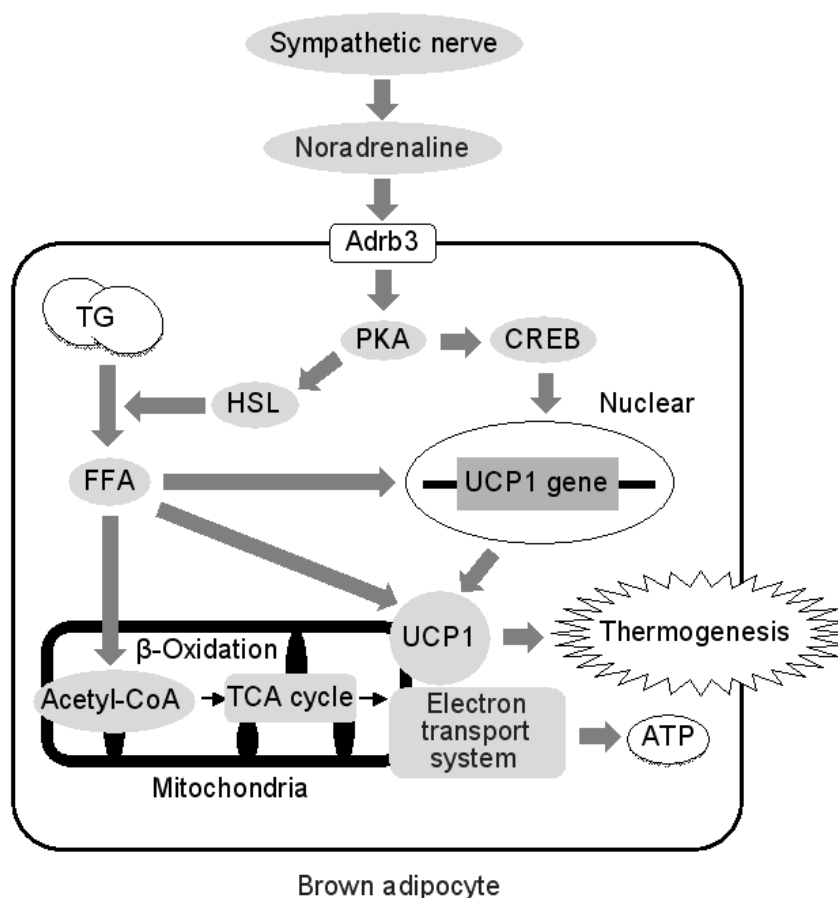


Fig. 1-2-1. The mechanism of thermogenesis in brown adipocytes.

第1項では予備試験として、WREとWLEの抗肥満効果を検証した。その結果、WLEに高脂肪食を摂取したラットでの体重増加抑制効果があることを確認した。そこで本項では、WATの組織学的評価やmRNA発現量評価を実施することで、WLEによる抗肥満効果を詳細に検討することとした。

## 1-2-2 方法

### 1-2-2-1 試料

Okamotoら [31] の方法に従って、WLEを作製した。

### 1-2-2-2 動物試験

4週齢の雄性Wistarラットを、ステンレスのケージで個別飼育した。動物室の温度は $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は50%に保ち、明期08:00 am–08:00 pmで飼育した。1週間順化させた後、ラットの平均体重が均等になるよう、普通食群、高脂肪食群、WLE群の3群に群分けした(各 $n = 10$ )。Table 1-2-1の通り、普通食群にAIN-76を、高脂肪食群にコーンオイル20 g/100 g dietを含む高脂肪食を、WLE群に5% WLEを含む高脂肪食を、4週間(28日間)与えた。水は自由摂取とし、体重と飼料摂取量は週に3回測定した。4週間後、ラットを一晩絶食し、その後、麻酔下で断頭により屠殺後、頸動脈から血液を採取した。血液を3,000 rpmで15分間、 $4^{\circ}\text{C}$ で遠心分離することで血清を得て、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。腸間膜、腎周囲、精巣上体、および、鼠蹊部のWAT、肩甲骨間のBAT、肝臓、腎臓、膵臓、腓腹筋をすみやかに摘出し、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。第1項の予備試験動物では、腎周囲、精巣上体、および、鼠蹊部のWATに有効な結果が得られなかったため、本項では腸間膜のWATも検討することにした。試験全般に関して、その扱いはガイドライン(national institutes of health guide for the care and use of laboratory animals)を遵守した。

Table 1-2-1. Composition of experimental diets.

| Ingredient (g/100 g diet)            | Standard group<br>(AIN-76) | High-fat group | WLE group    |
|--------------------------------------|----------------------------|----------------|--------------|
| Casein                               | 20.0                       | 20.0           | 20.0         |
| DL-Methionine                        | 0.3                        | 0.0            | 0.0          |
| Corn starch                          | 15.0                       | 0.0            | 0.0          |
| Sucrose                              | 50.0                       | 48.3           | 43.3         |
| Corn oil                             | 5.0                        | 20.0           | 20.0         |
| Cellulose powder                     | 5.0                        | 7.0            | 7.0          |
| Mineral mix (AIN-76)                 | 3.5                        | 3.5            | 3.5          |
| Vitamin mix (AIN-76)                 | 1.0                        | 1.0            | 1.0          |
| Choline bitartrate                   | 0.2                        | 0.2            | 0.2          |
| WLE                                  | 0.0                        | 0.0            | 5.0          |
| (Dietary fiber contained in WLE 5 g) | -                          | -              | (0.135)      |
| <b>Total</b>                         | <b>100.0</b>               | <b>100.0</b>   | <b>100.0</b> |

Abbreviations: WLE, wasabi leaf extract

The WLE group was fed a high-fat diet containing 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

### 1-2-2-3 血清成分評価

1-1-2-3 と同様に評価した。

### 1-2-2-4 組織学的評価

腸管膜 WAT を 10 % 中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、パラフィンブロックを作成した。2-3  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン (hematoxylin and eosin; HE) 染色した。その後、単位視野当たりの脂肪細胞数をカウントした。

### 1-2-2-5 糞乾燥重量と糞中脂質濃度評価

最後の 3 日間、糞を回収し、凍結乾燥後の重量を秤量した。凍結乾燥した糞にクロロホルム-メタノール混合液 (2 : 1 v/v) 5 mL を加え、4°C で一晩、糞中の脂質を抽出した。抽出液を試験管に移した後、75°C 湯浴中で抽出液がなくなるまで加熱し、乾燥機に入れて乾燥させ、デシケーター内で放冷した。鹼化させるため、5 % KOH を含むメタノール 5 mL に再溶解し、75°C 湯浴中で 45 分間加熱した。試料中の FFA 濃度を市販のキットを用いて測定した。標準は 2 mg/mL の大豆油標準液を用いた。

### 1-2-2-6 mRNA 発現量評価

肩甲骨間 BAT の total RNA は RNeasy Mini Kit を用いて、精巢上体 WAT の total RNA は QIAzol を用いて抽出した。抽出した total RNA を、SuperScriptIII を用いて、cDNA に逆転写した。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) は、TaqMan Universal PCR Maser Mix を用い、ABI Prism 7000 Sequence Detection System にて実施した。 $\beta$ -アクチンは内部標準として使用した。 $\beta$ -アクチンのプライマーとプローブは、Oishi ら [55] の方法に従って合成した。UCP1 と Adrb3 のプライマーとプローブは、TaqMan Gene Expression Assays を使用した。ランダムに選んだ  $n = 5$  の各臓器を試験に供した。

### 1-2-2-7 統計解析

結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表現した。ANOVA による検定後、Fisher's 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。統計解析は、Stat View version 5.0 (Abacus Concepts) を用いて実施した。

## 1-2-3 結果

### 1-2-3-1 摂取量、体重、組織重量評価

3 群間で全摂食量に有意な差はなく、最終体重は、高脂肪食群に対して WLE



群で有意に低かった (Table 1-2-2)。WLE 群と高脂肪食群で、各 WAT と肩甲骨間 BAT の臓器重量に有意な差はなかった (Table 1-2-2)。WLE 群と高脂肪食群間で、肝臓、腎臓、膵臓、および、腓腹筋の重量に有意な差はなかった (Table 1-2-2)。

#### 1-2-3-2 組織学的評価

単位視野当たりの腸間膜 WAT の脂肪細胞数が、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に多かった (Fig. 1-2-2、Table 1-2-3)。

#### 1-2-3-3 血清成分評価

3 群間において、TG、PL、および、FFA 濃度に有意な差はなかったが、TC 濃度は普通食群に対して、高脂肪食群と WLE 群で有意に低かった (Table 1-2-4)。WLE 群と高脂肪食群で、クレアチニン、AST、および、ALT に有意な差はなかった (Table 1-2-4)。

#### 1-2-3-4 mRNA 発現量評価

3 群間において、精巣上体 WAT の Adrb3 発現量に有意な差はなかった (Table 1-2-5)。肩甲骨間 BAT の Adrb3 mRNA 発現量は、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に高く、UCP1 mRNA 発現量は、高脂肪食群と WLE 群に有意な差はなかった (Table 1-2-5)。

#### 1-2-3-5 糞乾燥重量と糞中脂質濃度評価

糞脂質量は、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に低かった (Table 1-2-6)。糞乾燥重量は、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に高かった (Table 1-2-6)。

Table 1-2-2. Total food intake, body weight, and tissue weight.

|                          | Standard group            | High-fat group            | WLE group                  |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Total food intake (g)    | 339.5 ± 12.9              | 337.0 ± 13.1              | 339.5 ± 15.0               |
| Initial body weight (g)  | 106.9 ± 5.15              | 107.7 ± 5.43              | 107.0 ± 4.34               |
| Final body weight (g)    | 193.5 ± 5.71 <sup>a</sup> | 219.3 ± 8.40 <sup>b</sup> | 211.5 ± 10.13 <sup>c</sup> |
| WAT                      |                           |                           |                            |
| Mesenteric (g)           | 3.89 ± 1.12 <sup>a</sup>  | 4.78 ± 0.71 <sup>b</sup>  | 4.91 ± 0.80 <sup>b</sup>   |
| Perinephric (g)          | 3.71 ± 0.93 <sup>a</sup>  | 4.68 ± 0.99 <sup>b</sup>  | 4.50 ± 0.86 <sup>b</sup>   |
| Epididymal (g)           | 2.65 ± 0.92 <sup>a</sup>  | 3.32 ± 0.66 <sup>ab</sup> | 3.53 ± 0.85 <sup>b</sup>   |
| Inguinal (g)             | 3.13 ± 0.84 <sup>a</sup>  | 5.05 ± 1.03 <sup>b</sup>  | 5.24 ± 0.98 <sup>b</sup>   |
| Interscapular BAT (g)    | 0.24 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 0.29 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.31 ± 0.06 <sup>b</sup>   |
| Liver (g)                | 4.90 ± 0.68 <sup>a</sup>  | 5.43 ± 0.20 <sup>b</sup>  | 5.45 ± 0.60 <sup>b</sup>   |
| Kidney (g)               | 1.29 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 1.41 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 1.40 ± 0.08 <sup>b</sup>   |
| Pancreas (g)             | 0.66 ± 0.13               | 0.70 ± 0.15               | 0.70 ± 0.13                |
| Gastrocnemius muscle (g) | 2.30 ± 0.15 <sup>a</sup>  | 2.46 ± 0.20 <sup>b</sup>  | 2.43 ± 0.14 <sup>ab</sup>  |

Data are expressed as mean ± SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WLE, wasabi leaf extract; WAT, white adipose tissue;

BAT, brown adipose tissue

The WLE group was fed a high-fat diet containing 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

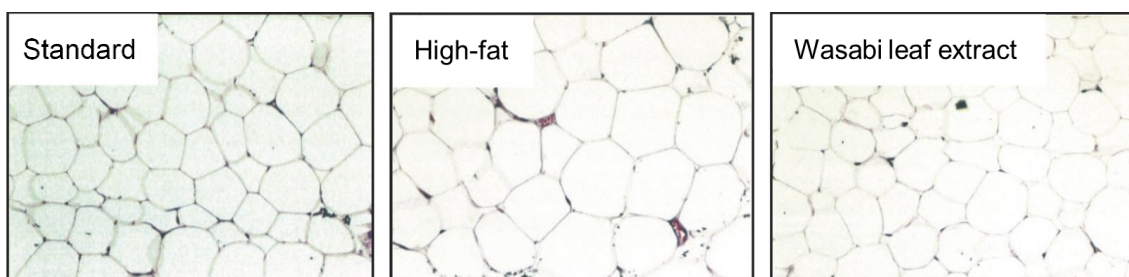


Fig. 1-2-2. Histological analysis of the mesenteric white adipose tissue (WAT). The tissue was dipped into a 10% formalin neutral buffer solution. After embedding in paraffin the tissue was cut into 2–3  $\mu$ m sections and stained using hematoxylin and eosin.

Table 1-2-3. The number of adipocytes in mesenteric white adipose tissues.

|   | Standard group              | High-fat group              | WLE group                   |
|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Number of adipocytes (cells/visual field) | 68.1 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup> | 57.5 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup> | 64.5 $\pm$ 9.2 <sup>c</sup> |

Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WLE, wasabi leaf extract

The WLE group was fed a high-fat diet containing 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

Table 1-2-4. Serum variables measured.

|  | Standard group           | High-fat group           | WLE group                |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Total cholesterol (TC) (mg/dL)         | 88.2 ± 36.4 <sup>a</sup> | 60.8 ± 22.3 <sup>b</sup> | 59.7 ± 14.7 <sup>b</sup> |
| Triglycerides (TG) (mg/dL)             | 112.0 ± 61.1             | 78.6 ± 25.5              | 69.7 ± 27.6              |
| Phospholipid (PL) (mg/dL)              | 139.7 ± 62.0             | 95.1 ± 38.4              | 103.2 ± 25.9             |
| Free fatty acid (FFA) (mg/dL)          | 1.37 ± 0.48              | 1.27 ± 0.51              | 1.09 ± 0.56              |
| Creatinine (mg/dL)                     | 0.99 ± 0.42              | 1.22 ± 0.55              | 1.07 ± 0.69              |
| Asparate aminotransferase (AST) (IU/L) | 203.5 ± 47.7             | 159.0 ± 80.3             | 229.9 ± 55.0             |
| Alanine aminotransferase (ALT) (IU/L)  | 27.2 ± 2.88              | 16.3 ± 9.63              | 21.2 ± 6.26              |

Data are expressed as mean ± SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abreviations: WLE, wasabi leaf extract

The WLE group was fed a high-fat diet containing 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

Table 1-2-5. The mRNA expression in the epididymal white adipose tissue (WAT) and interscapular brown adipose tissue (BAT).

|                   | Standard group            | High-fat group           | WLE group                 |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Epididymal WAT    |                           |                          |                           |
| Adrb3             | 100.0 ± 68.4              | 119.7 ± 45.4             | 113.2 ± 58.6              |
| Interscapular BAT |                           |                          |                           |
| Adrb3             | 100.0 ± 45.8 <sup>a</sup> | 70.4 ± 7.1 <sup>b</sup>  | 119.6 ± 15.9 <sup>a</sup> |
| UCP1              | 100.0 ± 22.8 <sup>a</sup> | 58.1 ± 22.8 <sup>b</sup> | 70.3 ± 16.8 <sup>b</sup>  |

Data are expressed as mean ± SD (n = 5).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WLE, wasabi leaf extract; Adrb3,  $\beta$ 3-adrenergic receptor;

UCP1, uncoupling protein 1

The WLE group was fed a high-fat diet containing 5% WLE.

High-fat diet was defined as feed containing 20% corn oil.

Table 1-2-6. Fecal excretion in 3 days.

|                             | Standard group           | High-fat group           | WLE group                |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Dried fecal weight (g/24 h) | 1.66 ± 0.16 <sup>a</sup> | 2.34 ± 0.39 <sup>b</sup> | 2.67 ± 0.33 <sup>c</sup> |
| Fecal lipids (mg/24 h)      | 0.22 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.42 ± 0.28 <sup>b</sup> | 0.23 ± 0.06 <sup>a</sup> |

Data are expressed as mean ± SD (n = 10).

Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups.

Abbreviations: WLE, wasabi leaf extract

#### 1-2-4 考察

本項では、WLE を含む高脂肪食を摂取させたラットにおける抗肥満効果を検証した。最終体重は、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に低かった (Table 1-2-2)。3 群間で全摂食量に有意な差はなかったため (Table 1-2-2)、第 1 項と同様に、ラットの体重増加抑制は WLE 摂取に起因していることが示された。WLE 群と高脂肪食群で、各 WAT と BAT の臓器重量に有意な差はなかったが (Table 1-2-2)、単位視野当たりの腸間膜 WAT の脂肪細胞数が高脂肪群に対して WLE 群で有意に多かった (Fig. 1-2-2、Table 1-2-3)。そのため、WLE 摂取により脂肪細胞が小さくなる可能性が考えられた。今回、腸間膜や腎周囲、精巣上体、および、鼠径部の WAT は秤量したものの、他の WAT、例えば大網、後腹膜、皮下等の WAT は秤量しなかった。そのため、未秤量の WAT の重量が低くなっている可能性が考えられた。さらに、Yamasaki ら [47] は、ワサビ葉の熱水抽出物を 163 日間摂取させた C57BL/6J マウスに、精巣上体 WAT の重量上昇抑制といった抗肥満効果があることを報告した。本項での実験期間は 4 週間であったが、実験期間を延ばすことで、精巣上体 WAT の重量上昇抑制が生じる可能性がある。

WLE 群と高脂肪食群で、肝臓、腎臓、膵臓、および、腓腹筋の重量に有意な差はなかった (Table 1-2-2)。クレアチニン、AST、および、ALT にも有意な差はなかった (Table 1-2-4)。第 1 項では、6 週齢のラットに高脂肪食を摂取させ、実験を開始したが、本項ではそれを 5 週齢とした。過去、5 週齢のラットに高脂肪食を摂取させた研究が報告されている [56–58]。そのため、本項の実験において、ラットの週齢に問題はないことが考えられた。WLE 群の最終体重が高脂肪食群に対して有意に低かったことは、WLE による副作用または成長阻害に関係していないと考えられた。

3 群間において、TG、PL、および、FFA 濃度に有意な差はなかったが、TC 濃度は普通食群に対して、高脂肪食群と WLE 群で有意に低かった (Table 1-2-4)。Maeda ら [42] は、C57BL/6J マウスに高脂肪食を摂取させたところ、普通食 (AIN-93G) 群に対して、HLD コレステロール、TG、および、FFA に有意差はなかったものの、TC と LDL コレステロールが有意に上昇したことを報告した。Berraonodo ら [56] は、Wistar ラットに高エネルギー食を摂取させたところ、普通食 (Rodent Toxicology Diet) 群に対して、FFA の濃度は高いが、有意差がなかったことを報告した。Nomura ら [58] は、Sprague-Dawley ラットに高脂肪食を摂取させたところ、普通食 (CE-2) 群に対して、TC 濃度は低かったが、有意差はなかったことを報告した。Margareto ら [59] は、動物に高脂肪食や高エネルギー食を摂取させると、組織に過剰に脂肪酸 (エネルギー) が蓄えられることで、血中の FFA や他の脂質代謝マーカーの濃度が、低くなる可能性があることを報告した。これらの報告より、高脂肪食や高エネルギー食を動物に摂取させても、

脂質代謝マーカーが、普通食群よりも必ずしも高くなるとは限らないことが伺える。そのことを考慮すると、本項において、高脂肪食群と WLE 群の血中の TC 濃度が低かった理由として、高脂肪食摂取の可能性が考えられる。

WLE 群は、肩甲骨間 BAT の *Adrb3* mRNA 発現が上昇していた (Fig. 1-2-5)。それに伴い、*Adrb3* タンパク質が産生促進し、PKA を活性化した可能性がある。活性化した PKA は UCP1 の mRNA 発現を上昇させるが (Fig. 1-2-1)、WLE 群の UCP1 mRNA は上昇していなかった (Fig. 1-2-5)。一方、PKA は HSL も活性化する。HSL は脂肪細胞に蓄積されている脂肪を分解する酵素であるが、その分解によって産生された FFA が、酸化的リン酸化または UCP1 による ATP 合成を通じて消費される。そのため、食事由来の脂質は、WLE 群における HSL 活性化を通じて消費された可能性がある。一方、Oowatari ら [48] は、ワサビ葉の熱水抽出物をメタボリックシンドロームモデルである SHRSP/ZF ラットに摂取させたところ、体重増加が抑制され、直腸温が普通食群に対して熱水抽出物群で有意に上昇するという結果を報告した。これらのことから、WLE 群において生体の体温を上昇させる成分が含有されている可能性があり、本試験での体重増加抑制に関与したと推測される。

糞脂質量は高脂肪食群に対して WLE 群で有意に低く (Table 1-2-6)、WLE が食事由来の脂質の吸収を促進する可能性が考えられた。オルリスタットはリパーゼ阻害薬であり、食事由来の脂質の吸収を抑える効果がある。脂質吸収の抑制に伴った体重減少効果がある一方で、腹部膨満、便排出量の増加、脂肪便増加に伴う便失禁等の副作用が報告されている [60, 61]。WLE は脂質吸収を促進したにも関わらず、体重増加抑制効果があった。そのため、吸収された脂質はエネルギーとして消費された可能性がある。生物学的順応により、エネルギー消費量の増加が脂質吸収促進を招いた可能性が考えられる。糞乾燥重量は、高脂肪食群に対して WLE 群で有意に増加していた (Table 1-2-6)。WLE に含まれている食物繊維量は少なく (Table 1-2-1)、食物繊維が糞乾燥重量を増やしたことは考えにくい。糞排出促進について、さらなる検証が必要である。

Yamasaki ら [47] は、ワサビ葉の熱水抽出物を含む高脂肪食を摂取させた C57BL/6J マウスに抗肥満効果があったことを報告した。ワサビ葉熱水抽出物には AITC 等の刺激成分は含まれていなかった。また、ポリフェノールに抗肥満効果があることが報告されている [41, 43, 62]。そのため、WLE に含まれているポリフェノールが有効成分の 1 つである可能性が考えられた。例えば、Xu ら [62] は、ルテオリンを摂取させた C57BL/6 系統のマウスにおいて、高脂肪食に誘導された体重増加や、精巣上体と皮下の WAT の重量増加が抑制されることを報告した。さらに、精巣上体 WAT の脂肪細胞の直径が有意に小さくなる結果も得られていた。ルテオリンはワサビ葉に含まれていることが報告されているため [35]、本



研究での抗肥満効果に寄与した可能性が考えられる。

本項では、WLE を含む高脂肪食を摂取させたラットに体重増加抑制効果があり、この効果が糞脂質排出量の増加を伴わないことと、肩甲骨間 BAT の *Adrb3* mRNA 発現上昇に関係していることを確認した。有効成分の 1 つとして、ポリフェノールが効いている可能性が考えられる。そこで、第 3 項では、3T3-L1 細胞を用いて、有効成分探索試験を実施した。

### 第3項 3T3-L1細胞を用いた脂肪分化阻害成分の探索

#### 1-3-1 背景と目的

3T3-L1 前駆脂肪細胞は、脂肪細胞分化に関する研究で一般的に用いられており、エピガロカテキンガレート (epigallocatechin-3-gallate; EGCg) や大豆サポニン等の多数の分化阻害成分が報告されてきた [63, 64]。デキサメタゾン (dexamethasone; DEX) や 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine; IBMX)、インスリンを用いた 3T3-L1 前駆脂肪細胞の処理は、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR) と CCAAT/エンハンサー結合タンパク質 (CCAAT/enhancer binding protein; C/EBP) 遺伝子ファミリーの活性を増大させ [65, 66]、脂肪細胞分化を誘導する。PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  遺伝子は、グルコーストランスポーター4 (glucose transporter type 4; GLUT4)、リポタンパク質リパーゼ (lipoprotein lipase; LPL)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase; ACC)、脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase; FAS) 等の脂肪生成に関係する遺伝子を発現誘導することが示されてきた [67–69]。このため、PPAR $\gamma$  の発現調節は、脂肪細胞分化を制御する上で重要である。なお、前駆脂肪細胞からの脂肪細胞への分化が肥満を誘導するにも関わらず、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体に分化誘導能があることが報告されており [70]、分化誘導に関する議論には注意が必要である。

ワサビ葉は ITC 類をほとんど含まず、そのほとんどが廃棄されている。近年、ワサビ葉に含まれる成分が報告されており、フラボノイド類 [35]、フェニルプロパノイド類 [28]、テルペノイド類 [32]、および、カロテノイド類 [32] の存在が示されている。ワサビ葉から単離された 5-ヒドロキシフェルラ酸メチルエステル (5-hydroxyferulic acid methyl ester; 5-HFA ester) (Fig. 1-3-1, compound 1) は既知化合物であるものの、他の植物からは単離されておらず、細胞試験において抗炎症活性が報告されている [32]。

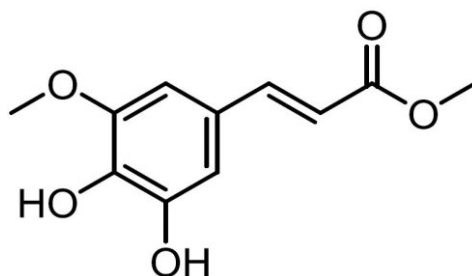


Fig. 1-3-1. Chemical structure of 5-HFA ester (1).

第1項と第2項では、WLEを含む高脂肪食を摂取させたラットが抗肥満効果を示したことを確認した。そこで、本項では3T3-L1前駆脂肪細胞を用いて、ワサビ葉に含まれる脂肪分化阻害活性成分を探索した。

## 1-3-2 方法

### 1-3-2-1 試料

静岡県にて採集したワサビ葉を使用した。シナピン酸 (sinapic acid) (2)、カフェ酸 (caffeic acid) (5)、フェルラ酸 (ferulic acid) (7) (Fig. 1-3-2) 等の試薬類は、試薬一覧の通り入手した。

### 1-3-2-2 NMR 法

2D核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) スペクトルと同様に、 $^1\text{H}$  (400 MHz) と  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) スペクトルを、Bruker AVANCE III 400 spectrometer (Bruker Bio Spin) を用いて測定した。NMR測定のパルスプログラムは、標準的なシーケンスとパラメーターに設定した。ケミカルシフト ( $\delta$ ) を ppm、結合定数 (J) を Hz で表した。 $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルにおけるケミカルシフトは、メタノール- $d_4$ の残留溶媒シグナルを用いて補正した ( $\delta_{\text{H}}$  3.31,  $\delta_{\text{C}}$  49.0)。

### 1-3-2-3 細胞培養と脂肪分化

マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM) に浮遊させた後、100  $\mu\text{L}$  ( $1.0 \times 10^5$  cells) を 96 ウェルプレートに播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) で1日間前培養した。

培地を除去した後、1  $\mu\text{M}$  DEX と 0.5 mM IBMX を含む分化培地に、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) に溶解した試料を添加し (day 0)、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) で2日間培養した。なお、培地中の DMSO 濃度は 0.1% とした。培地を除去した後、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリンを含む維持培地に試料を添加して6日間培養した (day 8)。6日間のうち、培地交換は4日目に1回行った。分化誘導剤である DEX、IBMX、および、インスリンの添加時期は、三上ら [

71] の方法を参考にして実施した。

### 1-3-2-4 細胞毒性評価

6日間後 (day 8)、培地を除去し、Cell Counting Kit-8 を用い、生細胞数を測定した。すなわち、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfonyl)

-2H-tetrazolium (WST-8) 2 mL を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) 100  $\mu$ L を添加した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で 3 時間培養した後の 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーで測定した。細胞毒性は、コントロールの培養上清の吸光度と、試料添加培養上清の吸光度の比で評価した。

#### 1-3-2-5 脂肪蓄積量評価

細胞毒性評価後、4 % ホルマリン 100  $\mu$ L を添加し、4°C で一晩浸漬することで細胞を固定した。ホルマリンを除去した後、60 % イソプロパノールで洗浄した。オイルレッド O 溶液 50  $\mu$ L を添加した後、室温で 10 分間、脂肪滴を染色した。Milli-Q 水で 3 回洗浄した後、イソプロパノール 50  $\mu$ L を添加した各ウェルの吸光度 (測定波長 520 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。脂肪蓄積量は、コントロールのウェルの吸光度と、試料添加ウェルの吸光度の比で評価した。

#### 1-3-2-6 mRNA 発現量評価

試料による mRNA 発現抑制は、脂肪蓄積抑制 (1-3-2-5) やタンパク質産生抑制 (1-3-2-7) より初期に変動すると考え、total RNA の抽出は day 6 に実施した。まず、CellAmp Direct RNA Prep Kit for RT-PCR を用いて、3T3-L1 細胞から total RNA を抽出した。total RNA は、PrimeScript RT reagent Kit を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR は、SYBR Premix DimerEraser を用い、95°C、30 秒間の加熱により DNA ポリメラーゼを活性化した後、95°C、5 秒間と 60°C、30 秒間のサイクルを 45 回繰り返した。PCR プライマーの塩基配列は Table 1-3-1 の通りとした。 $\beta$ -アクチンを内部標準として使用した。

Table 1-3-1. Sequences of primers used for real time PCR.

| Gene name      | Accession No. | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3')   |
|----------------|---------------|------------------------|--------------------------|
| $\beta$ -actin | NM_007393     | CCTGTGCTGCTCACCGAGGC   | GACCCCGTCTCTCCGGAGTCCATC |
| PPAR $\gamma$  | NM_011146     | TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG | TTCAGCTGGTCGATATCACTGGAG |
| C/EBP $\alpha$ | NC_000073     | CGCAAGAGCCGAGATAAAGC   | CACGGCTCAGCTGTTCCA       |
| GLUT4          | NM_009204     | ACGACGGACACTCCATCTGTTG | GGAGACATAGCTCATGGCTGGAA  |
| LPL            | M60845        | TGGATGAGCGACTCCTACTTCA | CGGATCCTCTCGATGACGAA     |
| SREBP-1c       | NM_011481     | CAGCACAGCAACCAGAAGC    | CCTCCTCCACTGCCACAAG      |
| ACC            | NM_133360     | GGGCACAGACCGTGGTAGTT   | CAGGATCAGCTGGGATACTGAGT  |
| FAS            | NM_007989     | GTGACCGCCATCTATATCG    | CTGTCGTCTGTAGTCTTGAG     |

Abbreviations: PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ; GLUT4, glucose transporter type 4; LPL, lipoprotein lipase; SREBP-1c, sterol regulatory element-binding protein-1; ACC, acetyl-CoA carboxylase; FAS, fatty acid synthase

#### 1-3-2-7 ウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析は day 8 に実施した。3T3-L1 細胞からタンパク質を RIPA バッファーを用いて抽出した。抽出液中のタンパク質は、10 % ポリアクリルアミドゲルにて分離した後、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride; PVDF) メンブレンに転写した。5 % スキムミルクを含む TBST (10 mM Tris、100 mM NaCl、0.1 % Tween 20) を用い、室温で 1 時間浸すことでブロッキングした後、メンブレンに一次抗体である抗 PPAR $\gamma$  抗体と抗  $\beta$ -アクチン抗体と反応させた。 $\beta$ -アクチンは内部コントロールとして用いた。その後、メンブレンは西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) 標識二次抗体と反応させた。化学発光検出試薬を用いて、バンドを検出した。

#### 1-3-2-8 LC-MS 定量評価

乾燥ワサビ葉 10 mg にメタノール 500  $\mu$ L を添加した後、30 秒間の攪拌、5 分間の超音波処理、5 分間の遠心分離することで抽出液を得た。残渣の抽出処理を再度繰り返し、得られた抽出液を合わせた。抽出液に窒素ガスを吹き付けて乾燥させることで、メタノール抽出物を得た。そこへメタノール 1 mL を添加して再溶解した後、0.20  $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (liquid chromatography-mass spectrometer; LC-MS) に注入した。LC-MS は、四重極質量分析計 Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) を装備

した Accela LC system (Thermo Fisher Scientific) を用い、条件は以下の通りとした。

【高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography; HPLC) 条件】

column: ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm; Waters)

eluent: A) H<sub>2</sub>O (0.1 % formic acid)、B) acetonitrile (0.1 % formic acid)  
2 % B (0–1 min)、2–98 % B (1–16 min)

flow rate: 0.4 mL/min

injection: 5 μL

column temperature: 40 °C

【MS 条件】

ion source: ESI

scan mode: selected ion monitoring

polarity: negative ion mode

sheath gas: 40 arb

auxiliary gas: 10 arb

spray voltage: 2000 V

vaporizer temperature: 300 °C

capillary temperature: 350 °C

resolution: 70,000

【ソフトウェア】

xcalibur

ワサビ葉からの 5-HFA ester (1) 回収率を補正するために、5-HFA ester (1) をワサビ葉に添加した後、同様に抽出処理を行った添加回収試験を実施した。5-HFA ester (1) の濃度は外部標準法によって求めた。5–100 ng/mL の範囲で 3 点プロットしたところ、直線性 ( $R^2 > 0.999$ ) の高い検量線が得られた。定量限界は、シグナルノイズ比を 10 とした。

1-3-2-9 5-HFA ester (1) と類縁体の合成

アルゴンガス雰囲気下において、シナピン酸 (2,900 mg、4 mmol) (2) を超脱水ジクロロメタン (super-dehydrated CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 30 mL に懸濁させた。ジクロロメタン溶液中の 1 M 三臭化ホウ素 (boron tribromide; BBr<sub>3</sub>) 6.6 mL を -78 °C で攪拌

しながら、ジクロロメタン懸濁液に滴下した。滴下後、室温で24時間攪拌を続けた。1 M 塩酸 6 mL を加えて室温でさらに2時間攪拌を続けた後、水層、ジクロロメタン層、沈殿物を分画し、沈殿物は水に溶解した。これらの画分を薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography; TLC) で分析したところ、水画分と沈殿水溶解液に5-ヒドロキシフェルラ酸 (5-hydroxyferulic acid; 5-HFA) (4) が含まれていることを確認した。水画分と沈殿水溶解液を0.1 M 水酸化ナトリウムにより pH 3 に調整した後、酢酸エチルを添加した。TLC において5-HFA (4) が酢酸エチル層に移行したことを確認した後、分画し、酢酸エチル画分は無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した。水画分と酢酸エチル画分を、HPLC を用いて分析したところ、両画分のクロマトグラムが類似していた。これらの画分を混合した後、HPLC を用いて精製したところ、5-HFA (87.2 mg, 0.42 mmol) (4) を 10.4 % の収率で得た。副産物として、3,4,5-トリヒドロキシ桂皮酸 (3,4,5-trihydroxycinnamic acid; 3,4,5-THCA, 85.6 mg, 0.44 mmol) (9) も 10.9 % の収率で得た。

次に5-HFA (4) のメチル化を試みた。5-HFA (35 mg, 0.17 mmol) (4) をメタノール 3.5 mL で再溶解した。ヘキサン溶液中の10% トリメチルシリルジメタン (trimethylsilyldiazomethane; TMSD) 2.2 mL を室温で攪拌しながら、メタノール再溶解液に滴下した。TLC において5-HFA (4) のスポットが消失したのを確認した後、溶液から溶媒を除去した。メタノールで再溶解した後、HPLC を用いて5-HFA ester (1) を精製した。

同様に、シナピン酸 (2) やカフェ酸 (5)、3,4,5-THCA (9) のメチル化を試みた。シナピン酸 (2) からシナピン酸メチルエステル (sinapic acid methyl ester; SA ester) (3) と 3,4,5-トリメトキシ桂皮酸メチルエステル (3,4,5-trimethoxy cinnamic acid methyl ester; 3,4,5-TMCA ester) (12) を、カフェ酸 (5) からカフェ酸メチルエステル (caffeic acid methyl ester; CfA ester) (6) とイソフェルラ酸メチルエステル (isoferulic acid methyl ester; IFA ester) (8)、ジメトキシ桂皮酸メチルエステル (dimethoxycinnamic acid methyl ester; DMCA ester) (11) を、3,4,5-THCA (9) から 3,4,5-トリヒドロキシ桂皮酸メチルエステル (3,4,5-trihydroxycinnamic acid methyl ester; 3,4,5-THCA ester) (10) を、TMSD 処理によってメチル化した。各化合物の構造式は Fig. 1-3-2 の通りである。

#### 1-3-2-10 統計解析

結果は、平均値 ± 標準偏差で表現した。Student's *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

### 1-3-3 結果

#### 1-3-3-1 構造決定

5-HFA ester (1)、SA ester (3)、5-HFA (4)、CfA ester (6)、IFA ester (8)、3,4,5-THCA (9)、3,4,5-THCA ester (10)、DMCA ester (11)、3,4,5-TMCA ester (12) について、構造解析を実施した (Fig. 1-3-2、Table 1-3-2、1-3-3)。

##### 【5-HFA ester (1)】

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.30–7.54 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.30 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.54 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.76 (3H, s)  $\delta$  3.87 (3H, s) にそれぞれ 3H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 2 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  223.0607 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_5$ : 223.0601) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、5-HFA ester (1) と決定した。

##### 【SA ester (3)】

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.39–7.60 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.39 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.60 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.77 (3H, s)  $\delta$  3.87 (6H, s) にそれぞれ 3H 分、6H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 3 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  239.0905 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_5$ : 239.0914) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、SA ester (3) と決定した。

##### 【5-HFA (4)】

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.26–7.52 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.26 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.52 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.87 (3H, s) に 3H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 1 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  209.0448 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_5$ :



209.0445) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{10}H_{10}O_5$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、5-HFA (4) と決定した。

#### 【CfA ester (6)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.24–7.57 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.26 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.55 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.76 (3H, s) に 3H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 1 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  193.0500 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for  $C_{10}H_9O_4$ : 193.0495) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{10}H_{10}O_4$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、CfA ester (6) と決定した。

#### 【IFA ester (8)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.31–7.57 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.31 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.57 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.76 (3H, s)、 $\delta$  3.89 (3H, s) にそれぞれ 3H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 2 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。ここで、上記の条件を満たし、かつ、カフェ酸のメチル化により生成する可能性のある化合物として、FA ester と IFA ester の 2 種類が考えられることから、 $^1H$ -NMR スペクトルを、FA ester の  $^1H$ -NMR スペクトルの文献値 [73] と比較したところ、芳香環由来のプロトンにおける化学シフトにわずかな違いが見られた。そこで、 $^{13}C$ -NMR を測定して詳細な構造解析を行った。NMBC において、芳香環に位置するメトキシ基のプロトン ( $\delta_H$  3.89) からのクロスピークが、 $\delta_C$  112.5 (C-5) へは観測されたものの、 $\delta_C$  114.8 (C-2) へは観測されなかったことから、メトキシ基は C-4 に結合していることが考えられた。これらのことから、IFA ester (8) と決定した。

#### 【3,4,5-THCA (9)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.18–7.45 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.18 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.45 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、芳香環由来のシグナルが  $\delta$  6.60 (2H, s) に 2H 分見られたことから、本化合物は等価なプロトンを 2 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  195.0294 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for  $C_9H_7O_5$ :

195.0288) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_9H_8O_5$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、3,4,5-THCA (9) と決定した。

#### 【3,4,5-THCA ester (10)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.22–7.46 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.22 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.46 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、芳香環由来のシグナルが  $\delta$  3.75 (3H, s) に 3H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 1 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。これらのことから、3,4,5-THCA ester (10) と決定した。

#### 【DMCA ester (11)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.40–7.62 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.40 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.62 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、芳香環由来のシグナルが  $\delta$  3.77 (3H, s)、 $\delta$  3.86 (3H, s)、 $\delta$  3.86 (6H, s) にそれぞれ 3H 分、6H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 3 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。これらのことから、DMCA ester (11) と決定した。

#### 【3,4,5-TMCA ester (12)】

$^1H$ -NMR スペクトルにおいて、積分値より  $\delta$  6.49–7.63 付近に二重結合または芳香環由来のシグナルが観測され、 $\delta$  6.49 (1H, d,  $J=16.0$ ) および  $\delta$  7.63 (1H, d,  $J=16.0$ ) の結合定数が 16.0 Hz であることから、二重結合はトランス型であると決定した [72]。また、メトキシ基由来のシグナルが  $\delta$  3.78 (3H, s)、 $\delta$  3.79 (3H, s)、 $\delta$  3.87 (6H, s) にそれぞれ 3H 分、3H 分、6H 分見られたことから、本化合物はメトキシ基を 4 つ有するケイ皮酸構造を有していると推定した。さらに、LC-MS により、 $m/z$  253.1066  $[M+H]^+$  (calcd. for  $C_{13}H_{17}O_5$ : 253.1071) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{13}H_{16}O_5$  と決定した (データは示していない)。これらのことから、3,4,5-TMCA ester (12) と決定した。

#### 1-3-3-2 5-HFA ester (1) の細胞毒性と脂肪細胞分化阻害評価

ワサビ葉メタノール抽出物を分画し、脂肪細胞分化阻害活性のある成分を探索した。5-HFA ester (1) は、酢酸エチル抽出分画から単離した。5-HFA ester (1) の細胞毒性と脂肪細胞分化阻害活性を検証したところ、細胞毒性を示さない 25–100  $\mu$ M で、濃度依存的に脂肪蓄積を減少させた (Fig. 1-3-3)。5-HFA ester (1)

の脂肪細胞分化阻害活性の  $IC_{50}$  は、 $63 \mu\text{M}$  であった。

#### 1-3-3-3 LC-MS 定量評価

5-HFA ester (1) は、乾燥ワサビ葉に  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  の濃度で含まれていた。定量値は、添加回収試験の結果から得られた 5-HFA ester (1) の回収率 (89.0%) による補正をした結果を示した。

#### 1-3-3-4 mRNA 発現量評価

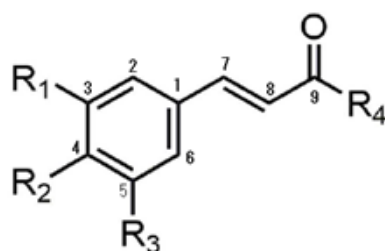
$100 \mu\text{M}$  の 5-HFA ester (1) は、脂肪分化を調節する転写因子である  $\text{PPAR}\gamma$  や  $\text{C/EBP}\alpha$  の mRNA 発現量を有意に抑制した (Fig. 1-3-4A)。脂肪合成関連遺伝子である  $\text{GLUT4}$ 、 $\text{LPL}$ 、ステロール調節エレメント結合タンパク質-1c (sterol regulatory element binding protein-1c;  $\text{SREBP-1c}$ )、 $\text{ACC}$ 、および、 $\text{FAS}$  の mRNA 発現量も有意に抑制した (Fig. 1-3-5)。

#### 1-3-3-5 ウェスタンブロット分析

$100 \mu\text{M}$  の 5-HFA ester (1) が  $\text{PPAR}\gamma$  産生を抑制したことをバンドにて確認した (Fig. 1-3-4B)。

#### 1-3-3-6 フェニルプロパノイド類の脂肪細胞分化阻害評価

オイルレッド O 染色にて、5-HFA (4)、CfA ester (6)、3,4,5-THCA (9)、および、3,4,5-TMCA ester (12) の  $IC_{50}$  は  $100 \mu\text{M}$  より低値を示した。12 種類のフェニルプロパノイドの中で、脂肪細胞分化阻害活性がもっとも高いのは CfA ester (6) であり、 $IC_{50}$  は  $46 \mu\text{M}$  であった。3,4,5-THCA ester (10) と DMCA ester (11) はわずかに活性があったものの、シナピン酸 (2)、SA ester (3)、カフェ酸 (5)、フェルラ酸 (7)、および、IFA ester (8) は活性がなかった (Fig. 1-3-2)。



| compounds | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | IC <sub>50</sub> (μM) |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| <b>1</b>  | OMe            | OH             | OH             | OMe            | 63                    |
| <b>2</b>  | OMe            | OH             | OMe            | OH             | >150                  |
| <b>3</b>  | OMe            | OH             | OMe            | OMe            | >150                  |
| <b>4</b>  | OMe            | OH             | OH             | OH             | 81                    |
| <b>5</b>  | OH             | OH             | H              | OH             | >150                  |
| <b>6</b>  | OH             | OH             | H              | OMe            | 46                    |
| <b>7</b>  | OMe            | OH             | H              | OH             | >150                  |
| <b>8</b>  | OH             | OMe            | H              | OMe            | >150                  |
| <b>9</b>  | OH             | OH             | OH             | OH             | 74                    |
| <b>10</b> | OH             | OH             | OH             | OMe            | 145                   |
| <b>11</b> | OMe            | OMe            | H              | OMe            | 111                   |
| <b>12</b> | OMe            | OMe            | OMe            | OMe            | 91                    |

Fig. 1-3-2. Chemical structures of phenylpropanoid analogs and their IC<sub>50</sub> values of lipid accumulation (%). Sinapic acid (**2**), caffeic acid (**5**), and ferullic acid (**7**) were purchased from Sigma-Aldrich (Tokyo, Japan). 5-HFA (**4**) and 3,4,5-THCA (**9**) were obtained by the demethylation of sinapic acid (**2**) with BBr<sub>3</sub>. 5-HFA ester (**1**) was obtained by the methylation of 5-HFA (**4**), with TMSD. SA ester (**3**), CfA ester (**6**), IFA ester (**8**), 3,4,5-THCA ester (**10**), DMCA ester (**11**), and 3,4,5-TMCA ester (**12**) were synthesized by methylation using TMSD. The IC<sub>50</sub> values of lipid accumulation were calculated as 100% cell viability and are presented as the mean (n = 3).

Table 1-3-2. <sup>1</sup>H-, and <sup>13</sup>C-NMR chemical shifts (δ) of synthesized compounds **1**, **3–4**, **6**, and **8**.

| Position | 5-HFA ester ( <b>1</b> ) | SA ester ( <b>3</b> ) | 5-HFA ( <b>4</b> ) | CfA ester ( <b>6</b> )  | IFA ester ( <b>8</b> )  |                |
|----------|--------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
|          |                          |                       |                    |                         | δ <sub>H</sub>          | δ <sub>C</sub> |
| 1        |                          |                       |                    |                         |                         | 128.9          |
| 2        | 6.73 (1H, d, 2.0)        | 6.90 (2H, s)          | 6.73 (1H, d, 2.0)  | 7.03 (1H, d, 2.0)       | 7.07 (1H, d, 2.0)       | 114.8          |
| 3        |                          |                       |                    |                         |                         | 148.1          |
| 4        |                          |                       |                    |                         |                         | 151.5          |
| 5        |                          |                       |                    | 6.77 (1H, d, 8.0)       | 6.94 (1H, d, 8.0)       | 112.5          |
| 6        | 6.76 (1H, d, 2.0)        | 6.90 (2H, s)          | 6.75 (1H, d, 2.0)  | 6.94 (1H, dd, 8.0, 2.0) | 7.05 (1H, dd, 8.0, 2.0) | 122.7          |
| 7        | 7.54 (1H, d, 16.0)       | 7.60 (1H, d, 16.0)    | 7.52 (1H, d, 16.0) | 7.55 (1H, d, 16.0)      | 7.57 (1H, d, 16.0)      | 146.5          |
| 8        | 6.30 (1H, d, 16.0)       | 6.39 (1H, d, 16.0)    | 6.26 (1H, d, 16.0) | 6.26 (1H, d, 16.0)      | 6.31 (1H, d, 16.0)      | 115.9          |
| 9        |                          |                       |                    |                         |                         | 169.6          |
| 3-OMe    | 3.87 (3H, s)             | 3.87 (6H, s)          | 3.87 (3H, s)       |                         |                         |                |
| 4-OMe    |                          |                       |                    |                         | 3.89 (3H, s)            | 56.4           |
| 5-OMe    | 3.87 (3H, s)             | 3.87 (6H, s)          |                    |                         |                         |                |
| 9-OMe    | 3.76 (3H, s)             | 3.77 (3H, s)          |                    | 3.76 (3H, s)            | 3.76 (3H, s)            | 52.0           |

Data were recorded at 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD.

*J*- values are given in parentheses.

Abbreviations: 5-HFA ester, 5-hydroxyferulic acid methyl ester; SA ester, sinapic acid methyl ester;

5-HFA, 5-hydroxyferulic acid; CfA ester, caffeic acid methyl ester; IFA ester, isoferulic acid methyl ester

Table 1-3-3. <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts (δ) of synthesized compounds **9–12**.

| Position | 3,4,5-THCA ( <b>9</b> ) | 3,4,5-THCA ester ( <b>10</b> ) | DMCA ester ( <b>11</b> ) | 3,4,5-TMCA ester ( <b>12</b> ) |
|----------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| 1        |                         |                                |                          |                                |
| 2        | 6.60 (2H, s)            | 6.60 (2H, s)                   | 7.20 (1H, d, 2.0)        | 6.93 (2H, s)                   |
| 3        |                         |                                |                          |                                |
| 4        |                         |                                |                          |                                |
| 5        |                         |                                | 6.96 (1H, d, 8.4)        |                                |
| 6        | 6.60 (2H, s)            | 6.60 (2H, s)                   | 7.15 (1H, dd, 8.4, 2.0)  |                                |
| 7        | 7.45 (1H, d, 16.0)      | 7.46 (1H, d, 16.0)             | 7.62 (1H, d, 16.0)       | 7.63 (1H, d, 16.0)             |
| 8        | 6.18 (1H, d, 16.0)      | 6.22 (1H, d, 16.0)             | 6.40 (1H, d, 16.0)       | 6.49 (1H, d, 16.0)             |
| 9        |                         |                                |                          |                                |
| 3-OMe    |                         |                                | 3.86 (3H, s)             | 3.87 (6H, s)                   |
| 4-OMe    |                         |                                | 3.86 (3H, s)             | 3.80 (3H, s)                   |
| 5-OMe    |                         |                                |                          | 3.87 (6H, s)                   |
| 9-OMe    |                         | 3.75 (3H, s)                   | 3.77 (3H, s)             | 3.78 (3H, s)                   |

Data were recorded at 400 MHz in CD<sub>3</sub>OD.

*J*- values are given in parentheses.

Abbreviations: 3,4,5-THCA, 3,4,5-trihydroxycinnamic acid; 3,4,5-THCA ester, 3,4,5-trihydroxycinnamic acid methyl ester; DMCA ester, dimethoxycinnamic acid methyl ester; 3,4,5-TMCA ester, 3,4,5-trimethoxy cinnamic acid methyl ester

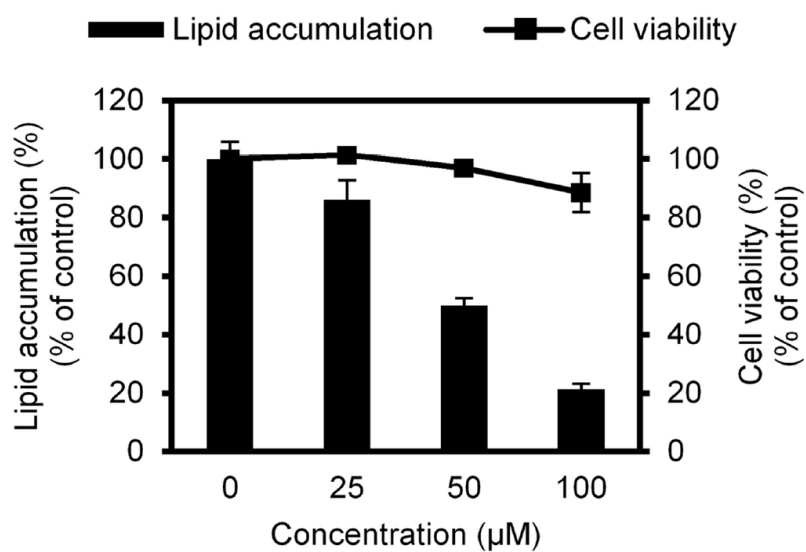


Fig. 1-3-3. Effect of 5-HFA ester (**1**) on lipid accumulation and cell viability in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 25–100 μM 5-HFA ester (**1**) for 8 days. Cell viability was evaluated using a Cell Counting Kit-8 on day 8. The intracellular lipid accumulation was measured by Oil Red O staining on day 9. The results are expressed as a percentage relative to that of control cells and are presented as mean ± S.D. (n = 3).

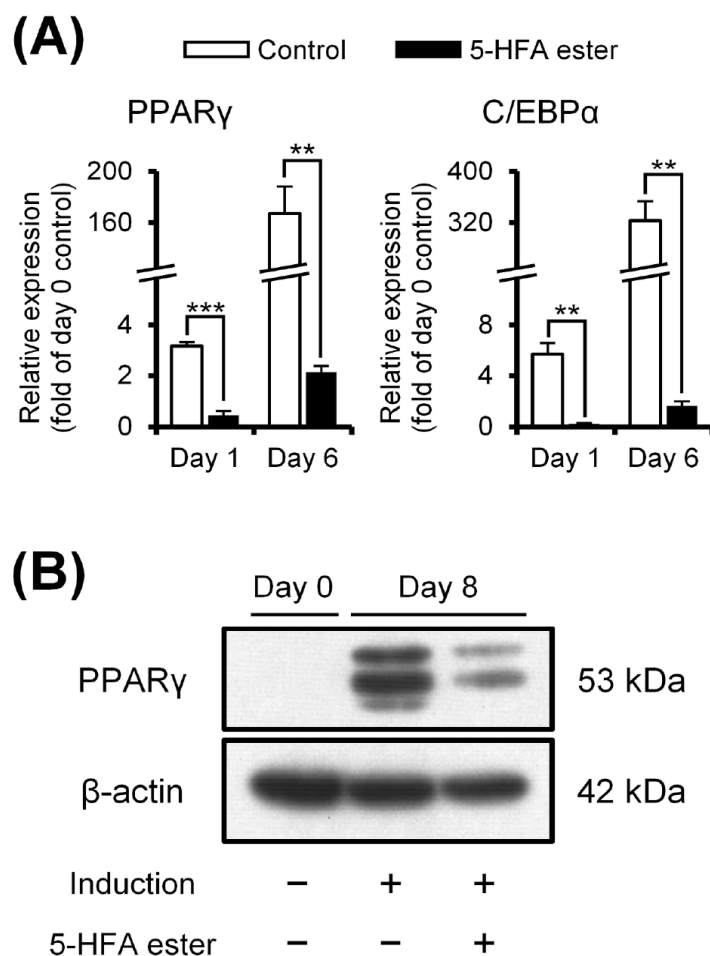


Fig. 1-3-4. Effect of 5-HFA ester (**1**) on the expression of adipocyte differentiation-related genes in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 100  $\mu$ M 5-HFA ester (**1**) for 8 days. (A) Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells on days 1 and 6. The mRNA expression levels of adipocyte differentiation-related genes, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , were analyzed by RT-PCR and normalized to  $\beta$ -actin. The results are expressed relative to the levels of uninduced cells (day 0 control) and are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001, compared with the control. (B) Total cellular proteins were extracted from 3T3-L1 cells on day 8. The level of PPAR $\gamma$  protein expression was analyzed by western blotting.



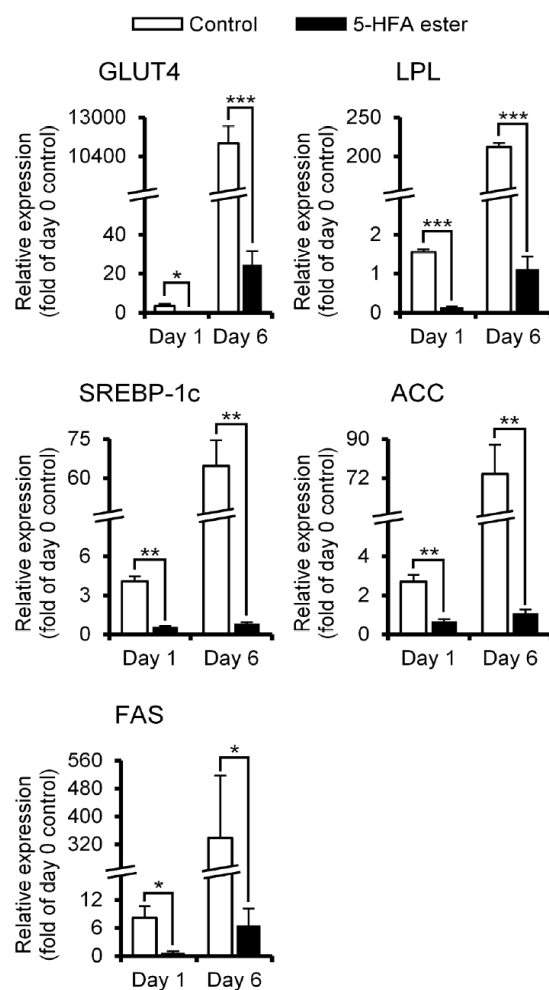


Fig. 1-3-5. Effect of 5-HFA ester (**1**) on the expression of adipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells were incubated with 100  $\mu$ M 5-HFA ester (**1**) for 6 days. Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells on days 1 and 6. The mRNA expression levels of adipogenesis-related genes, GLUT4, LPL, SREBP-1c, ACC, and FAS, were analyzed by RT-PCR and normalized to  $\beta$ -actin. The results are expressed relative to the levels of uninduced cells (day 0 control) and are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001, compared with the control.

#### 1-3-4 考察

本項において、ワサビ葉成分 5-HFA ester (1) が脂肪細胞分化阻害活性を示すことを確認した。PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  は、脂肪細胞分化を調節する転写因子であるが、5-HFA ester (1) はこれらの mRNA 発現を抑制した。さらに、5-HFA ester (1) は PPAR $\gamma$  産生も抑制した。以上により、5-HFA ester (1) が PPAR $\gamma$  産生を調節することにより、分化阻害効果を発揮したことが示された。しかし、5-HFA ester (1) が直接的に PPAR $\gamma$  に作用するかは明らかではない。C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、KLF ファミリー、GATA ファミリー等の PPAR $\gamma$  の上流に局在化している遺伝子発現を評価することにより、5-HFA ester (1) の標的分子を明らかにする必要がある [74]。Ilavenil ら [75] は、5-HFA ester (1) の類縁体であるクマル酸が PPAR $\gamma$ 2 の発現を減少させたため、クマル酸と PPAR $\gamma$ 2 の受容体ドメインによる水素結合、および、疎水性相互作用の可能性のあることを報告した。本項にて脂肪細胞分化阻害活性を確認した各成分が、同様のメカニズムを有する可能性がある。

5-HFA ester (1) は、GLUT4、LPL、SREBP-1c、ACC、FAS 等の脂肪生成に関連する遺伝子の mRNA 発現を阻害した。Ji ら [76] は、SREBP-1c の発現量が増えると、PPAR $\gamma$  の活性化を誘導することを報告した。そのため、5-HFA ester (1) が SREBP-1c に作用した可能性がある。SREBP-1c はインスリンからのシグナルによって調節される [77]。5-HFA ester (1) による SREBP-1c 調節因子に対する作用を検証することで、分子メカニズムが明らかになると考えられる。

5-HFA ester (1) と類縁体について、脂肪分化阻害活性を比較したところ、カテコール構造やベラトロール構造等のオルト位に共通の官能基を有している構造を含む分子に活性があることが明らかとなった。しかしながら、Nishina ら [78] は、カテコール構造を含むフラボノイド類について、ルテオリンが 3T3-L1 細胞の脂肪蓄積を抑制したのに対して、トリセチンが脂肪蓄積を促進したことを報告した。そのため、様々な分子骨格を有する化合物に適応する構造活性相関を検討する必要があることが考えられた。フェニルプロパノイド類においては、活性の強さは、CfA ester (6) と 3,4,5-THCA ester (10) のように、官能基の数に依存して変化していた。さらに、カフェ酸 (5) と CfA ester (6) のように、カルボキシル基の構造的違いによっても、活性の強さが変化していた。そのため、活性の強さはカテコール基やベラトロール基による影響だけでなく、全体的な極性にも依存することが示された。Jumam ら [79] は、各 4  $\mu$ M のカフェ酸 6-フェニルヘキシルエステルとカフェ酸デシルエステルが、脂肪蓄積を 46% と 75% 阻害することを報告した。さらに、4  $\mu$ M の 3,4,5-トリヒドロキシ桂皮酸ドデシルエステルは脂肪蓄積を 84% 抑制した。以上により、長いアルキル鎖を有するカルボキシル基に置換することで、活性が強くなることが考えられた。カフェ酸誘導体は、ワサビ葉に配糖体として存在する [32]。そのため、より活性の高

い脂肪細胞分化阻害成分を見出すには、ワサビ葉の抽出条件や試料処理等に関する研究が必要である。

5-HFA ester (1) について、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化阻害活性だけでなく、分化誘導後に脂肪蓄積を抑制する効果があるかを検証した。分化誘導後、脂肪滴の蓄積を顕微鏡にて確認した後、5-HFA ester (1) を添加して培養したところ、細胞毒性を示さなかった濃度で脂肪蓄積量を減らした。その IC<sub>50</sub> は 197 μM であった (データは示していない)。すなわち、5-HFA ester (1) は、成熟脂肪細胞の脂肪蓄積を抑制する。Oowatari ら [48] は、ワサビ葉の熱水抽出物をメタボリックシンドロームモデルである SHRSP/ZF ラットに摂取させたところ、体重増加が抑制され、精巣上体 WAT の PPAR $\gamma$  やその下流の LPL や FAS 等の mRNA 発現量が減少したことを報告した。精巣上体 WAT の重量は、熱水抽出物群とコントロール群に有意差が見られなかったものの、熱水抽出物摂取により精巣上体 WAT の脂肪細胞のサイズが有意に小さくなる結果が得られていた。さらに、第 2 項においては、WLE を含む高脂肪食を Wistar ラットに摂取させたところ、腸間膜 WAT の重量は、WLE 群と高脂肪食群で有意差が見られなかったものの、WLE 摂取により脂肪細胞のサイズが有意に小さくなっていった。これらの脂肪細胞が小型化する現象において、5-HFA ester (1) による前駆脂肪細胞に対する分化阻害活性、および/または、成熟脂肪細胞に対する脂肪蓄積抑制活性が関与した可能性が考えられる。

5-HFA ester (1) は、脂肪分化阻害活性や脂肪蓄積抑制活性を有するものの、その含有量は低く、乾燥ワサビ葉で  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  であった。そのため、5-HFA ester (1) 以外にも、WLE やワサビ葉熱水抽出物等の粗抽出物の活性に関与する有効成分が含有されている可能性が考えられる。5-HFA ester (1) を含まない分画物のいくつかは、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化阻害活性を示したことを確認しており (データは示していない)、今後、これらの分画物に含まれる有効成分の同定が必要である。ワサビ葉にイソオリエンチンやルテオリン等のフラボノイド類が含まれることが報告されている [35]。Poudel ら [80] は、イソオリエンチン、ルテオリン等のフラボノイド類が、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化を阻害し、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、SREBP-1c 等の転写因子やその下流の activating protein-2、FAS、HSL、および、LPL の mRNA の発現を抑制することを報告した。PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、および、FAS に関しては、タンパク質の発現も抑制した。さらに、Nishina ら [78] は、ルテオリンと分化誘導剤を 3T3-L1 前駆脂肪細胞に添加したところ、PPAR $\gamma$ 、C/EBP、SREBP-1c、FAS、GLUT4 等の mRNA 発現、GLUT4 タンパク質の産生、および、脂肪蓄積が抑制されたことを報告した。そのため、有効成分未同定の分画物において、可能性の 1 つとしてイソオリエンチンやルテオリンが有効成分であることが考えられる。一方、ワサビ葉の有効成分が相加的もしくは相乗

的に効果を発揮した可能性もあるため、複数の成分を同時添加することで、その効果を確認する手段もある。

本項では、3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた検証を実施したところ、ワサビ葉に存在する 5-HFA ester (1) が、脂肪細胞分化を阻害することを確認した。第 2 項の動物試験では、BAT における *Adrb3* の mRNA 発現量上昇等の効果があったため、有効成分が褐色脂肪細胞に作用する可能性が考えられた。そこで第 4 項では、褐色脂肪細胞を用いて、脂肪蓄積抑制成分の検証を試みた。

