

ヘム鉄とイソフラボンの新しい作用メカニズムの解明による保健機能食品の開発

著者	小川 和宏
著者別表示	Ogawa Kazuhiro
雑誌名	平成17(2005)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2004-2005
ページ	11p.
発行年	2007-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051082

ヘム鉄とイソフラボンの新しい作用メカニズムの解明による
保健機能食品の開発

課題番号 16500503

平成16年度～平成17年度 科学研究費補助金
基盤研究(C) 研究成果報告書

平成 19 年 3 月

研究代表者 小 川 和 宏

金沢大学大学院医学系研究科・助教授

金沢大学附属図書館



0800-04469-X



ヘム鉄とイソフラボンの新しい作用メカニズムの解明による 保健機能食品の開発

課題番号16500503

序

鉄補充の目的で食品成分として摂取されているヘム鉄（ヘム）は、ヘモグロビンなどの補欠分子族として我々の生命維持に必須であるが、過剰の遊離ヘムはラジカル発生源で毒性が強い。ヘムはヘムオキシゲナーゼ（HO）によりCO、鉄、ビリベルジンへ分解され、ビリベルジンは速やかに抗酸化物質ビリルビンへと変換される。活性を持つHOのアイソザイムとして、基質ヘムなどにより発現が誘導される誘導型のHO-1と、発現量があまり変化しない構成型のHO-2の、2つが知られている。HO-1の誘導は重要な生体防御反応であり、HO阻害物質は癌抑制効果や新生児黄疸の治療効果を持つことなどが示されている。また、HO-2がin vivoでの低酸素応答に関与していることを我々は見出し、その後、HO-2がカリウムチャンネル（BK_{Ca}）と複合体を形成して、低酸素ではHO-2によるCO産生が減少してカリウム電流を減少させるという、in vitroでの低酸素応答メカニズムが報告された。このように重要な役割を担っているヘム鉄とその分解系調節を、更に詳細に検討することで、食品成分の新たな応用への道が拓かれることが期待される。

一方、大豆イソフラボンはエストロゲン受容体に結合してエストロゲン様作用を発揮することから、エストロゲン補充目的で摂取されている。近年、イソフラボンの安全性を危惧する声があがり、内閣府食品安全委員会で検討された結果、一日摂取目安量の上限値が70-75mgと発表された。既知のエストロゲン受容体を介する作用の有効性と安全性以外に、イソフラボンの新たな作用メカニズムを探索することは、用途開拓に資すると考えられる。

本研究では、生体防御作用や抗癌作用、低酸素関連疾患への将来的な応用を視野に入れ、ヘム鉄やイソフラボンなどの食品化合物、低酸素などによるヘム分解系の誘導や抑制を、作用メカニズムも含めて解析するとともに、即時型低酸素センシング機構である、ヘム（鉄）／HO／CO／カリウムチャンネルの諸分子群について、長時間低酸素暴露での発現調節や役割について検討を加えた。

研究組織

研究代表者 小川 和宏 金沢大学大学院医学系研究科・助教授

交付決定額

(単位金額：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,300,000	0	2,300,000
平成17年度	1,400,000	0	1,400,000

計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

- 1) Zhang, Y., Furuyama, K., Kaneko, K., Ogawa, K., Yoshizawa, M., Kawamura, M., Takeda, K., Yoshida, T., Shibahara, S.: Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. FEBS Journal; 273(14): 3136-3147 (Epub 2006 Jun 19) (資料-1)
- 2) Ding, Y., Zhang, Y. Z., Furuyama, K., Ogawa, K., Igarashi, K., Shibahara, S.: Down-regulation of heme oxygenase-2 is associated with the increased expression of heme oxygenase-1 in human cell lines. FEBS Journal; 273(23): 5333-5346 (Epub 2006 Oct 25) (資料-2)
- 3) 小川和宏, 永田耕一, 鈴木勝也, 今野俊宏, 柴原茂樹, 柳澤輝行: 核内受容体を介するイソフラボンの作用メカニズムの解明. 大豆たん白質研究; 7, 125-129 (2004 Oct) (資料-3)
- 4) 小川和宏: ヘム分解系—多彩な疾患への創薬標的—. 日本薬理学雑誌; 124, 360-362 (2004 Nov 1) (資料-4)

(2) 口頭発表等

- 5) 永田耕一, 小川和宏, 今野俊宏, 柴原茂樹, 柳澤輝行: イソフラボンによるヘムオキシゲナーゼ-1誘導抑制機構. 第55回日本薬理学会北部会 (2004 Sep 24) (資料-5)
- 6) 小川和宏, 五十嵐和彦, 藤田博美, 柳澤輝行, 柴原茂樹: ヒト肺細胞における低酸素とNO 供与体によるヘムオキシゲナーゼ-1 の発現調節. 第 77 回日本生化学会大会 (2004 Oct 16)
- 7) 今野俊宏, 小川和宏, 増宮晴子, 高橋雅彦, 柳澤輝行: 肺胞上皮細胞における低酸素によるカリウムチャネル発現調節と電流変化. 第 78 回日本薬理学会年会 (2005 Mar 23)
- 8) 小川和宏, 柳澤輝行: ヘム分解系調節の肺疾患への応用可能性. 第 33 回薬物活性シンポジウム (2005 Oct 5) (資料-6)
- 9) 小川和宏: 大豆イソフラボンの新たな作用メカニズムとの応用の可能性. (招待講演) 第

11 回国際食品素材/添加物会議 (2006 May 30) (資料-7. 資料-10 は当該発表が月刊誌 FOOD STYLE 21, 2006年7月号(食品化学新聞社)へ掲載された記事)

10) 小川和宏: 大豆イソフラボンの有効性と安全性を考える. 金沢大学サテライト・プラザ 公開講演 (2007 Mar 17) (資料-8)

特許の出願状況

11) [発明者及び権利者] 小川和宏 [発明の名称] ヘムオキシゲナーゼ-1誘導剤、培地製造方法、移植用臓器の保存液製造方法および実験動物生産方法. [公開番号] 特開2005-298492 [出願年月日] 2005年3月14日 (資料-9)

研究成果

へム鉄の作用や分解系調節に関しては、長時間の低酸素暴露が、誘導型の HO-1 だけでなく構成型の HO-2 の発現も減少させることを見出した。この HO-2 発現抑制には、転写レベルでの抑制に加えて mRNA の半減期の短縮という調節機構も含まれていた (発表 1)。

また siRNA により HO-2 の発現を抑制すると、HO-1 が誘導されることを見出した。これに対して HO-1 の発現抑制では、HO-2 は誘導されなかった。へム負荷条件下で HO-2 の発現を抑制すると、細胞内へム濃度が上昇したことから、HO-2 が細胞内のへム鉄濃度の調節と HO-1 の発現調節に重要であることが強く示唆された (発表 2)。

この他、HO-1 誘導法の探索として、ポリアミンが単独でヒトの細胞において HO-1 を強く誘導することを見出し、2004 年 3 月に特許出願していた。本研究では他の HO-1 誘導物質との併用など一部データを追加して、国内優先権主張で再出願した (発表 11)。特許庁の中小企業等特許先行技術調査支援事業による調査 (2007 年 2-3 月実施) で、同一文献や類似文献は抽出されなかったため、今後応用に向けて発展させたいと考えている。

大豆イソフラボン化合物のへム分解系への影響を解析したところ、ゲニステインはへムやニトロプロシドナトリウム (SNP) による HO-1 誘導 (発表 6) を抑制した。これに対してダイゼインは、誘導物質や細胞の種類によっては、HO-1 誘導を抑制しなかった (発表 3, 5, 9, 10)。このようにゲニステインとダイゼインの HO-1 誘導抑制作用には違いがあることを見出した。へム鉄とイソフラボンは食品として併用される可能性も高いことから、食品成分としてはへムによる HO-1 誘導を抑制しにくいダイゼインがより好ましい場合もあると考えられる (発表 3, 5, 9, 10)。なお、イソフラボンはエストロジェン受容体を介してエストロジェン様作用を発揮するが、エストラジオールは HO-1 誘導を抑制しなかったことやその他の実験結果から、イソフラボンによる HO-1 誘導抑制作用はエストロジェン受容体を介さない可能性が示唆された (発表 5, 9, 10)。

へム鉄関連の低酸素応答では、ヒト肺胞上皮由来細胞を長時間低酸素暴露すると、種々のカリウムチャネルの発現量が増加すること、この発現誘導に伴ってカリウム電流が出現することを見出した。この電流出現には、へム鉄/HO 関連分子を含む 2 種類のカリウムチャネル分子の発現誘導が重要であることを示唆する結果を得ている。遺伝子発現調節を含む亜急性期の新たな低酸素応答機構と考えられ、発現誘導メカニズムと生体での意義が注目される (論文作成中)。またへム鉄/HO/CO/カリウムチャネルの酸素センシング機

