

1 課題名

小豆由来ポリフェノール内包リポソームを利用した新規マクロファージ機能抑制方法の研究

2 研究者

千里金蘭大学 生活科学部 食物栄養学科 教授 日沼州司

3 成果概要

[研究目的]

マクロファージは生体防御機構で中心的に働いている細胞である。しかし生体内でのマクロファージの役割については未知の部分も多い。例えば、固形癌では、癌の増殖に必要な微小血管の形成にマクロファージが重要な役割を果たしているため、マクロファージを抑制することにより、癌の治療に効果があることが報告されている。したがってマクロファージを特異的に抑制する方法の開発は、生体防御機構の解析だけでなく癌などの疾患の治療に役立つ可能性がある。本研究代表者らはこれまでに豆類を含む植物性食品に由来するある種のポリフェノールが、マクロファージに対して強力な増殖抑制作用を有することを見出している。さらに本研究代表者らは人工的に作製した脂質膜の微小粒子であるリポソームを利用して、マクロファージの増殖や機能を抑制する物質をリポソーム内に封入し、リポソームをマクロファージに取り込ませることにより、マクロファージを特異的に抑制するための研究をこれまで進めてきた。小豆はポリフェノールが豊富な食材として知られているが、小豆由来ポリフェノールにもマクロファージ機能抑制作用が期待されるので、本研究では *in vitro* の培養細胞を使ってこの作用の有無を確認し、さらにリポソームと組み合わせることによりマクロファージを特異的に抑制する方法の検討を行った。

[研究方法及び手法]

小豆に含有されている代表的な既知ポリフェノールであるアントシアニン、カテキン、ルチン、レスベラトロールについて、マクロファージに対する増殖抑制効果を、*in vitro* での細胞培養系で検討した。比較対象として既知のポリフェノールであるおよび大豆由来のポリフェノールとしてよく知られているフラボン、イソフラボン、ゲニステイン等と活性の比較を行った。ヒト単球性白血病由来細胞株である THP-1 細胞株を使って、まず小豆および他の食品由来ポリフェノールについてマクロファージ増殖抑制活性の比較検討を行った。スクリーニング方法は以下のように行った。THP-1 細胞を適当に希釈した被検体とともにマイクロプレートで3日間培養し、細胞のミトコンドリア脱水素酵素による

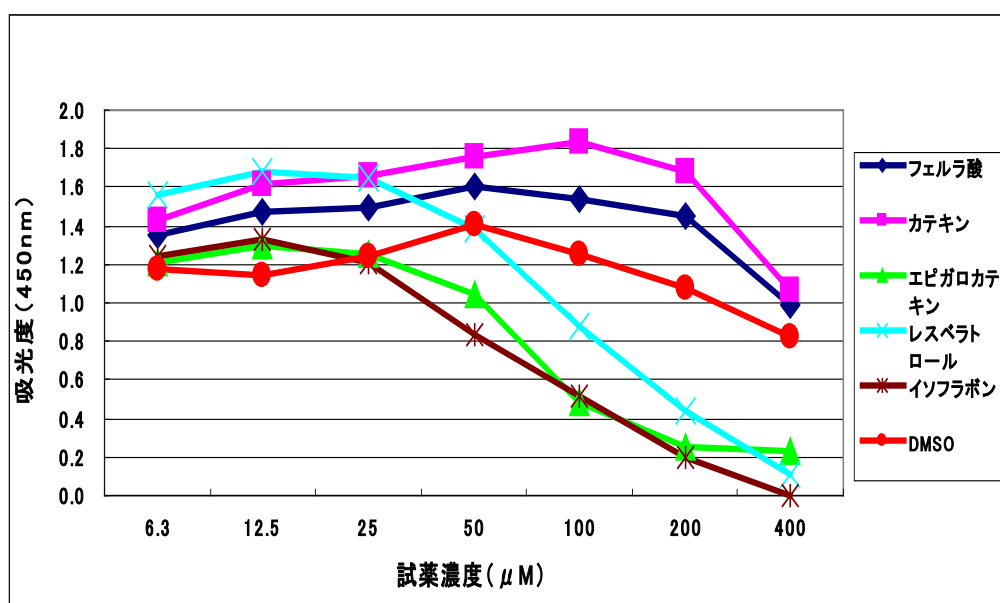
る WST-8 のホルマザンへの変換に基づく発色を利用して、450nm の吸光度をプレートリーダーにより測定し、THP-1 の増殖、生残率に対する影響を定量的に検討した。