## 第4項 褐色脂肪細胞を用いた脂肪蓄積抑制成分の探索

### 1-4-1 背景と目的

第3項で 5-HFA ester を有効成分として同定したが、ワサビ葉における含有量が乾燥葉で  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  と低いため、他の分子メカニズムを介した経路や有効成分が存在する可能性が示唆された。第2項の動物試験では、肩甲骨間 BAT の ADRB3 mRNA 発現量が上昇したため、有効成分が褐色脂肪細胞に作用する可能性が考えられる。

従来、ヒト成人には BAT が存在していないと言われていた。しかし、近年、フルオロデオキシグルコース-陽電子放射断層撮影 (fluorodeoxyglucose-positron emission tomography) 検査によりヒト成人に BAT が存在することが明らかにされており、カプサイシン類縁体であるカプシエイトが BAT を介してエネルギー消費量を高めることが報告されている [81, 82]。第2項の結果から WLE にもカプシエイトと同様の効果が期待される。そこで本項では、まずは有効成分を検証するため、褐色脂肪細胞を用いた試験を試みた。

### 1-4-2 方法

#### 1-4-2-1 試料

Okamoto ら [31] の方法に従って、WLE を作製した。イソサポナリン (isosaponarin) は、Nagai ら [34] の方法に従って、ワサビ葉から単離した。5-HFA ester と SA ester は、第3項で合成したものを使用した。その他試薬類は、試薬一覧の通り入手した。

#### 1-4-2-2 HPLC 定性評価

WLE 20 mg に 50% エタノール 2 mL を添加し、よく攪拌した。上清を  $0.20 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過し、HPLC に注入した。使用した標準品と分析条件は以下の通りとした。標準品は、ワサビ葉に存在することが報告されている成分を使用した [28, 32, 35]。

#### 【標準品】

アピゲニン (apigenin)  
イソオリエンチン (isorientin)  
イソサポナリン (isosaponarin)  
イソビテキシン (isovitexin)  
シナピン酸 (sinapic acid)

フェルラ酸 (ferulic acid)

ルテオリン (luteolin)

5-HFA ester

SA ester

#### 【HPLC 条件】

column: Dverosil packed column C30-UG-3 (2.0 × 150 mm, 3 μm; Nomura Chemical)

eluent: A) H<sub>2</sub>O (0.1 % formic acid)、B) methanol

2 % B (0–5 min)、2–30 % B (5–180 min)、30–95 % B (180–222.6 min)

flow rate: 0.2 mL/min

injection: 4 μL

column temperature: 40°C

detection: 254 nm (photo diode array detector 210–400 nm)

#### 1-4-2-3 細胞毒性評価

初代褐色脂肪細胞(ラット、生後2–4日齢)を専用の増殖用培地に浮遊させた。これを96ウェルプレートに $0.7 \times 10^4$  cells/wellの濃度で播種した後、CO<sub>2</sub>インキュベータ内(5 % CO<sub>2</sub>、37°C)で2日間培養した。試料を含む増殖用培地に培地交換し、さらに2日間培養した。主に高濃度のウェルで、試料の析出や着色が見受けられた。吸光度への影響を取り除くため、試料を含まない増殖用培地に培地交換(100 μL/well)した後、WST-8を10 μL/wellの濃度で添加して90分間培養した。マイクロプレートリーダーを用い、450 nmにおける吸光度を測定した。測定値は使用培地のブランク吸光度として0.2を引き、各プレートのコントロールの生存率を100 % として各試料の生存率を算出した。生存率の参考資料として、顕微鏡写真を撮影した。

#### 1-4-2-4 mRNA 発現量評価

ポジティブコントロールとして1 μM のノルアドレナリン (noradrenaline (別名 (-)-norepinephrine(+)-bitartrate salt hydrate) ; NA) を用い、褐色脂肪細胞の培養マニュアルに従って実験を実施した。褐色脂肪細胞を増殖用培地に浮遊させた後、24 ウェルプレートに $3.0 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種した。CO<sub>2</sub>インキュベータ内(5 % CO<sub>2</sub>、37°C)で3日間培養した後、分化誘導用培地に交換した。さらに2日間培養した後、試料を含む脂肪細胞維持培地に培地交換した。その2日間後も培地交換を実施し、さらに1日間培養した後、0.2 mL/well の TRI Reagent を用いて細胞から total RNA を抽出した。その後、SuperScript VILO cDNA Synthesis kit を用いて total RNA 500 ng を cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR

は、95°C、10 分間の加熱により DNA ポリメラーゼを活性化した後、95°C、10 秒間と 60°C、30 秒間、72°C、1 秒間のサイクルを 45 回繰り返した。PCR プライマーの塩基配列は以下の通りとした。

#### UCP1

フォワード (5'-3') : gcctgcctagcagacatcat

リバース (5'-3') : tggccttcaccttgatct

#### Adrb3

フォワード (5'-3') : tggaggaagctgacagaat

リバース (5'-3') : tagggcttgggagcgact

#### GAPDH

フォワード (5'-3') : aatgtatccgttgatctga

リバース (5'-3') : gcttcaccaccttctgatgt

GAPDH は内部標準として使用した。

#### 1-4-2-5 脂肪蓄積量評価

1-4-2-4 と同様に培養した後、オイルレッド O 染色を実施した。オイルレッド O 染色は、リピットアッセイキットの取扱説明書の通り実施した。キット付属の抽出液を 0.5 mL/well 添加した後、96 ウェルプレートに各 0.1 mL 取り分け、540 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。コントロールを 100 % とした相対値を算出した。

#### 1-4-2-6 統計解析

結果は、平均値 ± 標準偏差で表現した。Student's *t* 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

#### 1-4-3 結果

##### 1-4-3-1 HPLC 定性評価

保持時間と UV 吸収スペクトルを、各標準品と WLE で照合したところ、WLE の 3 つのメインピークがイソサポナリン、イソビテキシン、および、イソオリエンチンであることを同定した (Fig. 1-4-1)。他のピークは、HPLC 分析に供した標準品と保持時間が一致しなかったり、ピークが小さいことにより UV 吸収

スペクトルが判別できないといった理由で、同定できなかった。イソサポナリン、イソビテキシン、および、イソオリエンチンは、全てフラボノイド類の配糖体であった。イソビテキシンはアピゲニンの C-配糖体であり、イソサポナリンはイソビテキシンの B 環 4'位に O-配糖体が結合した構造であり、イソオリエンチンはルテオリンの C-配糖体である (Fig. 1-4-2)。前述の通り、アピゲニンとルテオリンはワサビ葉に存在することが報告されている [35]。そこで、細胞試験には、これらの計 5 成分を用いることとした。

#### 1-4-3-2 細胞毒性評価

イソオリエンチンを除いた4成分において、高濃度のウェルでの生存率上昇が観察された (Fig. 1-4-3)。主に高濃度のウェルで見受けられた試料の析出や着色による吸光度への影響を取り除くため、試料を含まない増殖用培地に培地交換したものの、その影響が残っていたことが考えられた。そこで、顕微鏡観察における細胞の形態 (データは示していない) と生存率の平均値 (Fig. 1-4-3) から細胞毒性を評価し、細胞毒性のない上限濃度を、イソサポナリンとイソビテキシンで1000  $\mu$ M、アピゲニンで20  $\mu$ M、イソオリエンチンで500  $\mu$ M、ルテオリンで0.8  $\mu$ Mと判定した。

#### 1-4-3-3 mRNA発現量評価

コントロールの顕微鏡観察より、褐色脂肪細胞が問題なく増殖、分化し、脂肪滴を蓄積していることを確認した (データは示していない)。UCP1 mRNA発現量は、NA、および、全成分において有意な上昇があった (Fig. 1-4-4)。Adrb3 mRNA発現量は、NA、および、全成分において有意な変化はなかった (データは示していない)。

#### 1-4-3-4 脂肪蓄積量評価

脂肪蓄積量はイソビテキシン、イソオリエンチン、および、ルテオリンで有意な減少があった (Fig.1-4-5)。特にイソビテキシンとルテオリンは、濃度依存的な効果であった。NA ( $p = 0.053$ )、イソサポナリン、および、アピゲニンに有意な減少はなかった。



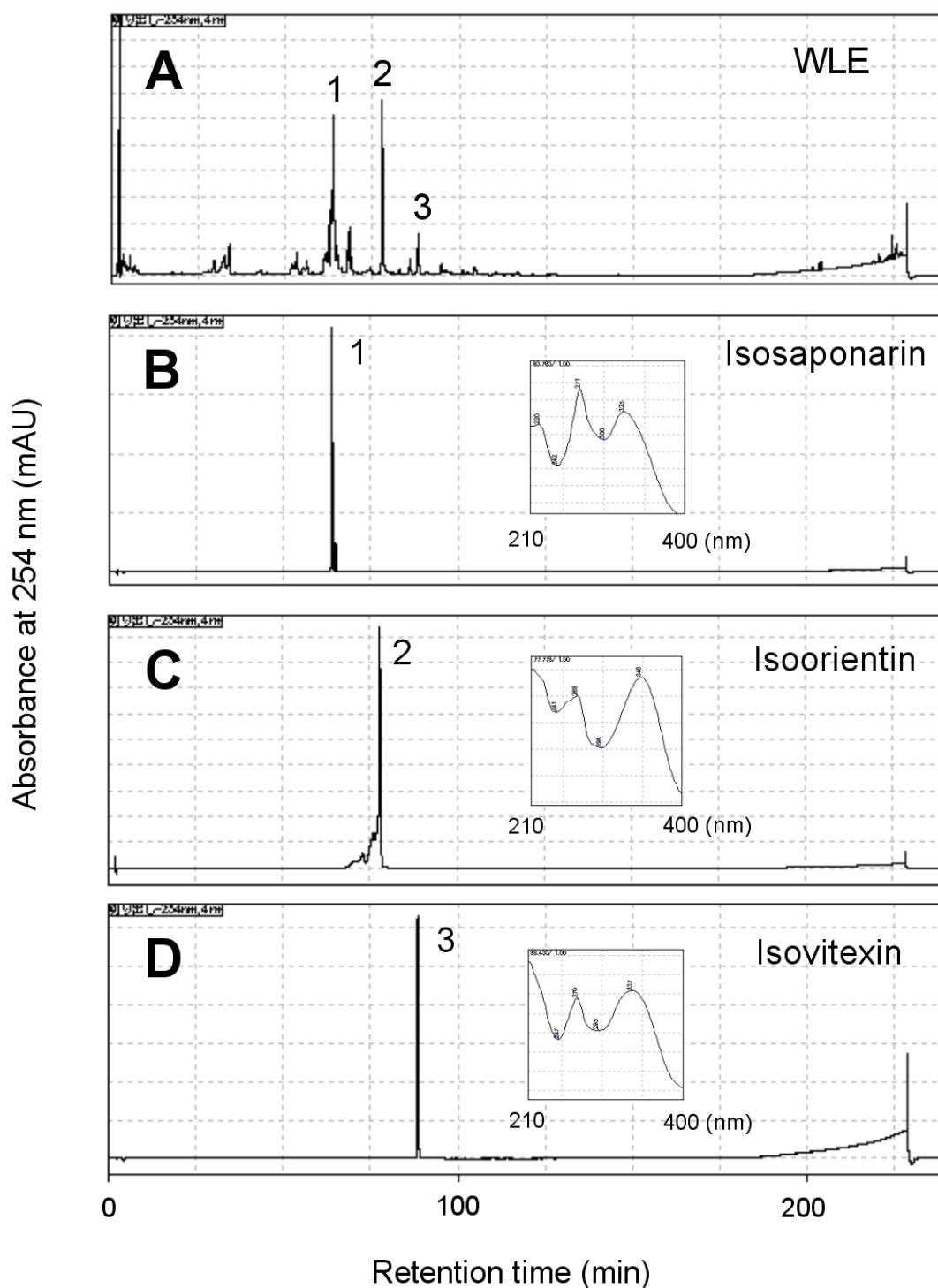
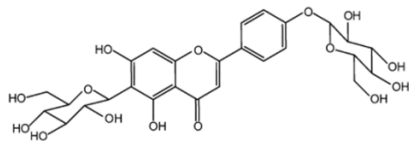
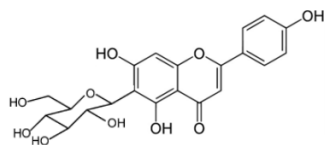


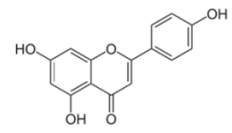
Fig. 1-4-1. HPLC analysis of WLE (A), isosaponarin (B), isoorientin (C), and isovitexin (D). Samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with C30 column and UV detector. Three major peaks were identified with the retention time and UV spectrum of reference standards.



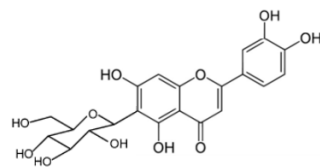
Isosaponarin



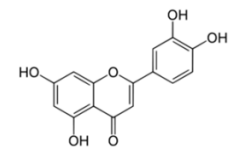
Isovitexin



Apigenin



Isoorientin



Luteolin

Fig. 1-4-2. Chemical structures of wasabi leaf flavonoids.

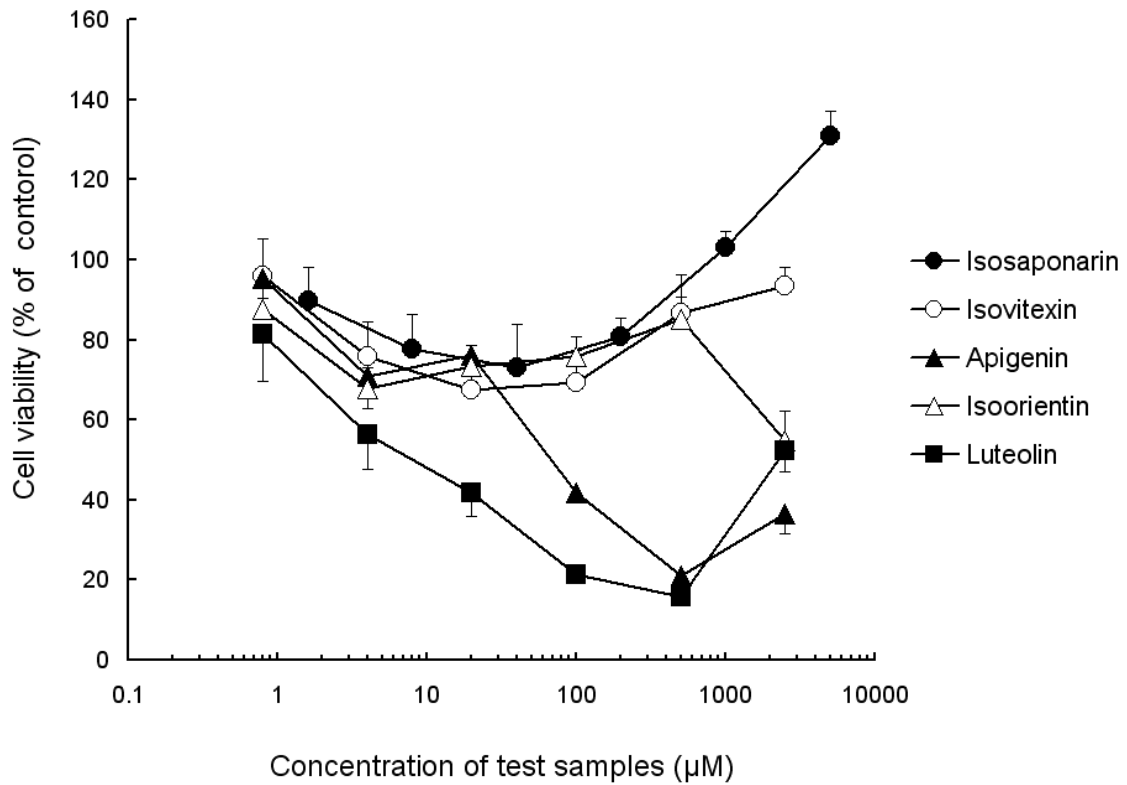


Fig. 1-4-3. Effects of wasabi leaf flavonoids on cell viability in brown adipocytes. The brown adipocytes incubated with test samples. Cell viability was evaluated using a Cell Counting Kit-8. The results are expressed as a percentage relative to that of control cells and are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

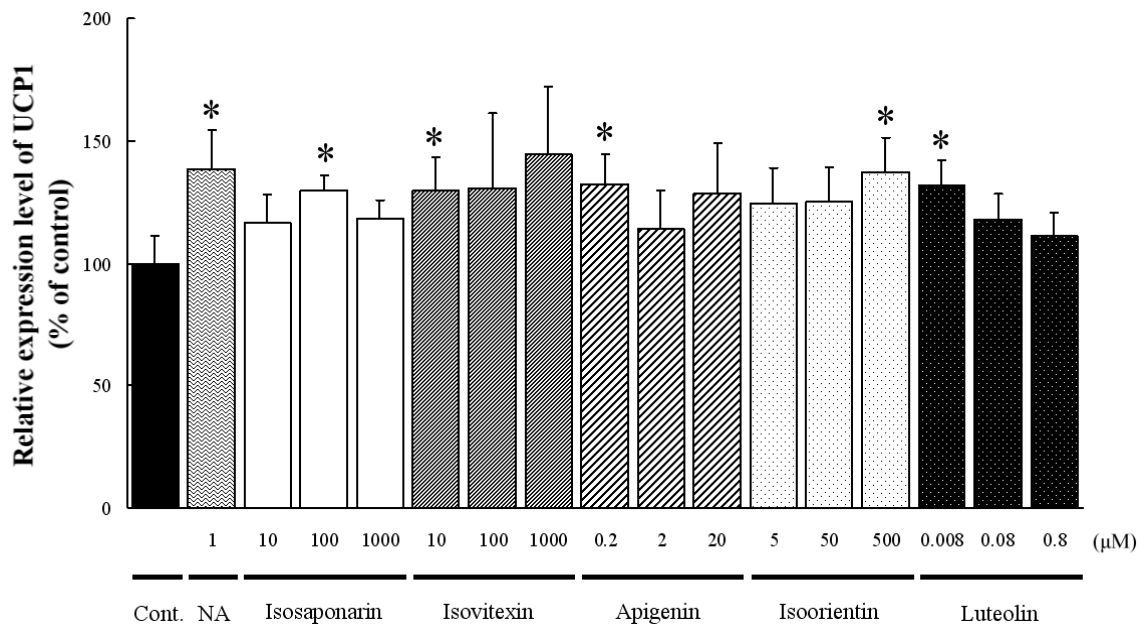


Fig. 1-4-4. Effects of wasabi leaf flavonoids on the expression of UCP1 mRNA in brown adipocytes. The differentiated brown adipocytes incubated with test samples. The mRNA expression levels of UCP1 was analyzed by real time PCR and normalized to GAPDH. The results are expressed as a percentage relative to that of control cells and are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistically significant difference (Student's *t*-test) are indicated as \* $p < 0.05$  when compared with the control value. Cont.: control, NA: noradrenaline.

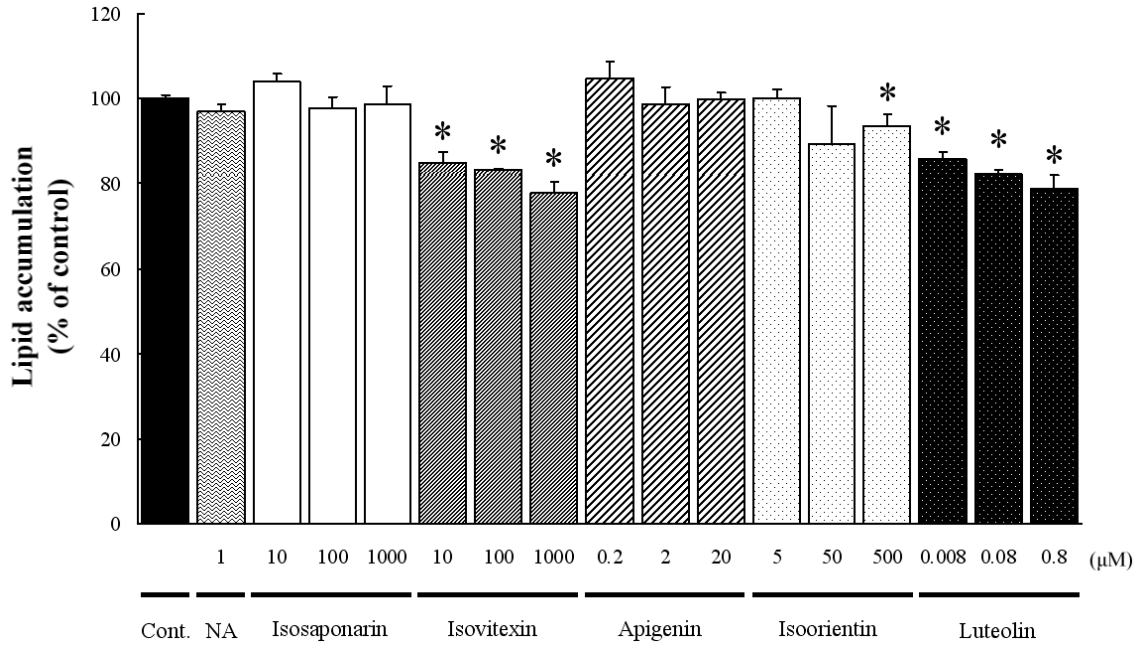


Fig. 1-4-5. Effects of wasabi leaf flavonoids on lipid accumulation in brown adipocytes. The differentiated brown adipocytes incubated with test samples. The intracellular lipid accumulation was measured by Oil Red O staining. The results are expressed as a percentage relative to that of control cells and are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Statistically significant difference (Student's *t*-test) are indicated as \* $p < 0.05$  when compared with the control value. Cont.: control, NA: noradrenaline.

#### 1-4-4 考察

白色脂肪細胞が余剰のエネルギーを脂肪として貯蔵するのに対し、褐色脂肪細胞は脂肪を酸化分解して体温を維持するとともに、余剰エネルギーを消費する。交感神経刺激により *Adrb3* が PKA を活性化すると、PKA は HSL を活性化する。HSL は脂肪細胞に蓄えられた脂肪を遊離する。それによって生じた FFA は、酸化分解されて熱産生の基質として利用されるとともに、UCP1 のリガンドとして脱共役を直接的に活性化する (Fig.1-2-1) [83]。

本項ではまず、ワサビ葉フラボノイド類であるイソサポナリン、イソビテキシン、アピゲニン、イソオリエンチン、および、ルテオリンが、褐色脂肪細胞に対して脂肪蓄積抑制活性を示すか検証した。脂肪蓄積量はイソビテキシン、イソオリエンチン、および、ルテオリンで有意な減少があった (Fig.1-4-5)。特にイソビテキシンとルテオリンは、濃度依存的な効果であった。その一方で、*Adrb3* mRNA 発現量については、どの成分においても上昇は見られなかった (データは示していない)。そのため、イソビテキシン、イソオリエンチン、および、ルテオリンによる脂肪蓄積抑制活性は、*Adrb3* mRNA 発現上昇を介さない分子メカニズムである可能性が考えられる。

NA の刺激が持続すると、*Adrb3* や PKA、cAMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element binding protein; CREB) を介して UCP1 mRNA 発現を上昇させるが (Fig.1-2-1) [83, 84]、本項においても、NA は UCP1 mRNA 発現を有意に上昇させた (Fig. 1-4-4)。UCP1 mRNA 発現量は、本項の試験に供した全てのワサビ葉フラボノイド類においても、有意な上昇が認められた (Fig. 1-4-4)。それゆえに、UCP1 タンパク質も上昇した可能性がある。その一方で、イソビテキシン、イソオリエンチン、および、ルテオリンには有意な脂肪蓄積抑制活性があったため (Fig.1-4-5)、褐色脂肪細胞において脂肪生成より脂肪分解が上回っていたことが考えられる。脂肪分解は、脂肪細胞に蓄えられた脂肪が遊離し、FFA に変換されることで生じる。FFA は、酸化分解されて熱産生の基質として利用されるとともに、UCP1 のリガンドとして脱共役を直接的に活性化する (Fig.1-2-1) [83]。本研究において、ワサビ葉フラボノイド類による UCP1 タンパク質と FFA の上昇が可能性の 1 つとして考えられ、これらの上昇が熱産生を誘導し、抗肥満効果を発揮するかもしれない。

UCP1 mRNA 発現上昇が見られたことから、ワサビ葉フラボノイド類が細胞内に取り込まれ可能性がある。膜の両側に物質の濃度差があるとき、その濃度勾配に従って物質が移動する減少を単純拡散というが、細胞膜は脂質二重膜で構成されているため、脂溶性が高い成分ほど、膜を通過しやすくなる。Takano-Isikawa ら [85] は、フラボノイド類を用いて、ラット腹腔マクロファージにおけるプロスタグランジン E2 の産生阻害効果を検証したところ、配糖体よ

りもアグリコンの方が  $IC_{50}$  が低く、強い活性であったことから、細胞膜透過性が活性の違いの一因である可能性を示した。これらの現象は、配糖体に対するアグリコンの脂溶性の高さが関係していることが考えられる。本項においても、ワサビ葉フラボノイド類による脂肪蓄積抑制や UCP1 mRNA 発現上昇は、配糖体と比較してアグリコンで、低濃度で作用していた (Fig.1-4-4、1-4-5)。そのため、これらの効果を発揮する要因の 1 つとして、アグリコンの高い細胞膜透過性が考えられた。今後、ワサビ葉フラボノイド類による褐色脂肪細胞への細胞膜透過性について、単純拡散の他、トランスポーターを介する可能性等、細胞膜通過機構に対する検証が必要である。

本項では、NA 処理により UCP1 mRNA 発現量が有意に上昇するよう条件を調整し、その条件で mRNA 発現量や脂肪蓄積量を評価した。その結果、1  $\mu$ M の NA が UCP1 mRNA 発現を有意に上昇させたものの、脂肪蓄積抑制活性に有意な減少は見られなかった ( $p = 0.053$ )。本項にて褐色脂肪細胞に NA を 3 日間処理した後にオイルレッド O 染色を実施したのに対して、Harmelen ら [86] は、大網等の白色脂肪細胞に NA 処理した 2 時間後、脂肪分解の指標としてグリセロール濃度が上昇することを報告した。今後、ワサビ葉フラボノイド類の評価において、NA 処理条件を詳細に探索した上での脂肪蓄積量を検証や、分子メカニズム解明の 1 つとして、脂肪分解能を検証する必要がある。

フラボノイド類の配糖体を摂取すると、大部分は糞中に排泄されるが [87]、小腸上皮細胞や腸内細菌に存在している  $\beta$ -グルコシダーゼ等によって加水分解され、アグリコンとなることが報告されている [88]。配糖体の多くは、基質の水酸基に糖が結合した O-配糖体であり、これらは加水分解によりアグリコンとなる [89]。一方、天然には基質の炭素に糖が直接 C-C 結合した C-配糖体が存在しており、これらはグルコシダーゼや酸による糖部の加水分解を受けないため、O-配糖体等と比べると極めて安定である [89]。イソビテキシンとイソオリエンチンは C-配糖体を、イソサポナリンは C-配糖体と O-配糖体を有している

(Fig.1-4-2)。Sun ら [90] は、イソビテキシンを含む廣金錢草の抽出物を経口投与させたラット血漿において、これらのフラボノイド類を高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometer; LC-MS/MS) を用いて検出したことを報告した。以上のことから、イソビテキシンとイソオリエンチンは配糖体の形で吸収され、その後、褐色脂肪細胞に作用する可能性がある。一方、イソサポナリンにおいては、C-配糖体は加水分解を受けにくい、O-配糖体は加水分解されやすいため、イソビテキシンの形で吸収される可能性がある。フラボノイドアグリコンは、小腸での吸収された後、酵素によってグルクロン酸や硫酸が結合し、その大部分が抱合体になるが [91]、Simoi ら [92] はヒトにルテオリンを摂取させたところ、血清中にルテオリンの

モノグロクロニドの他、遊離のルテオリンが存在することを報告した。さらに、同じくラット血漿において、遊離のアピゲニンが検出された報告もあるため [90]、これらのアグリコンが遊離の状態では褐色脂肪細胞に作用する可能性がある。今後、グルコシダーゼによる加水分解、吸収性、抱合体化等を含め、ヒトに摂取した場合の抗肥満効果を総合的に検証する必要がある。

Hosoya ら [35] は、ワサビ葉からフラボノイド類を単離、同定したことを報告した。ワサビ葉 7.0 kg からの単離量は、イソサポナリンで 7.5 mg、イソビテキシンで 58.6 mg、アピゲニンで 3.5 mg、イソオリエンチンで 41.7 mg、ルテオリンで 7.4 mg であった。本研究では、イソビテキシンとルテオリンには濃度依存的な脂肪蓄積抑制効果があった (Fig. 1-4-5)。イソビテキシンの抽出効率を上げるには、抽出溶媒の水溶性を高める必要があり、反対に、ルテオリンの場合は脂溶性を高める必要がある。これらの抽出工程を組み合わせることで、ワサビ葉素材の抗肥満効果がより高くなることが考えられる。

本項では褐色脂肪細胞を用いて、ワサビ葉の抗肥満効果における有効成分を検証した。その結果、イソビテキシン、イソオリエンチン、および、ルテオリンが脂肪蓄積を抑制することと、これら 3 成分の他、イソサポナリン、アピゲニンを含む 5 成分が UCP1 の mRNA 発現量を上昇させたため、これらの成分も有効成分として効果を発揮することが考えられた。

以上、本章では、高脂肪食ラットに対する WLE の抗肥満効果と、その有効成分として、5-HFA ester (第 3 項) やワサビ葉フラボノイド類 (本項) が挙げられることを検証した。



## 第2章 ワサビ根茎成分 6-MSITC による抗酸化効果

### 第1項 分化 HL-60 細胞からの $O_2^-$ 産生阻害効果

#### 2-1-1 背景と目的

ワサビ根茎は、機能性成分 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate; 6-MSITC) の存在が明らかになっている。そこで、本章と第3章ではこの化合物を細胞試験用の試料として用いることとした。

本章では、6-MSITC による抗酸化効果を検証した。生体内で活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) が過剰に発生すると、タンパク質や脂質、DNA 等の生体分子は酸化障害を受ける。この酸化障害は生体の機能低下を促し、アルツハイマー病や動脈硬化、がん等の疾病の原因となる [39]。酸化障害を予防する機能性食品やその成分が研究され [93–95]、商品開発がされている。

ROS を消去するには、ROS 産生そのものを阻害するか、生体内の抗酸化性を高める必要がある。本項では、6-MSITC による ROS 産生阻害効果を検証した。生体において、白血球の一種である好中球は ROS の主な産生源である。細菌が生体内に進入すると、好中球がスーパーオキシドアニオン (superoxide anion;  $O_2^-$ ) を産生し、 $O_2^-$  および  $O_2^-$  から産生した ROS が細菌を殺菌することで、細菌から生体を防御している。しかし、好中球が ROS を過剰に産生すると、生体内での炎症を誘発して様々な疾病の原因となる [39]。

好中球において、 $O_2^-$  を産生するのはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; NADPH オキシダーゼ) という酵素複合体である (Fig. 2-1-1)。NADPH オキシダーゼは、膜結合タンパク質 (シトクロム  $b_{558}$ ) である  $gp91^{phox}$  と  $p22^{phox}$ 、細胞質タンパク質である  $p47^{phox}$ 、 $p67^{phox}$ 、Rac、 $p40^{phox}$  から構成されている [96, 97]。プロテインキナーゼ C (protein kinase C; PKC) が活性化すると、PKC が  $p47^{phox}$  をリン酸化する [98]。 $p47^{phox}$  のリン酸化は、細胞質タンパク質を膜移動させる [96, 97]。NADPH オキシダーゼが会合すると、 $gp91^{phox}$  が NADPH やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (nicotinamide adenine dinucleotide; NADH) を基質として  $O_2^-$  を産生する [96, 97]。

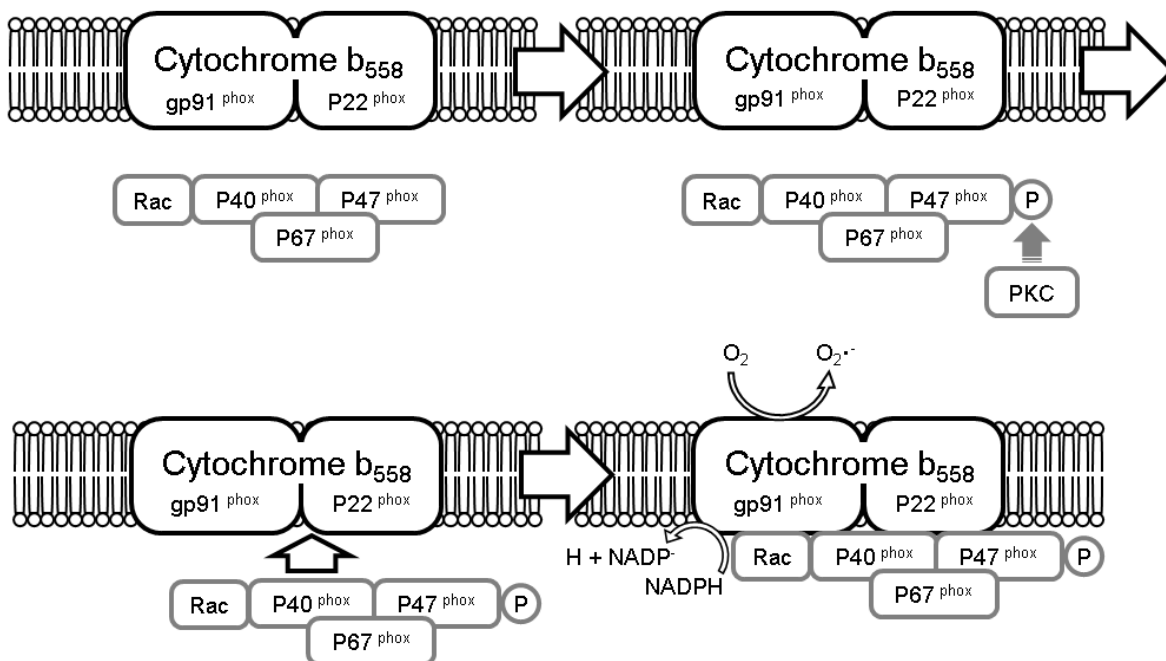
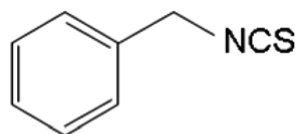


Fig. 2-1-1. The mechanism of superoxide generation in neutrophils.