構の各分子について、急性期と亜急性期における役割の異同などが興味深い。

なお、第11回国際食品素材/添加物会議での招待講演（2006年5月東京、発表9）や金沢大学公開講座での講演（2007年3月金沢、発表10）で、イソフラボンの有効性と安全性に加え、イソフラボンとヘム鉄（代謝）との関係、イソフラボンの新たな機能・用途についても解説するなど、学術論文や学会以外での情報発信（発表）も積極的に行っている。

本研究で明らかになってきたイソフラボン、ヘム鉄、ポリアミンを中心とした食品成分によるヘム分解系調節を、今後はメカニズムも含めて更に詳細に解析し、化合物群の組み合わせなどでより効率的なHO誘導法・抑制法を見出して、生体防御機能を持つ食品成分や抗癌作用増強薬などへの応用へつなげていきたい。低酸素下で起きる発現調節を含む生体応答の中で、特にヘム鉄やヘム鉄関連分子の調節にも着目して、低酸素関連疾患における食品成分の応用可能性も検討していきたい。

巻末に資料として、発表9件（資料1-9）と、発表が掲載された記事1件（資料10）の、計10件を添付する。個々の発表（発表番号は、「研究発表」欄の番号と一致）について、以下に概略を述べる。

発表1)

Zhang, Y., Furuyama, K., Kaneko, K., Ogawa, K., Yoshizawa, M., Kawamura, M., Takeda, K., Yoshida, T., Shibahara, S.: Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. FEBS Journal; 273(14): 3136-3147 (2006) (資料-1)

ヒト由来のいくつかの細胞で、長時間の低酸素が誘導型のHO-1だけでなく、構成型と言われてきたHO-2の発現も減少させることを見出した。HO-1の発現は転写レベルで調節されることが多いが、今回発見したHO-2の調節には、mRNAの半減期の短縮という、転写レベル以外での調節機構も含まれていた。このHO-2の発現調節は、低酸素に応答して細胞内ヘム濃度を調節するメカニズムである可能性があり、イソフラボンによるHO-1誘導抑制作用との関連も解析していきたい。

発表2)

Ding, Y., Zhang, Y. Z., Furuyama, K., Ogawa, K., Igarashi, K., Shibahara, S.: Down-regulation of heme oxygenase-2 is associated with the increased expression of heme oxygenase-1 in human cell lines. FEBS Journal; 273(23): 5333-5346 (2006) (資料-2)

ヒトの種々の細胞で、siRNAによりHO-2の発現を抑制すると、HO-1が誘導されることを見出した。これに対してHO-1の発現抑制では、HO-2は誘導されなかった。また、培地にヘムを加えた条件でHO-2の発現を抑制すると、細胞内ヘム濃度が大きく上昇した。細胞内のヘム濃度調節には、誘導性のHO-1の発現調節が重要とこれまで考えられ、多くの研究が行われてきたが、今回の結果は、HO-2の発現が細胞内のヘム濃度の調節とHO-1の発現調節に重要であることを強く示唆している。HO-2の発現抑制によるHO-1の誘導が、イソフラボンによって抑制されるかどうかなど、ヘム分解系調節・細胞内ヘム濃度調節とイソフラボンの関連について、更に解析を進めたい。

発表 3)

小川和宏, 永田耕一, 鈴木勝也, 今野俊宏, 柴原茂樹, 柳澤輝行: 核内受容体を介するイソフラボンの作用メカニズムの解明. 大豆たん白質研究; 7, 125-129 (2004) (資料-3)

大豆イソフラボンのゲニステインやダイゼインは、核内受容体であるエストロゲン受容体に結合してエストロゲン様作用を発揮する。一方、転写抑制因子 Bach1 にヘムが結合することで Bach1 の DNA 結合が阻害され、代わりに Nrf2 などの転写活性化因子が結合して、ヘム分解酵素 HO-1 などの標的遺伝子の転写を活性化する。ヘム分解酵素 HO-1 は基質であるヘムや酸化ストレスなどで誘導され、ヘム分解を促進して抗酸化物質ビリルビンを産生する生体防御タンパク質である。

