

<p><b>サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出</b>  <b>小テーマ 1-3: ウイルス発がん予防における高機能性食品の有用性の検証</b>  <b>a) ブルーベリー葉が有する生理機能の解明(活性本体の同定と作用機序解析)</b></p>
<p><b>サブテームリーダー</b> 鹿児島大学医歯学総合研究科：教授 坪内博仁  <b>研究従事者</b> 宮崎大学医学部：教授 片岡寛章  鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：講師 宇都浩文  宮崎県産業支援財団：研究員 石田洋一、赤松絵奈  南日本酪農協同(株)：課長代理 竹下正彦 雲海酒造(株)：研究員 森永浩通</p>
<p><b>研究の概要、新規性及び目標</b></p> <p><b>①研究の概要</b>  肝がん発症：進展予防に効果のある高機能性食品の開発を目的として、宮崎県産農作物から HCV レプリコン産生抑制活性を有する高機能性食品を見出し、その機能性成分の同定や作用機序の解明を進める。また、作用機序解明によって得られた知見を活用して、創薬への展開の可能性を検討する。</p> <p><b>②研究の独自性・新規性</b>  これまで HCV については有用な in vitro 評価系はなく、抗 HCV 薬の開発を困難なものにしていた。本事業では、中外製薬との共同研究により、HCV レプリコン細胞を用いた in vitro 評価系を導入し、HCV の感染増殖を抑制する高機能性食品の探索が可能になった。HCV レプリコン細胞を高機能性食品探索に適用した例は他になく、独自性・新規性共に高い。選抜される高機能性食品は、HCV 感染によって惹起される C 型肝炎や肝硬変、更には肝細胞がんの予防に大きく貢献することが期待される。</p> <p><b>③研究の目標</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・フェーズⅠ：HCV レプリコン細胞系を用いて、レプリコン産生抑制活性を有する高機能性食品を探索する。活性の高い食品については、活性成分を同定する。</li> <li>・フェーズⅡ：選抜された高機能性食品の活性本体を同定し、その作用機序を明らかにする。</li> <li>・フェーズⅢ：活性本体の作用機序に関する知見を蓄積し、高機能性食品開発に役立てると同時に創薬への展開を図る。</li> </ul>
<p><b>研究の進め方及び進捗状況</b></p> <p>抗 HCV 効果が期待できる宮崎県産農作物のスクリーニングから、ブルーベリー葉を有用な食品として選抜した。活性本体としてプロアントシアニジン (PAC) の同定、更に作用機序解析により PAC の標的分子候補の同定に成功した。更に安全性試験、健常者を対象とした臨床試験まで実施したことから、概ね目標通りに計画が進んでおり、良好な進捗状況である。</p>
<p><b>主な成果</b></p> <p><b>具体的な成果内容：</b></p> <p>283 種、1700 部位の宮崎県産農作物より、抗 HCV 活性を有する高機能性食品のスクリーニングを行った結果、ブルーベリー葉、サトイモ皮、及びウメ種子の 80%エタノール抽出物において、強力な抗 HCV 活性を認めた。これら 3 種の農作物の内、将来的な商品化を勘案すると、大量栽培の可能性や食品加工のし易さなどから、ブルーベリー葉を特に有用な食品素材として選抜した。</p> <p>活性本体の精製・同定は、以下のように行った。