

H259R 細胞によるステロイドホルモン合成評価系の確立と菊花抽出物の合成阻害作用

若生 豊*・馬 東建**

論文要約

うつ病の要因にはストレスによるコルチゾールの過剰分泌がある。HPA 系の反応に対するフィードバック機能が減弱しているため過剰分泌が継続し、海馬の神経が傷つき神経新生が抑制されることで海馬が委縮し、うつ病を引き起こしていることが示唆されている。従って、コルチゾールの過剰分泌を安全に抑制する化合物の発見が望まれている。本研究ではコルチゾール分泌抑制成分を探索する観点から菊抽出物成分についてステロイド産生能力を有するヒト副腎皮質腫瘍細胞 H295R 細胞を用いた実験系より検討を行った。菊抽出物には dc-AMP で誘導したコルチゾール産生の抑制活性が認められ、その活性強度 IC_{50} はポリフェノール量当たり約 $22\mu\text{M}$ と計算された。

キーワード：ブルーベリー、ポリフェノール、プロアントシアニジン、加熱処理、抗酸化活性

Inhibitory effect of chrysanthemum petals extract on steroidogenesis in H295R cells.

Yutaka WAKO* and Donjian MA**

ABSTRACT

It has been expected that the development of the safe anti-stress medicine which suppressed the over secretion of the stress hormone level. In this study, to explore the possibility of protection of the hippocampal nervous cells using a dietary approach, we have examined the inhibitory effect of extracts from chrysanthemum petals using H295R cells. Incubation of these cells treated with the extracts suppressed the dc-AMP induced steroidogenesis. The IC_{50} of inhibitory effect of the chrysanthemum petals extract on steroidogenesis is $22\mu\text{M}$.

Keywords : *Blueberry, polyphenol, proanthocyanidin, heat treatment, antioxidative activity*

1. 緒 言

今日、高齢化やストレスが原因となり各種の脳神経系疾患が増えている。うつ病患者も増えており、社会的に大きな問題となっている。うつ病の主な症状は抑うつ気分、睡眠障害、食欲の減退・増加などである。ヒトはストレスを感じると、脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモンが働き、副腎皮質からストレスホルモンであるコルチゾールが分泌されることが Selye により提唱された、HPA 系が知られている。コルチゾールの分泌量は多すぎても少なすぎても弊害が生じるため、この系はフィードバック機能による閉鎖系となっており、ストレス性の刺激に対する HPA 系の反応が過剰とならないように調節されている。ところが、うつ病等ではこの HPA 系の反応に対するフィードバック機能が減弱している異常があることが分かってきている。コルチゾールが過剰分泌されると、海馬の神経が傷つき、神経新生が抑制されることで海馬が委縮し、うつ病を発症する要因になっていると考えられている。従って、コルチゾールなどのステロイドホルモンが過剰となっている疾患においてはホルモン量を下げる対応が望まれる。しかし、ステロイド阻害薬の使用は、体内で精密に調節されているステロイド分泌に悪影響を与えホルモンバランスを乱すことが懸念され、クッシング病など一部で使用されている以外うつ病の治療などには取り入れられておらず、安全な抗ストレス剤の開発が望まれている。

さて、食品成分の作用は薬と異なり一般に活性（用量作用比）が高くないこと、単一の作用だけではなく環境要因の改善などの効果を持つことがあること、人類が長年摂取しているもので安全性が高いことなどから、薬物治療を補完する働きが期待されている。脳の健康には食事や運動が大いに関連することが多くの研究で分かってきた。その一つにコルチゾールレベルを抑制する働きを示すリン脂質（フォスファチジルセリン）やパセリなどの野菜に含まれるアピゲニンなどの食品成分が知られ既に一部はサプリメントとして利用されている。近年、食用菊成分が有意の神経栄養因子様作用を示す研究成果が報告されている。青森県の特産である食用菊の阿房宮品種には菊花の有効性成分の一つであるフラボノイドが含まれており、特にアピゲニンおよびその配糖体が多く存在していることが明らかになっている。本研究ではステロイドホルモン産生抑制活性の評価を目的としてステロイドホルモン産生能を有するヒト副腎皮質腫瘍細胞 H295R 細胞を用いた培養細胞によるホルモン合成能の評価系を確立した。また、うつ病をはじめとする HPA 系異常を伴う神経疾患の改善に役立つことが期待される阿房宮の花弁メタノール抽出物の評価へ、この H295R 細胞を用いた培養細胞のホルモン合成評価系が適用できるかについて確認の実験を行った。