HO-1 や Bach1 などの発現に対するイソフラボンの影響をヒト由来の細胞を用いて解析したところ、ゲニステインはヘムやニトロプロシドナトリウム (SNP) による HO-1 誘導を抑制した。これに対してダイゼインは、SNP による HO-1 誘導を抑制したが、ヘムによる HO-1 誘導を抑制しなかった。このように、ゲニステインとダイゼインでは、HO-1 誘導抑制作用に違いが見られた。HO-1 の転写誘導・抑制を担う転写因子 Bach1 や Nrf2 の mRNA レベルは、これらの実験条件で大きな変化はみられなかった。

過剰の遊離ヘムはラジカル発生源で毒性が強く、HO-1 誘導は疾患の予防にも重要である上、ヘム鉄とイソフラボンが併用される可能性も高いことから、ヘムによる HO-1 誘導を抑制しにくいダイゼインが食品成分としてより好ましい場合もあると考えられる。

発表 4)

小川和宏: ヘム分解系—多彩な疾患への創薬標的—。日本薬理学雑誌; 124, 360-362 (2004) (資料-4)

ヘムオキシゲナーゼによってヘムが分解される酵素反応系では、抗酸化物質ビリルビンや血管弛緩物質 CO など、生体防御物質や調節物質が産生される。ヘムは我々の生命維持に必須であるが、過剰のヘムはラジカルを発生して毒性が強い。ヘム分解酵素の誘導型アソザイムである HO-1 は、ヘムや酸化的ストレスによって誘導され、これはヘム分解系の反応を促進する生体防御反応である。従ってヘム分解系は、単なる不要物の処理系というだけでなく、生体防御や生体調節を行う重要な生理活性物質の産生系でもある。

このヘム鉄分解系を誘導や抑制することで、どのような疾患群を目的とした創薬標的になり得るか、その魅力を論じた。HO-1 の誘導は、循環器系や呼吸器系疾患、低酸素関連疾患、虚血再還流障害など、種々の疾患群の予防や治療に有用であると期待され、一方 HO-1 の抑制は、癌、マラリア、黄疸など一部の疾患への応用が期待される。代表者が見出したポリアミンによる誘導や、イソフラボンによる誘導抑制を、今後実用化に近づけていきたい。

発表 5)

永田耕一、小川和宏、今野俊宏、柴原茂樹、柳澤輝行: イソフラボンによるヘムオキシゲナーゼ-1誘導抑制機構. 第55回日本薬理学会北部会 (2004) (**資料-5**)

イソフラボンの作用機序として、エストロゲン受容体へ結合し部分アゴニスト的に働くことが知られており、エストロゲン補充を目的とした食品成分として応用されている。我々は、エストロゲン受容体を高発現の乳癌由来 MCF-7 や低発現の肺癌由来 A549 など、ヒト由来のいくつかの細胞を用いて、イソフラボンによる HO-1 誘導抑制作用がエストロゲン受容体を介するかどうかを検討した。その結果、ゲニステインやダイゼインはエストロゲン受容体を介さない機序で HO-1 の誘導を抑制している可能性が示唆された。こうした作用機序の解析を基に、エストロゲン補充以外のイソフラボンの用途開拓を進めていきたい。

発表 6)

小川和宏、五十嵐和彦、藤田博美、柳澤輝行、柴原茂樹: ヒト肺細胞における低酸素と NO 供与体によるヘムオキシゲナーゼ-1 の発現調節. 第 77 回日本生化学会大会 (2004)

SNP などいくつかの NO 供与体は、HO-1 の発現を転写レベルで誘導する。一方、低酸素はヒト由来の細胞において、HO-1 の転写抑制に働く Bach1 の発現を誘導するとともに、HO-1 の発現を抑制する。我々は、ヒト由来細胞を用いて、低酸素下での NO 供与体の HO-1 誘導能を調べたところ、常酸素下と同様に HO-1 を誘導した。従って低酸素下で抑制され

るヒト HO-1 の発現を維持・誘導するために、NO 供与体が利用できる可能性がある。

いくつかの NO 供与体について、転写抑制因子 Bach1 への影響を解析したところ、Bach1 の DNA 結合を阻害するものと、阻害しないものがあった。この Bach1 の DNA 結合阻害活性と HO-1 誘導との関連を探り、HO-1 誘導法の開発へつなげていきたい。

発表 7)

今野俊宏, 小川和宏, 増宮晴子, 高橋雅彦, 柳澤輝行: 肺胞上皮細胞における低酸素によるカリウムチャンネル発現調節と電流変化. 第 78 回日本薬理学会年会 (2005) (論文作成中)