HL-60 ヒト骨髄性白血病細胞は、レチノイン酸刺激条件下で、好中球、骨髄球、および、後骨髄球から成る顆粒白血球に分化する [40]。ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA) 刺激は、PKC のアイソザイムである PKC- $\beta$  を膜移動させ、NADPH オキシダーゼを活性化する [99]。それゆえに、もし PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^{\cdot-}$  産生を阻害する成分があれば、その成分は抗酸化剤として使用できる可能性がある。

ベンジルイソチオシアネート (benzyl isothiocyanate; BITC) はパパイア [100] やマカ等の植物に含まれている ITC 類の 1 つである。BITC (Fig. 2-1-2) による抗酸化効果が研究されており、BITC は PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^{\cdot-}$  産生や、外因性の NADH 消費を阻害した [101]。PMA 刺激は細胞質に存在する PKC- $\beta$  を膜に移行させるが、BITC はその移行を阻害せず、NADPH オキシダーゼの会合も阻害しなかった。BITC はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) の酵素活性を減少させるが、GAPDH の活性中心である Cys-149 と Cys-153 のチオール基を修飾することが分子メカニズムとして考えられる。それゆえに、BITC は、gp91<sup>phox</sup> の基質結合部位もしくは活性中心のチオール基を修飾することで、NADPH オキシダーゼから  $O_2^{\cdot-}$  の産生を阻害した可能性がある [101]。



Benzyl isothiocyanate  
(BITC)

Fig. 2-1-2. Chemical structure of BITC.

アリルイソチオシアネート (allyl isothiocyanate; AITC) やフェネチルイソチオシアネート (phenethyl isothiocyanate; PEITC)、メチルイソチオシアネート (methyl isothiocyanate; MITC) 等の ITC 類も、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害した。一方、BITC の類縁体である *O*-メチルベンジルチオカルバメート (*O*-methylbenzyl thiocarbamate;  $C_6H_5-CH_2-NH-C(=S)-OCH_3$ 、BITC-OMe) は阻害しなかった [101]。6-MSITC は *N*-アセチル-L-システイン (*N*-acetyl-L-cysteine; NAC) [102] とヒートショックプロテイン 90 $\beta$  (heat shock protein 90 $\beta$ ; HSP90 $\beta$ ) のチオール基 [103] を修飾することが報告されている。それゆえに、6-MSITC は gp91<sup>phox</sup> のチオール基を修飾することで、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害する可能性がある。

本項では、6-MSITC が ROS 産生そのものを阻害するか検証するために、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生阻害効果を検討した。

## 2-1-2 方法

### 2-1-2-1 試料

6-MSITC は、村田ら [104] の方法に従い、6-メチルチオヘキシルイソチオシアネート (6-methylthiohexyl isothiocyanate; 6-MTITC) を酸化させることで合成した。定量核磁気共鳴 (quantitative nuclear magnetic resonance; qNMR) 法を用いた分析によると、6-MSITC の純度は 96 % であった (データは示していない)。その他、BITC 等は試薬一覧の通り入手した。6-MSITC と BITC のエタノール溶液を試料として使用した。

### 2-1-2-2 細胞培養

HL-60 ヒト骨髄性白血病細胞を、10 % FBS を含む Roswell park memorial institute medium 1640 (RPMI-1640 培地) で、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で培養した。

### 2-1-2-3 分化

HL-60 細胞を好中球に分化させるため、 $1.0 \times 10^6$  cells/mL の濃度で 10 % FBS と  $1 \mu\text{M}$  レチノイン酸を含む RPMI-1640 培地に浮遊させた後、3 mL を 6 ウェルプレートに播種し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で 9 日間培養した。遠心分離により、培地を除去した後、細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells/mL の濃度で FBS を含まない RPMI-1640 培地に浮遊させた。ニトロブルーテトラゾリウム (nitroblue tetrazolium; NBT) は、 $\text{O}_2$  によって減少する。そこで、好中球への分化は NBT 染色することで確認した。染色細胞数をカウントした結果、9 日間のレチノイン酸処理条件下で、HL-60 細胞の約 70 % が好中球に分化してしたため (データは示していない)、本処理条件を採用することとした。

### 2-1-2-4 細胞毒性評価

分化 HL-60 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells/mL の濃度で FBS を含まない RPMI-1640 培地に浮遊させた。90  $\mu\text{L}$  を 96 ウェルプレートに播種した後、試料を含む RPMI-1640 培地 (FBS フリー) 10  $\mu\text{L}$  を添加し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で 10 分間培養した。さらに、20 % FBS、100 nM PMA を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) を 100  $\mu\text{L}$  添加し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で 30 分間培養した。10 % FBS と Cell Count Reagent SF を 10 % 含む RPMI-1640 培地 50  $\mu\text{L}$  を添加した後、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で培養した。添加 30 分、90 分後、培養上清の吸光度 (測定波長 450 nm、参照波長 590 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。参照波長は試料による濁りを確認するために測定した。30 分、90 分の値から 1 時間当たりの吸光度変化量を算出した。

### 2-1-2-5 $\text{O}_2^-$ 産生量評価

分化 HL-60 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cell/5 mL の濃度で FBS を含まない RPMI-1640 培地に浮遊させた。90  $\mu\text{L}$  を 96 ウェルプレートに播種した後、試料を含む RPMI-1640 培地 (FBS フリー) 10  $\mu\text{L}$  を添加し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で 10 分間培養した。さらに、20 % FBS、100 nM PMA、1 mM ルシゲニンを含む PBS を 100  $\mu\text{L}$  添加し、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ ) で 5 分間培養した。発光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

### 2-1-2-6 NADH 消費量評価

分化 HL-60 細胞  $5.55 \times 10^6$  cells を、10 % FBS を含む RPMI-1640 培地 5 mL に浮遊させた。試料 1  $\mu\text{L}$  を添加した後、 $\text{CO}_2$  インキュベーター内 (5 %  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ )

で15分間培養した。遠心分離により培地を除去した後、 $1.0 \times 10^6$  cells/90  $\mu$ LとなるようにPBSを添加後、96ウェルプレートに播種した(90  $\mu$ L/ウェル)。10 mM  $\beta$ -NADH-2Na 10  $\mu$ Lを添加した後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内(5% CO<sub>2</sub>、37°C)で10分間培養した。200 mM PMAを含むPBS 100  $\mu$ Lを添加した後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内(5% CO<sub>2</sub>、37°C)で15分間培養した。吸光度(測定波長340 nm)をマイクロプレートリーダーにて測定した。

#### 2-1-2-7 SOD 様活性評価

スーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase; SOD)様活性は、SOD Assay Kit-WSTを用いて測定した。試料20  $\mu$ Lを96ウェルプレートに添加した後、WST working solution 200  $\mu$ Lを添加してプレートミキサーでよく攪拌した。Enzyme working solution 20  $\mu$ Lを添加した後、37°Cで20分間、インキュベートした。吸光度(測定波長450 nm)をマイクロプレートリーダーにて測定した。コントロールに含まれるエタノール濃度は8.3%であり、SOD様活性はなかった(データは示していない)。

#### 2-1-2-8 統計解析

結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で表現した。Student's *t* 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

### 2-1-3 結果

#### 2-1-3-1 細胞毒性評価

6-MSITCとBITCは、100  $\mu$ M以上の濃度において生細胞数が減少し、細胞毒性が認められた(Fig. 2-1-3)。

#### 2-1-3-2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生量評価

Myhreら[105]は、ルシゲニンを好中球に添加したところ、O<sub>2</sub><sup>-</sup>は検出されたが、一酸化窒素やペルオキシ亜硝酸、過酸化水素(hydrogen peroxide; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ヒドロキシルラジカルは検出されなかったことを報告した。一方、秋山ら[106]は、ルシゲニンによってO<sub>2</sub><sup>-</sup>と次亜塩素酸が検出されたことを報告した。本研究では、分化HL-60細胞をPMAで刺激する際、SODを添加すると、発光強度が劇的に減少した。それゆえに、ルシゲニンにより、分化HL-60細胞のNADPHオキシダーゼから産生されたO<sub>2</sub><sup>-</sup>が、特異的に検出されていることが示された。

6-MSITCとBITCは分化HL-60細胞からのO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を阻害した(Fig. 2-1-4)。50%阻害濃度(half maximal inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>)は、6-MSITCで28.9  $\mu$ M、

BITC で 33.9  $\mu\text{M}$  であった。コントロールにおける蛍光強度は 30,000–50,000 relative light units (RLU) であった (データは示していない)。

#### 2-1-3-3 NADH 消費量評価

0.8、4、20  $\mu\text{M}$  の 6-MSITC と 20  $\mu\text{M}$  の BITC は、コントロールに対して、外因性の NADH 消費を有意に阻害した (Fig. 2-1-5)。

#### 2-1-3-4 SOD 様活性評価

アスコルビン酸をポジティブコントロールとして用いた。6-MSITC、BITC、および、アスコルビン酸に、濃度依存的な SOD 様活性があった (Fig. 2-1-6)。6-MSITC とアスコルビン酸の  $\text{IC}_{50}$  は、14.4 mM と 14.4  $\mu\text{M}$  であった。6-MSITC は、263  $\mu\text{M}$  以下で SOD 様活性はなかった。BITC の  $\text{IC}_{50}$  は算出できなかったが、2.63 mM で 10% の  $\text{O}_2^-$  を捕捉していた。SOD 様活性評価の際、ルシゲニンを添加して、コントロールの  $\text{O}_2^-$  産生量を分析したところ、蛍光強度は約 150,000 RLU であった (データは示していない)。

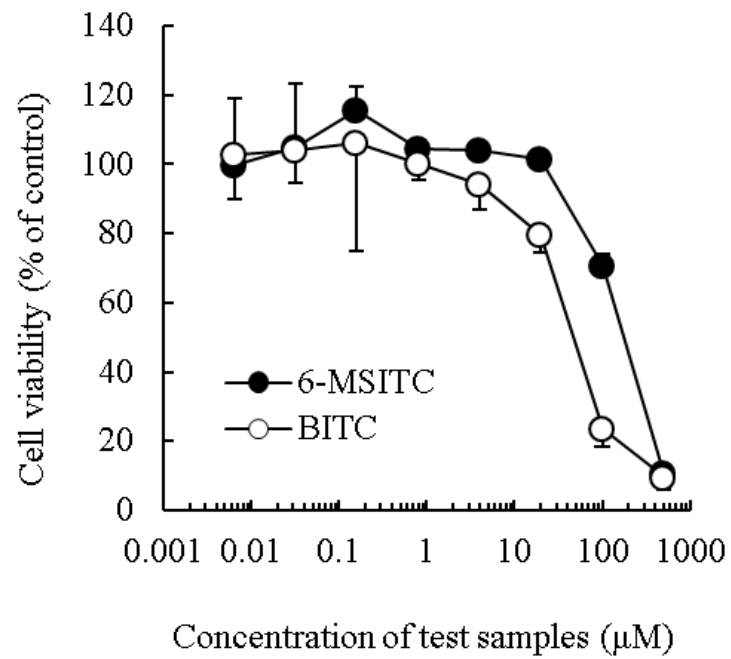


Fig. 2-1-3. Effects of 6-MSITC on HL-60 cell viability. The differentiated HL-60 cells were preincubated with test samples at 37°C for 10 min before adding PMA for 30 min. Then, the cell suspension was supplemented with Cell Count Reagent and incubated for 30 and 90 min. The absorption change per time unit was calculated to determinate the cell viability. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5).

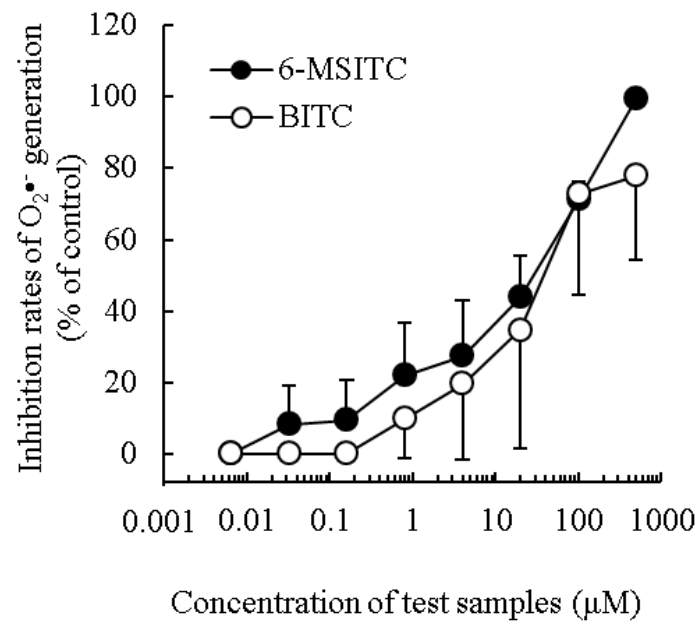


Fig. 2-1-4. Inhibitory effect of 6-MSITC on  $O_2^{\bullet-}$  generation from HL-60 cells. The differentiated HL-60 cells were preincubated with test samples at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min before adding PMA for 5 min. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5).



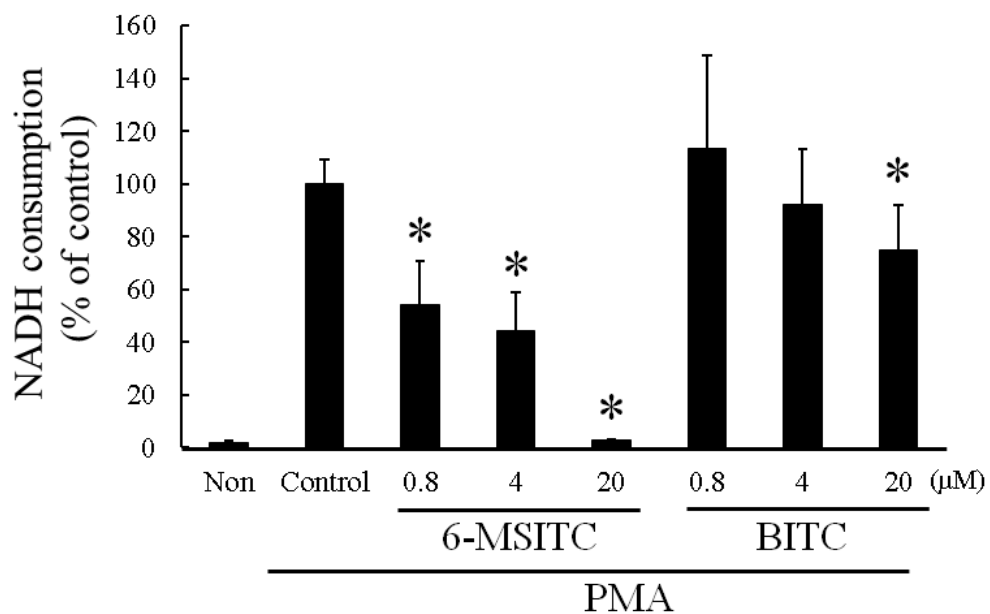


Fig. 2-1-5. Inhibitory effect of 6-MSITC on the consumption of exogenously added NADH. The differentiated HL-60 cells were preincubated with test samples at 37°C for 15 min before adding NADH for 10 min. The cell suspension was then stimulated by PMA for 15 min. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). Statistically significant differences (Student's *t*-test) on comparing with the control value are indicated as \**p* < 0.05.

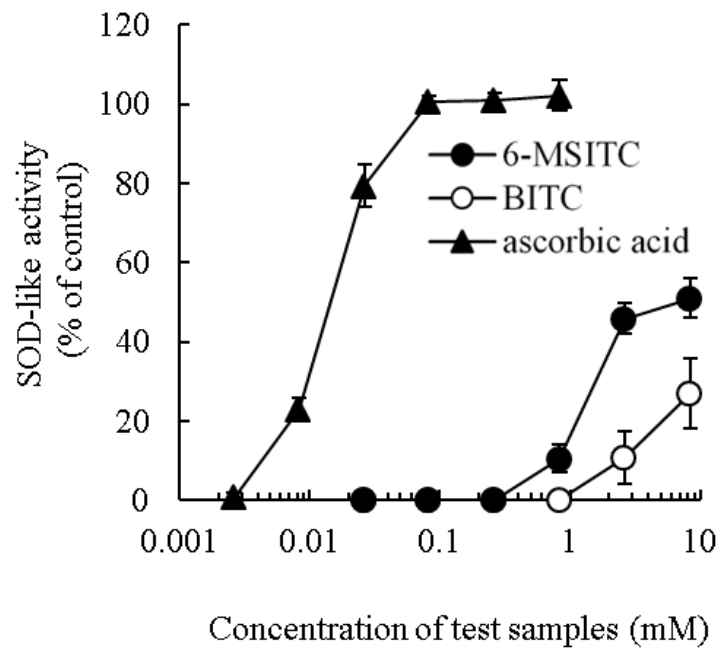


Fig. 2-1-6. SOD-like activity of 6-MSITC. The test samples were incubated with WST working solution and enzyme working solution. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

#### 2-1-4 考察

試料による抗酸化効果が生細胞数減少の影響を受けていないことを証明するため、細胞毒性試験と  $O_2^-$  産生分析の試料処理時間を同じにした。100  $\mu\text{M}$  以上の 6-MSITC と BITC で、生細胞数の減少 (Fig. 2-1-3) と  $O_2^-$  産生の阻害が認められたため (Fig. 2-1-4)、生細胞数の減少に伴って、 $O_2^-$  産生が減少したことが推定された。

6-MSITC は、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害した (Fig. 2-1-4)。6-MSITC による  $O_2^-$  産生阻害メカニズムを明らかにするため、外因性の NADH 消費量と SOD 様活性を検討した。SOD 様活性評価は、6-MSITC が産生した  $O_2^-$  を捕捉した可能性を検証した。仮に 6-MSITC に SOD 様活性があれば、6-MSITC が直接的に  $O_2^-$  を捕捉するかキサントキシダーゼ活性を減少させることが示される。なお、これらの可能性は、本評価系では区別できない。SOD Assay Kit-WST におけるルシゲニンの蛍光強度は約 150,000 RLU であり、PMA 刺激したときの分化 HL-60 細胞から蛍光強度は 30,000–50,000 RLU であったため (データは示していない)、 $O_2^-$  の産生量は、SOD Assay Kit-WST の方が 3–5 倍高かった。

HL-60 細胞における 6-MSITC の  $O_2^-$  産生阻害は、 $IC_{50}$  で 28.9  $\mu\text{M}$  であり (Fig. 2-1-4)、0.8、4、20  $\mu\text{M}$  の 6-MSITC は、コントロールに対して NADH 消費を有意に阻害した (Fig. 2-1-5)。一方、6-MSITC の SOD 様活性の  $IC_{50}$  は 14.4 mM であり、263  $\mu\text{M}$  以下の 6-MSITC は SOD 様活性を示さなかったため、263  $\mu\text{M}$  以下の 6-MSITC は直接的に  $O_2^-$  を捕捉しないことを確認した (Fig. 2-1-6)。6-MSITC が  $O_2^-$  を捕捉する濃度は、6-MSITC が PMA 刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害する濃度よりもはるかに高い。そのため、 $O_2^-$  捕捉活性は、分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生阻害活性に起因しないことが示された。以上のことから、6-MSITC が NADPH オキシダーゼの酵素反応を減少させることで、 $O_2^-$  産生を阻害することが示された (Fig. 2-1-7)。

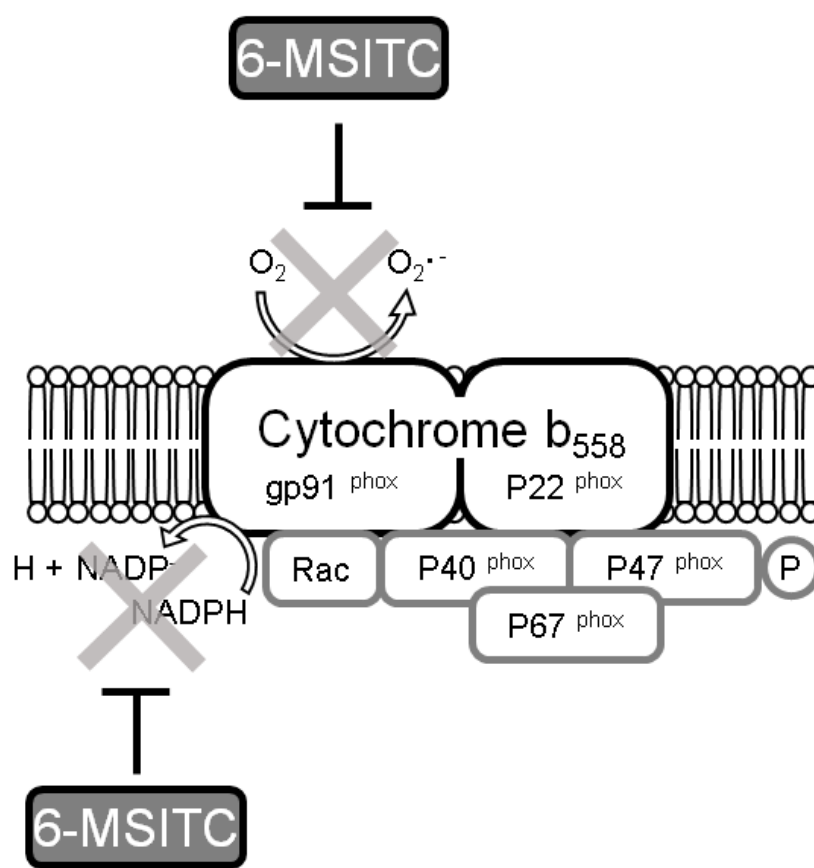


Fig. 2-1-7. The suppression on  $O_2^-$  by 6-MSITC in differentiated HL-60 cells.

Miyoshi ら [101] は、BITC が PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を有意に阻害することを報告した。BITC にはタンパク質のチオール基を修飾する作用があるので、gp91<sup>phox</sup> のチオール基を修飾することで、 $O_2^-$  産生を阻害した可能性がある [101, 107]。一方、6-MSITC も NAC [102] や HSP90 $\beta$  [103] のチオール基を修飾することが報告されている。そのため、6-MSITC は BITC と同様に、gp91<sup>phox</sup> のチオール基を修飾した可能性がある。AITC、PEITC、および、MITC は、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害することが報告されている [101]。ITC 類がタンパク質のチオール基を修飾することが報告されているため [108]、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生阻害には、ITC 基の存在が重要であると考えられる。

6-MSITC は BITC と側鎖が異なるため、その影響で分子メカニズムが異なる可能性がある。その 1 つとして、PKC- $\beta$  の膜移行や NADPH オキシダーゼの会合

を阻害するといった NADPH オキシダーゼの酵素反応を減少させるよりも上流に作用した可能性が挙げられる。

本項では、6-MSITC が NADPH オキシダーゼの酵素反応を減少させることで、PMA で刺激した分化 HL-60 細胞からの  $O_2^-$  産生を阻害することを解明した。すなわち、6-MSITC に ROS 産生そのものを阻害する作用があることを確認した。第 2 項では、6-MSITC が生体内の抗酸化性を高めるか検証するため、肝臓代謝モデルである HepG2 細胞を用いて、nuclear factor E2-related factor 2/Kelchlike ECH-associating protein 1 (Nrf2/Keap1) 系における 6-MSITC の抗酸化効果を明らかにすることを試みた。

## 第2項 HepG2 細胞での Nrf2/Keap1 系を介した NQO1 産生促進効果

### 2-2-1 背景と目的

生体内で ROS が過剰に発生すると、酸化障害が生じ、疾病原因となる [39]。ROS を消去するには、ROS 産生そのものを阻害するか、生体内の抗酸化性を高める必要がある。第1項では、6-MSITC が ROS 産生そのものを阻害することを確認したため、本項では、6-MSITC が生体内の抗酸化性を高めるかどうかを検証した。すなわち、肝臓の代謝モデルである HepG2 ヒト肝がん由来細胞を用いて、Nrf2/Keap1 系における 6-MSITC の抗酸化効果を検証した。

抗酸化剤応答配列 (*cis*-antioxidant response element; ARE) は抗酸化酵素のプロモーター領域にある配列であり、ARE の活性化は、酸化ストレスやがんに対して細胞を防御する。そして、nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)、c-Jun、activating transcription factor 2 (ATF2)、ATF4 等は、ARE の調節因子であることが示されている [109–111]。このうち Nrf2 は、塩基性ロイシンジッパー (basic region-leucinezipper) 型転写因子から構成される Cap 'n' Collar (CNC) ファミリーに属しており、活性化により ARE 誘導遺伝子を発現する [112, 113]。非酸化ストレス条件下では、Nrf2 は、アクチン結合タンパク質である Kelchlike ECH-associating protein 1 (Keap1) と細胞質で複合体を形成している (Fig. 2-2-1)。Keap1 は Nrf2 活性化の抑制因子であるが [114, 115]、酸化ストレス刺激が加わると、Nrf2-Keap1 複合体が解離した後、Nrf2 が核内に移行して small Maf タンパク質とヘテロダイマーを形成して ARE と結合し [112, 116, 117]、抗酸化酵素遺伝子群を発現する。一方、非酸化ストレス条件下では、Keap1 の N 末端側の broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac (BTB) ドメインと central linker ドメインに結合している Cullin3 (Cul3) 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体 (cul3-Rbx1 E3 ubiquitin ligase complex) が Nrf2 をユビキチン化し [118–120]、Nrf2 を分解する。Nrf2 は不安定なタンパク質であり、Nrf2-Keap1 複合体の形で細胞防御系を維持するには、活性化化合物による Nrf2 の安定化が重要であることが考えられる。

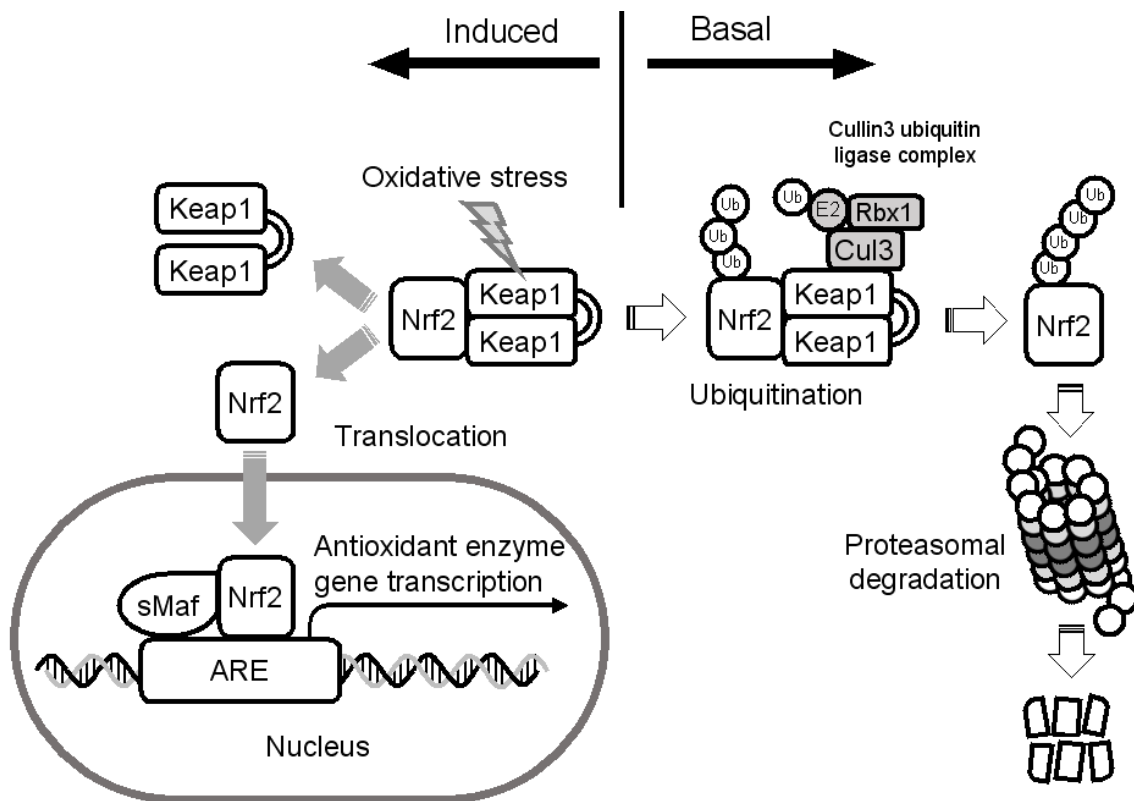


Fig. 2-2-1. The mechanism of antioxidant enzyme genes expression.