2. 材料および実験方法

2.1 試薬

Hydrocortisone, dc-AMP は Wako pure chemical industry Ltd. より購入した。H295R 細胞は ATCC より購入した。細胞培養用 DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium)、F12 培地 (Nutrient Mixture Ham) および ITS (Insulin-Transferrin-selenium) は Gibco より購入した。代替え血清の Ultrosor-G は PALL より購入した。タンパク定量キット Protein Assay Reagent は Bio-Rad より購入した。

2.2 供試試料および調製

食用菊（栽培品種：阿房宮）は栽培農家より直接入手した。食用菊の花弁を凍結乾燥の後、粉碎し 10 容の 80% メタノールで加熱抽出した。減圧濃縮により溶媒を除き濃縮し試料とした。抽出液の乾燥重量を測定し、所定濃度に調整し使用時まで -80°C で冷凍保存した。

2.3 HPLC コルチゾール分析

HPLC（高速液体クロマトグラフィー）はセミマイクロ仕様（流路内径 0.2mm ϕ ）の島津製作所 LC-10 を用いた。脈流緩和措置としてポンプとカラム間にダンパーを装備した。カラムは逆相系シリカゲル樹脂のセミマイクロカラム CAPCELL PAK C18 (1.5 \times 150mm、Shiseido) を用いた。分析は 50mM リン酸緩衝液：アセトニトリル (78:22, pH4.0) の溶離液を用い、流速 0.2ml/min でアイソクラティック溶出により行った。検出はマイクロセル (5mm \times ϕ 0.8mm) を装備した紫外可視検出器により波長 242nm の吸光度を感度 Atte=0 で測定した。



Fig.1 HPLC system. LC-10 (SHIMADZU)

2.4 タンパク質の抽出と定量

細胞のタンパク質抽出には Ripa バッファーを用いた。細胞を培養した 12 穴プレートより培養液を取り除き、phosphate buffered saline で良く well を洗浄後、PMSF

を添加した Ripa バッファーをプレートの各 well へ加えて細胞を溶解した。溶解液をマイクロチューブに移し、15000g で 30 分間遠心分離した。次いで、上清の細胞溶解液のタンパク質濃度をビシンコニン (BCA) 酸法により定量した。アルカリ環境下でタンパク質により還元され生じた Cu^+ とビシンコニン酸が配位結合した錯体の青紫色の発色を 562nm で比色する。吸光度はタンパク質濃度と比例し、アルブミンにより作成した標準カーブよりタンパク質量を求めた。定量の操作は、Protein Assay Reagent A および Protein Assay Reagent B (A : B=50 : 1) の混合溶液を調製し、試験管にとった適当量に希釈した細胞溶解液上清およびタンパク質標準試料 50 μl へ混合溶液 1ml を加え 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間放置し反応させた。10 分放冷後 HITACHI U-1080 Auto Sipper Photometer を用いて波長 562nm で比色し吸光度を測定し、標準カーブよりタンパク量を求めた。

2.5 細胞培養

ヒト副腎皮質腫瘍細胞由来 H295R 細胞は ATCC より購入した (Fig.2)。細胞の培養には ITS (insulin ; 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, transferrin ; 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selenium ; 6.25ng/ml) (1.0%)、Ultrosor G (2.0%) および抗生物質を含有する DMEM-F12 (1 : 1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle's and Ham's F-12 Medium) 培地を用い、5% CO_2 - 95% Air の気相中、37 $^{\circ}\text{C}$ で継代培養した。

