

氏名（本籍）	富 樫 眞 一	（神奈川県）
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	乙 第126号	
学位授与年月日	平成15年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	ヒト由来プラセンタエキス中の抗酸化物質に関する研究	
論文審査委員	主 査	教授 福 井 哲 也
	副 査	教授 辻 勉
	副 査	助教授 吉 村 吉 博

論文内容の要旨

好気性生物は大気中の酸素をエネルギー産生に利用しており、呼吸により取り込まれた酸素の一部は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) となる。ROSは生体制御に関与する重要な物質であるが、反応性に富むため、数々の酸化反応により生体に負の影響を及ぼすことがある。好気性生物はこれに対して、superoxide dismutase (SOD) やカタラーゼ等の抗酸化酵素、尿酸やグルタチオン (GSH) 等の低分子抗酸化物質、フェリチンやトランスフェリン等の金属イオンのキレート化による不活性化などの抗酸化機構を備えて、ROSによる酸化反応から生体を防護している。しかし様々な要因により、ROS消去能の低下やROS産生能の亢進が生じた場合には、動脈硬化、糖尿病、神経疾患等を発症する原因となることが明らかにされている。従って、抗酸化物質を用いて効率的に過剰なROSを消去することは、種々の疾患の治療、症状の改善に関与するものと、期待されている。

著者は、ROSに起因する障害に対する臨床応用が可能な抗酸化物質のひとつとして、ヒト由来プラセンタエキス (PLx) に着目した。胎盤 (プラセンタ) は様々な外的要因から胎児を保護するための多くの生理活性物質を含有することが知られている。それらの中で抗酸化に関与する物質として、ROSによる胎児の酸化ストレスを防御するためのSODやカタラーゼなどの酵素性抗酸化物質、およびビタミンEやビタミンCなどの非酵素性抗酸化物質がある。しかし、胎盤から調製したPLxは抗酸化酵素の活性を含まず、また、PLx中の抗酸化物質とその抗酸化作用の詳細についてはこれまでのところ明らかにされていない。これ

らを明らかにすることは、ROSが関与する種々の疾患に対するPLxおよびPLx中の抗酸化活性物質の適用にも貢献できるものと考え、以下の検討を行った。

1. PLxの*in vitro*、*in vivo*における抗酸化活性の検討

PLxの*in vitro*でのROS消去活性について、Fenton反応で生じた hydroxyl radical (HO \cdot) によるリノール酸の過酸化反応、およびデオキシリボースの分解反応を用いて測定した。HO \cdot の生成により進行するリノール酸の過酸化による共役ジエンの生成はPLxによって抑制され、PLx 1.0% (10 mg/ml) の抑制作用は抗酸化ビタミンであるビタミンE 10 mMの作用に相当した。また同様に、HO \cdot との反応によるデオキシリボースの分解によるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) の生成もPLxによって抑制され、PLx 1.0%のHO \cdot 捕捉作用は既知のHO \cdot 捕捉物質であるマンニトール 25 mM及び抗酸化ビタミンであるビタミンC 20 mMの作用に相当した。これらの結果から、PLxはHO \cdot 消去作用を有することが明らかとなった。

このように*in vitro*での抗酸化活性が示されたPLxの*in vivo*における作用を検討するため、その発症にROSが関与すると考えられる急性エタノール肝障害に対してPLxを経口的に前投与したときの各種パラメーターを測定した。その結果、PLxはエタノールによる肝臓中のGSHの減少と過酸化脂質の増加、および肝臓の抗酸化酵素活性の減少をいずれも抑制し、*in vivo*でも抗酸化活性を示すことが認められた。またPLx投与群では、エタノールの投与による血中のトランスアミナーゼ活性の増加も抑制されたことから、PLxの抗酸化作用による酸化ストレスの抑制が、エタノールによる急性肝障害の誘発を抑制することが示唆された。

2. PLx中の抗酸化活性成分の精製及び同定

PLxの抗酸化活性が明らかとなったことから、PLx中の抗酸化物質の精製・同定を試みた。PLxは分子量の異なる多くの物質を含有するが、PLx中の抗酸化物質は比較的分子量の低い物質であることが予測されたことから、最初にPLxをメタノールで処理したのちSephadex G-50でカラムクロマトグラフィーを行い、さらにHPLCを用いてPLx中の抗酸化活性成分を精製した。得られた精製標品のFAB-MSおよびNMRスペクトルを測定し、ウラシル、L-チロシン (Tyr) およびL-フェニルアラニン (Phe) と同定した。次に、同じPLxについてSephadex G-10でカラムクロマトグラフィーを行ったのち酢酸エチル・イソプロパノール混液(3

:2 v/v) で抽出し、シリカゲルカラム及びHPLCでTyr、Pheおよびウラシルとは異なる抗酸化活性成分を精製した。得られた精製標品のNMRスペクトルを測定し、L-トリプトファン(Trp)と同定した。1.0% PLx溶液中の各物質の濃度は、L-Pheが1.1 mM、L-Tyrが0.41 mM、L-Trpが0.28 mMおよびウラシルが0.13 mMであり、含量から計算したこれらの抗酸化成分による抗酸化活性の合計は元のPLxの抗酸化活性の約59%であった。

3. Phe、Tyr、Trpおよびウラシルの *in vitro*における抗酸化作用の検討

生体内で過酸化水素から遷移金属触媒の存在下で $\text{HO}\cdot$ が生成すると、 $\text{HO}\cdot$ はその近傍の生体成分(脂質、糖質、タンパク質および核酸等)を酸化して生体に酸化ストレスを生じさせる。そこで、 $\text{HO}\cdot$ によるデオキシリボースの分解反応、 $\text{HO}\cdot$ によるリノール酸の過酸化反応、t-ブチルヒドロペルオキシドで惹起されるチトクロームP-450依存性脂質過酸化反応、および $\text{HO}\cdot$ によるラット肝臓タンパク質のカルボニル化反応を指標として、酸化的ストレスに対するPLx中の各抗酸化物質の効果を測定した。その結果、いずれの反応においても、Tyr、Phe、Trpおよびウラシルの存在で抑制が認められたことから、PLx中の抗酸化活性成分として認められた4種の物質はいずれも $\text{HO}\cdot$ 捕捉作用および脂質過酸化抑制作用を示すことが明らかとなった。

4. Phe、Tyr、Trpおよびウラシルの *in vivo*における抗酸化作用の検討

同定したPLx中の4種の抗酸化物質はいずれも低分子量であり、経口摂取で容易に吸収され、生体内でも抗酸化作用を示すものと考えられる。そこで、同定した4種の抗酸化物質の *in vivo*における抗酸化作用を検討するため、エタノールで誘発される急性エタノール肝障害に対する各物質の効果を測定した。その結果、各抗酸化物質を経口的に前投与すると、エタノールによる肝臓中の過酸化脂質の増加およびGSHの減少はいずれも抑制されることがわかった。この結果は、エタノールで誘発される酸化的ストレスを各抗酸化物質が抑制したことを示唆するものであり、その作用は *in vitro*で認められた各物質による $\text{HO}\cdot$ の捕捉および脂質過酸化反応に対する抑制に基づくものであると推定される。また、エタノール投与によって生ずる抗酸化酵素の活性の低下がTyr、Pheおよびウラシル投与群で抑制されたことから、PLx中のPhe、Tyrおよびウラシルは、フリーラジカルの捕捉とともに、抗酸化酵素活性の低下も回復させることにより生体の酸化ストレスを抑制することが示唆された。一方、肝障害の指標であ

る血清トランスアミナーゼ活性の増加に対してはPLx投与群、Trp単独投与群、及びPhe、Tyr、ウラシル併用投与群において抑制が認められた。Phe、Tyr、ウラシルの各単独投与群では抑制が認められなかったことから、PLx中のTrp、Phe、Tyr、ウラシルは、何らかの複合的な作用によりエタノール肝障害を抑制することが推定された。

5. PLx中の高分子性抗酸化物質の精製・同定

以上の結果より、PLx中の低分子性の主な抗酸化物質はほぼ精製・同定できたものと考えられたが、これらの実験の過程で、PLx中には未同定の高分子性抗酸化物質も存在することが示唆された。そこで、この点について明らかにするため、PLxをSephadex G-10カラムで分離したときに得られる排除画分を分取し、HPLCを用いて精製した。その結果、抗酸化活性を示す6種のペプチドが得られ、このペプチドのアミノ酸配列を決定してホモロジー検索を行ったところ、全てコラーゲン由来のペプチドであることを判明した。また、コラーゲン由来のペプチドが示す抗酸化活性は、PLxが示す抗酸化活性の約15%と求められた。さらに、市販のヒト胎盤由来コラーゲンの抗酸化活性を測定したところ、その活性は小さいが、これを酵素分解することにより抗酸化活性が増加することが明らかとなった。従って、得られた6種のペプチドは胎盤からPLxを調製する過程で胎盤組織中のコラーゲンが分解して生じたものであると考えられる。コラーゲン由来の6種のペプチドのHO \cdot 捕捉活性は構造中のプロリンおよびヒドロキシプロリンに基づくものであると考えられたが、いずれも単体ではHO \cdot 捕捉活性をほとんど示さなかったことから、ペプチド構造を形成することによりHO \cdot 捕捉活性が発現することが示唆された。

以上、本研究により、PLxは生体の酸化ストレスに対して*in vivo*においても抑制作用を発現することが示唆され、また、その抗酸化作用は*in vitro*においては、主としてPLx中の抗酸化物質によるHO \cdot の捕捉による生体成分の酸化ストレスの抑制であることが明らかとなった。さらに、Phe、Tyr、Trp、ウラシルおよびコラーゲン由来ペプチドがPLx中の抗酸化活性物質であることが明らかとなった。PLxは生体に対する毒性が認められていないことから、ROSが関与する種々の疾患の治療や症状の緩和に対してこれらの抗酸化物質を利用することが可能であると考えられるが、本研究で得られた結果は、PLxを抗酸化という観点から積極的に利用するための基礎的知見を与えるものとする。

論文審査の結果の要旨

生体は、活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の、生体にとって不利な作用に対しては、superoxide dismutase (SOD) やカタラーゼ等の抗酸化酵素、尿酸やグルタチオン (GSH) 等の低分子抗酸化物質、フェリチンやトランスフェリン等の金属イオンのキレート化による不活性化などの抗酸化機構を備えて、これを防護している。しかし様々な要因により、ROS消去能の低下やROS産生能の亢進が生じた場合には、各種疾患を発症する原因となることが明らかにされている。従って、抗酸化物質を用いて効率的に過剰な ROS を消去することは、種々の疾患の治療、症状の改善に関与するものと、期待されている。

本論文において著者は、ROSに起因する障害に対する臨床応用が可能な抗酸化物質のひとつとして、ヒト由来プラセンタエキス (PLx) に着目し、これに含まれる抗酸化物質とその抗酸化作用について検討を行い、以下の結果を得た。

1. PLx の *in vitro*、*in vivo* における抗酸化活性

HO \cdot の生成により進行するリノール酸の過酸化及びHO \cdot との反応によるデオキシリボースの分解がPLxによって抑制されること、また、その発症にROSが関与すると考えられている急性エタノール肝障害に対してPLxを経口的に前投与すると、各種肝障害、酸化ストレスのパラメーターを抑制することを明らかにした。

2. PLx 中の抗酸化活性成分の精製及び同定

各種精製手段を用いてPLx中の抗酸化物質の精製・同定を試みた。得られた精製標品のFAB-MSおよびNMRスペクトルを測定し、ウラシル、L-チロシン (Tyr)、L-フェニルアラニン (Phe) 及びL-トリプトファン(Trp)と同定した。

3. Phe、Tyr、Trp およびウラシルの *in vitro* における抗酸化作用

HO \cdot によるデオキシリボースの分解反応、HO \cdot によるリノール酸の過酸化反応、t-ブチルヒドロペルオキシドで惹起されるチトクロームP-450依存性脂質過酸化反応、およびHO \cdot によるラット肝臓タンパク質のカルボニル化反応のいずれもが、同定した4種の抗酸化物質Tyr、Phe、Trpおよびウラシルにより抑制されることを明らかとした。

4. Phe、Tyr、Trp およびウラシルの *in vivo* における抗酸化作用

同定したPLx中の4種の抗酸化物質をラットに経口的に単独前投与すると、エタノール投与によって生ずる酸化ストレスを抑制すること、またこれらは、エタノール肝障害を抑制する上で、何らかの複合的な作用を示すことが推定され

た。

5. PLx 中の高分子性抗酸化物質の精製・同定

これらの実験の過程で、存在することが明らかとなった PLx 中には未同定の高分子性抗酸化物質を Sephadex G-10 カラム、及び HPLC を用いて精製した。その結果、抗酸化活性を示す 6 種のペプチドが得られ、これらは全てコラーゲン由来のペプチドであった。また、ヒト胎盤由来コラーゲンは、コラゲナーゼによる酵素分解を受けると、抗酸化活性が現れることを明らかとした。コラーゲン由来の 6 種のペプチドの HO \cdot 捕捉活性は構造中のプロリンおよびヒドロキシプロリンに基づくものであると考えられたが、いずれも単体では HO \cdot 捕捉活性をほとんど示さなかったことから、ペプチド構造を形成することにより HO \cdot 捕捉活性が発現するものと推定した。

以上、著者は、PLx が生体の酸化ストレスを抑制し、その抗酸化作用が *in vitro* においては、主として PLx 中の抗酸化物質による HO \cdot の捕捉による生体成分の酸化ストレスの抑制であることを明らかとした。さらに、PLx 中の主要な抗酸化成分は Phe、Tyr、Trp、ウラシルおよびコラーゲン由来ペプチドであることを示した。PLx は生体に対する毒性が認められていないことから、ROS が関与する種々の疾患の治療や症状の緩和に対して利用することが可能であると考えられるが、本研究で得られた結果は、PLx を抗酸化という観点から積極的に利用するための基礎的知見を与えるものと考えられ、今後のこの分野の研究の発展に資するところは大きいという点で、博士の学位を授与するに値する内容であると判定する。