Morimitsu ら [25] は、ラット由来肝上皮細胞株 RL34 細胞において、6-MSITC が Nrf2 の核移行を誘導し、ARE 受容体の遺伝子を活性化することを報告した。さらに、Mizuno ら [94] は、ラット線条体の初代神経細胞培養において、ROS やパラコートによる毒性から、6-MSITC が細胞を防御することを報告した。その分子メカニズムとして、6-MSITC が Nrf2/Keap1 系を活性化することで、 $\gamma$ -glutamyl cystein synthetase の発現が上昇し、細胞内グルタチオンが増えたことが示された。6-MSITC が ARE を通じた転写において、NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1) の mRNA 発現を上昇させ、NQO1 タンパク質を活性化することも報告されている [121, 122]。しかし、6-MSITC が Nrf2-Keap1 複合体に作用する分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本項では、HepG2 細胞での 6-MSITC の NQO1 発現誘導効果とともに、その分子メカニズムを検証した。

## 2-2-2 方法

### 2-2-2-1 試料

合成した 6-MSITC をガスクロマトグラフィー (gas chromatography; GC) で分析したところ、純度は 99.3 % であった [121]。その他試薬類は、試薬一覧の通り入手した。

### 2-2-2-2 細胞培養

HepG2 ヒト肝がん由来細胞は、10 % FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM) にて、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) にて培養した。

### 2-2-2-3 NQO1、Nrf2、Keap1 の産生量評価

HepG2 細胞を 0–20 μM の 6-MSITC で 6 時間処理した。40 μg のタンパク質を含む細胞溶解液を 8 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて分離した後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。ブロッキング後、メンブレンと一次抗体を 4°C で一晩反応させた。その後、メンブレンと西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase; HRP) 標識二次抗体を反応させた。enhanced chemiluminescence (ECL) を用いてバンドを検出し、画像解析ソフトウェアを用いて定量した。抗 NQO1 抗体、抗 Nrf2 抗体、抗 Keap1 抗体、および、抗 α-チューブリン抗体を用い、NQO1、Nrf2、Keap1、および、α-チューブリンを検出した。NQO1、Nrf2、および、Keap1 濃度は、各バンドの強度を α-チューブリンで補正して算出した。

### 2-2-2-4 Nrf2 半減期評価

タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide; CHX) は、Nrf2 の半減期 (half-life;  $t_{1/2}$ ) を算出するために使用した。HepG2 細胞を 10 μM の 6-MSITC で 1.5 時間前処理した後、5 μg/mL の CHX で 0–60 分間処理した。2-2-2-3 の通り、Nrf2、Keap1、および、α-チューブリンをウェスタンブロット分析により検出した。Nrf2 濃度は、コントロールを 100 % として算出した。

### 2-2-2-5 細胞溶解液中のタンパク質のユビキチン化阻害評価

プロテアソーム阻害剤である carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132) を用い、6-MSITC が細胞溶解液に含まれるタンパク質のユビキチン化を阻害するかを検証した。HepG2 細胞を 10 μM の MG132 で 1 時間前処理した後、10 μM の 6-MSITC で 6 時間処理した。2-2-2-3 の通り、細胞溶解液をウェスタンブロッ



ト分析に供し、Nrf2、Keap1、ユビキチン、および、 $\alpha$ -チューブリンを検出した。ユビキチン濃度は、ユビキチンのバンドの強度を  $\alpha$ -チューブリンで補正して算出した。

#### 2-2-2-6 Nrf2 のユビキチン化阻害評価

6-MSITC で処理した HepG2 細胞 ( $3.0 \times 10^6$  cells) を、modified radio-immunoprecipitation assay buffer (modified RIPA バッファー) [10 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)、0.1 % ノニデット P-40、1 % デオキシコール酸、50 mM フッ化ナトリウム、50 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、プロテアーゼ阻害剤カクテル (pH 8.0) ] に溶解した。細胞溶解液を 10 秒で 2 回、超音波処理した後、氷上で 30 分間静置した。14,000  $\times$  g、4°C で 15 分間、遠心分離した後、上清に含まれるタンパク質濃度を、Protein assay kit を用いて算出した。免疫沈降のため、タンパク質 1 mg を含む上清にプロテイン A-セファロースビーズを添加した後、1 時間緩やかに振とうした。その後、2  $\mu$ g の抗 Nrf2 抗体または抗 Keap1 抗体を添加した後、4 時間緩やかに振とうした。免疫沈降による沈殿物を modified RIPA バッファーで 5 回洗浄した後、SDS サンプルバッファーを添加し、5 分間煮沸した。2-2-2-3 の通り、煮沸液をウエスタンブロット分析に供し、ユビキチンを検出した。ユビキチン化した Nrf2 の濃度は、MG132 単独添加を 100 % として算出した。

#### 2-2-2-7 Keap1 修飾体形成に関する評価

HepG2 細胞を 10  $\mu$ M の 6-MSITC で 6 時間処理した後、2-2-2-3 の通り、ウエスタンブロット分析に供し、Keap1 と  $\alpha$ -チューブリンを検出した。Keap1 修飾体の濃度は、Keap1 修飾体のバンドの強度を  $\alpha$ -チューブリンで補正して算出した。

#### 2-2-2-8 Nrf2 核局在化評価① (ウエスタンブロット分析)

HepG2 細胞を 90 % コンフルエントになるまで 10 mm ディッシュで培養した。細胞を 10  $\mu$ M の MG132 で 1 時間前処理した後、10  $\mu$ M の 6-MSITC で 6 時間処理した。核と細胞質のタンパク質抽出液は、Tanigawa ら [123] の方法に従って調製した。細胞を洗浄した後、氷冷した PBS にてスクレイパーで回収し、500  $\times$  g、5 分間の遠心分離を実施した。細胞をバッファー A [10 mM Hepes-KOH、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.5 % ノニデット P-40、1 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol; DTT)、0.5 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (pH 7.9) ] で、氷上で 20 分間溶解させた。14,000  $\times$  g、4°C で 15 分間遠心分離することで、上清 (細胞質画分) を分離した。核ペレットをバッファー A で 3 回洗浄した後、

バッファーB [20 mM Hepes、0.5 M KCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (pH 7.9) ] 中でローテーターにて 4°C で 30 分間再懸濁し、14,000 × g、4°C で 15 分間遠心分離することで、核画分を得た。40 µg のタンパク質を含む細胞質画分と核画分を、抗 Nrf2 抗体、抗 α-チューブリン抗体、抗ラミン B 抗体を用いて、2-2-2-3 の通り、ウェスタンブロット分析に供した。抗 α-チューブリン抗体と抗ラミン B 抗体は、細胞質画分と核画分のマーカーとして各々用いた。Nrf2 濃度は、Nrf2 のバンドの強度を α-チューブリンまたはラミン B で補正して算出した。核画分の残りは、ゲルシフトアッセイ (electrophoretic mobility shift assay; EMSA) に用いた。タンパク質濃度は、Protein assay kit を用いて算出した。

#### 2-2-2-9 Nrf2 核局在化評価② (免疫細胞化学染色)

HepG2 細胞を 30 mm ディッシュのポリ-L-リジンでコートしたスライドグラスに播種して培養した後、10 µM の 6-MSITC を添加して 6 時間処理した。免疫細胞化学分析は、Tanigawa ら [123] の方法に従って実施した。PBS で洗浄した後、4 % パラホルムアルデヒドを含む PBS での 15 分間固定し、Triton X-100 で 15 分間透過処理し、0.5 % ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を含む PBS で 30 分間ブロッキングした。抗 Nrf2 抗体を添加して 1 時間反応させた後、Alexa Fluor 568 標識二次抗体を添加して 1 時間反応させた。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) は、染色に用いられる蛍光色素で、DNA と強く結合する。細胞核の DAPI での染色の他、位相差顕微鏡での観察も実施した。

#### 2-2-2-10 EMSA

EMSA とは、DNA とタンパク質の相互作用を検証するアッセイであり、DNA とタンパク質が結合すると、DNA の移動速度が遅くなる性質を利用している。DNA はタンパク質への結合配列を含む直鎖状の DNA 断片を使用しており、DNA をラベル化しておけば、電気泳動後に検出可能となる。タンパク質を検出する場合、標的タンパク質と特異的抗体を電気泳動前に反応させておき、DNA-タンパク質-抗体複合体を形成させる。さらに移動速度が遅くなり、これをスーパーシフトアッセイと表現する。

T4 ポリヌクレオチドキナーゼは、DNA または RNA の 5'末端に、ATP の γ 位のリン酸基を添加する酵素である。NQO1-ARE オリゴヌクレオチド (5'-TTTTATGCTGTGTCATGGTT-3') の 5'末端ラベル化を、二本鎖オリゴヌクレオチド 10 pmol と [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (5000 Ci/mmol) 50 µCi とともに、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて実施した [124]。ラベル化したオリゴヌクレオチドを、

セファデックス G-25 スピнкаラムを用いて精製した。

2-2-2-8 の通り、HepG2 細胞を 10  $\mu$ M の 6-MSITC で 6 時間処理した核画分を得た。結合バッファー [25 mM Tris-HCl、75 mM KCl、0.3 % ノニデット P-40、7.5 % グリセロール、2.5 mM DTT、1 mg/mL BSA、poly (dI)  $\cdot$  poly (dC) 1  $\mu$ g (pH 7.5)] 中で、ラベル化オリゴヌクレオチド、もしくは、非ラベル化競合オリゴヌクレオチドを、核画分 5 mg とともに、25°C で 30 分間インキュベートした。スーパーシフトアッセイでは、核画分を 25°C で 20 分間、プローブと結合させた後、25°C で 30 分間、抗 Nrf2 抗体またはラビット IgG 抗体と反応させた。生成物は、0.5  $\times$  Tris borate/EDTA バッファー中の 5 % 未変性ポリアクリルアミドゲルに 4°C で溶解した。電気泳動後、ゲルを 3 MM クロマトグラフィーペーパーに載せて乾燥した。ペーパーをフルオロ・イメージアナライザーにセットし、放射線エネルギーセンサーにてバンドを検出した。

lane 1 は 6-MSITC 未処理の細胞溶解液、lane 2 は 6-MSITC 処理液、lane 3 は 10 倍過剰の cold wild ARE オリゴヌクレオチド処理液、lane 4 は 10 倍過剰の変異 ARE オリゴヌクレオチド処理液とした。lane 5–8 ではスーパーシフトアッセイを実施した。lane 5 と 6 はラビット IgG 抗体 (ネガティブコントロール) での処理、lane 7 と 8 は抗 Nrf2 抗体での処理を実施した。

#### 2-2-2-11 レポーター遺伝子アッセイとトランスフェクション

レポーター遺伝子アッセイとは、試料が受容体に結合したときに生体内のリガンドと同様のメカニズムで起こる転写活性を測定する試験法である。試料が受容体に結合し、その受容体が特定の遺伝子の上流に存在する応答配列に結合すると、下流に位置している遺伝子の転写が促進される。下流に位置する遺伝子として、例えばルシフェラーゼの遺伝子をレポーター遺伝子として導入 (トランスフェクション) し、その発光能を指標とすることで、試料による転写活性を確認することができる。

トランスフェクションとは核酸を細胞に化学的に導入することで、遺伝子導入方法の中では、もっとも簡便な方法である。核酸 (DNA または RNA) は陰電荷であるため、陽電荷をもつ物質 (リボソームやポリマー等) に結合して複合体を形成する。その複合体が陰電荷を帯びた細胞表面に引きつけられ、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれる。共トランスフェクションは、二つの特性を持つ遺伝子を同時に一つの細胞に移入することで、それぞれに特有の発現をさせて誘導する。目的遺伝子を発現するプラスミドが導入された細胞は、一時的に多量のタンパク質を発現 (一過性発現) する。

一過性トランスフェクションは、Hou ら [121] の方法に従って実施した。ヒト NQO1 の 41 bp ARE/EpRE を含む pGL2-hNQO1 ルシフェラーゼレポータープ

ラスミドを、Moehlenkamp ら [125] の方法に従って構築した。HepG2 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells) を 12 ウェルプレートに播種した後、24 時間培養した。トランスフェクション試薬である LipofectAMINE 2000 を用いて、細胞に NQO1 プロモーターエンコーディングホタルルシフェラーゼプラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  と pGL4-TK-エンコーディングウミシイタケルシフェラーゼプラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  を共トランスフェクトした。Nrf2 を過剰発現させるため、細胞にラット Nrf2 を有する哺乳動物発現プラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  も共トランスフェクトした。Opi-Minimum essential medium eagle (Opi-MEM) における DNA 混合物に pcDNA3 コントロールベクターを加えることで、トランスフェクトされた DNA 量を  $0.25 \mu\text{g}/\text{ウェル}$  で 5 時間一定に保った。DMEM に置換して 24 時間培養した後、 $0\text{--}20 \mu\text{M}$  の 6-MSITC を添加して 12 時間処理した。Dual-Luciferase Reporter Assay System を使用して、ホタルとウミシイタケのルシフェラーゼ活性を発光検出器で測定した。ルシフェラーゼ活性は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性によって標準化し、コントロール細胞と比較した倍数で表現した。

#### 2-2-2-12 siRNA のトランスフェクション

低分子 2 本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) とは 21–23 塩基対から成る RNA のことである。siRNA は、mRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。スクランブル siRNA とはネガティブコントロールとして用いられる RNA であり、対象となる RNA の塩基配列をランダム化して構築した産物であり、特異的な活性を示さない。

siRNA のトランスフェクションは、Tanigawa ら [123] の方法に従って実施した。HepG2 細胞 ( $3.0 \times 10^5$  cells) を 60 mm ディッシュに播種した。LipofectAMINE 2000 を用いて、細胞に NQO1 プロモーターエンコーディングホタルルシフェラーゼプラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  と pGL4-TK エンコーディングウミシイタケルシフェラーゼプラスミド  $0.1 \mu\text{g}$  を共トランスフェクトした。100 nM のヒト Nrf2 siRNA、もしくは、スクランブル siRNA も共トランスフェクトして 24 時間培養した。培地を DMEM に置換して添加して、さらに 24 時間培養した後、 $10 \mu\text{M}$  の 6-MSITC で 12 時間処理した細胞溶解液を、レポーター遺伝子アッセイに供した。一方、 $10 \mu\text{M}$  の 6-MSITC で 6 時間処理した細胞溶解液は、ウェスタンブロット分析にて Nrf2、NQO1、および、 $\alpha$ -チューブリンを検出するのに使用した。Nrf2 と NQO1 濃度は、Nrf2 と NQO1 のバンドの強度を  $\alpha$ -チューブリンで補正して算出した。

#### 2-2-2-13 統計解析

ANOVA による検定後、Turkey's 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

## 2-2-3 結果

### 2-2-3-1 NQO1、Nrf2、Keap1 の産生量評価

6-MSITC が抗酸化酵素の発現を誘導するか検証するため、HepG2 細胞を 0–20  $\mu\text{M}$  の 6-MSITC で 6 時間処理した。細胞溶解液をウエスタンブロット分析したところ、6-MSITC は濃度依存的に NQO1 産生を促進した (Fig. 2-2-2A)。コントロールの  $\alpha$ -チューブリンに、濃度依存的な産生量変化はなかった (Fig. 2-2-2A)。

Nrf2/Keap1 系は抗酸化酵素や解毒代謝酵素の発現に重要な役割を果たすことがよく知られている。そのため、細胞溶解液における Nrf2 と Keap1 量を検証した。6-MSITC は濃度依存的に Nrf2 産生を有意に促進し、一方で有意差はなかったものの、Keap1 を減少させた (Fig. 2-2-2B)。

### 2-2-3-2 Nrf2 半減期評価

Nrf2 は不安定なタンパク質である [126, 127]。そこで、6-MSITC による Nrf2 の増加が、Nrf2/Keap1 系にどのような影響を与えているのかを検証した。10  $\mu\text{M}$  の 6-MSITC で 1.5 時間前処理した後、タンパク質合成阻害剤である CHX を添加し、経時的に Nrf2 と Keap1 をウエスタンブロット分析によって検出した。これらのタンパク質の減少量から  $t_{1/2}$  を算出したところ、6-MSITC 処理により、Nrf2 の  $t_{1/2}$  は 11.5 分から 35.2 分に約 3 倍延びた (Fig. 2-2-3)。一方、Keap1 の  $t_{1/2}$  に変化はなかった (Fig. 2-2-3)。

### 2-2-3-3 Nrf2 のユビキチン化阻害評価

非酸化ストレス条件下にて、ユビキチンに依存したプロテアソーム経路を通して、Nrf2 が速やかに減少することが報告されている [126, 128]。6-MSITC による Nrf2/Keap1 比の上昇が、Nrf2 のユビキチン化阻害によるかどうかを検証するため、6-MSITC 存在下または非存在下において、プロテアソーム阻害剤である MG132 で処理した後、免疫沈降によって Nrf2 のユビキチン化を検証した。バンドの強度を目視で確認したところ、Nrf2 は、6-MSITC または MG132 の単独または複合処理によって上昇し、対して Keap1 は同処理により減少した (Fig. 2-2-4A)。同じ時間において、MG132 処理は、ユビキチン化の増加原因となり、ユビキチン化は 6-MSITC との共処理によって減少した (Fig. 2-2-4A)。6-MSITC と MG132 で共処理において、Keap1 ではなく (データは示していない)、ユビキチン化した Nrf2 が顕著に減少していた (Fig. 2-2-4B)。

#### 2-2-3-4 Keap1 修飾体形成に関する評価

*tert*-ブチルヒドロキノン (*tertiary*-butylhydroquinon; *t*BHQ) [129]、4-メチルスルフィニルブチルイソチオシアネート (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate; 4-MSITC = スルフォラファン) [130]、ケルセチン (quercetin) [123]、エブセレン (ebselen) [131] 等の成分が Keap1 修飾体の形成を誘導し、150 kDa 以上の Keap1 は機能が消失することが報告されている。ウエスタンブロット分析にて、約 150 kDa の Keap1 修飾体が 6-MSITC で処理した細胞で検出された (Fig. 2-2-4C)。

#### 2-2-3-5 Nrf2 核局在化評価① (ウエスタンブロット分析)

核において、Nrf2 は ARE 転写を活性化する。6-MSITC によって安定化された Nrf2 が核に蓄積するか検証するために、6 時間の 6-MSITC 処理、もしくは非処理細胞における Nrf2 の局在化をウエスタンブロット分析にて検証した。10  $\mu$ M の 6-MSITC は、核の Nrf2 を有意に増やした (Fig. 2-2-5)。一方、コントロールの細胞質では、Nrf2 はほとんど検出されなかった (Fig. 2-2-5)。

#### 2-2-3-6 Nrf2 核局在化評価② (免疫細胞化学染色)

顕微鏡を用いた免疫細胞化学分析において、6-MSITC で処理した細胞は、核において強い Nrf2 シグナルを示した (Fig 2-2-6)。2-2-3-5 と同様に、Nrf2 の核局在化を確認した。

#### 2-2-3-7 EMSA

6-MSITC によって核蓄積した Nrf2 が ARE 複合体を形成するか検証するために、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 標識 NQO1-ARE オリゴヌクレオチドを用いて、EMSA を実施した。6-MSITC 非処理の細胞溶解液 (lane 1) に対し、6-MSITC 処理では Nrf2-ARE 複合体が著しく増加していた (lane 2) (Fig. 2-2-7A)。10 倍過剰の cold wild ARE オリゴヌクレオチド添加は、Nrf2-ARE 複合体の形成を完全に阻害した (lane 3)。一方、10 倍過剰の変異 ARE オリゴヌクレオチド添加は、Nrf2-ARE 複合体の形成を阻害しなかった (lane 4)。さらに、6-MSITC で処理した細胞溶解液と抗 Nrf2 抗体を反応させると、Nrf2 のスーパーシフトが増加していた (lane 8)。ネガティブコントロールのラビット IgG 抗体の添加では、スーパーシフトのバンドは検出されなかった (lane 5、6)。

#### 2-2-3-8 レポーター遺伝子アッセイとトランスフェクション

6-MSITC によって増加した Nrf2-ARE 複合体が、ARE の転写活性を誘導するか検証するため、core ARE プロモーター - ルシフェラーゼプラスミド (-327/+59) とともに NQO1 遺伝子のプロモーター活性分析を実施した。1-20  $\mu$ M の 6-MSITC

は、濃度依存的に ARE プロモーターからのルシフェラーゼ活性を誘導した (Fig. 2-2-7B)。

#### 2-2-3-9 siRNA のトランスフェクション

6-MSITC による ARE 転写活性誘導と NQO1 発現誘導に、Nrf2 の上昇が必要か検証するため、HepG2 細胞に ARE-ルシフェラーゼレポータープラスミドと Nrf2 siRNA を共トランスフェクトした。その結果、Nrf2 siRNA のトランスフェクションにより、6-MSITC 処理および非処理の両条件下において、ARE 転写活性が減少した (Fig. 2-2-8A)。ネカティブコントロールであるスクランブル siRNA のトランスフェクションでは、6-MSITC 処理および非処理条件ともに、ARE 転写活性でコントロールとの有意な差がなかった (Fig. 2-2-8A)。

ウエスタンブロット分析では、Nrf2 siRNA のトランスフェクションにより、6-MSITC 処理で Nrf2 と NQO1 の産生が有意に減少しており (Fig. 2-2-8B)、このことは ARE 転写活性の減少に起因していることが考えられた。スクランブル siRNA のトランスフェクションは、6-MSITC 処理および非処理条件ともに、Nrf2 と NQO1 の産生でコントロールとの有意な差がなかった (Fig. 2-2-8B)。

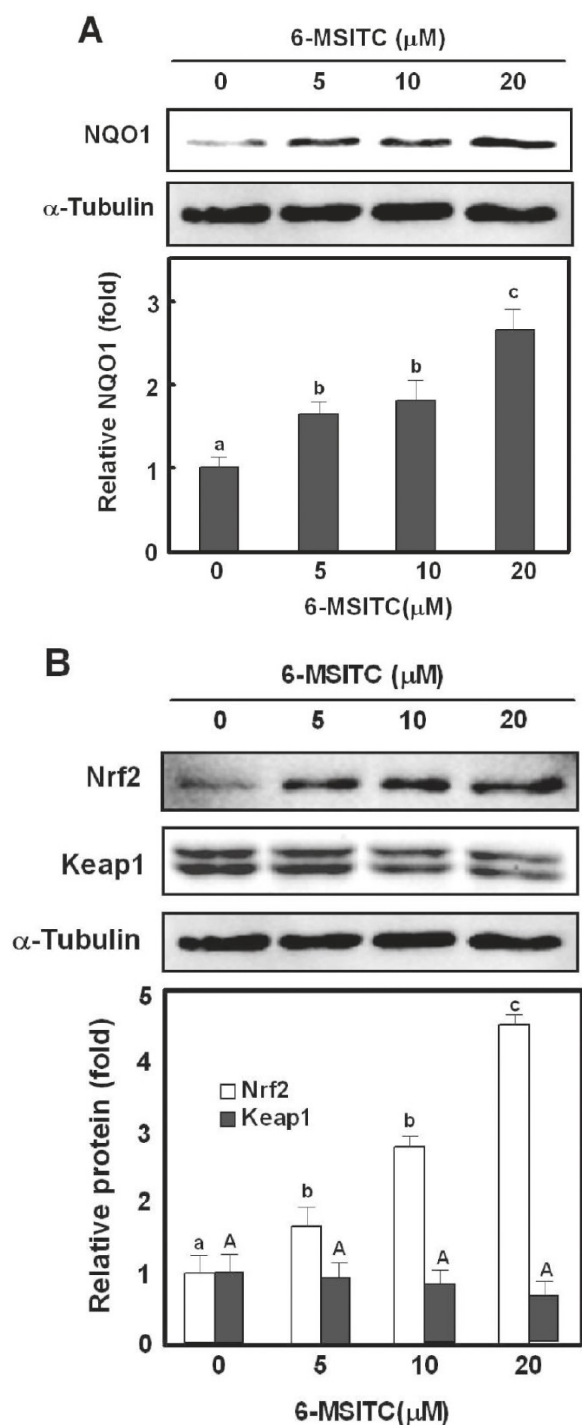


Fig. 2-2-2. Effects of 6-MSITC on the levels of NQO1 (A), Nrf2, and Keap1 (B). HepG2 cells were treated with 0–20  $\mu\text{M}$  6-MSITC for 6 h. Cell lysates were used to detect NQO1, Nrf2, Keap1, and  $\alpha$ -tubulin by Western blot analysis with their respective antibodies. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts (small for Nrf2 and capital for Keap1 in panel B) differs significantly at  $p < 0.05$ .



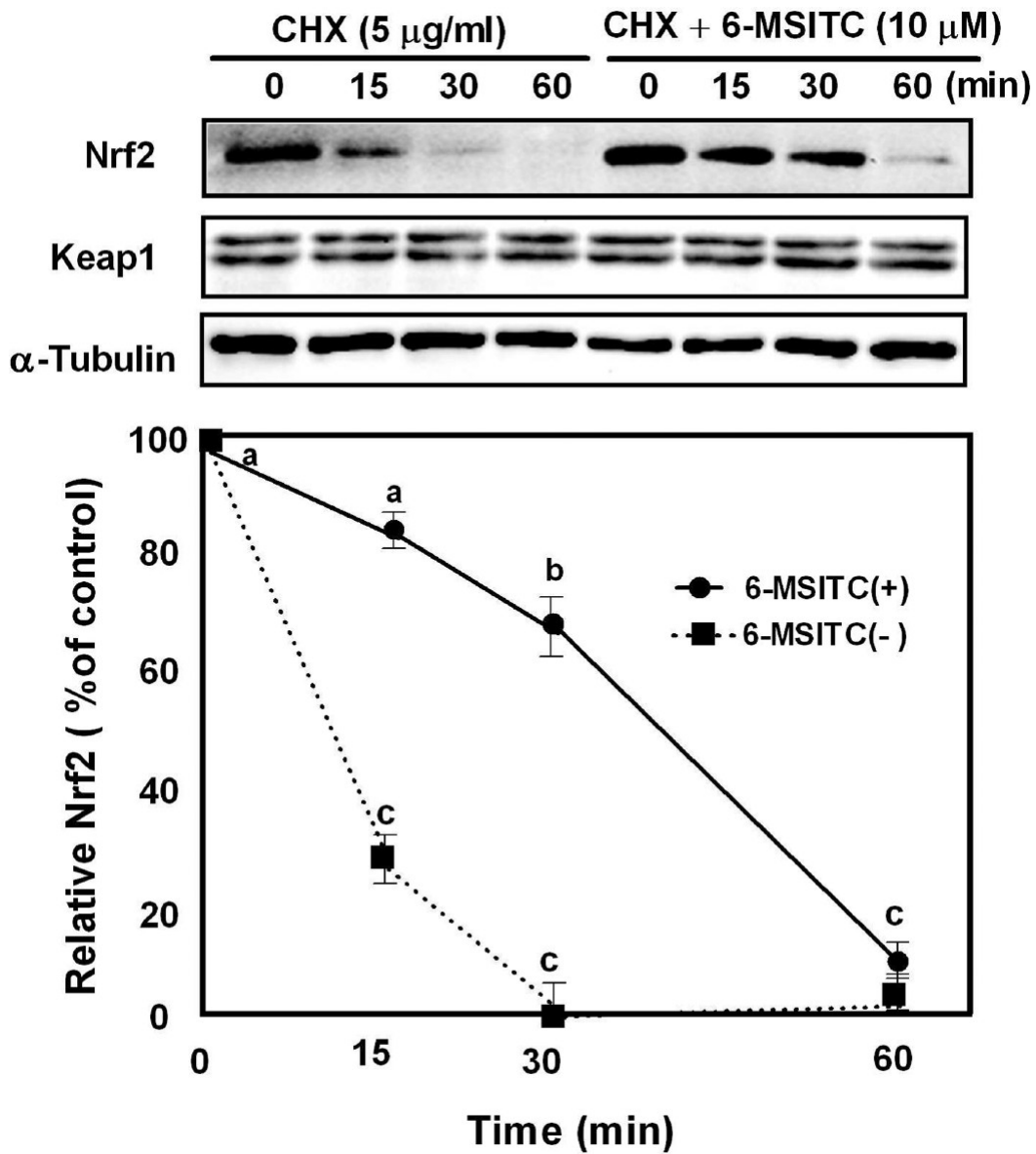


Fig. 2-2-3. 6-MSITC increases stabilization of Nrf2. HepG2 cells were treated with 5  $\mu$ g/mL CHX or pretreated with 10  $\mu$ M 6-MSITC for 1.5 h and then treated with CHX for 0–60 times. Nrf2, Keap1, and  $\alpha$ -tubulin were detected by Western blot analysis with their respective antibodies. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .

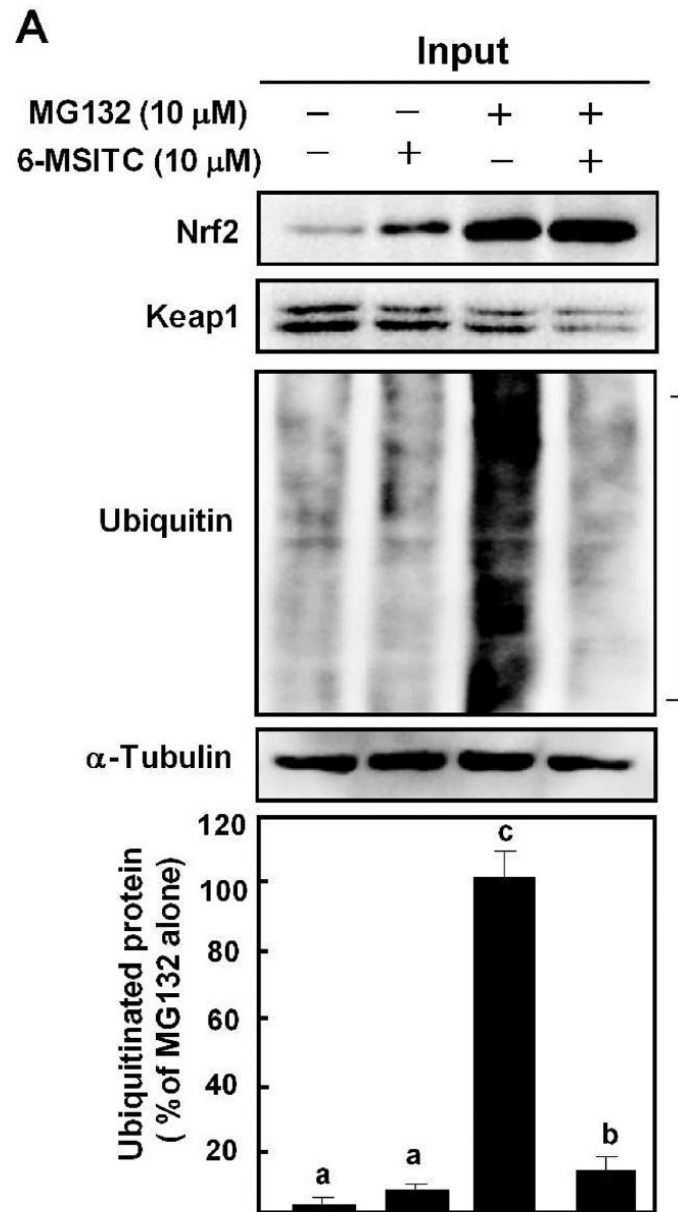


Fig. 2-2-4. Effects of 6-MSITC on Nrf2 ubiquitination and Keap1 modification. (A) Western blot analysis of endogenous Nrf2, Keap1, and ubiquitin. HepG2 cells were treated with 10  $\mu$ M MG132 for 1 h and then treated with or without 10  $\mu$ M 6-MSITC for 6 h. Cell lysates were used to detect Nrf2, Keap1, ubiquitin, and  $\alpha$ -tubulin with their respective antibodies.