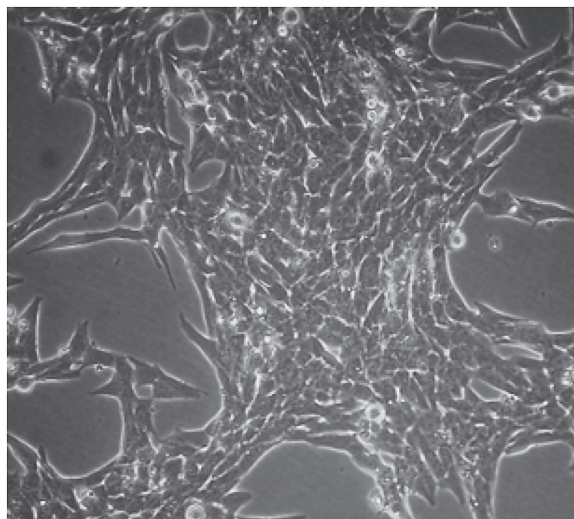


Fig.2 H295R cell

2.6 Cell viability 測定

市販の細胞数測定 / 細胞毒性評価キット Cell Counting Kit-8 (CCK-8 ; Nakarai Co) により測定した。培養細胞を 10% CCK-8 含有培地で 2-3h 培養後、吸光度 450nm をマイクロプレートリーダー (MPR、東ソー) で測定した。Cell viability は対照の吸光度に対する試験群の吸光度のパーセントで表した。

2.7 ステロイドホルモン合成阻害活性の測定

コルチゾール合成能の評価は H295R 細胞を用いた。継代培養した細胞を密度 $5 \times 10^5/\text{ml}$ で 12-well plate に播種し 24h 前培養した。細胞が 80% コンフルエントとなったとき培地を 1% ITS、0.01% ウシ胎仔血清 (BSA) および抗生物質を含む D-MEM/F-12 培地に交換しさらに 24h 培養後、同組成の新しい培地 (1.0m) と交換した。取り除いた培地は定常状態のコルチゾール合成量を求め分析試料とする。コルチゾール合成は dibutyryl cyclic AMP (1mM) で刺激することにより開始した。dc-AMP の添加と同時にコルチゾール合成に対する影響を検討する被検試料のエタノールあるいはメタノール溶解液を加え、一定時間 (48 時間あるいは 24 時間) 培養した。なお、培養液のエタノールあるいはメタノール等の溶媒は最終濃度で 0.5% (v/v) を超えないこととした。培養終了後培養液は HPLC 法によるコルチゾール定量分析に付した。培養液 1ml を 5 容のエーテルで抽出し、窒素気流下のホットブロック上で溶媒を留去した後、乾固した試料をエタノール 1ml で溶解し HPLC 分析試料とした。またプレートに付着している細胞は全タンパク質量を定量するため、溶解抽出し BCA 法による分析に付した。

3. 実験結果

3.1 コルチゾールの HPLC 分析条件の検討

ステロイドホルモンは存在量が極めて微量であるため、通常鋭敏な分析感度を有する放射免疫測定法 (Radio-immunoassay) または酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)、あるいは質量分析法で測定する必要がある。近年、中島らは、牛の血中ストレスホルモン測定において、セミマイクロ HPLC 法により測定が可能であることを報告している。本研究では培養細胞によるコルチゾール合成評価系において、培養液中に分泌されたコルチゾールを HPLC 法にて検出可能かを検討し、培養細胞の評価手段にセミマイクロ HPLC 法が適用可能であるかを検討した。極微量分析に対応するため HPLC 装置およびカラムはセミマイクロ仕様のものへ改修整備した。カラム内径 0.15mm (0.46mm)、配管内径 0.13mm (0.3mm)、検出器セル 2.5 μl (8 μl)。また脈留を緩和するためダンパーを装備した。

低濃度であるためホルモンの濃縮方法についても検討を行った。抽出と同時に濃縮効果が得られる分散液マイクロ抽出法 (DLLME 法) を検討したが抽出溶媒と培養液の分離が不完全であったためこの方法は適用できなかった。中島らが示している単純な溶媒抽出に従いエーテル抽出を試みた。抽出溶媒を窒素気流下で乾固しエタノールに溶解し分析試料とした。分析感度は最大の $\text{Atte}=0$ で行い、その分析結果を Fig.3 に示す。標準コルチゾールの保持時間と同位置に培養液中の H295R 細