次にマクロファージがより選択的に取り込みやすいとされているフォスファチジルセリンを構成成分の一つとする約 120nm リポソーム粒子を作製し、このリポソームに小豆由来ポリフェノールなどの食品由来成分の内包化の検討を行った。先ず凍結乾燥リポソームを作製し、再水和させる過程で目的物資をリポソームに取り込ませる方法を検討した。

[研究成果]

THP-1 細胞に対して増殖抑制活性を指標として、小豆由来のポリフェノールのマクロファージ増殖抑制活性について検討した。その結果、レスベラトロールに明確なマクロファージ増殖抑制活性が検出された。他の食品由来の化合物としてはゲニステイン、エピガロカテキン、ケルセチン、フラボン、アピゲニン、フラバノン、コロソリン酸、ウルソール、イソフラボン、カルノソール、クリシン、ゼルンボン、カルコン、カプサイシン、ピペリン、ジアリルジスルフィド、クルクミン等が 10~400 μ M の濃度で 50% 増殖阻害 (IC_{50}) を示した。図 1 に測定結果の一例を示す。

図 1 食品由来成分による THP-1 に対する増殖抑制効果



興味深いことにマクロファージに対して抑制作用を示すことが知られている合成化合物のクロドロン酸はTHP-1 に対して IC_{50} は $>400 \mu$ M であり、レスベラトロールおよび小豆以外の食品由来成分にも強力なマクロファージ抑制物質が存在することが明らかになった。しかし小豆の成分としても知られているアスタキ

サンチン、カテキン、ルチンには明確なマクロファージ抑制活性は検出されなかった。

リポソームはジパルミトイルフォスファチジルセリン(DPPS)、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、コレステロールがそれぞれモル比で1:5:4になるように組成を調製して作製した。凍結乾燥リポソームは水で再水和した結果、負電荷を帯びた約120nmの粒子であることがわかった。次にこのリポソームに小豆由来のポリフェノールであるレスベラトロールおよび比較対象としてイソフラボン、エピガロカテキン、カルコンについても同時に内包化の検討を行った。これらの化合物は適当な有機溶媒に溶解した後、凍結乾燥リポソームと混合し、リポソームに取り込ませた後、有機溶媒を限外ろ過により除去し、最終的にリン酸緩衝液に置換したものを調製し、各化合物の内包量を調べた。レスベラトロールの濃度は9~37 μ M程度であり他の化合物の濃度(3~52 μ M)とあまり変わらなかった。全体的に、今回用いた方法では全体的に取り込み効率はかなり低いことがわかった。今後さらにレスベラトロールの内包化の改善については検討を要すると考えている。

[まとめと今後の研究展開]

小豆由来成分として知られているレスベラトロールは、マクロファージの増殖を顕著に阻害することを明らかにすることができた。小豆に関する本研究を契機として、さらに他の食品由来成分や天然化合物にもマクロファージ増殖抑制活性を示す成分が広く存在していることもわかった。これらの食品由来成分は *in vitro* で細胞増殖抑制およびアポトーシスを誘導すると考えられるが、長年人々が食品として利用してきたものに含まれている成分であることから、生体へ投与した場合の安全性は比較的高いことが期待できる。しかし本研究により今回見出された小豆成分のレスベラトロールを含む化合物群は、マクロファージだけでなく他の細胞種(繊維芽細胞など)に対しても増殖抑制作用を示すこともわかった。そのためレスベラトロールのような小豆成分をマクロファージに選択的に作用させるための工夫が必要である。本研究ではレスベラトロール等をリポソームに内包化することによってマクロファージに貪食作用あるいはエンドサイトーシスを通じて、選択的に導入する目的で、レスベラトロール等のリポソーム内包化の検討を行った。その結果、ある程度のリポソームへの内包化はできたが、その内包化効率は今回の方法では十分ではなかった。今後、内包化の方法をさらに検討することにより、内包量を増加させることが必要である。高用量の食品由来ポリフェノールの内包化ができれば、*in vivo* に投与して選択的にマクロファージを抑制することが可能になると期待されるので、今後検討を進めたい。