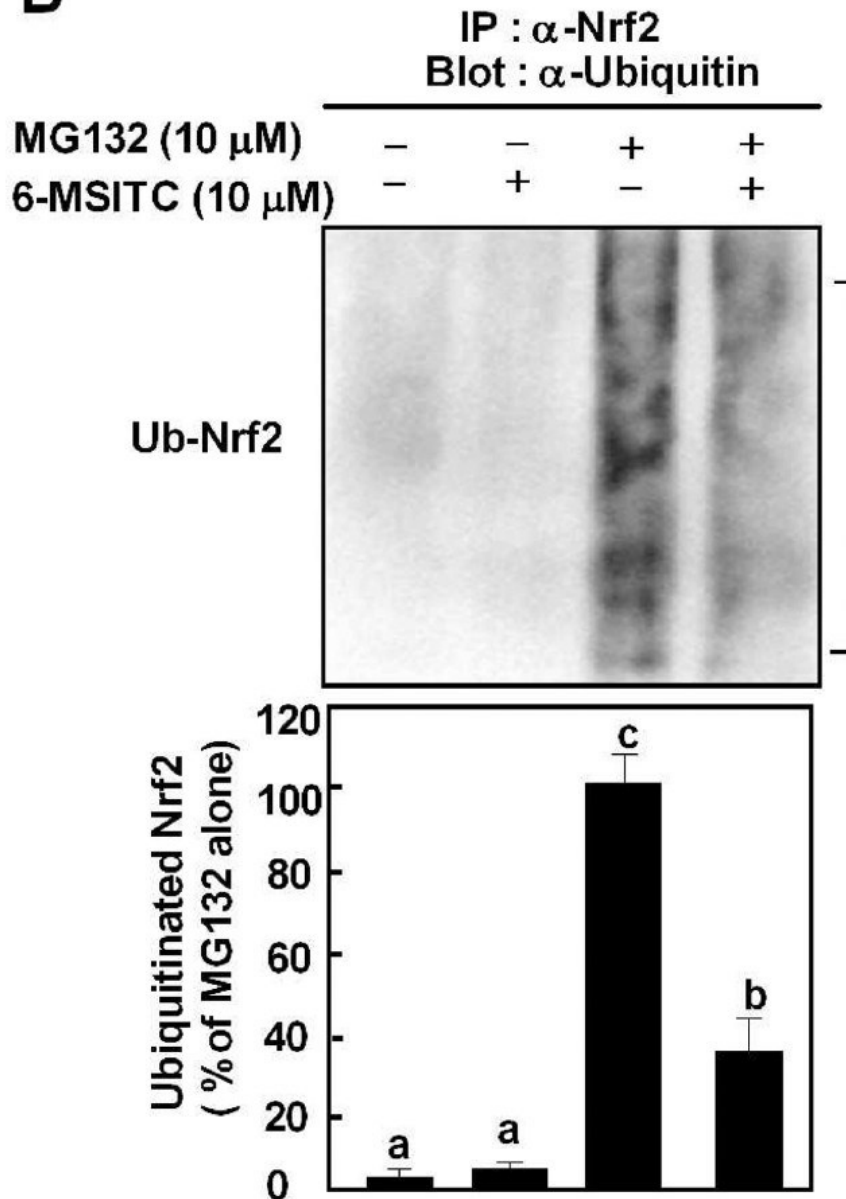
**B**

Fig. 2-2-4. Effects of 6-MSITC on Nrf2 ubiquitination and Keap1 modification. **(B)** Effects of 6-MSITC on ubiquitination of Nrf2. Cell lysates were immunoprecipitated with Nrf2 antibody and visualized by Western blot analysis with ubiquitin antibody. The marker shows the ubiquitinated Nrf2. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .

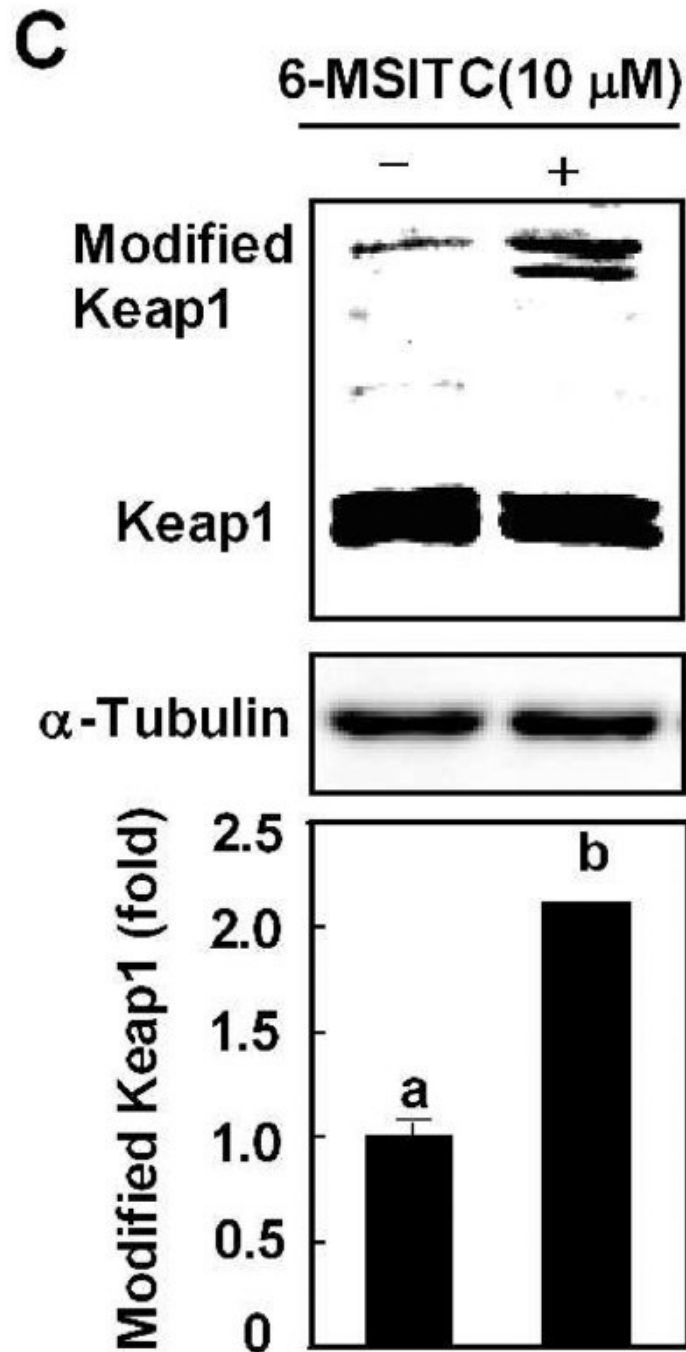


Fig. 2-2-4. Effects of 6-MSITC on Nrf2 ubiquitination and Keap1 modification. (C) Modification of Keap1 by 6-MSITC. HepG2 cells were treated with 10  $\mu$ M 6-MSITC for 6 h and analyzed by Western blot analysis with Keap1 and  $\alpha$ -tubulin antibody. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .

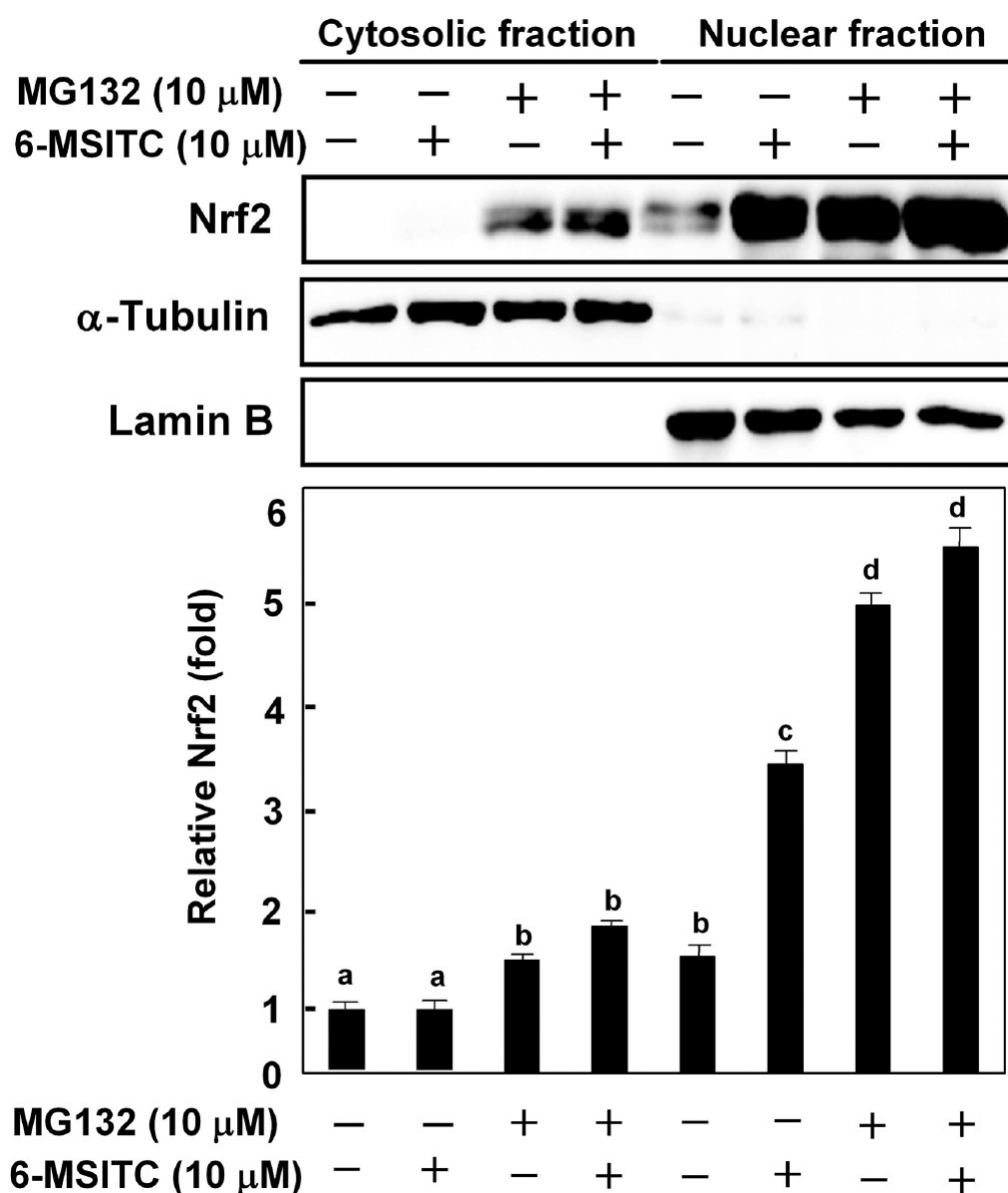


Fig. 2-2-5. Western blot analysis of cytosolic and nucleus Nrf2. HepG2 cells were pretreated with 10  $\mu$ M MG132 for 1 h and then treated with or without 10  $\mu$ M 6-MSITC for 6 h. The nuclear and cytosolic extracts were subjected to Western blot analysis with Nrf2,  $\alpha$ -tubulin, and lamin B antibodies.  $\alpha$ -Tubulin and lamin B antibodies were used as markers for the cytosolic and nuclear extracts, respectively. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .

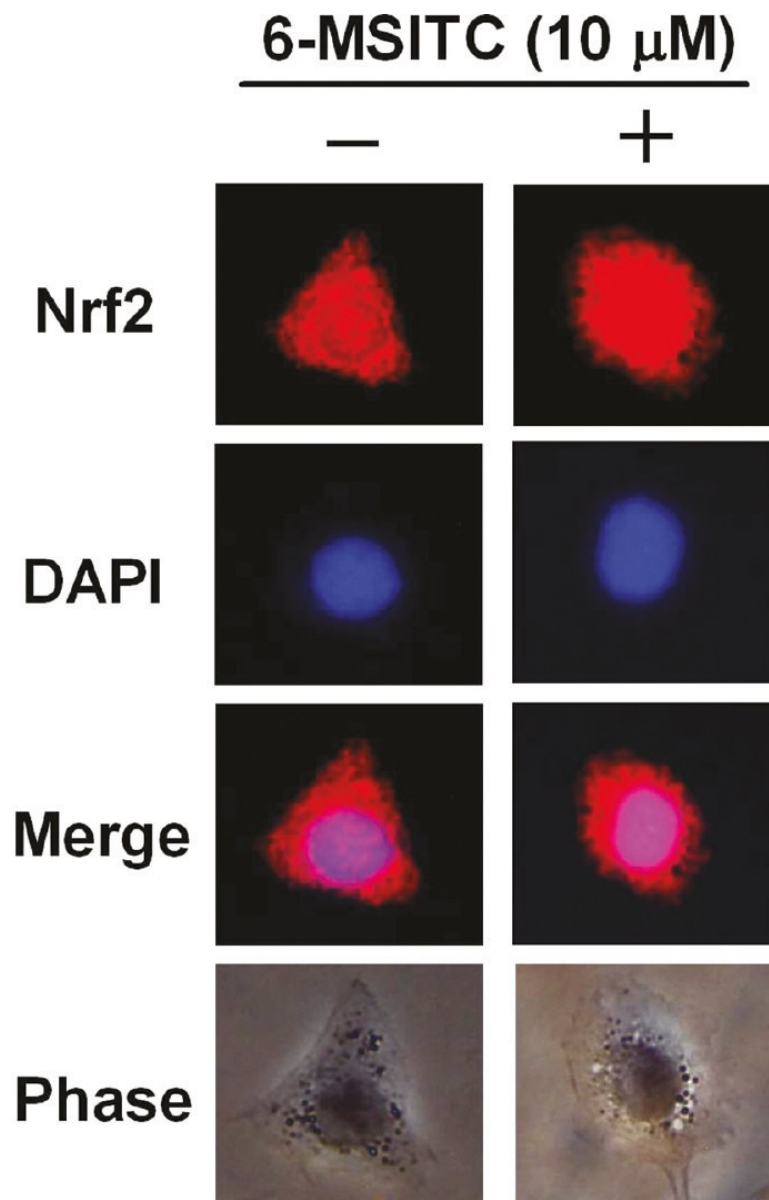


Fig. 2-2-6. 6-MSITC increases the localization of Nrf2 in nucleus. HepG2 cells were untreated (left panel) or treated with 10  $\mu$ M 6-MSITC for 6 h (right panel) and then subjected to immunohistochemical staining with Nrf2 antibody followed by incubation with Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies. For each condition, an image of the cell nucleus stained with DAPI specific for DNA and a phase-contrast image (Phase) are also presented. Nuclear localization of Nrf2 protein is indicated by the presence of violet in the merged images.

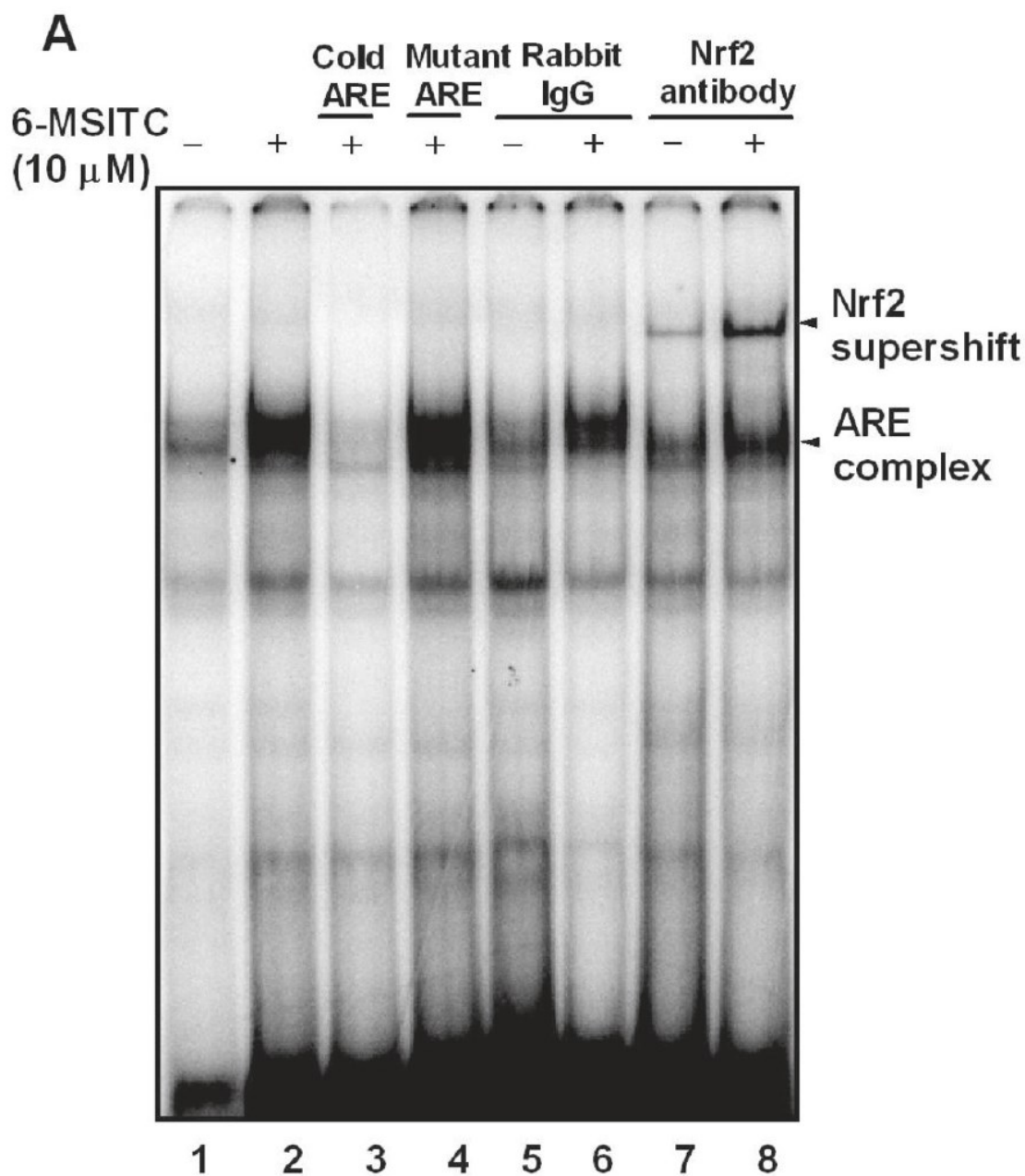


Fig. 2-2-7. 6-MSITC stimulates Nrf2-mediated ARE activity. (A) EMSA of ARE-binding complex with Nrf2 antibody. HepG2 cells were treated with 10  $\mu$ M 6-MSITC for 6 h, and nuclear proteins were extracted. The nuclear extracts were reacted with  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide probe of NQO1-ARE for 30 min at 25°C (lane 1–4). For supershift assay, the nuclear extracts were reacted with the probe for 20 min at 25°C and then incubated with Nrf2 antibody or rabbit IgG for another 30 min at 25°C (lane 5–8).

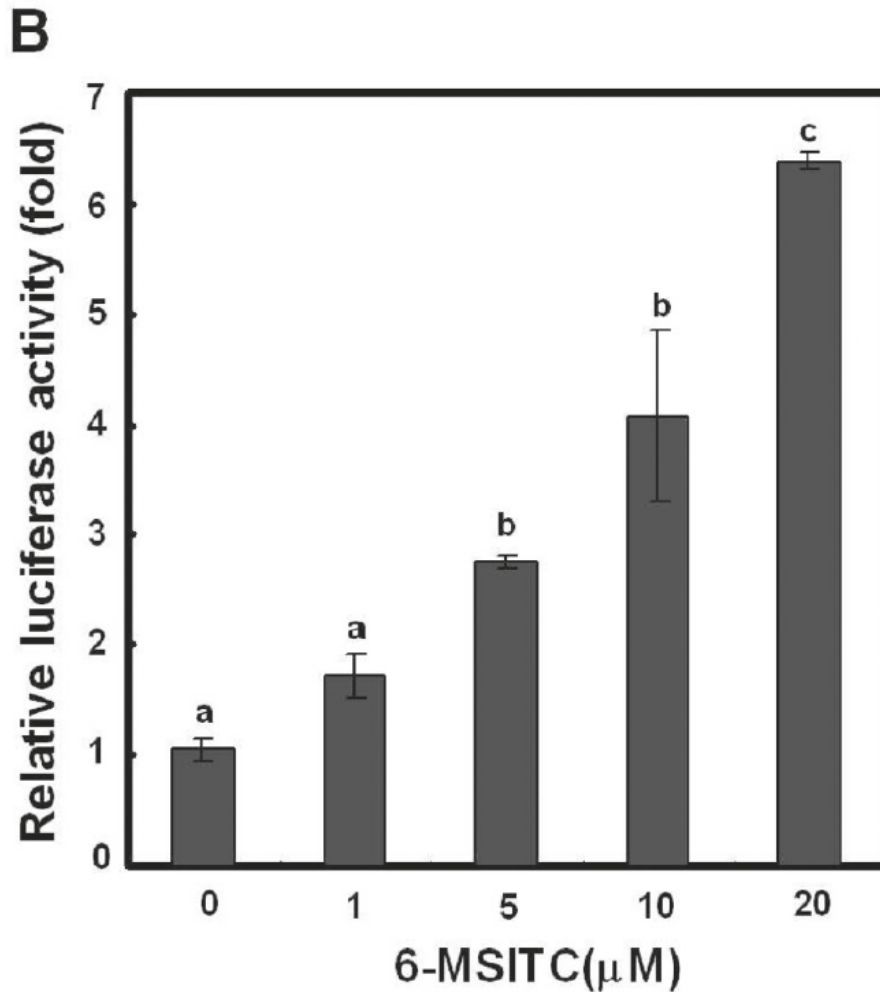


Fig. 2-2-7. 6-MSITC stimulates Nrf2-mediated ARE activity. **(B)** Reporter gene assay of Nrf2-mediated ARE activity by 6-MSITC. HepG2 cells were cotransfected with 0.2  $\mu\text{g}$  of pGL2-ARE-luciferase and 0.1  $\mu\text{g}$  of the Nrf2 expression plasmids in Opti-MEM for 5 h. The cells were then placed in DMEM for 24 h and then stimulated by 0–20  $\mu\text{M}$  6-MSITC for an additional 12 h. The cells were lysed and assayed for firefly and renilla luciferase activities. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .



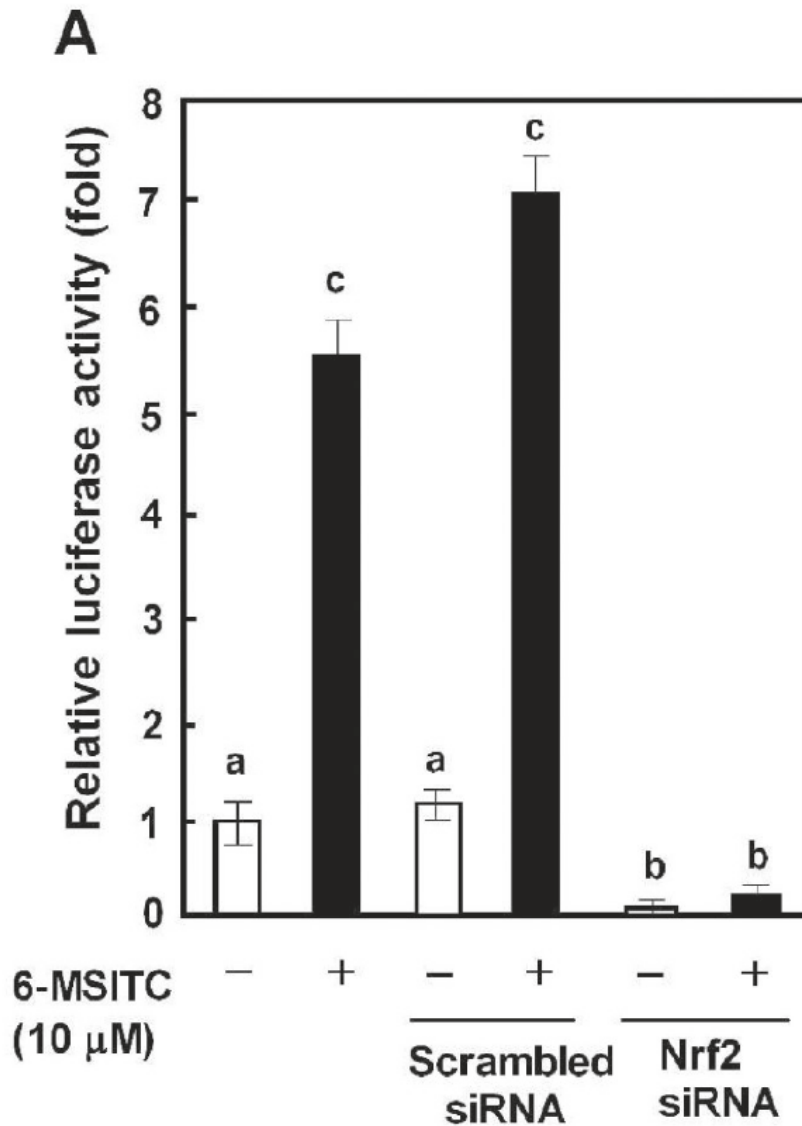


Fig. 2-2-8. Effects of 6-MSITC on ARE activity in Nrf2- or Keap1-deficient cells. (A) Report gene assay. HepG2 cells were cotransfected with pGL2-ARE luciferase construct, pGL4-TK-Renilla, and 100 nM siRNA against Nrf2 or scrambled duplex in Opti-MEM for 24 h. The cells were then placed in DMEM for 24 h and then stimulated by 10 μM 6-MSITC for an additional 12 h. The cells were lysed and assayed for firefly and renilla luciferase activities. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts differs significantly at  $p < 0.05$ .

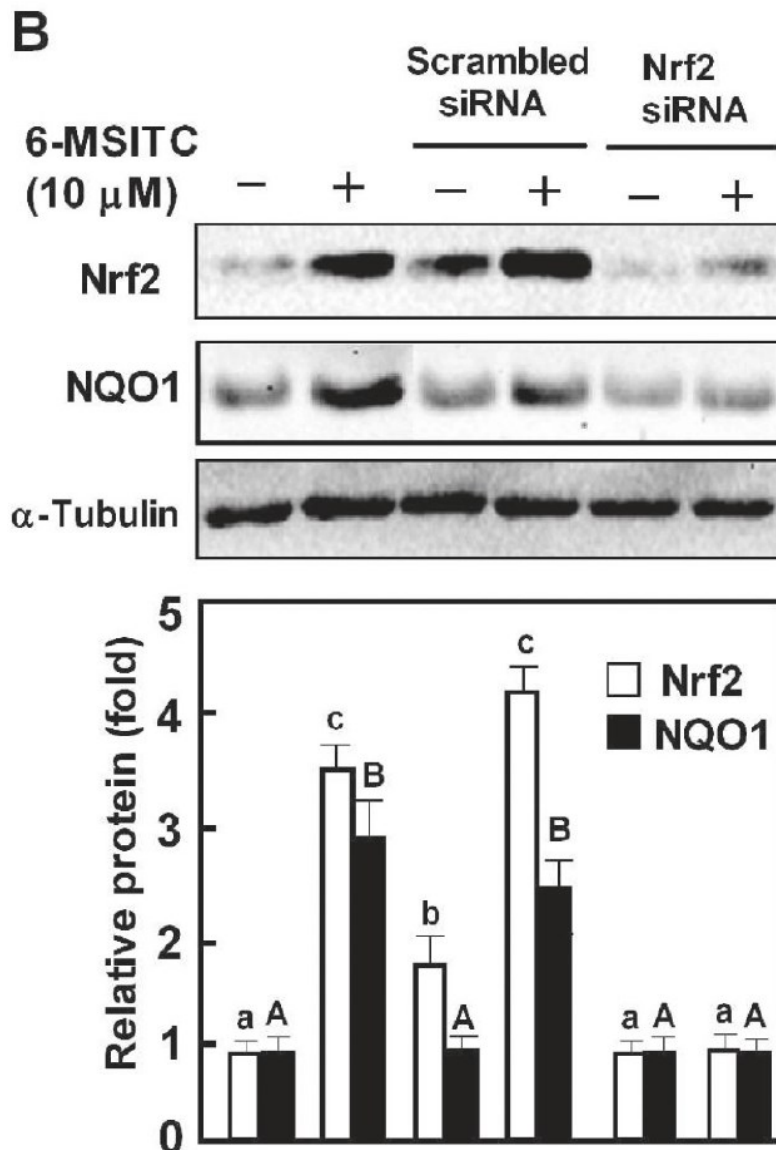


Fig. 2-2-8. Effects of 6-MSITC on ARE activity in Nrf2- or Keap1-deficient cells. **(B)** Western blot analysis. HepG2 cells were transfected with 100 nM siRNA against Nrf2 or scrambled duplex in Opti-MEM for 24 h. The cells were further placed in DMEM for 24 h and then stimulated with 10  $\mu$ M 6-MSITC for an additional 6 h. Cell lysates were used to detect Nrf2, NQO1, and  $\alpha$ -tubulin by Western blot analysis with their respective antibodies. The average value from triplicate tests with differently lettered superscripts (small for Nrf2 and capital for NQO1 in panel B) differs significantly at  $p < 0.05$ .

