

論文

原著

日本語のみ

## セロリエキスとルチン併用による終末糖化産物形成阻害作用

### Inhibition of advanced glycation end product formation by celery extract and rutin

河北 龍志<sup>1)</sup> / 松井 孝憲<sup>2)</sup> / 山岸 昌一<sup>3)</sup>

Kawakita Ryuji<sup>1)</sup> / Matsui Takanori<sup>2)</sup> / Yamagishi Sho-ichi<sup>3)</sup>

1) 株式会社アップワード

2) 久留米大学医学部糖尿病性血管合併症病態・治療学

3) 昭和大学医学部内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科学部門

1) Upward Co.,LTD

2) Department of Pathophysiology and Therapeutics of Diabetic Vascular Complications, Kurume University School of Medicine

3) Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology Department of Medicine, Showa University School of Medicine

#### 執筆者連絡先

山岸 昌一

〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8

昭和大学医学部内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科学部門

shoichi@med.showa-u.ac.jp

Yamagishi Sho-ichi

Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology Department of Medicine

Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai Tokyo 142-8666, Japan

shoichi@med.showa-u.ac.jp

Diabetes Frontier Online 7, e1-002, 2020 [http://doi.org/10.15634/J0100\\_0701\\_002](http://doi.org/10.15634/J0100_0701_002)

受付日: 2020-5-20 / 受理日: 2020-6-09 / 掲載日: 2020-6-10

#### 要約

加齢や糖尿病、食事に伴って生体内に蓄積される終末糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) は、多くの老年病や老け顔などの老化徴候に関わることが知られている。しかしながら、これまで抗糖化活性をもつ医薬部外品の開発は行われていない。本研究では、医薬部外品として認められているセロリエキスとルチンのAGEs形成抑制作用について検討した。1%セロリエキス、100 $\mu$ MルチンはAGEs形成を阻害しなかったが、両者を併用すると有意にAGEsの形成が抑制された。コントロールに比べて、医薬部外品原料規格に準じた0.1%セロリエキスと100 $\mu$ Mルチンは、それぞれ単独あるいは併用でAGEs形成を有意に阻害した。一方、医薬部外品原料規格に準じた0.5%セロリエキスは、単独ではAGEsの形成を抑えることができなかったが、100 $\mu$ MルチンのAGEs形成抑制作用を増強した。医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスとルチンの併用は、老年徴候や老年病と関わり深いAGEsの形成を効果的に抑える一手段だと言えるかもしれない。

Endogenously formed and food-derived advanced glycation end products (AGEs) play a role in geriatric sings and aging-related disorders, including old-looking face. However, no anti-AGE-quasi-drugs have been developed. We examined here effects of celery extract and rutin on *in vitro*-formation of AGEs. Although 1% celery extract or 100 $\mu$ M rutin did not affect the formation of AGEs, combination of these agents significantly inhibited the formation of AGEs. 0.1 % celery extract and/or 100 $\mu$ M rutin prepared according to the Japanese standards of quasi-drug ingredients (0.1 % CE-QD and/or 100 $\mu$ M R-QD) significantly inhibited the AGEs formation. On the other hand, 0.5 % CE-QD did not affect the formation of AGEs, it potentiated the anti-AGEs effects of 100 $\mu$ M R-QD. Our present study suggests that combination of CE-QD and R-QD might protect against aging-related disorders via suppression of AGEs formation.

#### キーワード

AGEs / RAGE / セロリ / ルチン

#### はじめに

糖尿病では、心血管病、がん、アルツハイマー病、骨粗鬆症などさまざまな老年病のリスクが高まることが知られている<sup>1)2)3)4)5)6)7)8)9)10)</sup>。そし

て、これら疾患の発症、進展の共通の分子基盤に終末糖化産物（advanced glycation end products：AGEs）の形成亢進や蓄積が関わっていることが推定されてきている<sup>1)2)3)4)5)6)7)8)</sup>。実際、罹病期間が長く、血糖コントロールの悪い糖尿病患者ほど合併症が起こりやすく、AGEsが大小血管合併症や総死亡を予測するバイオマーカーとなりうるということが報告されている<sup>9)10)11)</sup>。また、最近になり、食・生活習慣の歪みによってもAGEsの蓄積が亢進すること、一般住民においてもAGEsが心血管病やがんなどの老年病のマーカーとなることが示されている<sup>6)7)8)9)11)12)13)14)</sup>。さらに、動物実験やいくつかの臨床試験により、AGEsの形成を阻止したり、体内から除去することで血管障害やがんの増殖、進展が抑制されることも見い出されている<sup>15)16)17)18)</sup>。以上の事実は、AGEsの形成阻害が老年疾患に対する1つの治療標的となることを示唆している。