胞分泌コルチゾールの明瞭なピークが確認され検出可能であることが判明した。合成誘導剤を加えない定常状態のコルチゾール分泌量も確認できた。このことにより、セミクロ HPLC 法が培養系によるコルチゾール評価系の検出手段として利用可能なことが確認された。

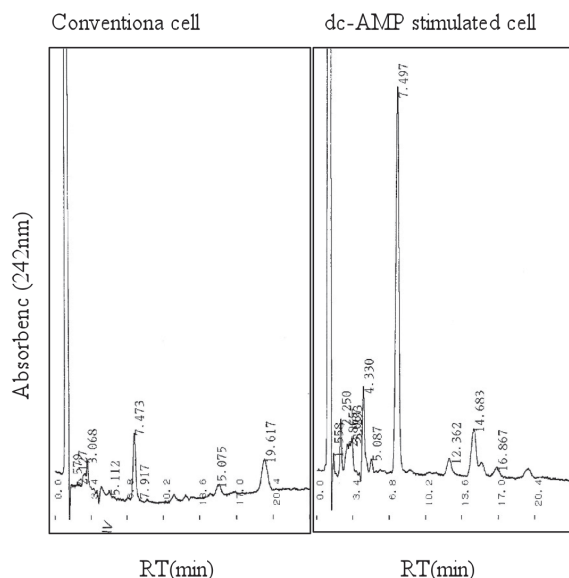


Fig.3 Induction of cortisone synthesis in H295R cell stimulated with dc-AMP.

The cortisone in ether extract of cell culture medium is detected by HPLC. HPLC: SHIMADZU 10ACvp. Column: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 (1.5 × 150mm). Buffer: 50mM phosphatebuffer:acetonitrile (78 : 22) pH 4.0. Flowrate: 0.2ml/min. Detector : 242nm. Attenuation : 0.

3.2 フラボノイドのコルチゾール合成阻害

ステロイドホルモン合成阻害能が知られているアピゲニン標準物質を用い、検討した培養細胞の評価系を用い阻害作用を観察した (Fig.4)。有意なコルチゾールピークの減少が認められ Fig.4 へ示すように、定常状態、dc-AMP による誘導、および dc-AMP と共に試料を処理した各群のコルチゾールピーク面積より、図に示した式より阻害率を計算した。アピゲニンの濃度に対する阻害率を Fig.5 に示す。阻害作用が試料濃度に従って上昇することが認められ評価系として有効であることが示唆された。50% の阻害を示す IC₅₀ は約 20 μM 前後であるが、その濃度では既に細胞の cell viability が影響を受けることが示された。

次に菊花メタノール抽出物によるコルチゾール阻害の結果を Fig.6 に示した。乾燥重量当たりの IC₅₀ は約 130μg dry wt/ml 前後であり、ポリフェノール濃度当たりで表すと 22μM 前後と計算されアピゲニンの IC₅₀ とほぼ一致した。従って、菊抽出物中の阻害活性を有する成分はアピゲニンなどの特定のフラボノイドに起因することが考えられ、量的に多く存在している、アピゲニンやその配糖体が阻害に強く関わっていることが考えられ

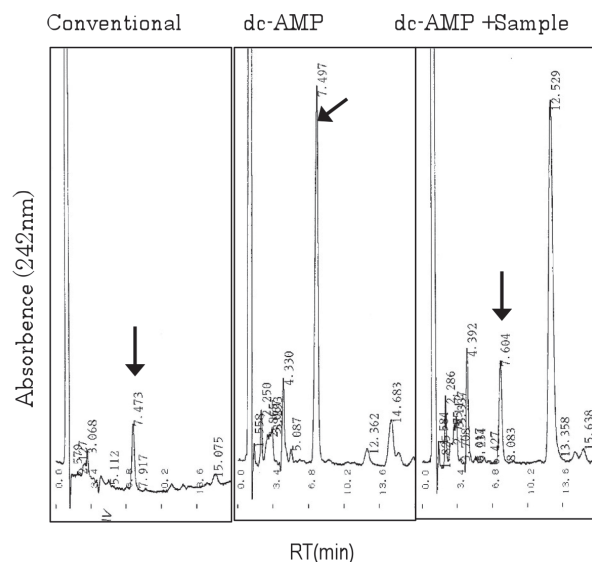


Fig.4 Evaluation of suppressive effect of sample on cortisone synthesis using H295R cell culture.

$$\text{Inhibition} = \frac{[(\text{Area/Protein})_{\text{act. cont}}] - [(\text{Area/Protein})_{\text{sample}}]}{[(\text{Area/Protein})_{\text{act. cont}}] - [(\text{Area/Protein})_{\text{control}}]}$$

(Area/Protein)_{act. cont} : Area of cortisol peak induced by dc-AMP which corrected with protein content.