まず、ブルーベリー葉凍結乾燥粉末をメタノールで抽出、クロロホルムと水の液-液分配を行なったところ、抗 HCV 活性のほとんどは水層に認められた。HPLC で更に精製、分取を繰り返すことにより、最終的に初発のメタノール抽出物に比べ、比活性で 63 倍高い精製画分を得ることができた。精製物を同定するため、まず電子線マイクロアナライザー (EPMA) による構成元素解析を行ったところ、精製物の構成元素は C、H、O であることが分かった。続いて、LC-IT-TOF 型質量分析計 (LC-IT-TOF-MS) による元素組成解析を行った。その結果、ブルーベリー葉の抗 HCV 活性本体として PAC の同定に成功した。同様に、サトイモ皮の抗 HCV 活性本体も PAC であることを明らかにした。</p> <p>PAC は、カテキン類が多数共有結合した重合体である。構造解析を進めるため、PAC の加硫分解産物を LC-IT-TOF-MS で調べたところ、ブルーベリー葉由来 PAC (B-PAC) は、平均重合度 (mDP) は 7.7 で、エピカテキン組成比が高いことが分かった。重合度と活性の相関を調べた結果、単量体のカテキンやエピカテキン、2 量体では活性はなく、3 量体より活性が認められ、mDP 8 で最大の活性を示した。更に、他の農作物由来の PAC を用いて、抗 HCV 活性と化学構造の違いを検討したところ、PAC の構成単位としてガロカテキンやエピガロカテキンの組成比が高くなると、即ち構造的には Flavan-3-ol の B 環の OH 基が三つになると、活性が低下する傾向にあることが明らかとなった。とりわけこれらの組成比が高いクロトン樹液由来 PAC (C-PAC) では、ほとんど活性を示さないことが明らかとなった。</p> <p>将来的に PAC の in vivo 摂食試験を行うことを見越し、PAC の大量調製法の確立を試みた。ブルーベリー葉凍結乾燥粉末をヘキサソ、酢酸エチルで洗浄した後、不溶性の残渣をメタノールで抽出した。これを約 2 L の Sephadex LH-20 カラムにアプライし、60%メタノール、100%メタノールで洗浄後、70%アセトンで溶出した。結果、約 50 g のブルーベリー葉より約 500 mg の PAC を調製することに成功した。</p> <p>食品成分の作用機序を明らかにすることは、科学的エビデンスに基づいた高機能性食品を開発する上で極めて重要である。特に、IFN と異なる作用機序を有した高機能性食品成分は、IFN が効かない C 型肝炎に対する効果が期待されると共に、新しいコンセプトに基づいた抗 HCV 薬を開発する上でも非常に重要である。そこでまず、B-PAC と IFN の作用機序を比較することにした。IFN の抗ウイルス効果は、MxA などの IFN 誘導遺伝子の発現を活性化することで発揮されるのに対し、B-PAC がこれらの遺伝子を発現誘導することはなかった。以上の結果、B-PAC は IFN とは異なる機序で抗 HCV 活性を示すことが示唆された。</p> <p>次に、より詳細に PAC の作用機序を明らかにするため、遺伝子・蛋白質の網羅的発現解析を行った。DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、B-PAC で処理した細胞において発現が増減する遺伝子を検索した。発現増加する遺伝子として Tubulin alpha 3、Microtubule-associated protein 1B、Keratin 19、Growth differentiation factor 15 などが、また、発現減少する遺伝子として Dickkopf homolog 1、ATPase</p>