#### 2-2-4 考察

Nrf2 による ARE 転写活性は、Nrf2/Keap1 の状態に起因することが報告されている [116, 117, 129]。非酸化ストレス条件下では、細胞質に局在化した Nrf2 は、ユビキチン-26S プロテアソーム経路を通じて速やかに減少する [114, 117, 126]。この間、Nrf2 の Nrf2-ECH homology (Neh) 2 ドメインのリジン残基を標的とする Cul3 型ユビキチンリガーゼ複合体において、Keap1 が基質アダプターとして機能している [114]。そのため、Nrf2-Keap1-Cul3 複合体からの Nrf2 解離は、Nrf2 による遺伝子転写活性誘導にて重要な段階であると考えられる [114]。しかし、外因性誘導剤による Nrf2 活性化の分子メカニズムは解明されていない。特に、Nrf2 が活性化している間、外因性誘導剤が Nrf2 と Keap1 の相互作用にどのような影響を与えるかが知られていない。近年、酸化ストレス刺激が、Keap1-Cul3 複合体による Nrf2 へのユビキチン化活性を阻害することが推測されており、新たに生合成された Nrf2 が Keap1-Cul3 複合体からのユビキチン化を回避して核に蓄積する [114, 115, 120]。あるいは、Keap1 はシステイン残基に富むタンパク質であり、そのチオール基を介した酸化ストレス誘導剤と Keap1 の相互作用は、Nrf2-Keap1-Cul3 複合体から Nrf2 を解離させ、ARE を活性化するために Keap1-Cul3 複合体によるユビキチン化から Nrf2 を防御するとの報告もある [132, 133]。

毒性成分のヒ素は、おそらく Keap1-Cul3 複合体によるユビキチン化活性阻害を通じて、Nrf2 のユビキチン化を阻害する [134]。一方、*t*BHQ とケルセチン [123] は、Keap1-Cul3 複合体によるユビキチン化活性を阻害するのではなく、約 150 kDa の Keap1 修飾体の形成を誘導する。約 150 kDa の Keap1 修飾体は、Keap1-Cul3 複合体の相互作用を変え、Nrf2 の蓄積を導き、Nrf2 を介した転写を増強する [132]。本研究では、6-MSITC が約 150 kDa の Keap1 修飾体を形成し (Fig. 2-2-4C)、Nrf2/ARE を活性化することで NQO1 発現誘導することを確認した。6-MSITC は約 150 kDa の Keap1 修飾体を増加させ、約 70 kDa の Keap1 を減少させたことから (Fig. 2-2-4C)、6-MSITC によるユビキチン化阻害 (Fig. 2-2-4B) とターンオーバー阻害 (Fig. 2-2-3) を通じた Nrf2 安定化は、約 150 kDa の Keap1 修飾体の形成に起因していることが考えられた。さらに、MG132 処理により上昇した Nrf2 のユビキチン化が 6-MSITC との共処理により減少したことからも (Fig. 2-2-4B)、6-MSITC による約 70 kDa の Keap1 の減少は、ユビキチン-26S プロテアソーム経路ではなく、約 150 kDa の Keap1 修飾体の形成に起因することが示された。

6-MSITC の類縁体である 4-MSITC は Keap1 のチオール基と反応してチオノアシル付加体を形成することが報告されている [130]。高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (liquid chromatography-tandem mass spectrometer; LC-MS/MS) を用いた検証では、4-MSITC は Cys-489 等の Kelch ドメインのシス

テイン残基と最も速く付加体を形成していた。さらに、Keap1 のシステイン残基の中でも、酸化ストレスセンサーとして機能し、Nrf2 の活性を制御している残基として、BTB ドメインの Cys-151 と central kinker ドメインの Cys-273、Cys-288 があげられるが、これらの残基においても、チオノアシル付加体を形成した。さらに、4-MSITC は、Nrf2 から Keap1 へのユビキチン化の切り替えを誘導せず、約 150 kDa の Keap1 修飾体を形成した。6-MSITC は NAC [102] や HSP90 $\beta$  [103] のチオール基と反応し、チオノアシル付加体を形成することが報告されているため、Keap1 においても、4-MSITC と同様にシステイン残基のチオール基と結合する可能性がある。その結果、約 150 kDa の Keap1 修飾体が形成され、Nrf2 の安定化に寄与した可能性が考えられる。今後、詳細な検証が必要である。

ARE 誘導剤による約 150 kDa の Keap1 修飾体の形成を誘導が複数報告されている。Hong ら [130] は、*t*BHQ 処理により形成された約 150 kDa の Keap1 修飾体を、ポリユビキチン化された Keap1 であると報告した。*t*BHQ 処理による Keap1 のセンサーシステインへの親電子的修飾が、Nrf2 から Keap1 にユビキチン化を切り替える仮説を提唱した。それゆえに、Nrf2 が安定化される。一方、Zhang ら [135] は、*t*BHQ 処理による約 130 kDa の Keap1 修飾体の形成に、センサーシステインの 1 つである Cys-151 が関わっていることと、約 130 kDa の Keap1 修飾体は、Keap1 と Keap1 以外のタンパク質との付加体や Keap1 の二量体等から成り立っている可能性を報告した。DTT 処理にて約 130 kDa のバンドが検出されたことから、ジスルフィド結合は Keap1 修飾化の原因ではないと考えられる。さらに、Sakurai ら [131] は、エブセレン処理において、DTT 無添加条件下では 150 kDa 以上の Keap1 修飾体のバンドを検出したものの、DTT 還元条件下ではそのバンドが消失したことを報告した。さらに、エブセレン処理によって形成された 150 kDa 以上の Keap1 修飾体は、Cys-151 の突然変異において検出されなくなった。これらのことから、エブセレン処理によって形成された 150 kDa 以上の Keap1 修飾体は、Cys-151 のジスルフィド結合が関与していることが考えられる。本研究では、6-MSITC が Keap1-Cul3 複合体によるユビキチン化を Nrf2 から Keap1 に切り替えなかったため（データは示していない）、約 150 kDa の Keap1 修飾体形成の要因として、Keap1 のユビキチン化は考えがたい。6-MSITC によって形成された Keap1 修飾体の構造に関して、今後の検証が必要である。最後に、Nrf2 siRNA は、ARE 転写活性誘導と Nrf2 と NQO1 の産生促進を劇的に減少させたため (Fig. 2-2-7A、2-2-7B)、Nrf2 は 6-MSITC が ARE 転写活性と NQO1 発現誘導するのに必要な因子であることが示された。

以上、6-MSITC が Nrf2 と Keap1 を標的にすることにより、Nrf2 による ARE 転写活性を調節することを証明した。6-MSITC は約 150 kDa の Keap1 修飾体を形成することで約 70 kDa の Keap1 を減らし、Nrf2 のユビキチン化とターンオー

バーを阻害することで Nrf2 を増やした。その結果、Nrf2/Keap1 比が上昇し、Keap1 と比べて過剰な Nrf2 は Keap1-Cul3 からのユビキチン化を回避し、核に蓄積した Nrf2 は ARE 転写活性を誘導することで、NQO1 の産生を促進した。本項では、HepG2 細胞における 6-MSITC の NQO1 産生促進効果とともに、その分子メカニズムを確認した。

本章では、ワサビ根茎成分 6-MSITC に ROS 産生そのものを阻害する効果と生体内の抗酸化性を高める効果があることを、細胞試験によって確認した。

### 第3章 ワサビ根茎成分 6-MSITC による育毛効果

#### 3-1 背景と目的

毛の退行は外観が大きく変わるため、心理的・社会的に強い影響を及ぼし、男女を問わず多くの人が悩んでいる。Quality of life (QOL) 改善のため、育毛効果がある機能性食品やその成分が研究され [136–138]、商品開発がされている。将来、高齢化に伴い、その需要が高まることが予想される。

毛包は、毛乳頭細胞 (dermal papilla cells; DPCs)、毛母細胞、メラノサイト、毛包幹細胞等の様々な細胞からなる皮膚付属器官である。DPCs は毛包の基部に存在し、成長因子等のメディエーターを放出することで、毛の成長と毛周期を制御する必要不可欠な機能を有している。もし DPCs を制御できる成分があれば、育毛誘導剤として利用できる可能性がある。

ヒト DPCs は血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) を発現する [139]。VEGF は重要な血管新生因子であり、休止期にて消失した毛包周囲の毛細血管を形成する [139]。VEGF は、オートクリン作用を有し、血管内皮細胞増殖因子受容体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2; VEGFR2) を通じてヒト DPCs の増殖を促進する [140]。VEGF は、毛細血管形成、または、DPCs の細胞賦活活性を上昇させることで、育毛効果を発揮する可能性がある。

ミノキシジルは育毛作用のある医薬品であり、ヒトにおいて毛髪量を増やすことが報告されている [141]。Han ら [142] は、ミノキシジルによる DPCs の細胞賦活活性がヒトにおいて育毛効果を発揮することを示した。さらに、Lachgar ら [143] は、DPCs のミノキシジルによる VEGF mRNA 発現量上昇は、男性型脱毛症における毛包の血管新生を維持することを示した。Li ら [144] は、ミノキシジルが DPCs のスルホニル尿素受容体 2B (sulfonyleurea receptor 2B; SUL2B) をおそらく活性化・開口させ、ATP から変換されたアデノシンはアデノシン A1 受容体 (adenosine A1 receptor; ADORA1) とアデノシン A2 受容体 (adenosine A2 receptor; ADORA2) の経路を通じて VEGF 産生を誘導することを報告した。これらのことから、ミノキシジルをポジティブコントロールとし、対象成分による DPCs の細胞賦活活性化と VEGF mRNA 発現上昇を指標に、育毛効果を評価することが可能である。

ブロッコリーはワサビと同様にアブラナ科に属しており、6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate; 6-MSITC) の類縁体である 4-メチルスルフィニルブチルイソチオシアネート (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate; 4-MSITC = スルフォラファン) 等のイソチオシアネート (isothiocyanate; ITC) 類を含有している。都築ら [145] は、ブロッコリースプラウト抽出物が、DPCs の細胞賦活活性を高め、VEGF の mRNA 発

現量を上昇させることを報告した。さらに、Sasaki ら [146] は、4-MSITC を摂取させた ob/ob マウスにおいて、毛が再生したことを報告した。ジヒドロテストステロン (dihydrotestosterone; DHT) は、毛包の退行を引き起こすことで、男性型脱毛症を誘導する。4-MSITC はマウス肝臓の  $3\alpha$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ ( $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase) を増やすことで、血中の DHT を分解し、DHT による育毛阻害をブロックした可能性が示されている。6-MSITC は細胞や動物試験等で様々な機能が報告されているが、育毛効果は報告されていない。しかし、ブロッコリースプラウト抽出物や 4-MSITC でその効果が報告されたことから、6-MSITC における効果が期待される。

そこで本章では、6-MSITC による育毛効果を、ヒト DPCs を用いて検討した。

## 3-2 方法

### 3-2-1 試料

6-MSITC は、村田ら [104] の方法に従い、6-メチルチオヘキシルイソチオシアネート (6-methylthiohexyl isothiocyanate; 6-MTITC) を酸化させることで合成した。定量核磁気共鳴 (quantitative nuclear magnetic resonance; qNMR) 法を用いた分析によると、6-MSITC の純度は 96 % であった (データは示していない)。その他試薬類は、試薬一覧の通り入手した。

### 3-2-2 細胞培養

ヒト DPCs は、Cell Applications, Inc. より購入した。DPCs の継代数は 3 回以下が推奨されている。本試験では、継代数が 2 回以下の DPCs を使用した。細胞を付属の DPCs 専用培地に浮遊させた後、コラーゲン I コートフラスコに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) で培養した。

### 3-2-3 細胞毒性評価

DPCs を  $5.0 \times 10^4$  cells/mL の濃度で DPCs 専用培地に浮遊させた後、100  $\mu$ L をコラーゲン I コート 96 ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) で 1 日間培養した。50 % コンフルエントを確認した後、培地を除去した。6-MSITC を含む DPCs 専用培地 100  $\mu$ L を添加した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) で 3 日間培養した。PBS で細胞を洗浄した後、Cell Count Reagent SF を 10 % 含む DPCs 専用培地 100  $\mu$ L を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C) に入れた。添加 30 分、90 分後、培養上清の吸光度 (測定波長 450 nm、参照波長 595 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。30 分、90 分の値から 1 時間当たりの吸光度変化量を算出した。

#### 3-2-4 細胞賦活活性評価

DPCs を  $4.0 \times 10^4$  cells/mL の濃度で DPCs 専用培地に浮遊させた後、300  $\mu$ L をコラーゲン I コート 48 ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で 1 日間培養した。培地除去後、試料を含む DPCs 専用培地 300  $\mu$ L を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で 1 日間、および、3 日間培養した。培地除去後、PBS で細胞を洗浄した。そこへ Cell Count Reagent SF を 10% 含む DPCs 専用培地 300  $\mu$ L を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) に入れた。添加 30 分、90 分後、培養上清の吸光度 (測定波長 450 nm、参照波長 595 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定した。30 分、90 分の値から 1 時間当たりの吸光度変化量を算出した。

#### 3-2-5 mRNA 発現量評価

DPCs を  $3.33 \times 10^5$  cells/mL の濃度で DPCs 専用培地に浮遊させた後、300  $\mu$ L をコラーゲン I コート 48 ウェルプレートに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で 1 日間培養した。100 % コンフルエントを確認した後、培地を除去した。試料を含む DPCs 専用培地 300  $\mu$ L を添加した後、CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (5 % CO<sub>2</sub>、37°C) で 2 時間培養した。PBS で細胞を洗浄した後、細胞から total RNA を抽出した。total RNA は、FastLane Cell cDNA kit を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR 反応は、SYBR *Premix Ex Taq* を用い、95°C、30 秒間の加熱により DNA ポリメラーゼを活性化した後、95°C、10 秒間と 60°C、30 秒間のサイクルを 40 回繰り返した。PCR プライマーの塩基配列は以下の通りとした。

#### VEGF

フォワード (5'-3') : aaagcatttgtttgtacaagatccg

リバース (5'-3') : cttgtcacatctgcaagtacgttcg

#### アデノシン A2b 受容体 (adenosine A2b receptor; ADORA2b)

フォワード (5'-3') : caatcccattgtctatgcttaccgg

リバース (5'-3') : gctgtaccccagcctgaccattccc

#### グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)

フォワード (5'-3') : catccctgctctactggcgctgcc

リバース (5'-3') : ccaggatgcccttgagggggcctc



GAPDH は内部標準として使用した。

### 3-2-6 統計解析

結果は、平均値 ± 標準偏差で表現した。ANOVA による検定後、Turkey's 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判断した。

## 3-3 結果

### 3-3-1 細胞毒性評価

6-MSITC は、 $8 \mu\text{M}$  以上の濃度において生細胞数が減少し、細胞毒性が認められた (Fig. 3-1)。この結果から、育毛試験は  $2 \mu\text{M}$  を上限とすることとした。なお、細胞毒性評価における試料処理時間は、細胞賦活活性評価等の育毛評価における最長処理時間である 3 日間とした。 $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルは細胞毒性を示さなかった (データは示していない)。

### 3-3-2 細胞賦活活性評価

試料処理 1 日間では、 $0.08$ 、 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC と  $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルがコントロールに対して有意な細胞賦活活性を示した (Fig. 3-2A)。 $0.4 \mu\text{M}$  の 6-MSITC は、 $0.08$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC と  $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルに対しても有意に細胞賦活活性を上昇させた (Fig. 3-2A)。試料処理 3 日間では、 $0.08$ 、 $0.4 \mu\text{M}$  の 6-MSITC と  $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルがコントロールに対して有意な細胞賦活活性を示した (Fig. 3-2B)。 $0.08$ 、 $0.4 \mu\text{M}$  の 6-MSITC は、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC と  $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルに対しても有意に細胞賦活活性を上昇させた (Fig. 3-2B)。

$0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC に DPCs に対する強力な細胞賦活活性があったものの、位相差顕微鏡による観察では、試料処理 3 日後のコントロールと  $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC の生細胞数にほとんど違いはなかった (Fig. 3-3)。

### 3-3-3 mRNA 発現量評価

mRNA 発現量評価は、試料処理を 2 時間とした。 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC は、コントロールと  $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC に対して VEGF mRNA 発現を有意に上昇した (Fig. 3-4A)。コントロールに対する有意差はなかったものの、 $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルは VEGF mRNA 発現を上昇させていた (Fig. 3-4A)。

$2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC と  $30 \mu\text{M}$  のミノキシジルは、コントロールと  $0.08$ 、 $0.4 \mu\text{M}$  の 6-MSITC に対して ADORA2b mRNA 発現量を有意に上昇した (Fig. 3-4B)。

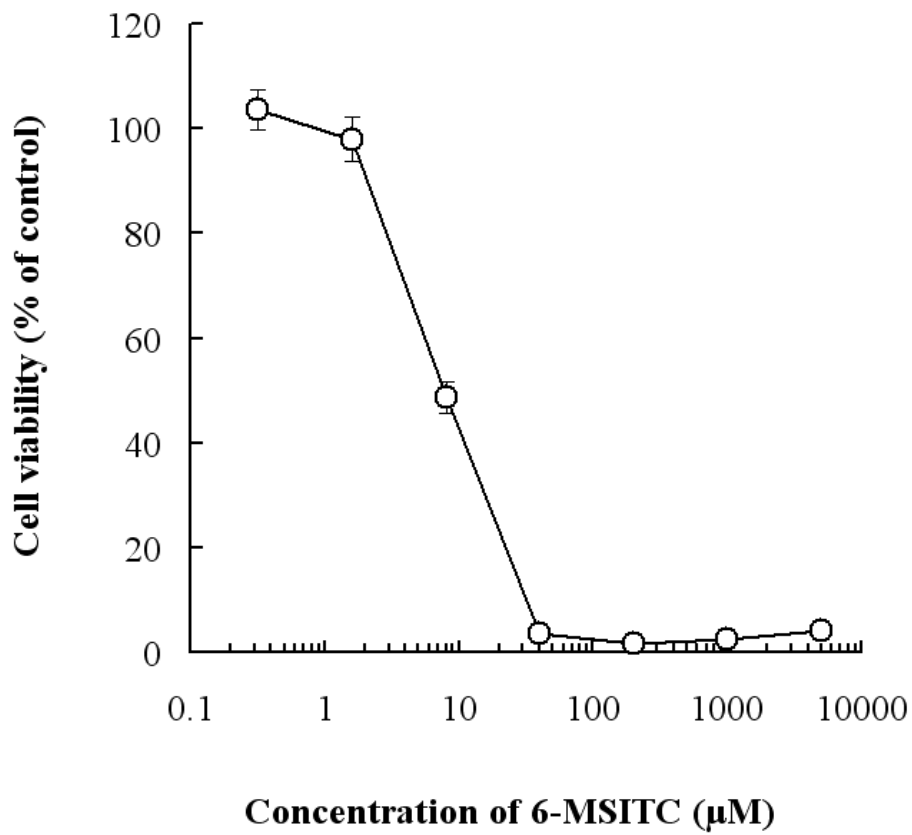


Fig. 3-1. Effects on DPC viability. DPCs were preincubated with 6-MSITC at 37°C for 3 days. Cells were then supplemented with Cell Count Reagent and incubated for 30 and 90 min. The absorption change per time unit was calculated to determinate cell viability. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

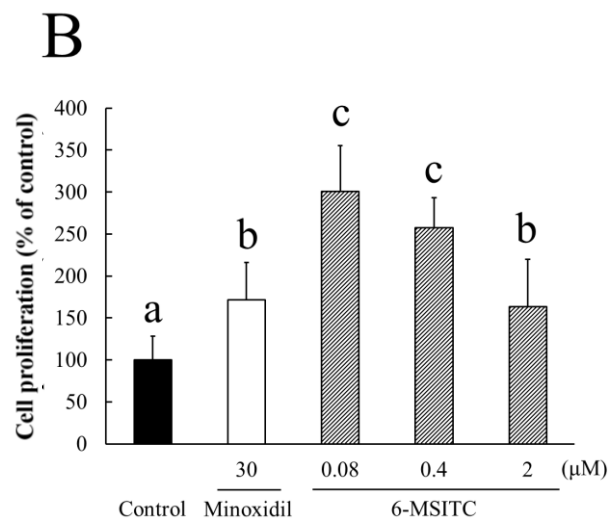
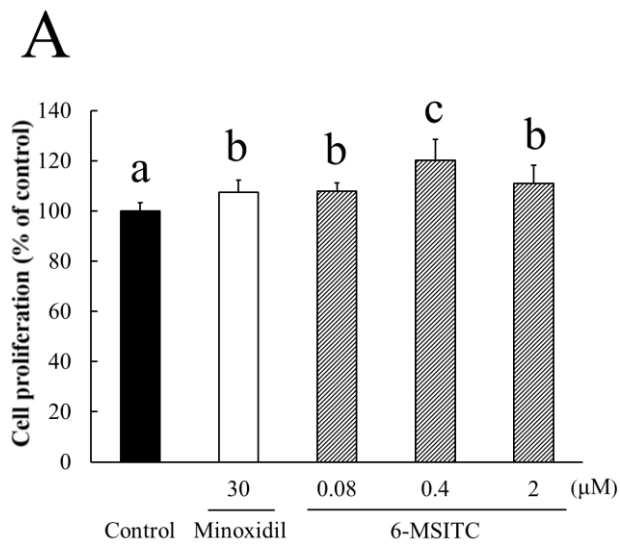
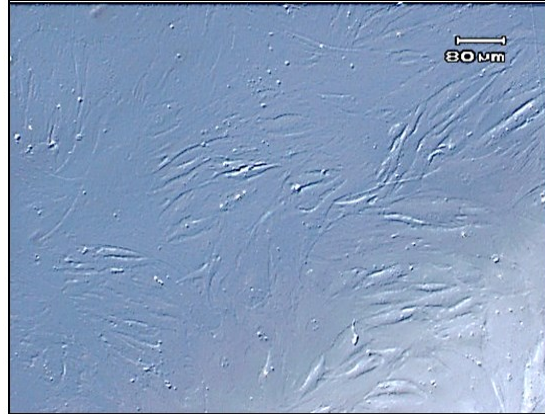


Fig. 3-2. DPC proliferation effect. DPCs were preincubated with test samples at 37°C for 1 (A) or 3 days (B). Cells were then supplemented with Cell Count Reagent and incubated for 30 and 90 min. The absorption change per time unit was calculated to determine cell proliferation. Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

Control



6-MSITC at 0.08 μM

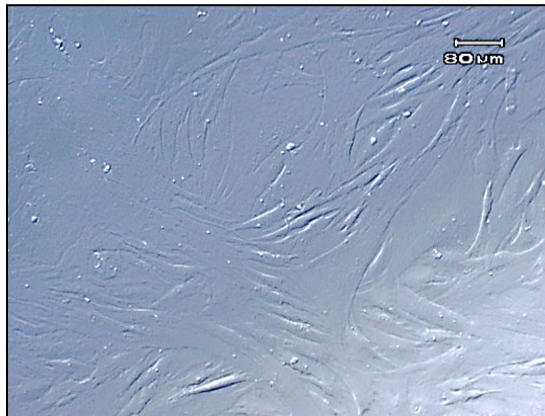


Fig. 3-3. DPCs under phase-contrast microscopy. After DPCs were incubated with test samples at 37°C for 3 days, the cells were observed with a phase-contrast microscope.

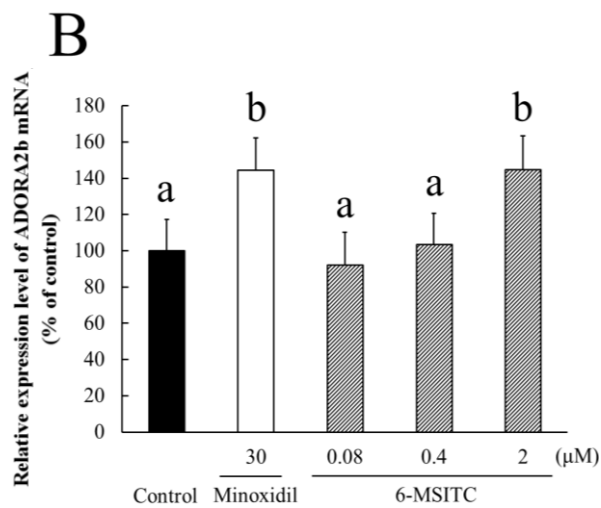
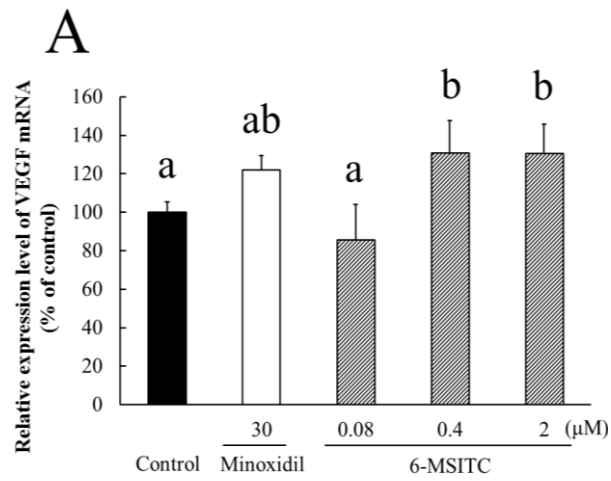


Fig. 3-4. Upregulation effects of mRNA relative expression level. DPCs were incubated with test samples at 37°C for 2 h. After total RNA was extracted and reverse transcribed, real-time PCR reactions were performed. The mRNA expression of (A) VEGF and (B) ADORA2b are shown. Different symbols express  $p < 0.05$  as compared with the other groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

### 3-4 考察

6-MSITC は、WST 法において細胞賦活活性があった (Fig. 3-2A、3-2B)。3 日間の培養において、細胞賦活活性は  $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC が高かった。しかし、位相差顕微鏡での観察では、生細胞数はコントロールとほとんど違いがなかった (Fig. 3-3)。同様に、 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC も、生細胞数はコントロールと変わらなかった (データは示していない)。そのため、6-MSITC は生細胞数を増加させるよりも、細胞自体を活性化する効果がある可能性がある。今後、細胞の活性化に関するさらなる検証が必要である。

培養細胞を用いた 6-MSITC の機能性評価が報告されている [17–21, 25, 50, 51, 94, 103, 121, 122]。しかし、6-MSITC が細胞賦活活性を上昇するといった報告はないため、今後、細胞特異性に関しては検証が必要である。Zanichelli ら [147] は、*R* 体の 4-MSITC が間葉系幹細胞に対して細胞賦活活性を示したことを報告している。*R* 体の 4-MSITC は、間葉系幹細胞に対して低濃度処理で細胞賦活活性を示し、高濃度処理でアポトーシスを誘導した。6-MSITC は 4-MSITC と構造が類似しているため、6-MSITC においても同様の作用を有する可能性がある。

Li ら [140] はヒト毛胞 DPCs が VEGF を放出し、VEGF が VEGFR2 を通じて DPCs の細胞賦活活性を上昇させることを報告した。2 時間の試料処理後、 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC はコントロールと  $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC に対して、VEGF mRNA 発現量を有意に上昇した。一方、 $0.08$ 、 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC は、1 日間、および 3 日間の試料処理後に、コントロールに対して有意に細胞賦活活性を上昇させた (Fig. 3-2A、3-2B)。そのため、 $0.4$ 、 $2 \mu\text{M}$  の 6-MSITC による DPCs の細胞賦活活性は、可能性の 1 つとして、VEGF mRNA 発現量の上昇に起因することが考えられる。 $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC による細胞賦活活性は、1 日間より 3 日間の試料処理後の方が高い効果であった。VEGF mRNA 発現量を測定する際、6-MSITC の処理時間を 2 時間で実施し、有意な上昇は示さなかった。VEGF mRNA 発現量を評価する際、処理時間を延ばすことで発現量が増加する可能性がある。一方、 $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC による DPCs の細胞賦活活性は、VEGF mRNA 発現量の上昇以外の可能性に起因することも考えられる。例えば、Kwon ら [148] は、エピガロカテキン-3-ガレート (epigallocatechin-3-gallate; EGCG) が DPCs の細胞賦活活性を有意に上昇させることを報告しており、その分子メカニズムとして Erk と Akt のリン酸化の促進や Bcl-2/Bax 比の上昇の可能性を述べている。 $0.08 \mu\text{M}$  の 6-MSITC においても EGCG と同様にこれらのタンパク質に作用した可能性がある。

ミノキシジルが ADORA1 と ADORA2 の経路を通じて VEGF 産生を誘導することが報告されている [144]。予備試験として、DPCs の DNA マイクロアレイ分析 (3D-Gene human oligo chip 25k) を実施したところ、6-MSITC とミノキシジル

による ADORA1 mRNA 発現量に変化はなかったが、6-MSITC とミノキシジルは ADORA2b mRNA 発現量を上昇させた（データは示していない）。そのため、本試験として、ADORA2b mRNA の定量分析をリアルタイム PCR 法にて実施した。2 時間の試料処理後、2  $\mu$ M の 6-MSITC と 30  $\mu$ M のミノキシジルは、コントロールや 0.08、0.4  $\mu$ M の 6-MSITC に対して ADORA2b mRNA 発現量を有意に上昇した (Fig. 3-4B)。一方、VEGF においては 0.4、2  $\mu$ M の 6-MSITC が、発現量を有意に上昇させた (Fig. 3-4A)。2  $\mu$ M の 6-MSITC による VEGF mRNA 発現量の上昇は、可能性の 1 つとして、ADORA2b mRNA 発現量上昇に起因したことが考えられる。分子メカニズムを考慮すると、ADORA2b mRNA は VEGF mRNA より早く変動する可能性があるため、6-MSITC の処理時間を VEGF mRNA より ADORA2b mRNA を短くすれば、0.4  $\mu$ M の 6-MSITC においても、ADORA2b mRNA 発現量の上昇が生じた可能性がある。その一方で、0.4  $\mu$ M の 6-MSITC による VEGF mRNA 発現量の上昇は、ADORA2b mRNA 発現以外の可能性に起因したことも考えられる。以上のことより、6-MSITC による ADORA2b mRNA 発現量の上昇は、VEGF mRNA の上昇に関係する可能性がある。今後、ADORA2b のタンパク質を分析する等、詳細な分子メカニズムを解明する必要がある。

Lewis ら [149] は、アリルイソチオシアネート (allyl isothiocyanate; AITC) が活性中心 Cys-215 への修飾を通じて、protein tyrosine phosphatase を不活性化することを報告した。6-MSITC は *N*-アセチル-L-システイン (*N*-acetyl-L-cysteine; NAC) [88] やヒートショックプロテイン 90 $\beta$  (heat shock protein 90 $\beta$ ; HSP90 $\beta$ ) のチオール基 [89] に結合することが報告されている。一方、AITC は生体条件下において、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) のリジン残基のアミノ基と結合することも報告されており [150]、6-MSITC も同様にアミノ基と結合する可能性がある。本試験では、6-MSITC は DPCs を刺激したが、DPCs 専用培地に含まれる FBS は成長因子等のタンパク質を含んでいる。6-MSITC は DPCs を直接的に刺激した可能性があるが、FBS に含まれるタンパク質のシステイン残基やリジン残基を修飾することで間接的に DPCs を刺激した可能性がある。

本章では、6-MSITC が DPCs において、細胞賦活活性を上昇させることと VEGF mRNA 発現量を上昇させることを報告した。DPCs における 6-MSITC の刺激効果は、ADORA2b mRNA 発現量の上昇に関係している可能性がある。ヒトを対象とした試験を実施する必要があるものの、6-MSITC が育毛効果を発揮する成分として活用できる可能性がある。

## 総括

本研究では、ワサビの有効活用を目的とした機能性研究を実施した。ワサビは日本人の食文化に欠かせない伝統食材であるが、将来、ワサビの消費量を維持または増加させるためには、付加価値をつける必要があることが考えられる。そこで本研究では、ワサビの根茎と葉を機能性原料として扱うことを想定した。特にワサビ葉は、通常ほとんど廃棄されているため、その有効活用は産業としても重要である。

第1章ではワサビの抗肥満効果を検討した。第1項と第2項では実験動物を用いた検討を実施した。まず、WRE または WLE を含む高脂肪食を Wistar ラットに食べさせて比較した。4週間後、ラットの最終体重は高脂肪食群と WRE 群では差がなかったものの、WLE 群で有意に減少した。さらに、WLE 群は肩甲骨間 BAT の *Adrb3* の mRNA 発現量を有意に上昇した。このことから、WLE による *Adrb3* の mRNA 発現量上昇が、高脂肪食ラットの肥満抑制に関与する可能性が考えられた。そこで、第3項と第4項では培養細胞を用い、ワサビ葉に含まれる抗肥満成分を探索した。前駆脂肪細胞からの脂肪細胞への分化が肥満を誘導するため、分化阻害化合物が抗肥満成分となる可能性がある。3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて、その分化を阻害する成分として、ワサビ葉より 5-HFA ester を単離、同定した。一方、有効成分が BAT に作用する可能性もある。ラット初代褐色脂肪細胞を用いて検証したところ、イソビテキシンとルテオリンに脂肪蓄積抑制活性があり、上記2成分に加えてイソサポナリン、イソオリエンチン、アピゲニンが UCP1 mRNA 発現量を上昇させることが判明した。以上の成分が WLE の抗肥満効果に寄与する可能性が考えられた。

ワサビ根茎には抗肥満効果が認められなかったため、別の効果を検証することとした。既に根茎については、機能性成分 6-MSITC の存在が明らかになっているため、この化合物を細胞試験用の試料として用いることとした。第2章では、6-MSITC の抗酸化効果を検証した。ROS を消去するには、ROS 産生そのものを阻害するか、生体内の抗酸化性を高める必要がある。生体において好中球は ROS の主な産生源であり、第1項では、PMA で刺激した分化 HL60 細胞（好中球）から産生される  $O_2^-$  の阻害効果を検証した。6-MSITC は  $O_2^-$  の産生を阻害し ( $IC_{50}$  値 ; 28.9  $\mu M$ )、0.8~20  $\mu M$  の濃度で NADP 消費を有意に阻害した。一方、無細胞系の試験では、263  $\mu M$  以下で  $O_2^-$  捕捉活性はなかったため、6-MSITC による  $O_2^-$  産生阻害効果は、NADPH オキシダーゼにおける酵素反応の減少に起因することが考えられた。一方、第2項では、肝臓の代謝モデルである HepG2



細胞を用いて、Nrf2/Keap1系における6-MSITCの抗酸化酵素誘導効果を検証した。6-MSITCはNQO1を有意に上昇させた。6-MSITCはKeap1修飾体の形成を誘導することで約70 kDaのKeap1を減少させ、Nrf2のユビキチン化を阻害して半減期を約3倍に延ばした。上昇したNrf2は核に移行し、AREの転写活性を誘導した。これらの結果から、6-MSITCによるKeap1修飾体の形成を通じて、Nrf2が上昇することでNQO1産生を促進することが考えられた。すなわち、6-MSITCは好中球からのO<sub>2</sub>産生阻害と、Nrf2/Keap1系を通じたNQO1産生促進により、抗酸化効果を発揮する可能性が考えられた。

第3章では6-MSITCの育毛効果を検討した。ヒトDPCsは毛包の基部に存在しており、VEGF等の分子メディエーターを分泌することで、毛髪の成長やヘアサイクルを調節している。6-MSITCをDPCsに添加した結果、有意な細胞賦活性があり、VEGFとADORA2bのmRNA発現量を上昇させた。ADORA2の経路を通じたVEGFの誘導が報告されているため、6-MSITCがADORA2b mRNAの上昇を通じて、育毛効果を発揮する可能性が考えられた。

以上のように、本研究では、ワサビやその成分による抗肥満や抗酸化、育毛効果を、培養細胞や実験動物を用いて明らかにした。現在、ワサビの使用用途は専ら薬味ばかりであるが、本研究によって、ワサビの薬味以外の用途としての機能性食品素材として有効利用できる可能性を見出した。長寿国である日本では、健康寿命を平均寿命に近づけようとする機運が高まっている。健康な生活を続けていく上で、ワサビの抗酸化や抗肥満効果が役立つ可能性がある。一方、心理的・社会的に快適な生活を続けていく上で、ワサビの育毛効果が役に立つ可能性がある。このように、心身共に健康を保つ素材として、ワサビを有効に活用できるかもしれない。今後、ヒトでの摂取による効果の検証等、ワサビの機能性研究のさらなる発展が期待される。

## 参考文献

- [1] 大澤俊彦：「サプリメント」による抗老化療法の現状と展望, 日本老年医学会雑誌, **42**, 587–595 (2005).
- [2] Yamane, K., Sugiyama, Y., Lu, Y.X., Lü, Na., Tanno, K., Kimura, E., and Yamaguchi, H. : Genetic differentiation, molecular phylogenetic analysis, and ethnobotanical study of *Eutrema japonicum* and *E. tenue* in Japan and *E. yunnanense* in China. *Hort. J.*, **85**, 46–54 (2016).
- [3] 足立昭三：ワサビ栽培, p.13, 株式会社秀潤社 (1988).
- [4] 平成 28 年特用林産基礎資料, (16) わさび (生産量), 農林水産省
- [5] 中日新聞, 11 判, p.26, 2001 年 4 月 17 日
- [6] 深江輔仁 撰:本草和名 下巻 (日本古典全集 第 1 回), p.43, 日本古典全集刊行会 (1927).
- [7] 人見必大：本朝食鑑 1 (東洋文庫 296), p.180, 平凡社 (1976).
- [8] 貝原益軒：大和本草 卷之五, p.25, 有明書房 (1983).
- [9] 岡田稔：新訂原色牧野和漢薬草大圖鑑, p.154, 株式会社北隆館 (2002).
- [10] 伊沢凡人, 会田民雄：カラー版薬草図鑑, p.277, 社団法人家の光協会 (1999).
- [11] Ina, K., Ina, H., Ueda, M., Yagi, A., and Kishima, I. :  $\omega$ -Methylsulfinylalkyl isothiocyanates in wasabi. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 537–538 (1989).
- [12] Kumagai, H., Kashima, N., Seki, T., Sakurai, H., Ishii, K., and Ariga, T. : Analysis of volatile components in essential oil of upland Wasabi and their inhibitory effects on platelet aggregation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2131–2135 (1994).