(Area/Protein)_{control} : Area of cortisol peak in conventional state which corrected with protein content.

(Area/Protein)_{sample} : Area of cortisol peak co-treated with sample and dc-AMP which corrected with protein content.

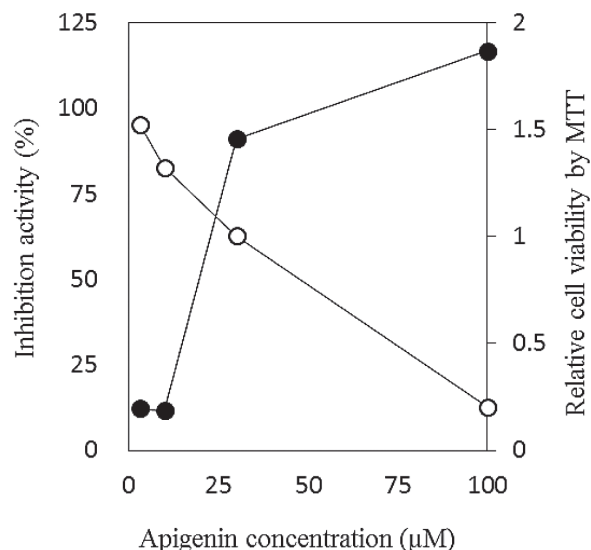


Fig.5 Inhibitory effects of apigenin on the steroid synthesis of H295R cell.

H295R cells were stimulated with dc-AMP and cultured with or without apigenin (3 to 100 μM) for 48h. Express the inhibitory effects of apigenin on cortisone synthesis, as the ratio of cortisone levels of culture medium present with apigenin against to those level without apigenin (●). The cell viability was also estimated with MTT as a function of apigenin concentration (○).

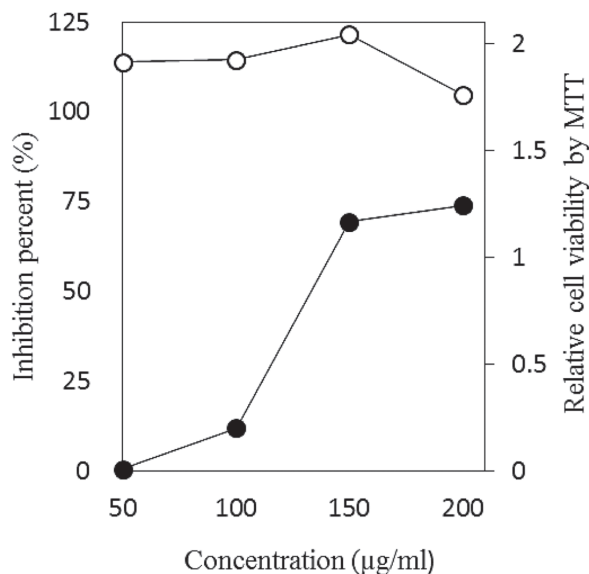


Fig.6 Inhibitory effects of Chrysanthemum extract on the steroid synthesis of H295R cell.

H295R cells were stimulated with dc-AMP and cultured with or without Chrysanthemum extract (50 to 200μg) for 48h. Express the inhibitory effects of Chrysanthemum extract on cortisone synthesis, as the ratio of cortisone levels of culture medium present with Chrysanthemum extract against to those level without Chrysanthemum extract (●). The cell viability was also estimated with MTT as a function of Chrysanthemum extract concentration (○).