family AAA domain containing 2、Prospero-related homeobox 1 などが見出された。しかし、これらの遺伝子と HCV 感染との関連性は知られておらず、また、Tubulin alpha 3 のようにハウスキーピング遺伝子の発現が大きく変動していたことから、トランスクリプトーム解析からでは PAC の抗 HCV 活性の作用機序の本質に迫る知見は得られないように思われた。トランスクリプトーム解析と平行して、二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行った。B-PAC の抗 HCV 活性に関わる蛋白質を見出すため、B-PAC (抗 HCV 活性あり) 或いは C-PAC (活性なし) で処理したレプリコン細胞より蛋白質を抽出し、発現蛋白質を比較した。その結果、両者で共通に発現が増減する蛋白質は多く見出されたが、B-PAC 処理細胞でのみ発現が増減する蛋白質は見出せなかった。従って、プロテオーム解析を用いた網羅的蛋白質発現解析についても、C-PAC の抗 HCV 活性の作用機序を解明するには有効な手段ではないように思われた。

そこで、より直接的に PAC の標的分子を同定するため、PAC アフィニティクロマトグラフィーを行った。PAC 固定化樹脂にレプリコン細胞抽出液を処理し、PAC 結合蛋白質を二次元電気泳動で分離、質量分析計で同定した。B-PAC に結合する蛋白質として、mRNA のプロセッシングや輸送に関わる hnRNP 蛋白質 (hnRNP A/B、hnRNP A2/B1、hnRNP D0、hnRNP K、hnRNP L、hnRNP Q)、mRNA からの翻訳開始に関わる eIF-3 蛋白質 (eIF-3F、eIF-3G、eIF-3H)、および酸化還元反応に関わる PDI A3 を同定した。これらの蛋白質の中で、hnRNP L、hnRNP K、hnRNP Q については HCV の感染増殖に必要との報告があり、また、HCV の mRNA から蛋白質への翻訳開始には eIF-3 が関わっている。いずれの蛋白質も HCV 遺伝子の翻訳開始段階に必要であることが報告されている。以上の結果と知見より、B-PAC は HCV の翻訳開始に関わる宿主蛋白質 (hnRNPs や eIF-3) の阻害剤である可能性が示唆された。なお、これらの蛋白質は、抗 HCV 活性を示さないカテキン、エピカテキン、及び C-PAC には結合しないことから、有力な標的蛋白質候補であることが示唆された。

PAC は高い抗酸化活性を有し、抗炎症効果、抗アレルギー効果、メタボリックシンドローム抑制効果など多彩な機能が知られている。PAC の多機能性を肝疾患に活用する一環として、肝硬変に病態が進展する過程で起こる肝線維化に着目した。肝線維化は、肝星細胞が PDGF などの細胞増殖因子によって活性化することで引き起こされる。そこで、PDGF による肝星細胞株 LI90 の活性化に及ぼす PAC の影響を調べたところ、PAC は PDGF による肝星細胞の活性化を抑制することを見出した。

特許件数: 5

論文数: 1

口頭発表件数: 7

## 研究成果に関する評価

### 1 国内外における水準との対比

PAC の作用として、抗腫瘍作用、抗炎症、抗アレルギーやメタボリックシンドローム抑制作用などが知られているが、抗 HCV 活性を見出したのは本研究が最初である。とりわけ、PAC の標的分子は新しいコンセプトに基づいた抗 HCV 薬開発にも繋がる可能性があり、今後注目すべき研究成果である。

### 2 実用化に向けた波及効果

現在、C 型肝炎治療はインターフェロン・リビリン併用療法が主流であるが、著効率の低さと副作用からこれに代わる治療法が待望されている。PAC 含有食品は既に健康食品として販売されているものもあり、日常的に摂取可能な C 型肝炎予防食品として期待される。PAC は有機合成できないため、医薬品には不向きであるが、標的分子を明らかにすることで、これに特異的に結合する化合物を新たにスクリーニングするなど創薬への波及効果も大きい。

## 残された課題と対応方針について

最も重要な課題は、C 型慢性肝炎の患者を対象としたブルーベリー葉熱水抽出物の有効性の検証である。また、PAC アフィニティクロマトグラフィーによって同定された標的分子候補について、分子生物学的検証を進める必要がある。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	3,698	3,308	7,786	8,724	5,063	28,579	0	5,167	9,625	6,450	10,041	10,041	41,324	69,903
設備費	0	0	6,000	7,610	19,996	14,998	48,604	0	0	0	0	0	0	0	48,604
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	0	2,000	6,850	9,539	7,675	3,200	29,264	0	3,000	3,351	5,000	4,500	3,500	19,351	48,615
旅費	0	40	108	374	373	270	1,165	0	0	0	110	520	280	910	2,075
その他	27	46	32	512	581	314	1,512	0	0	0	490	890	0	1,380	2,892
小計	27	5,784	16,298	25,821	37,349	23,845	109,124	0	8,167	12,976	12,050	15,951	13,821	62,965	172,089

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備: 蛍光プレートリーダー (Beckman Coulter, DTX 800)、HPLC (Prominence, SPD-M20A)、分取クロマト (島津, LC-8A)、真空凍結乾燥器 (EYELA, FDU-2100)

地域負担による設備: