

ザクロ等に含まれるエラグ酸の生理機能性

家田彩菜・高田祐一・岩本和子・財満信宏・森山達哉

近畿大学農学部応用生命化学科

Physiological functions of ellagic acid

Ayana IEDA, Yuichi TAKADA, Kazuko IWAMOTO, Nobuhiro ZAIMA
and Tatsuya MORIYAMA

*Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kindai University,
3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

Synopsis

Ellagic acid is one of natural polyphenols contained in various plants such as pomegranates, raspberries, or walnuts. Recent studies have revealed that ellagic acid and urolithins, microflora human metabolites of ellagic acid, are functional factors having various bioactivities including antioxidation, anticancer, the amelioration of insulin resistance, and the regulation of adipocytokine secretion. There is a possibility that ellagic acid and its metabolites are effective to prevent the onset and/or progress of several diseases such as cancer and diabetes.

Keywords: ellagic acid, urolithin, obesity, adipocytokine

1. はじめに

現代社会では食生活の変化から肥満人口が増加しており、肥満の進行はインスリン抵抗性を惹起し、高脂血症や動脈硬化、2型糖尿病などの生活習慣病の発症リスクを上昇させる。肥満が進行すると体内の脂肪

細胞は肥大し、増加することが知られている。脂肪細胞は脂肪を合成・蓄積するだけでなく、アディポサイトカインと呼ばれるタンパク質を分泌する。これらはエネルギー恒常性の維持、脂質代謝、免疫その他の生理学的機能において重要な役割を担っている¹⁾(図1)。従って、食品成分による

図1

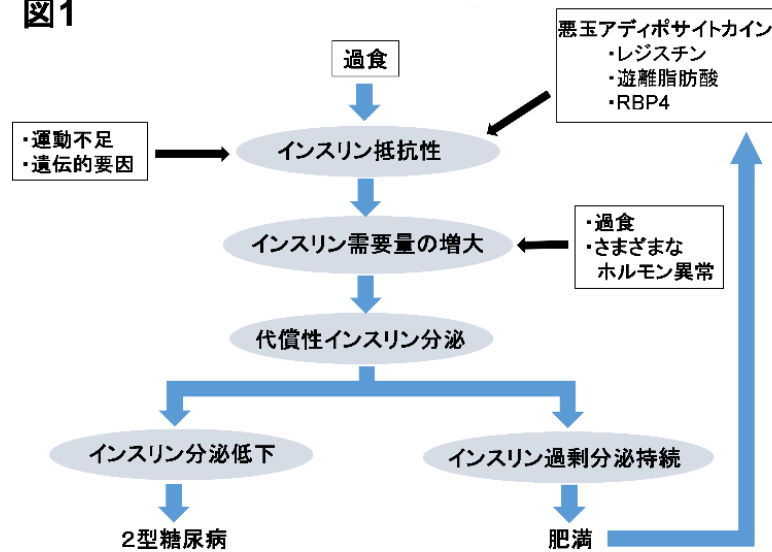


図1 アディポサイトカイン類と肥満・糖尿病

脂肪細胞の機能制御、およびアディポサイトカインの分泌調節は、肥満や2型糖尿病などの生活習慣病の予防・改善につながる事が期待される。

近年、肥満や脂肪細胞機能、さらにはガン・炎症などの病態の発症や進展に影響する食品成分の探索が進んでおり、機能性食品素材としての開発や実用化に向けた研究が盛んに行われている。なかでも、植物が有する機能性成分であるファイトケミカル類には様々な成分が含まれるが、代表的なものとしてポリフェノール類が挙げられる。本研究室ではそれら食品機能性成分の探索を行った結果、ザクロ果実に多く含有されているエラグ酸に新たな機能性を見出した。そこで本稿では、古くから薬としても広く利用されてきた歴史を持つザクロの成分エラグ酸に着目し、その生理機能性に関するこれまでの知見をまとめた。

2. エラグ酸の構造と化学的性質

エラグ酸 (2,3,7,8-tetrahydroxy[1]-benzopyrano[5,4,3-cde][1]benzopyran-5,10-dione) はラズベリー、イチゴ、クルミ、ザクロなどの数多くの野菜、果物に含まれる天然フェノール性ラクトン化合物である²⁻⁵⁾。エラグ酸は植物細胞壁および細胞膜の構成成分であるエラジタンニンと呼ばれる水溶性タンニンの形態で植物に存在している。エラジタンニンは、グルコースとエラグ酸とのエステルであり、加水分解されるとエラグ酸が生成する。

エラグ酸の様々な生理学のおよび薬理的側面に関する研究は多いが、体の細胞膜や組織を構成する脂質やタンパク質を攻撃するフリーラジカル反応、特にエラグ酸との直接反応に関する研究はまだ少ない。Cozziらは、*in vitro* で培養したチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) を用いて、DNA 二重らせんをアルキル化剤の損傷か

ら守るプロテクターや、過酸化水素により生じた酸素種のスカベンジャーとしてエラグ酸が複数の作用機序を有することを報告した^{6,7)}。これらは、エラグ酸が反応性フリーラジカルを掃去し過酸化水素に対する細胞遺伝学的防御を可能にするということを示している。

エラグ酸の細胞に対する保護効果は、ヒドロキシルラジカル(OH)、スーパーオキシドアニオン(O²⁻)といったフリーラジカルや過酸化水素(H₂O₂)といった活性酸素種(ROS)産生の阻害、ROSの消去、DNA結合、およびアルキル化損傷からのDNAの保護を含む様々な要素に起因するが、エラグ酸の構造-機能関係から、フェノール性ヒドロキシ基およびラクトン基のそれぞれが、異なる条件下で必要とされることが示唆されている^{6,8)}。

3. エラグ酸の抗酸化能

HassounらはC57BL/6Jマウスを用いてエラグ酸及びビタミンEが胎児・胎盤組織内の脂質過酸化を抑制する働きを持つことを明らかにし、その抗酸化能はビタミンEと比較してエラグ酸の方が高いと報告した⁹⁾。

またPriyadarsiniらは、エラグ酸が水と比べてメタノールやDMSOなど有機溶媒中で溶解性が増すことに注目し、エラグ酸が良好な親油性抗酸化剤として作用すると報告した⁹⁾。この性質は、エラグ酸がペルオキシラジカルを捕捉するのみならず、連鎖的脂質過酸化反応を停止させる抗酸化物質の有力候補となりうることを示している。

シスプラチンはガンの化学療法に広く使われる抗腫瘍剤として知られ、その効果は

頭頸部、精巣、卵巣、膀胱および小細胞肺癌など様々な腫瘍に対して実証されている。しかしその有益な抗腫瘍作用にもかかわらず、用量依存性腎毒性、肝毒性および精母毒性が認められるため、臨床腫瘍学におけるその適用は制限されている。ほとんどの抗癌剤は、酸化剤/抗酸化剤のバランスを乱すことによって様々な器官に毒性を引き起こすが、シスプラチン誘発性腎症および肝毒性も、ROS産生など脂質過酸化の増加と密接に関連している。ROSの産生は、肝臓および腎臓組織を含む様々な器官における正常な生理学的事象であるが、過剰に産生されると核酸、タンパク質および脂質を含む生体高分子の構造的損傷を引き起こし、最終的にはマロンジアルデヒド(MDA)のような細胞傷害性二次産物の形成をもたらす。シスプラチン処置動物へのエラグ酸の投与は、シスプラチン単独群と比較してMDAレベルを低下させ、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)レベルを肝臓および心臓組織で増加させることが観察された。これらの組織における脂質過酸化の低下は、エラグ酸が強力にフリーラジカルを捕捉し、酸化的DNA損傷を抑制したことを明らかに示しており、適度なエラグ酸の補給は、シスプラチン誘導酸化ストレスに対して保護的役割を果たす可能性があると考えられる¹⁰⁾。

4. エラグ酸の抗ガン作用

子宮頸部扁平上皮癌(CaSki)細胞においてエラグ酸は24~48時間以内に細胞周期のG1停止(G1 arrest)を誘導し、時間・用量依存的に細胞増殖抑制、細胞周期停止お

よびアポトーシスを誘導した。また、エラグ酸 (10^{-5} M) 処理した CaSki 細胞を 48 時間フローサイトメトリー分析したところ、エラグ酸処理の方では G1 ピークの細胞は 82% 存在したが、未処理の細胞では 30% しか存在しなかった。

DNA 損傷のシグナルを受けて活性化されたがん抑制遺伝子 p53 は p21 を転写誘導することで細胞周期を G1 で止める。エラグ酸処理した CaSki 細胞では、p53 mRNA およびタンパク質のレベルに影響はなかったが、p21 mRNA およびタンパク質のレベルは増加していた。エラグ酸による p21 の活性化は、p53 非依存性のメカニズム、もしくは p53 タンパク質のレベルの変化を伴わない p53 依存性メカニズムのいずれかによって起こりうると考えられる。上記結果より、癌細胞の細胞周期制御におけるエラグ酸の効果が裏付けられた¹¹⁾。

Edderkaoui らはヒト由来膵臓癌細胞

(MIA PaCa-2、PANC-1) を用いて、エラグ酸がアポトーシスを誘導し、膵臓癌細胞の増殖を抑制することを報告した。さらにミトコンドリア脱分極、シトクロム c 放出、および下流のカスパーゼ活性化が見られたことからミトコンドリア経路でアポトーシスが誘導されていることが示された。また、エラグ酸のミトコンドリアへの効果を試験するために、MIA PaCa-2 細胞からミトコンドリアを単離し、エラグ酸がミトコンドリアの呼吸、膜電位、およびシトクロム c 放出に及ぼす影響を測定したところ、膵臓癌細胞におけるミトコンドリア機能にエラグ酸は直接影響しないことが示された。そこで通常は活性化され、癌細胞において抗アポトーシスの役割を果たす転写因子、

NF- κ B をエラグ酸が遮断することによってミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導すると仮定し検証すると、MIA PaCa-2 および PANC-1 細胞系の両方においてエラグ酸用量依存的に NF- κ B 結合活性が減少することが見出された。よってミトコンドリアの死の経路を刺激する 1 つの機構は、膵臓癌細胞の主要な増殖因子である NF- κ B を阻害することによるものであることが示された。これらの結果は膵臓癌の治療におけるエラグ酸の潜在的な治療的役割を示唆すると著者らは述べている¹²⁾。

5. ザクロ果実エキス及びエラグ酸の糖尿病や脂質代謝に対する効果

2 型糖尿病は、肥満に関連する主要な慢性疾患である。2 型糖尿病発症の原因因子ともなる脂肪細胞が分泌するホルモン類はアディポサイトカインと総称され、インスリン抵抗性を調節する働きを持つものも知られている^{13,14)}。近年、このアディポサイトカインの 1 つであるレジスチンの発現・分泌と 2 型糖尿病の関連についていくつかの報告がなされている。本研究室では、脂肪細胞の培養細胞実験モデルであるマウス由来 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いてアディポサイトカイン分泌に対するザクロ果実エキス (PFE) 及びエラグ酸の効果とその作用のメカニズムを検討した。また、高レジスチンレベルのモデル系としての卵巣摘出 (ovariectomy: OVX) マウスに PFE を、肥満・糖尿病モデル系である KK-Ay マウスにエラグ酸を与え、これらが及ぼすアディポサイトカイン類や血中パラメータへの影響を調べた

5-1 培養脂肪細胞に対する効果

3T3-L1 脂肪細胞を用いた *in vitro* の実験において PFE はレジスチン分泌量を濃度 (10, 50, 100 g/mL) および時間 (0, 3, 6, 9 hr) 依存的に顕著に抑制した。一方、インスリン感受性アディポサイトカインであるアディポネクチンの分泌量を測定したところ、PFE は影響を及ぼさなかった。そこで、PFE がレジスチンの分泌を抑制する機構について調べた。一般的に、レジスチンの分泌は遺伝子発現変動を介して制御されることが報告されている。そこで、PFE 添加後のレジスチン mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。しかしレジスチン mRNA 発現量に変化は見られなかった。一方、細胞内レジスチン量については PFE 添加後有意な減少が見られ、さらにタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (cycloheximide; CHX) を添加した実験から、PFE の添加により細胞内レジスチンの分解が促進されていることが明らかとなった。細胞内アディポネクチンの分解についても同様に検討したが、この場合も分泌量と同様に影響は見られなかった。