た。CCK-8 アッセイによる cell viability の結果は 200μg dry wt/ml の濃度でもわずかに低下する程度でこの範囲では細胞は正常な生理機能を維持していると考えられた。

4. 考 察

本研究は培養細胞を用いたコルチゾール合成の評価系において産生コルチゾールの検出にセミマイクロ HPLC 法が適用可能かを検討する目的で実施したものである。H295R 細胞は、ヒトの副腎皮質腫瘍組織より分離された細胞株でコレステロールからステロイドホルモンを合成する能力を有しており、ステロイドホルモン合成研究や環境ホルモン研究に利用されている。コルチゾール合成は c-AMP 刺激により始まり PKA の活性化、P450 におけるコレステロール側鎖の切断が生じ H295R 細胞内で ATP がアデニル酸シクラーゼによって c-AMP に変換されて反応が進行することが知られている。培養細胞のホルモン合成機能は細胞の分化した機能であるため継代を続けると低下するとされている、本実験では継代数が 20 回未満のものを使用することにより、この継代数の範囲の培養細胞においては HPLC により十分検出可能なホルモンの合成が行われていることが確認された。dc-AMP の刺激の無い定常状態で合成されているコルチゾールについても検出可能であることが判明した。

植物は、光や低温、あるいは乾燥といった過酷な環境中に存在し物理的ストレスを受けている。これに適応するためにフラボノイドはさまざまな特異的代謝物を生合成していると考えられ、フラボノイドはその代表的なものであり、植物はフラボノイドの抗酸化活性により酸化ストレスを緩和していると推測されている。一方、ポリフェノールは生体内でも様々な生理効果を発揮していることが明らかにされており、フラボノイドにおいては生体のストレスを緩和する効果が動物やヒトを対象とした実験から示唆されている。大豆イソフラボンの主要成分である Daidzin や genistin は構造上エストロゲンと類似性が高く、ステロイド合成系酵素の 3β -HSD を阻害し合成を抑制する。研究室では阿房宮の脳に対する健康機能について検討を進めている。ストレスが負荷されることにより、これに対抗するストレスホルモン(コルチゾール)が副腎皮質より合成分泌されるが、過剰の分泌は神経細胞にも損傷を与え神経疾患の要因になっている。従って生体内の応答を緩和する安全かつ有効な抗ストレス剤が求められており検討が進められている。最近アピゲニンもステロイド合成経路の複数個所を阻害することが明らかにされている。阿房宮にはアピゲニンや配糖体が多く存在することから、神経細胞保護作用の仕組みの一つとしてストレスホルモン合成抑制作用が関与していることが考えられ、阿房宮による抑制効果をヒト副腎皮質腫瘍細胞由来 H295R 細胞を用いた系で評価する予定でありアピゲニン標品、および菊花抽出試料を用いた予備実験を行った。菊花抽出物およびアピゲニンのいずれにおいても抑制活性を認めることができ、この合成評価系で検討可能なことが確認された。また、菊花抽出物ではポリフェノール量当たりの IC_{50} は、22μM 前後と計算され、アピゲニン処理で得られた IC_{50} である 20μM 前後とほぼ一致した。これらの結果から菊抽出物中のコルチゾールの阻害活性は活性を示すアピゲニンなどのフラボノイドのアグリコンやその配糖体が担っていることが示唆された。

5. 結 言

- 1) ヒト副腎皮質腫瘍細胞由来 H295R 細胞およびセミマイクロ HPLC によるステロイドホルモン測定法を確立し、ステロイドホルモン合成能評価系を構築した。
- 2) 阿房宮には抑制活性が認められポリフェノール量当たりの IC_{50} は、22μM 前後と計算され、アピゲニンの IC_{50} は 20μM 前後とほぼ一致し、菊花抽出物中のアピゲニンやその配糖体が抑制作用を担っているものと示唆された。

参考文献

- 1) OECD, H295R *Steroidogenesis Assay*, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.456, (2011) Paris, France. Available: [http://www.oecdilibrary.org/environment/test-no-456-h295r-steroidogenesis-assay_9789264122642-en]
- 2) 橋本常生 等、牛肉中ステロイドホルモン測定を試料調製、東京衛研年報, 53, p.p.136-138 (2002).
- 3) 中島純子 等、ストレス時の牛血中コルチゾールの動態と測定、平成16年度松本家畜保健衛生所調査報告、p.p. 11-16 (2006).