HO-2 はカリウムチャンネル (BK_{Ca}) と複合体を形成し、HO-2 によるヘム分解で生じる CO (カリウムチャンネル開口物質) が低酸素では減少して、カリウム電流が減少するという、即時型の低酸素応答のメカニズムが最近報告された。我々は、ヒト肺胞上皮由来細胞の低酸素暴露が長時間に及ぶと、種々のカリウムチャンネルの発現量が増加すること、この誘導に伴ってカリウム電流が出現することを見出した。この電流出現には、ヘム鉄/HO 関連分子を含む 2 種類のカリウムチャンネル分子の発現誘導が重要であることを示唆する結果を得ている。これは亜急性期の低酸素応答の新たなメカニズムと考えられ、発現誘導メカニズムと生体での意義が注目される。またヘム鉄/HO/CO/カリウムチャンネルの即時型酸素センシング機構の各分子が、亜急性期にどのような役割を果たしているかの解明が期待される。

発表 8)

小川和宏, 柳澤輝行: ヘム分解系調節の肺疾患への応用可能性. 第 33 回薬物活性シンポジウム (2005) (資料-6)

ヘム分解酵素の誘導型アイソザイム HO-1 は生体防御に重要であり、肺高血圧症や、炎症、虚血再還流、酸化ストレスなどで生じる組織傷害を抑制する。ヒト HO-1 はげっ歯類 HO-1 とは逆に、低酸素で発現が抑制されるため、例えば肺の低酸素部位などで HO-1 の発現を誘導することができれば、これらの疾患・病態の治療や予防に貢献できる可能性がある。一方、構成型アイソザイム HO-2 を欠損したマウスは野生型マウスに比べ、低酸素で起きる呼吸亢進が減弱しているなど、HO-2 が低酸素応答に関与していることを我々は見出した。また、HO-2 はカリウムチャンネルと複合体を形成し、低酸素では HO-2 により産生される CO の減少を介してカリウム電流を減少させる、酸素センサーとして機能することが、*in vitro* の実験で報告された。

このように HO は生体の防御や調節に重要なタンパク質であるため、HO-1 や HO-2 の発現量や機能の調節は、肺疾患をはじめとする種々の疾患群の治療や予防に有用と考えられ、調節法を開発して応用につなげていきたい。

発表 9)

小川和宏: 大豆イソフラボンの新たな作用メカニズムとの応用の可能性. (招待講演) 第 11 回国際食品素材/添加物会議 (2006) (資料-7, 資料-10 は当該発表が月刊誌 FOOD STYLE 21 (2006 年 7 月号、食品化学新聞社) へ掲載された記事)

大豆イソフラボンは女性ホルモン補充 (骨粗鬆症予防等) などを目的として広く摂取されているが、最近では安全性についても議論が高まり、内閣府食品安全委員会より上限摂取目安量が 2006 年に示された。本講演では、これまで論じられているイソフラボンの有効性と安全性について概説するとともに、イソフラボンとヘム鉄 (代謝) との関係や、新たな機能や新たな用途 (イソフラボン分子の使い分けによる食品成分の開発、HO-1 抑制作用による癌治療への応用など) の可能性を論じた。

発表 10)

小川和宏: 大豆イソフラボンの有効性と安全性を考える. 金沢大学サテライト・プラザ 公開講演 (2007) (資料-8) (講演記録は印刷中)

2007 年 3 月 17 日に金沢大学の公開講座での講演で、前記業績 9) の発表内容の抜粋に、より一般向けの内容も加えて概説・討論した。

発表11)

[発明者・権利者] 小川和宏 [発明の名称] ヘムオキシゲナーゼ-1誘導剤、培地製造方法、移植用臓器の保存液製造方法および実験動物生産方法. [公開番号] 特開2005-298492 [出願年月日] 2005年3月14日 (資料-9)

ポリアミンが単独でヒトの細胞においてヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を強く誘導することを見出し、2004 年 3 月に特許出願していた。本研究では、他の HO-1 誘導物質との併用など一部データを追加して、国内優先権主張で再出願した。なお本出願は先述の通り、特許庁の中小企業等特許先行技術調査支援事業による調査 (2007 年 2-3 月実施) で、同一文献や類似文献は抽出されなかったため、今後応用に向けて発展させたいと考えている。