- [13] 伊奈和夫：わさび、からし類の揮発性成分（辛味成分を中心とした），香料, **136**, 45–52 (1982).
- [14] Etoh, H., Nishimura, A., Takasawa, R., Yagi, A., Saito, K., Sakuta, K., Kishima, I., and Ina, K. :  $\omega$ -Methylsulfinylalkyl isothiocyanates in wasabi, *Wasabia japonica* Matsum. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1587–1589 (1990).
- [15] Isshiki, K., Tokuoka, K., Mori, R., and Chiba, S. : Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1476–1477 (1992).
- [16] Wagner, A.E., Boesch-Saadatmandi, C., Dose, J., Schultheiss, G., and Rimbach, G. : Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate – role of Nrf2, NF- $\kappa$ B and microRNA-155. *J. Cell. Mol. Med.*, **16**, 836–843 (2012).
- [17] Yamada-Kato, T., Nagai, M., Ohnishi, M., and Yoshida, K. : Inhibitory effects of wasabi isothiocyanates on chemical mediator release in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **58**, 303–307 (2012).
- [18] Morimitsu, Y., Hayashi, K., Nakagawa, Y., Fujii, H., Horio, F., Uchida, K., and Osawa, T. : Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, wasabi. *Mech. Ageing Dev.*, **116**, 125–134 (2000).
- [19] Watanabe, M., Ohata, M., Hayakawa, S., Isemura, M., Kumazawa, S., Nakayama, T., Furugori, M., and Kinae, N. : Identification of 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate as an apoptosis-inducing component in wasabi. *Phytochemistry*, **62**, 733–739 (2003).
- [20] Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M., and Kumagai, Y. : Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ. Health Perspec.*, **119**, 1117–1122 (2011).
- [21] Uto, T., Fujii, M., and Hou, D.X. : Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 transcription by 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate, a

- chemopreventive compound from *Wasabia japonica* (Miq.) Matsumura, in mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1772–1784 (2005).
- [22] Fukuchi, Y., Kato, Y., Okunishi, I., Matsutani, Y., and Osawa, T. : 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate, an antioxidant derived from *Wasabia japonica* MATUM, ameliorates diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 290–295 (2004).
- [23] Yoshida, J., Nomura, S., Nishizawa, N, Ito, Y., and Kimura, K. : Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia japonica* Matsum). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 136–139 (2011).
- [24] Nagai, M., and Okunishi, I. : The effect of wasabi rhizome extract on atopic dermatitis-like symptoms in HR-1 hairless mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **55**, 195–200 (2009).
- [25] Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, K., Fujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M., and Uchida, K. : A sulforaphane analogue that potently activates the nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3456–3463 (2002).
- [26] Atwell, L.L., Hsu, A., Wong, C.P., Stevens, J.F., Bella, D., Yu, T.W., Pereira, C.B., Löhr, C.V., Christensen, J.M., Dashwood, R.H., Williams, D.E., Shannon, J., and Ho, E. : Absorption and chemopreventive targets of sulforaphane in humans following consumption of broccoli sprouts or a myrosinase-treated broccoli sprout extract. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 424–433 (2015).
- [27] Pedras, M.S., Sorensen, J.L., Okanga, F.I., and Zaharia, I.L. : Wasalexins A and B, new phytoalexins from wasabi: Isolation, synthesis, and antifungal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 3015–3020 (1999).
- [28] Hosoya, T., Yun, Y.S., and Kunugi, A. : Antioxidant phenylpropanoid glycosides from the leaves of *Wasabia japonica*. *Phytochemistry*, **69**, 827–832 (2008).
- [29] Lee, Y.S., Yang, J.H., Bae, M.J., Yoo, W.K., Ye, S., Xue, C.C., and Li, C.G. :

- Anti-oxidant and anti-hypercholesterolemic activities of *Wasabia japonica*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **7**, 459–464 (2010).
- [30] Sekiguchi, H., Takabayashi, F., Deguchi, Y., Masuda, H., Toyozumi, T., Masuda, S., and Kinae, N. : Leaf extract of *wasabia japonica* relieved oxidative stress induced by *helicobacter pylori* infection and stress loading in mongolian gerbils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1194–1199 (2010).
- [31] Okamoto, M., Hashimoto, T., Goto, M., Nagai, M., Okunishi, I., and Kanazawa, K. : Preventive effects of wasabi leaf extract on carcinogenic initiation. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 251–254 (2008).
- [32] Yoshida, S., Hosoya, T., Inui, S., Masuda, H., and Kumazawa, S. : Component analysis of wasabi leaves and evaluation of their anti-inflammatory activity. *Food Sci. Technol. Res.*, **21**, 247–253 (2015).
- [33] Mochida, K. and Ogawa, T. : Anti-influenza virus activity of extract of Japanese wasabi leaves discarded in summer. *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 1704–1708 (2008).
- [34] Nagai, M., Akita, K., Yamada, K., and Okunishi, I. : The effect of isosaponarin isolated from wasabi leaf on collagen synthesis in human fibroblasts and its underlying mechanism. *J. Nat. Med.*, **64**, 305–312 (2010).
- [35] Hosoya, T., Yun, Y.S., and Kunugi, A. : Five novel flavonoids from *Wasabia japonica*. *Tetrahedron*, **61**, 7037–7044 (2005).
- [36] Uno, K., Yamada, T., Ishigaki, Y., Imai, J., Hasegawa, Y., Gao, J., Kaneko, K., Matsusue, K., Yamazaki, T., Oka, Y., and Katagiri, H. : Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *Eur. Heart J.*, **33**, 1279–1289 (2012).
- [37] Klop, B., Elte, J.W., and Cabezas, M.C. : Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets. *Nutrients*, **5**, 1218–1240 (2013).
- [38] Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. : Mechanisms linking obesity to

- insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, **444**, 840–846 (2006).
- [39] 吉川敏一：フリーラジカルの医学, 京都府立医科大学雑誌, **120**, 381–391 (2011).
- [40] Breitman, T.R., Selonick, S.E., and Collins, S.J. : Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 2936–2940 (1980).
- [41] Kamiya, T., Nagamine, R., Sameshima-Kamiya, M., Tsubata, M., Ikeguchi, M., and Takagaki, K. : The isoflavone-rich fraction of the crude extract of the Puerariae flower increases oxygen consumption and BAT UCP1 expression in high-fat diet-fed mice. *Glob. J. Health Sci.*, **4**, 147–155 (2012).
- [42] Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., and Miyashita, K. : Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Mol. Med. Rep.*, **2**, 897–902 (2009).
- [43] 西繁典, 齋藤優介, 小疇浩, 弘中和憲, 小嶋道之 : シーベリー葉ポリフェノールによる抗脂肪食投与雄マウスの抗肥満効果, 日本食品科学工学会誌, **54**, 477–481 (2007).
- [44] Thomaz, F.S., Panchal, S., Ward, L., Worrall, S. : Effect of wasabi (*Wasabia japonica*) on metabolic parameters of diet-induced obese Wistar rats. *Diabetol. Stoffwechs*, **12**, S1–S84 (2017).
- [45] Tanaka, Y., Ikeda, T., Yamamoto, K., Masuda, S., Ogawa, H., and Kamisako, T. : 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate prevents high-fat diet-induced fatty liver but fails to attenuate hepatic iron accumulation in mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **43**, 1153–1156 (2016).
- [46] Ogawa, T., Tabata, H., Katsube, T., Ohta, Y., Yamasaki, Y., Yamasaki, M., and Shiwaku, K. : Suppressive effect of hot water extract of wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.) leaves on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Food Chem.*, **118**, 239–244 (2010).

- [47] Yamasaki, M., Ogawa, T., Wang, L., Katsube, T., Yamasaki, Y., Sun, X., and Shiwaku, K. : Anti-obesity effects of hot water extract from wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.) leaves in mice fed high-fat diets. *Nutr. Res. Pract.*, **7**, 267–272 (2013).
- [48] Oowatari, Y., Ogawa, T., Katsube, T., Iinuma, K., Yoshitomi, H., and Gao, M. : Wasabi leaf extracts attenuate adipocyte hypertrophy through PPAR $\gamma$  and AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 1594–1601 (2016).
- [49] Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. : Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, **427**, 260–265 (2004).
- [50] Terada, Y., Masuda, H., and Watanabe, T. : Structure-activity relationship study on isothiocyanates: comparison of TRPA1-activating ability between allyl isothiocyanate and specific flavor components of wasabi, horseradish, and white mustard. *J. Nat. Prod.*, **78**, 1937–1941 (2015).
- [51] Uchida, K., Miura, Y., Nagai, M., and Tominaga, M. : Isothiocyanates from *Wasabia japonica* activate transient receptor potential ankyrin 1 channel. *Chem. Senses*, **37**, 809–818 (2012).
- [52] Cawthorne, M.A., Sennitt, M.V., Arch, J.R., and Smith, S.A. : BRL 35135, a potent and selective atypical beta-adrenoceptor agonist. *An. J. Clin. Nutr.*, **55**, 252S–257S (1992).
- [53] Emilsson, V., Summers, R.J., Hamilton, S., Liu, Y.L., and Cawthorne, M.A. : The effects of the  $\beta$ 3-adrenoceptor agonist BRL 35135 on UCP isoform mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **252**, 450–454 (1998).
- [54] Ito, M., Ishihara, A., Gomori, A., Matsushita, H., Ito, M., Metzger, J.M., Marsh, D.J., Haga, Y., Iwaasa, H., Tokita, S., Takenaga, N., Sato, N., MacNeil, D.J., Moriya, M., and Kanatani, A. : Mechanism of the anti-obesity effects induced by a novel melanin-concentrating hormone 1-receptor antagonist in mice. *Br. J.*

*Pharmacol.*, **159**, 374–383 (2010).

- [55] Oishi, Y., Kato, H., and Noguchi, T. : Dietary protein as a potent regulator of the hyaluronan synthase gene in rat skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 736–742 (2003).
- [56] Bonilla, S., Redonnet, A., Noël-Suberville, C., Pallet, V., Garcin, H., and Higuieret, P. : High-fat diets affect the expression of nuclear retinoic acid receptor in rat liver. *Br. J. Nutr.*, **83**, 665–671 (2000).
- [57] 小林謙一, 松本雄宇, 廣田弥里, 遠田昂史, 寺本明子, 吉野美香, 山本祐司, 田所忠弘 : 高脂肪食摂取ラットにおけるシルク (家蚕・野蚕) パウダーの排便促進効果および糞中脂質排泄促進効果, *日本食生活学会誌*, **25**, 185–190 (2014).
- [58] Nomura, S., Ichinose, T., Jinde, M., Kawashima, Y., Tachiyashiki, K., and Imaizumi, K. : Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 840–847 (2008).
- [59] Margareto, J., Marti, A., and Martínez, J.A. : Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPAR $\gamma$ . *J. Nutr. Biochem.*, **12**, 130–137 (2001).
- [60] Hauptman, J., Lucas, C., Boldrin, M.N., and Collins, H. : Orlistat in the long-term treatment of obesity in primary care settings. *Arch. Fam. Med.*, **9**, 160–167 (2000).
- [61] Hvizdos, K.M., and Markham, A. : Orlistat: a review of its use in the management of obesity. *Drugs*, **58**, 743–760 (1999).
- [62] Xu, N., Zhang, L., Dong, J., Zhang, X., Chen, Y.G., Bao, B., and Liu, J. : Low-dose diet supplement of a natural flavonoid, luteolin, ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**, 1258–1268 (2014).



- [63] Moon, H.S., Chung, C.S., Lee, H.G., Kim, T.G., Choi, Y.J., and Cho, C.S. : Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. *Obesity*, **15**, 2571–2582 (2007).
- [64] Yang, S.H., Ahn, E.K., Lee, J.A., Shin, T.S., Tsukamoto, C., Suh, J.W., Mei, I., and Chung, G. : Soyasaponins Aa and Ab exert an anti-obesity effect in 3T3-L1 adipocytes through downregulation of PPAR $\gamma$ . *Phytother. Res*, **29**, 281–287 (2015).
- [65] Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. : Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.*, **5**, 1538–1552 (1991).
- [66] Wu, Z., Bucher, N.L., and Farmer, S.R. : Induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4128–4136 (1996).
- [67] Auwerx, J., Schoonjans, K., Fruchart, J.C., and Staels, B. : Regulation of triglyceride metabolism by PPARs: fibrates and thiazolidinediones have distinct effects. *J. Atherosclero. Thromb.*, **3**, 81–88 (1996).
- [68] Wu, Z., Xie, Y., Morrison, R.F., Bucher, N.L., and Farmer, S.R. : PPAR $\gamma$  induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP $\alpha$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest.*, **101**, 22–32 (1998).
- [69] Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. : Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 145–171 (2000).
- [70] Bhattarai, B.R., Kafle, B., Hwang, J.S., Ham, S.W., Lee, K.H., Park, H., Han I.O., and Cho, H. : Novel thiazolidinedione derivatives with anti-obesity effects: dual action as PTP1B inhibitors and PPAR- $\gamma$  activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6758–6763 (2010).
- [71] 三上一保, 新本洋士 : 脂肪前駆細胞分化誘導試験—前駆脂肪細胞株

- (3T3-L1) を用いた脂質代謝改善機能評価法—, 平成 21 年度農林水産省補助事業 (食農連携促進事業) 食品機能性評価マニュアル集第 I 集 (改訂 2 版), 社団法人日本食品科学工学会, 115–122 (2009).
- [72] Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J.: 有機化合物のスペクトルによる同定法—MS, IR, NMR の併用—(第 7 版), p.204, 株式会社東京化学同人 (1999).
- [73] 吉田周平: 静岡県産ワサビ葉の成分分析および機能性評価, 静岡県立大学食品栄養科学部, 卒業論文 (2012).
- [74] Matsuo, H., Kondo, Y., Kawasaki, T., Tokuyama, S., and Imamura, N. : Borrelidin isolated from *Streptomyces* sp. inhibited adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells via several factors including GATA-binding protein 3. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 1504–1511 (2015).
- [75] Ilavenil, S., Kim, da H., Srigopalram, S., Arasu, M.V., Lee, K.D., Lee, J.C., Lee, J.S., Renganathan, S., and Choi, K.C. : Potential application of *p*-coumaric acid on differentiation of C2C12 skeletal muscle and 3T3-L1 preadipocytes-an in vitro and in silico approach. *Molecules*, **21**, 997 (2016).
- [76] Ji, S., Doumit, M.E., and Hill, R.A. : Regulation of adipogenesis and key adipogenic gene expression by 1, 25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 cells. *PLoS One*, **10**, e0126142 (2015).
- [77] Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J., and Aouadi, M. : Insulin signaling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, **56**, 949–964 (2013).
- [78] Nishina A., Ukiya M., Fukatsu M., Koketsu M., Ninomiya M., Sato D., Yamamoto J., Kobayashi-Hattori K., Okubo T., Tokuoka H., and Kimura H. : Effects of various 5,7-dihydroxyflavone analogs on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 1794–1800 (2015).
- [79] Juman, S., Yasui, N., Okuda, H., Ueda, A., Negishi, H., Miki, T., and Ikeda, K. : Caffeic acid phenethyl ester inhibits differentiation to adipocytes in 3T3-L1 mouse fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1484–1488 (2010).

- [80] Poudel, B., Nepali, S., Xin, M., Ki, H.H., Kim, Y.H., Kim, D.K., and Lee, Y.M. : Flavonoids from *Triticum aestivum* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells by upregulating the insig pathway. *Mol. Med. Rep.*, **12**, 3139–3145 (2015).
- [81] Yoneshiro, T., Aita, S., Iwanaga, T., and Saito, M. : Nonpungent capsaicin analogs (capsinoids) increase energy expenditure through the activation of brown adipose tissue in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **95**, 845–850 (2012).
- [82] Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. : Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J. Clin. Invest.*, **123**, 3404–3408 (2013).
- [83] 入江由希子, 斉藤昌之 : ミトコンドリア脱共益蛋白質 UCP ファミリーとエネルギー消費・肥満, *化学と生物*, **37**, 514–520 (1999).
- [84] 斉藤昌之, 大橋敦子 : 抗肥満創薬のターゲットとしてのミトコンドリア脱共役タンパク質 UCP, *日本薬理学雑誌*, **118**, 327–333 (2001).
- [85] Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., and Yamaki, K. : Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, **13**, 310–317 (2006).
- [86] Van Harmelen, V., Lönnqvist, F., Thörne, A., Wennlund, A., Large, V., Reynisdottir, S., and Arner, P. : Noradrenaline-induced lipolysis in isolated mesenteric, omental and subcutaneous adipocytes from obese subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **21**, 972–979 (1997).
- [87] 成川隆也 : フラボノイド配糖体を分解するのはヒトか腸内細菌か?, *化学と生物*, **38**, 460–461 (2000).
- [88] 下位香代子 : フラボノイド類の血中代謝物と局所における有効性, *環境変異原研究*, **26**, 241–246 (2004).

- [89] 田口悟朗：切れない糖修飾を作る酵素，*生物工学会誌*，**93**，36 (2015).
- [90] Sun, D., Dong, L., Guo, P., Yan, W., Wang, C., and Zhang, Z. : Simultaneous determination of four flavonoids and one phenolic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of the Herba Desmodii Styracifolii extract. *J. Chromatogr. B*, **932**, 66–73 (2013).
- [91] 室田佳恵子，河合慶親，寺尾純二：フラボノイドの生体内輸送機構，*Vitamins (Japan)*，**84**，589–598 (2010) .
- [92] Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., and Kinae, N. : Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-*O*- $\beta$ -glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.*, **438**, 220–224 (1998).
- [93] Chow, S.E., Hshu, Y.C., Wang, J.S., and Chen, J.K. : Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J. Appl. Physiol.*, **102**, 1520–1527 (2007).
- [94] Mizuno, K., Kume, T., Muto, C., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Sugimoto, H., and Akaike, A. : Glutathione biosynthesis via activation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) – antioxidant-response element (ARE) pathway is essential for neuroprotective effects of sulforaphane and 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. *J. Pharmacol. Sci.*, **115**, 320–332 (2011).
- [95] Nakamura, Y., Ohto, Y, Murakami, A., Osawa, T., and Ohigashi, H. : Inhibitory effects of curcumin and tetrahydrocurcuminoids on the tumor promoter-induced reactive oxygen species generation in leukocytes in vitro and in vivo. *J. Cancer Res.*, **89**, 361–370 (1998).
- [96] Chanock, S.J., Benna, J.E., Smith, R.M., and Babior, B.M. : The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 24519–24522 (1994).
- [97] 宮野佳，住友英樹：酸化ストレス応答とNoxファミリー，*生物試料分析*，**32**，289–296 (2009).

- [98] Benna, J.E., Faust, R.P., Johnson, J.L., and Babior, B.M. : Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p47phox as determined by two-dimensional phosphopeptide mapping. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6374–6378 (1996).
- [99] Dekker, L.V., Leitges, M., Altschuler, G., Mistry, N., McDermott, A., Roes, J., and Segal, A.W. : Protein kinase C- $\beta$  contributes to NADPH oxidase activation in neutrophils. *Biochem. J.*, **347**, 285–289 (2000).
- [100] Tang, C.S., and Takenaka, T. : Quantitation of a bioactive metabolite in undisturbed rhizosphere—Benzyl isothiocyanate from *Carica papaya* L. *J. Chem. Ecol.*, **9**, 1247–1253 (1983).
- [101] Miyoshi, N., Takabayashi, S., Osawa, T., and Nakamura, Y. : Benzyl isothiocyanate inhibits excessive superoxide generation in inflammatory leukocytes: implication for prevention against inflammation-related carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **25**, 567–575 (2004).
- [102] Yamaguchi, H., Noshita, T., Kidachi, Y., Umetsu, H., Fuke, Y., and Ryoyama, K. : Detection of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) and its conjugate with *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-MS/APCI). *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 715–719 (2008).
- [103] Shibata, T., Kimura, Y., Mukai, A., Mori, H., Ito, S., Asaka, Y., Oe, S., Tanaka, H., Takahashi, T., and Uchida, K. : Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42150–42161 (2011).
- [104] 村田充良, 宇野みさえ, 永井陽子, 中川多世, 奥西勲 : わさびおよび加工わさび製品中の 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート含量, 日本食品科学工学会誌, **51**, 477–482 (2004).
- [105] Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., and Fonnum, F. : Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1575–1582 (2003).
- [106] 秋山佳織, 太田安彦, 徳永賢治 : 化学発光法による全血を用いた好中球活

性酸素産生能の検討, 生物試料分析, **35**, 140–145 (2012).

- [107] 中村宜督 : イソチオシアネートによるがん予防の可能性—細胞増殖の選択的制御とその分子機構—, 環境変異原研究, **26**, 253–258 (2004).
- [108] Zhang, Y. : The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates. *Carcinogenesis*, **33**, 2–9 (2012).
- [109] Hayes, J.D. and McMahon, M. : Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.*, **174**, 103–113 (2011).
- [110] Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. : Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 14960–14965 (1996).
- [111] Wasserman, W.W., and Fahl, W.E. : Functional antioxidant responsive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 5361–5366 (1997).
- [112] Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. : An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313–322 (1997).
- [113] Nguyen, T., Huang, H.C., and Pickett, C.B. : Transcriptional regulation of the antioxidant response element: Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15466–15473 (2000).
- [114] Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. : Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7130–7139 (2004).

- [115] Zhang, D.D., Lo, S.C., Cross, J. V., Templeton, D. J., and Hannink, M. : Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10941–10953 (2004).
- [116] Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. : Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
- [117] Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.C., Yang, C.S., and Pickett, C.B. : Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element: Degradation of Nrf2 by the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4536–4541 (2003).
- [118] Cullinan, S.B., Gordan, J.D., Jin, J., Harper, J.W., and Diehl, J.A. : The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: Oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 8477–8486 (2004).
- [119] Furukawa, M., and Xiong, Y. : BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 162–171 (2005).
- [120] Zhang, D.D., Lo, S.C., Sun, Z., Habib, G.M., Lieberman, M.W., and Hannink, M. : Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome independent pathway. *J. Biol. Chem.*, **280**, 30091–30099 (2005).
- [121] Hou, D.X., Fukuda, M., Fujii, M., and Fuke, Y. : Transcriptional regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase in murine hepatoma cells by 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate, an active principle of wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim.). *Cancer Lett.*, **20**, 195–200 (2000).
- [122] Hou, D.X., Fukuda, M., Fujii, M., and Fuke, Y. : Induction of NADPH:quinone oxidoreductase in murine hepatoma cells by methylsulfinylisothiocyanates: methyl chain length-activity study. *Int. J. Mol. Med.*, **6**, 441–444 (2000).

- [123] Tanigawa, S., Fujii, M., and Hou, D.X. : Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol. Med.*, **42**, 1690–1703 (2007).
- [124] Akimaru, H., Hou, D.X., and Ishii, S. : Drosophila CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat. Genet.*, **17**, 211–214 (1997).
- [125] Moehlenkamp, J.D., and Johnson, J.A. : Activation of antioxidant/electrophile-responsive elements in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**, 98–106 (1999).
- [126] Stewart, D., Killeen, E., Naquin, R., Alam, S., and Alam, J. : Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J. Biol. Chem.*, **278**, 2396–2402 (2003).
- [127] Kobayashi, A., Kang, M.I., Watai, Y., Tong, K.I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. : Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 221–229 (2006).
- [128] McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. : Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21592–21600 (2003).
- [129] Zhang, D.D., and Hannink, M. : Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8137–8151 (2003).
- [130] Hong, F., Freeman, M.L., and Liebler, D.C. : Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.*, **18**, 1917–1926 (2005).
- [131] Sakurai, T., Kanayama, M., Shibata, T., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M.



- and Uchida, K. : Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1196–1204 (2006).
- [132] Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P. : Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 11908–11913 (2002).
- [133] Dhakshinamoorthy, S. and Jaiswal, A.K. : Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene. *Oncogene*, **20**, 3906–3917 (2001).
- [134] He, X., Chen, M.G., Lin, G.X. and Ma, Q. : Arsenic induces NAD(P)Hquinone oxidoreductase I by disrupting the Nrf2/Keap1/Cul3 complex and recruiting Nrf2/Maf to the antioxidant response element enhancer. *J. Biol. Chem.*, **281**, 23620–23631 (2006).
- [135] Zhang, D.D. : Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.*, **38**, 769–789 (2006).
- [136] Esfandiari, A., and Kelly, A.P. : The effects of tea polyphenolic compounds on hair loss among rodents. *J. Natl. Med. Assoc.*, **97**, 1165–1169 (2005).
- [137] McElwee, K.J., Niiyama, S., Freyschmidt-Paul, P., Wenzel, E., Kissling, S., Sundberg, J.P., and Hoffmann, R. : Dietary soy oil content and soy-derived phytoestrogen genistein increase resistance to alopecia areata onset in C3H/HeJ mice. *Exp. Dermatol.*, **12**, 30–36 (2003).
- [138] Tsuruki, T., Takahata, K., and Yoshikawa, M. : Anti-alopecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimulating peptide derived from soy  $\beta$ -conglycinin. *Peptides*, **26**, 707–711 (2005).
- [139] Lachgar, S., Moukadiri, H., Jonca, F., Charveron, M., Bouhaddioui, N., Gall, Y., Bonafe, J.L., and Plouët, J. : Vascular endothelial growth factor is an autocrine

- growth factor for hair dermal papilla cells. *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 17–23 (1996).
- [140] Li, W., Man, X.Y., Li, C.M., Chen, J.Q., Zhou, J., Cai, S.Q., Lu, Z.F., and Zheng, M. : VEGF induces proliferation of human hair follicle dermal papilla cells through VEGFR-2-mediated activation of ERK. *Exp. Cell Res.*, **318**, 1633–1640 (2012).
- [141] De Villez, R.L. : Androgenetic alopecia treated with topical minoxidil. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **16**, 669–672 (1987).
- [142] Han, J.H., Kwon, O.S., Chung, J.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Kim, K.H. : Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *J. Dermatol. Sci.*, **34**, 91–98 (2004).
- [143] Lachgar, S., Charveron, M., Gall, Y., and Bonafe, J.L. : Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells. *Br. J. Dermatol.*, **138**, 407–411 (1998).
- [144] Li, M., Marubayashi, A., Nakaya, Y., Fukui, K., and Arase, S. : Minoxidil-induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: Possible involvement of sulfonylurea receptor 2B as a target of minoxidil. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1594–1600 (2001).
- [145] 都築啓晃, 渡邊尚子, 岡村勝正, 山田秀和, 緒方文彦, 川崎直人 : 脱毛因子の解明とブロッコリースプラウト抽出物の育毛効果, フレグランスジャーナル, **44**, 14–20 (2016).
- [146] Sasaki, M., Shinozaki, S., and Shimokado, K. : Sulforaphane promotes murine hair growth by accelerating the degradation of dihydrotestosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **472**, 250–254 (2016).
- [147] Zanichelli, F., Capasso, S., Cipollaro, M., Pagnotta, E., Carteni, M., Casale, F., Iori, R., and Galderisi, U. : Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis,

while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age (Dordr)*. **34**, 281–293 (2012).

- [148] Kwon, O.S., Han, J.H., Yoo, H.G., Chung, J.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Kim, K.H. : Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine*, **14**, 551–555 (2007).
- [149] Lewis, S.M., Li, Y., Catalano, M.J., Laciak, A.R., Singh, H., Seiner, D.R., Reilly, T.J., Tanner, J.J., and Gates, K.S. : Inactivation of protein tyrosine phosphatases by dietary isothiocyanates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **25**, 4549–4552 (2015).
- [150] Nakamura, T., Kawai, Y., Kitamoto, N., Osawa, T., and Kato, Y. : Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine. *Chem. Res. Toxicol.*, **22**, 536–542 (2009).

## 謝辞

博士論文執筆を進めるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学食品栄養科学部食品分析研究室 熊澤茂則先生に謹んでお礼申し上げます。また、論文のご精読や温かな励ましを下さいました食品衛生学研究室 増田修一先生、臨床栄養管理学研究室 新井英一先生、生体機能学研究室 下位香代子先生に感謝の意を表します。

研究を進めるにあたり、数々のご助言ご協力を頂きました鹿児島大学農学部 侯徳興先生、是則好美さん、谷川俊祐さん、相山女学園大学生生活科学部 内藤通孝先生、桃井沙央里さん、愛知学院大学心身科学部 大澤俊彦先生、東京農業大学食品安全健康学科 大石祐一先生、中部大学応用生物学部 南基泰先生、静岡県立大学食品栄養科学部 杉本収先生、細谷孝博先生、吉田周平さん、三澤尚己さんに厚くお礼申し上げます。

研究や論文執筆の機会を与えてくださった小林一光会長、小林桂子社長、石川良市さん、奥西勲さんや、共に研究に励んでくださった三浦陽介さん、石田佳織さん、青柳大介さん、金印グループの皆様から心から感謝いたします。

最後に私事になりますが、家事等のサポートにより論文執筆の時間を与えてくれた愛娘の加藤愛子さんや家族、両親に感謝します。ありがとうございました。

皆様のご多幸とより一層のご活躍をお祈りいたします。

平成 30 年 7 月  
加藤朋恵