一方、AGEsがシワ、シミ、たるみ、薄毛などのいくつかの美容上の問題を引き起こし、老け顔と関連することも報告されている<sup>19)20)21)</sup>。老け顔が、体内老化の指標となり、寿命と相関することも知られており、生体内におけるAGEsの蓄積が体内外の老化の徴候に関わることが推定されている<sup>22)23)</sup>。これまで、抗糖化成分を含んだ化粧品はいくつか開発されてきた。しかしながら、シャンプー・リンス、育毛剤などに使用できる医薬部外品として認められた規格原料の中で、実際に試験管内でAGEs形成抑制活性が実証されたものはほとんどない。

われわれは、以前にファイトケミカルの1つであるケルセチンがスルフォラファン<sup>24)</sup>のAGEs形成抑制作用を強めることを明らかにしてきた<sup>8)24)25)</sup>。ケルセチンの配糖体の1つに医薬部外品として認められているルチンがある<sup>26)</sup>。そこで今回われわれは、同じく医薬部外品として認められているセロリエキスがルチンのAGEs形成抑制作用を増強しうるかどうかが試験管内で検討を行った。

## 方法

### 1. セロリエキスとルチンの調整

市中のスーパーマーケットより購入した新鮮なセロリ50gに直ちに50mLのリン酸緩衝液（pH7.4）を加え、ミキサーで粉砕後、ガーゼで濾過し、4°C、3,000gで5分間遠心分離を行った。透明な上澄みを採取してセロリエキスとして-30°Cで保管し、リン酸緩衝液（pH7.4）で希釈し、最終濃度1%で実験に用いた。ルチンは、和光純薬から純度90%ものを購入して、dimethyl sulfoxide（DMSO）で溶解後、リン酸緩衝液（pH7.4）で希釈し最終濃度100 $\mu$ Mで実験に用いた。

### 2. 医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスとルチンの調整

スーパーマーケットより購入したセロリの茎を1%尿素含有1,3-ブチレングリコール溶液で抽出して、医薬部外品に準じてセロリエキスを調整した。具体的には、新鮮なセロリの茎100gに1%尿素含有1,3-ブチレングリコール100gを加えミキサーで粉砕後、60°Cに加温した。ついで、分散機にて1,000回転/分で30分間攪拌した後、室温まで冷却した。静置後、3メンブランフィルターにて濾過し、確認試験および純度試験を行い、医薬部外品原料規格に準じていることを確認した。医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスは、リン酸緩衝液（pH7.4）で希釈し、最終濃度0.1%、0.5%で実験に用いた。医薬部外品に準じたルチンは、アルプス薬品工業株式会社（飛騨）から購入し、DMSOで溶解後、リン酸緩衝液（pH7.4）で希釈し最終濃度100 $\mu$ Mで実験に用いた。

