



2023年9月13日（水）

- ・兵庫県教育委員会記者クラブ
 - ・兵庫県中播磨県民センター記者クラブ
 - ・宮崎県政記者室
 - ・文部科学記者会
 - ・科学記者会 同時配布
- 兵庫県公立大学法人 兵庫県立大学
国立大学法人 宮崎大学

細胞外小胞がケルセチンの吸収性や機能性を高める可能性を発見

研究成果の概要

石坂朱里助教、村上明教授（兵庫県立大学環境人間学部）、山崎正夫教授（宮崎大学農学部）らの研究グループは、タマネギなどの野菜や果物類に広く含まれるケルセチンの体内への吸収機構や機能性発現機構についての新しい知見を論文発表しました。

ケルセチンは、抗動脈硬化作用や抗肥満作用など多彩な生理機能性を示すポリフェノールの一種で、機能性食品の有効成分として期待されています。その反面、体内への吸収効率が極めて低く、また化学的に分解しやすい特性を持つにも関わらず脳内にまで移行するなど、吸収機構について未解明な側面がありました。

一方、血液や尿などの体液中には、直径 30-2000 nm の細胞外小胞（extracellular vesicles, EV）と呼ばれる極小の小胞が存在し、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たしています。EV には核酸やタンパク質などの機能性分子が内包されていることはすでに知られていますが、ケルセチンなどポリフェノールの存在は報告されていませんでした。

以上を背景として本研究では、培養細胞や実験動物に投与したケルセチンが EV に内包され、体内を循環する可能性について検証しました。まず、大腸がん細胞にケルセチンを添加し、一定時間培養後、培地中に残存するケルセチンを除去し、培養を続けました。その後、細胞から分泌された EV 内の成分を飛行時間型質量分析装置で精密分析したところ、ケルセチンや代謝産物の存在が確認できました。また、ケルセチンを経口投与したラット血清中 EV にケルセチンと代謝産物が含まれていることも証明しました。

さらに、大腸がん細胞の培地中から調製した EV にケルセチンを内包させると、化学的な安定性は有意に増加しました。この EV 内包ケルセチンは、通常の遊離状態に比べて免疫細胞への取り込み効率が極めて高く、抗炎症活性も強いことも判明しました。

以上から、経口摂取したケルセチンが消化管内で EV に内包され、効率よく吸収された後は安定した状態で体内を循環し、末梢組織で機能性を発現する可能性が示唆されました。

これらの研究成果は、2023年9月6日に Molecular Nutrition & Food Research 誌（Impact Factor 6.5）でオンライン掲載されました。

本研究成果のポイント

1. ポリフェノールの1種であるケルセチンを大腸がん細胞へ添加すると、一定時間後に、ケルセチンや代謝産物を含むEVが分泌されることを見出した。
2. ケルセチンをラットに投与すると、その血清のEV中にケルセチンやその代謝産物が存在することを証明した。
3. ケルセチンは水溶液中で化学的に分解しやすい性質を持っているが、EVに内包させると安定性や細胞への取り込み効率が顕著に増加した。
4. EVに内包させたケルセチンは、より低濃度で免疫細胞における炎症反応を抑制し、EVに内包されていない遊離のケルセチンに比べ遥かに高い抗炎症活性を示した。

背景と研究目的

ケルセチンはポリフェノールの一種で、タマネギを含む多様な野菜や果物に含まれている。古くから抗酸化作用や抗炎症作用が広く知られ、また最近では脂肪を分解することで抗肥満作用を示すことも期待され、様々な健康食品や飲料に利用されている。

その一方で、ケルセチンは水溶液中で速やかに分解し化学的に不安定である上に、吸収後は速やかに代謝・排泄され、体内寿命が短い。ケルセチンが栄養素ではなく動物には異物であることを考慮すれば、こうした特性を持つことは意外ではない。しかしながら、ケルセチンをラットに経口投与すると脳まで到達する¹⁾など、その吸収・輸送機構には不明な点が残されている。

近年、細胞間コミュニケーションにおけるEVの役割が注目されている。細胞から分泌されたEVは分泌細胞の性質が反映したタンパク質や核酸を含み、その情報を末梢組織の細胞へ伝達する。たとえば、ストレスに暴露された細胞においてストレス適応分子の発現量が増加すれば、EV中のストレス適応分子の量も増加し、それが末梢組織に伝播することで防御的に機能する可能性がある(図1)。

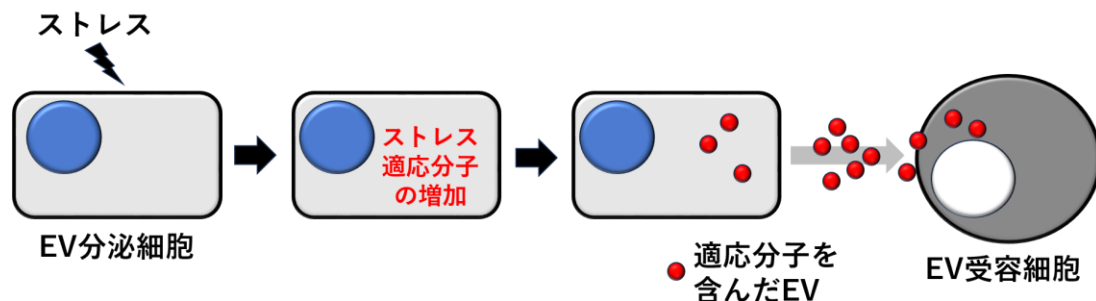


図1 EVを介した細胞間コミュニケーションの例

これまで、EV とポリフェノールの関係性については、たとえば緑茶カテキンで血管内皮細胞を処理すると、分泌された EV 中では肝臓の線維化を抑制する核酸類が増加した²⁾などの報告がある。しかし著者らが知る限り、ポリフェノールの吸収・輸送機構に関する知見はない。また、クルクミン（ターメリックのポリフェノール）の抗炎症活性は、EV に内包させると増大する³⁾ことは知られているが、ケルセチンについては不明である。

以上を背景として、本研究では培養細胞や実験動物にケルセチンを投与した場合、放出される EV にケルセチンやその代謝産物が含まれるか否かを検証し、さらにはケルセチンを内包させた EV の吸収性や機能性を遊離の状態と比較することなどを目的とした。

参考文献

- 1) Ishisaka A, *et al.*, *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1329-36.
- 2) Murata M, *et al.*, *Biomed Rep.* 2023;18(3):19.
- 3) Sun D, *et al.*, *Mol Ther.* 2010;18(9):1606-14.

研究内容

①細胞にケルセチンを投与するとケルセチンと代謝物を含んだ EV が放出される

HT-29 ヒト大腸がん細胞にケルセチン（100 μM ）を投与後 1 時間培養し、飛行時間型質量分析装置で分析した結果、添加したケルセチンの 0.02% が細胞内に取り込まれたと定量できた。その後、培地中のケルセチンを除去し、ケルセチンを含まない培地で 24 時間培養した際に放出された EV（平均粒径：210.6 nm）を解析した。その結果、細胞内ケルセチンの 1.7% は EV 中に移行していることが判明し、代謝産物としてグルクロン酸抱合体とメチル化体も検出された。以上の結果は、細胞内に取り込まれたケルセチンが、EV 内包後に放出されるという新規な輸送機構によって末梢組織へ移行する可能性を示唆している（図 2）。

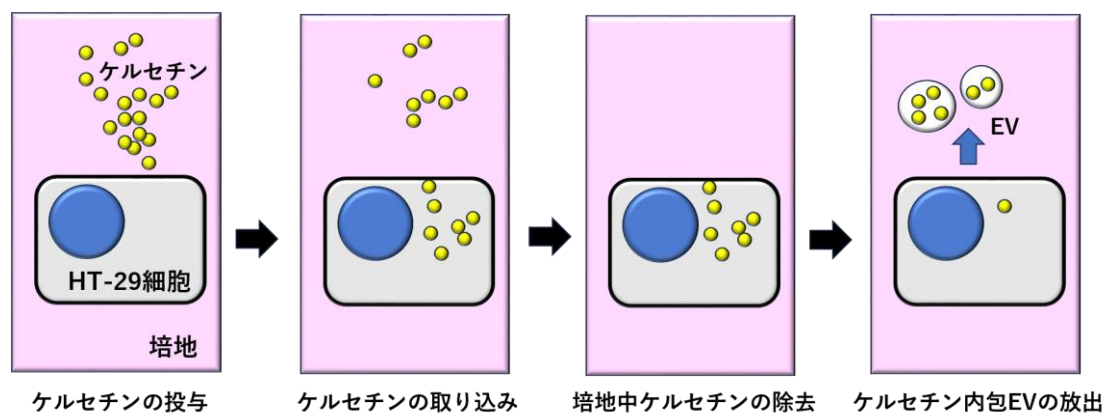


図 2 ケルセチンを投与した細胞から放出されるケルセチン内包 EV

② ラットにケルセチンを投与すると血清 EV 画分にケルセチンと代謝物が移行する

SD ラット (13 週齢、雄) にケルセチン (2 g/kg 体重) を胃内強制投与した。48 時間後に血清を回収し、これを超遠心分離することで得た EV 画分に血清アルブミンの混入を認めた。ケルセチン代謝物はアルブミン画分に存在する⁴⁾という既存の知見があることから、EV 画分からアルブミンを除去する必要性が生じた。そこで、本画分を限外ろ過法により分画し、CD9 (EV に特異的なタンパク質マーカー) とアルブミンの発現を指標とした EV 画分とアルブミン画分に区別し、それぞれに含まれるケルセチンと代謝産物を分析した。

その結果、まず既存の報告と同様、血清全体におけるケルセチン濃度は低く、750 nM と算出された。一方、EV 画分におけるケルセチンの濃度は血清中で換算すると 28.9 pM であったが、これはアルブミン画分中の濃度より約 20 倍も高いことが明らかとなった。また、EV 画分中にはケルセチン代謝産物であるグルクロン酸や硫酸抱合体、およびそれらのメチル化体が検出された。

経口投与したケルセチンやその代謝産物が血清 EV 中で検出されたのは、著者らが知る限り本研究が初めての例である。

③ EV に内包させたケルセチンの安定性や細胞への取り込み効率は増加する

先述のように、ケルセチンは水溶液中においては迅速に分解することから、EV に内包させたケルセチンの安定性を内包させない遊離の場合と比較した。

まず、細胞を含まない培地中に EV 内包ケルセチンを 1 μ M の濃度で添加後、37°C で加温し、2 時間までの残存量を内包させない場合と比較した。その結果、20 分後までは両者の安定性に差はなかったが、40 分以降においては、EV 内包ケルセチンの安定性は有意に高いことが判明した (図 3 左)。

さらに、RAW264.7 マクロファージの培地に EV 内包ケルセチンを 1 μ M の濃度で添加し、細胞内への取り込み量を経時的に定量したところ、遊離のケルセチンに比べて遥かに高い取り込み効率を示すことが明らかとなった (図 3 右)。

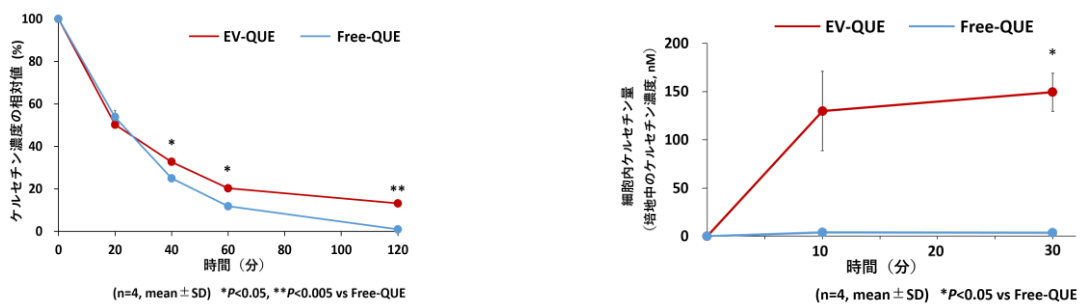


図 3 EV ケルセチンの化学的安定性 (左) と細胞内への取り込み効率 (右)

EV-QUE: EV 内包ケルセチン (赤線), Free-QUE: 遊離のケルセチン (青線)

④ EV に内包させたケルセチンは強い抗炎症活性を示す

マクロファージにおける過剰な一酸化窒素 (NO) 産生は炎症促進因子として知られている²⁾。ケルセチンが RAW264.7 マクロファージにおける NO 産生を抑制することは、約 20 年前に報告されている³⁾が、EV に内包された場合の活性は検討されていない。

そこで、炎症刺激性を有するリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) で RAW264.7 マクロファージを刺激し、NO 産生を誘導する炎症モデル実験系を用いて、EV 内包ケルセチンの抗炎症活性を遊離のケルセチンと比較した。

その結果、遊離のケルセチンが 10 μM 以上の濃度において有効であったのに対し、EV 内包ケルセチンは 2 μM の濃度でも NO 産生を約 70%抑制し、10 μM 以上の濃度では NO 産生を完全に阻害した (図 4)。したがって、ケルセチンは EV に内包されることによって抗炎症機能が顕著に増大することが強く示唆された。

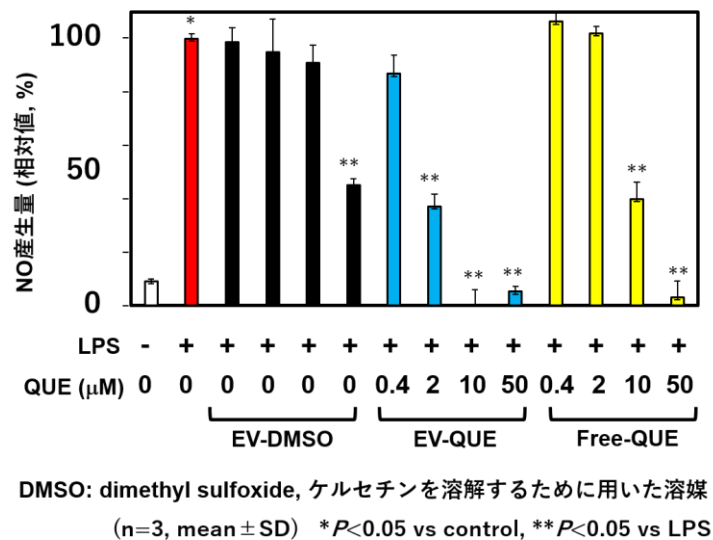


図 4 ケルセチン内包 EV の抗炎症作用

参考文献

- 1) Murota K, *et al.*, *J Med Invest.* 2007;54(3-4):370-4.
- 2) Wang X, *et al.*, *Cell Death Discov.* 2018;4, s41420-018-0046-5.
- 3) Jung WJ, *et al.*, *Biofactors.* 2004;21(1-4):113-7.

今後の展望

本研究でラットに投与したケルセチンの用量 (2 g/kg 体重) は、毒性が認められない最大量として設定したが、実験的な用量としてもかなり多量な投与条件である。今後は、用量を下げた投与条件でも血清中 EV でケルセチンが検出できるのかを検討する必要がある。また、



今回の実験では回収できる EV 量が投与後 48 時間で最大となったため、この時間でケルセチンの定量を実施したが、今後は継時変化についても検討する予定である。

一方、ラット血清中に存在するケルセチン内包 EV がどのような臓器や組織へ移行、蓄積するのは現在のところ全く不明である。一般的に EV は、血液脳関門も通過できると考えられているが、ケルセチンが局在性を示す臓器や組織が解明できれば、その機能性発現部位を特定できる可能性もある。

EV 内包ケルセチンは強い NO 産生抑制作用を示したが、これはマクロファージへの取り込み効率が高いことに起因すると推察できる。従って、他の様々な機能性評価系においても高い活性を示すことが想定される。

EV は分泌細胞の性質を末梢へ伝達するメッセンジャー的な機能を持つと考えられている。ケルセチンで処理した細胞内では機能性タンパク質の発現などに様々な変化が起こっている¹⁾ことから、分泌 EV 中におけるそれらの組成や量は未処理細胞とは異なると推察される。事実、先述のように、緑茶カテキンで処理した細胞から分泌された EV には機能性を有する核酸類が検出された²⁾ことから、ケルセチンについても同様な検討が必要である。

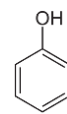
参考文献

- 1) Wenzel U, *et al.*, *Proteomics*. 2004;4(7):2160-74.
- 2) Murata M, *et al.*, *Biomed Rep*. 2023;18(3):19.

用語解説

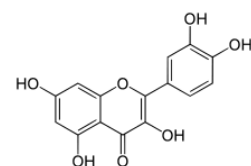
ポリフェノール

フェノール性水酸基（右図）を複数個有する化合物の総称で、自然界には 5000 種類以上が存在すると考えられている。植物は紫外線ストレスなどを抑制するためにポリフェノールを生合成しており、抗酸化性が強い。野菜や果物の色素、渋味、苦味などの原因物質である一方、ヒトにおける生理機能が期待されている。



ケルセチン

タマネギを中心として多彩な野菜・果物類に含まれるポリフェノールの一種。植物体内では糖が結合した配糖体と呼ばれる構造で不活性化しているが、昆虫や微生物による侵害で糖が加水分解され生理活性を示す。ヒトを含む動物への吸収効率は低く、ごく少量が吸収されても速やかに代謝を受け尿中から排出される一方、抗炎症作用など様々な生理機能が報告されている。





細胞外小胞 (extracellular vesicles, EV)

体内の多様な細胞から分泌されている直径 30-2000 nm の小胞。血液、尿、涙などの体液中に広く存在し、その分泌機構やサイズに応じて、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体の 3 種類に分類されている。細胞のように脂質二重層で覆われており、内部には脂質、タンパク質、核酸 (DNA, RNA など) を含んでいる。EV 中のこうした生体機能性成分に関しては、分泌細胞の性質を反映していることが多く、その情報を受容細胞へ伝達する機能があると考えられている。また、がんや神経変性疾患など、いくつかの疾患に固有な EV が分泌されることもあり、バイオマーカーとしての役割も注目されている。

マクロファージ

免疫細胞の 1 種で全身の組織に広く存在する。病原菌の侵入を感知し、それらを貪食することで生体防御機構において重要な役割を果たしている。貪食した病原菌の断片を細胞表面に発現することで抗原提示し、リンパ球における抗体産生機構にも関与している。その一方で、胃、大腸、肝臓などの臓器においてマクロファージの慢性的な活性化が起こると、活性酸素・活性窒素種および炎症性サイトカイン (炎症を起こす分泌性タンパク質の総称) などの過剰産生により正常組織も傷害を受ける。実験的にはリポ多糖 (グラム陰性菌の外膜成分) でマクロファージを処理すると上述の炎症反応を再現することができ、食品成分の抗炎症作用の評価系として広く利用されている。

一酸化窒素 (NO)

常温で無色無臭の気体であるが、酸素と反応すると二酸化窒素になり、光化学スモッグや酸性雨の要因の一つとなる。一方、血管内皮細胞も NO を産生しており、血管拡張作用を持つことはよく知られている (1998 年、関連研究に対してノーベル賞授与)。しかしながら、マクロファージからの過剰な NO 産生は、活性酸素との反応を経て活性窒素種を生成し、細胞内のタンパク質や核酸に損傷を与える。こうした炎症反応が持続すると、がんやリウマチなどの慢性炎症疾患の原因となる。

掲載論文の情報

掲載誌情報

Molecular Nutrition & Food Research, 2023, 2300225, <http://doi.org/10.1002/mnfr.202300225>



兵庫県立大学
UNIVERSITY OF HYOGO



宮崎大学
University of Miyazaki

論文タイトル (英文)

Role of extracellular vesicles in absorption and functional mechanisms of quercetin

著者 (英文)

Akari Ishisaka^{1,2}, Ryosuke Sugimoto¹, Haruka Marumo¹, Tomoki Doi¹, Kaede Hamada¹,
Misa Fujimoto¹, Nao Fujiwara¹, Masao Yamasaki³, Akira Murakami^{1,2*}

所属 (英文)

¹Department of Food Science and Nutrition, School of Human Science and Environment, University of Hyogo

²Research Institute for Food and Nutritional Sciences, University of Hyogo

³Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

*Corresponding author

論文タイトル (和文)

ケルセチンの吸収機構や生理活性発現機構における細胞外小胞の役割

著者 (和文)

石坂 朱里^{1,2}、杉元 亮介¹、丸毛 遥¹、土井 共生¹、濱田 楓¹、藤本 実紗¹、藤原 なお¹、
山崎 正夫³、村上 明^{1,2,*}

所属 (和文)

¹兵庫県立大学環境人間学部食環境栄養課程

²兵庫県立大学環境人間学部先端食科学研究センター

³宮崎大学農学部応用生物科学科

*責任著者

本研究に関する主な研究費

・公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団
財団設立 30 年記念研究助成



兵庫県立大学
UNIVERSITY OF HYOGO



宮崎大学
University of Miyazaki

「消化管で食品機能性を媒介する未知因子の究明」

研究代表者：村上 明

研究期間：2015年-2019年

・科学研究費補助金

基盤研究 (C) (19K05913)

「ケミカルストレスを引き金とする食品機能性成分の新規作用機構の解明」

研究代表者：村上 明

研究期間：2019年-2022年

・科学研究費補助金

基盤研究 (C) (22K05495)

「ファイトケミカルは交差耐性を賦与できるか？」

研究代表者：村上 明

研究期間：2022年-2025年

問い合わせ先

研究に関する問い合わせ

兵庫県立大学 環境人間学部 教授 村上 明 (ムラカミ アキラ)

Email: akira@shse.u-hyogo.ac.jp

電話番号：079-292-9325

宮崎大学 農学部 応用生物科学科 教授 山崎 正夫 (ヤマサキ マサオ)

Email: myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp

電話番号：0985-58-7209

報道に関する問い合わせ

兵庫県立大学 姫路環境人間キャンパス 経営部総務課

Email: u_hyogo_kankyoku@ofc.u-hyogo.ac.jp

電話番号：079-292-1515

宮崎大学 企画総務部 総務広報課広報係

Email: kouhou@of.miyazaki-u.ac.jp

電話番号：0985-58-7114