これら PFE の結果と同様の作用を示すザクロ中の候補成分を同定するために、ザクロに含まれる代表的な生理機能成分であるエラグ酸およびプニカ酸を検討したところ、3T3-L1 脂肪細胞においてエラグ酸は PFE の結果と同様に、アディポネクチンには影響を及ぼさずにレジスチンの分泌量及び細胞内タンパク質量を顕著に抑制した。また、ザクロ中の植物エストロゲンの関与を検討するために、エストロゲン受容体のアンタゴニスト ICI-182,780 を用いて、エストロゲン受容体の阻害が PFE のレジスチン分泌抑

制を阻止するかどうかを検討したが、変化はみられなかった。これらの結果から PFE 中に含まれるエラグ酸は、レジスチン分泌量を抑制する成分であると示唆された¹⁵⁾。

5-2 ザクロ抽出物投与マウスの解析

マウスを用いた *in vivo* の実験において 12 週間の PFE の摂取 (30 mg/kg/day) は、OVX マウスにおける血清中レジスチン濃度を OVX 対照群に対して有意に抑制した。一方、アディポネクチン濃度は細胞実験の場合と同様に変化しなかった。

5-3 エラグ酸投与マウスの解析

KK-Ay マウスを High-fat (HF) 食群と 0.1% エラグ酸含有 HF 食群に分け 68 日間飼育し、エラグ酸の生理作用を詳細に検討したところ、空腹時の血糖値や遊離脂肪酸 (FFA) および TG 血清濃度においてエラグ酸群で血糖値の上昇を抑制する作用が見られた。また、肝臓組織損傷を示す ASL / ALT 活性の増加が抑制され、肝脂肪症の改善も見られたことからエラグ酸が KK-Ay マウスの肝脂肪症改善に有効であることが示唆された。血清レジスチン濃度はエラグ酸群で有意に減少していたがレジスチン mRNA 発現量に変化はなく、コレステロール合成・輸送に関連する遺伝子 Apolipoprotein A-1 (ApoA1) と Low density lipoprotein receptor (LDLR)、肝臓における脂肪酸分解系酵素遺伝子の Carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) と Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) は発現亢進の効果が見られた。よってザクロ及びその一成分であるエラグ酸の摂取は血中のレジスチン分泌量

を抑制し肥満誘発性脂質異常症および肝脂肪症を改善する可能性が示された¹⁶⁾。

これらの研究から、エラグ酸がレジスチン分泌を抑制することが *in vitro*、*in vivo* の両方で証明された。これにより2型糖尿病の発症を予防するという新しいザクロの食品機能効果が期待できる。また、このエラグ酸によるレジスチンの分泌抑制の制御機構は、遺伝子発現変動を介さずにレジスチンが分泌制御される初の報告となった^{15,16)}。

5-4 培養肝細胞でのリポタンパク質代謝に対する効果

他にも、本研究室ではエラグ酸がヒト肝臓由来細胞 (HepG2、Huh-7) において、後に悪玉コレステロールとなるリポタンパク質 (VLDL) の構成成分 ApoB の分泌を抑制し、善玉リポタンパク質 (HDL) 構成成

エラグ酸は脂肪細胞のみならず、ヒト肝細胞でのリポタンパク質代謝・分泌にも影響を与える可能性が示唆された。

6. エラグ酸の代謝

エラグ酸のラクトン環の1つが開環および脱カルボキシル化し、異なる位置から水酸基が連続的に除去される代謝産物の総称がウロリチン (Uro) である。ヒトの腸内微生物叢による Uro の生産は、エラグ酸、プニカラギン、エラジタンニンが豊富に含まれるクルミのエキスを摂取した人の糞便サンプルを解析することで初めて実証された。ザクロジュースを摂取した被験者のウロリチン A (UroA) のピーク血漿レベルは、14~25 μM の範囲内であり、微生物組成の違いがウロリチン産生に影響を及ぼしてい

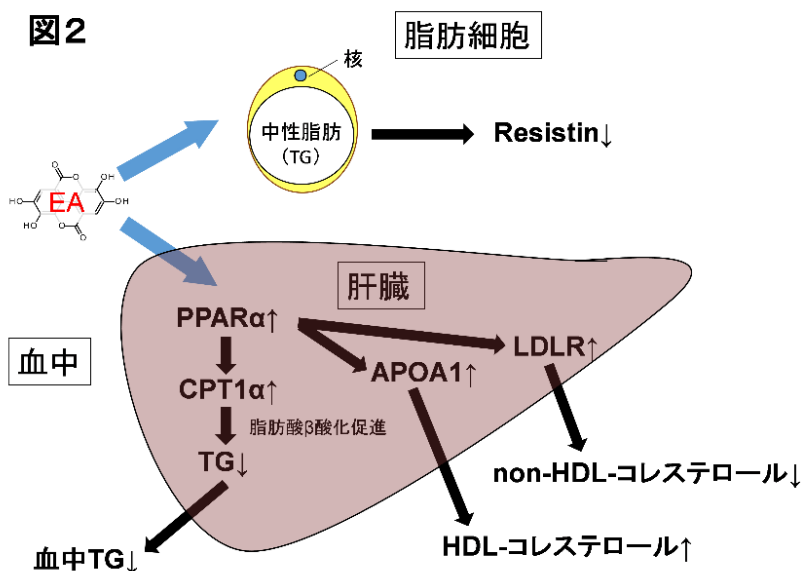


図2 エラグ酸の生理機能性

分である ApoA1 の分泌促進を引き起こすことを明らかにしつつある (論文準備中)。

ると考えられる。代謝産物は結腸内で産生され、摂取後 6~8 時間で血漿中に出現し、

活発な腸肝再循環により摂取後 48~72 時間は尿中および血漿中に存在していた¹⁷⁾。

7. エラグ酸代謝物の生理機能性

UroA、B、C、D および iso-UroA をヒト脂肪生成幹細胞 (hASCs) に添加し、脂質生成に対する効果を測定したところ、UroA、C、D は、TG 蓄積および生成タンパク質である PPAR γ および Fas の遺伝子発現を減少させることで新規脂肪細胞の形成を有意に阻害した。また、AMP 活性化プロテインキ

ー感受性代謝経路を変化させる可能性があることを示唆した。さらに Huh-7 細胞で放射性標識前駆体の代謝を追跡し TG 合成の調節を解析したところ、UroA、C、D が脂肪酸の β 酸化を増加させ、TG 蓄積を減少させた¹⁸⁾。

8. おわりに

天然フェノール系抗酸化物質であるエラグ酸は、抗酸化能、抗がん作用、アディポサイトカイン分泌調節能など様々な生理機

表 1 エラグ酸関連成分の生理機能性 (まとめ)

成分	機能性	細胞/動物種	作用機序	文献
エラグ酸	抗酸化	CHO細胞	ROS産生阻害・消去、DNA保護	[7]
		C57BL/6Jマウス	脂質過酸化抑制	[9]
		SDラット	DNA損傷抑制	[10]
	抗ガン	CaSki細胞	P21媒介G1停止による細胞増殖阻害	[11]
		MIA PaCa-2細胞 PANC-1細胞	ミトコンドリア脱分極 シトクロムC放出 下流カスパーゼ活性化 NF- κ B結合活性減少	[12]
PFE エラグ酸	抗インスリン 抵抗性	3T3-L1脂肪細胞 OVXマウス	レジスチン分泌抑制	[15]
		KK-Ayマウス	レジスチン分泌抑制 肝臓TG量低下 肝臓内の脂肪酸分解系 酵素遺伝子群の発現亢進	[16]
エラグ酸	リポタンパク 質代謝調節	HepG2細胞 HuH-7細胞	ApoB分泌抑制 ApoA1分泌促進	
UroA,C,D	TG分泌抑制	hASCs細胞	PPAR γ ・Fasの遺伝子発 現減少 AMPKのリン酸化促進	[18]
		HuH-7細胞	脂肪酸 β 酸化促進	[18]

ナーゼ (AMPK) のリン酸化を促進させていたことから、TG 生成を阻害しエネルギ

能性を有することが示された (図 2)。またエラグ酸が体内に吸収される際に結腸で産

生される代謝産物ウロリチンにも抗炎症作用や抗がん作用などエラグ酸と同様の効果があることが実証された(表1)。エラグ酸、ウロリチンはこれらの作用により代謝性疾患の予防・改善につながる有望な機能性食品成分となりうる。しかし体内動態やメカニズムなどには未知な部分も多く、今後のさらなる検討が必要である。

9. 参考文献

- 1) Yi-Hao Yu., Henry N. Ginsberg (2005) Adipocyte signaling and lipid homeostasis sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circulation Research* 96:1042-1052.
- 2) Lei F., Xing DM., Xiang L., Zhao YN., Wang W. (2003) Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chromatogr B* 796:189-194.
- 3) Sudheesh, S., Vijayalakshmi, N. R. (2005) Flavonoids from: *punica granatum* - potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia* 76:181-186.
- 4) Wang, R.-F., Xie, W.-D., Zhang, Z., Xing, D.-M., Ding, Y., Wang, W. et al. (2004) Bioactive compounds from the seeds of *punica granatum* (pomegranate). *J Nat Prod* 67:2096-2098.
- 5) Vатtem, D. A., Shetty, K. (2005) Biological functionality of ellagic acid: a review. *Journal of Food Biochemistry* 29-3:234-266.
- 6) K. Indira Priyadarsini., Sujata M. Khopde., S. Santosh Kumar., Hari Mohan (2002) Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50-7:2200-2206.
- 7) Cozzi R., Ricordy R., Bartolini F., Ramadori L., Perticone P., De Salvia R. (1995) Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ Mol Mutagen* 26-3:248-254.
- 8) David H. Barch., Lynn M. Rundhaugen., Gary D. Stoner., N.Sokalingum Pillay., William A. Rosche (1996) Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis* 17-2:265-269.
- 9) Hassoun, E. A., Walter, A. C., Alsharif, N. Z., & Stohs, S. J. (1997) Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology* 124-1:27-37.
- 10) Yüce, A., Ateşşahin, A., Çeribaşı, A. O. and Aksakal, M. (2007) Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 101-345-349.
- 11) A. Narayanan, Bhagavathi & Geoffroy, Otto & C. Willingham, Mark & G. Re, Gian & W. Nixon, Daniel (1999) P53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Letters* 136:215-221.
- 12) Edderkaoui M., Odinkova I., Ohno I., Gukovsky I., Go V. L., Pandol S. J., Gukovskaya A. S. (2008) Ellagic acid

- induces apoptosis through inhibition of nuclear factor kappa B in pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 14:3672-3680.
- 13) S. Galic., J. S. Oakhill., G. R. Steinberg. (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol* 316:129-139.
- 14) M. Gnacinska, S. Malgorzewicz, M. Stojek, W. Lysiak-Szydłowska, K. Sworczak (2009) Role of adipokines in complications related to obesity. A review *Adv. Med. Sci* 54:150-157.
- 15) Makino-Wakagi Y., Yoshimura Y., Uzawa Y., Zaima N., Moriyama T., Kawamura Y. (2012) Ellagic acid in pomegranate suppresses resistin secretion by a novel regulatory mechanism involving the degradation of intracellular resistin protein in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 417:880-885.
- 16) Yoshimura Y., Nishii S., Zaima N., Moriyama T., Kawamura Y. (2013) Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. *Biochem Biophys Res Commun* 434:486-491.
- 17) Juan Carlos Espín, Mar Larrosa, María Teresa García-Conesa, and Francisco Tomás-Barberán (2013) Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 1-15.
- 18) Kang, I., Kim, Y., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. and Chung, S. (2016) Urolithin A, C, and D, but not iso-urolithin A and urolithin B, attenuate triglyceride accumulation in human cultures of adipocytes and hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res* 60:1129-1138.