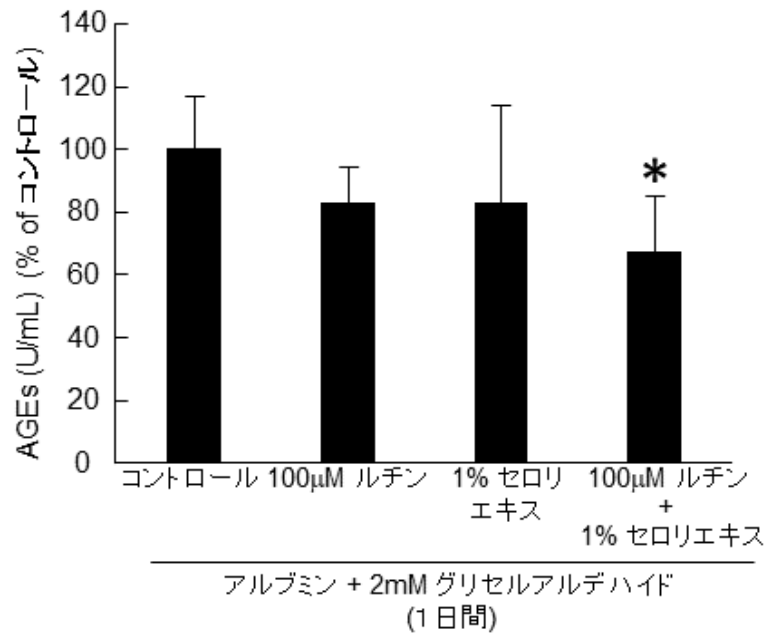
### 3. 酵素結合免疫吸着検査法（ELISA法）を用いたAGEs測定

0.2Mリン酸緩衝液（pH7.4）中で25mg/mLのウシ血清アルブミン（シグマ-アルドリッチ、米国）と2mMのグリセルアルデヒド（ナカライ、京都）を1%セロリエキス、医薬部外品原料規格に準じた0.1%あるいは0.5%セロリエキス、100 $\mu$ Mルチン、医薬部外品原料規格に準じた100 $\mu$ Mルチンの存在、非存在下に1日間37°Cでインキュベーションした。その後、サンプルをリン酸緩衝液（pH7.4）透析後、AGEs化したアルブミン量をAGEsに対するモノクローナル抗体を用いたenzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法で既報のごとく測定した<sup>27)</sup>。標準曲線におけるAGEs化したアルブミンの50%阻害濃度を1U/mLとした。

### 4. 統計解析

データは、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。データ間の統計比較は、Student's t-test（[図1](#)）ならびにANOVA followed by Tukey HSD法（[図2](#)）で行い、 $p < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

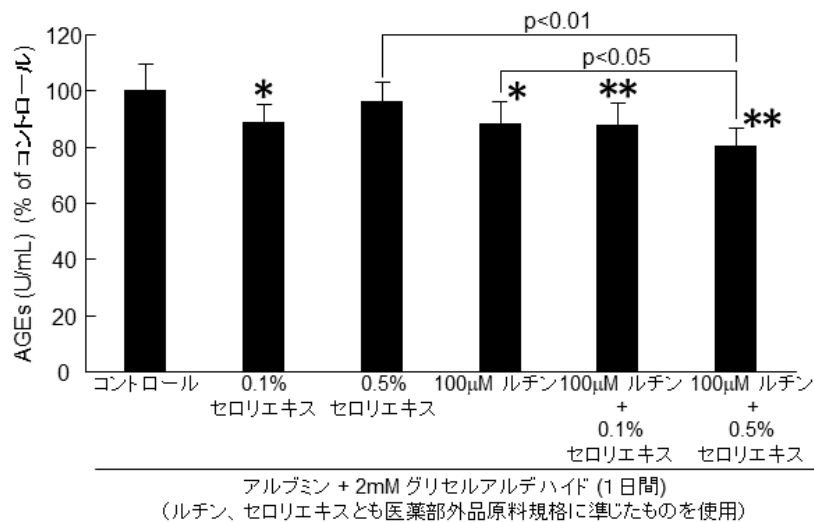
図1. 1%セロリエキスと100 $\mu$ MルチンのAGEs形成阻害作用



25mg/mLのウシ血清アルブミンを2mMのグリセルアルデヒドと1%セロリエキスと100μMルチン存在、非存在下に0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4) 溶液中で1日間37°Cでインキュベーションした。その後、サンプルを0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で透析後、AGEs化したアルブミン量をELISA法で測定した。

\*p<0.05 vs.コントロール, n=5

図2. 医薬部外品原料規格に準じた0.1%, 0.5%セロリエキスと100μMルチンのAGEs形成阻害作用



25mg/mLのウシ血清アルブミンを2mMのグリセルアルデヒドと医薬部外品原料規格に準じた0.1%, 0.5%セロリエキスと100μMルチン存在、非存在下に0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4) 溶液中で1日間37°Cでインキュベーションした。その後、サンプルを0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で透析後、AGEs化したアルブミン量をELISA法で測定した。

\*p<0.05 vs. コントロール, \*\*p<0.01 vs. コントロール, n=4

## 結果

図1に示すごとく、1%セロリエキスと100μMルチンは、コントロールに比べてAGEs形成を阻害する傾向はあったものの、有意差は認められなかった。しかしながら、1%セロリエキスに100μMルチンを添加することで、有意に試験管内におけるAGEs形成が抑制された。

医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスとルチンを用いた実験の結果を図2に示す。コントロールに比べて、医薬部外品原料規格に準じた0.1%セ

ロリエキスと100 $\mu$ Mルチンは、それぞれ単独あるいは併用でAGEs形成を有意に阻害した。一方、医薬部外品原料規格に準じた0.5%セロリエキスは、単独ではAGEsの形成を抑えることができなかったが、100 $\mu$ MルチンのAGEs形成抑制作用を増強した

## 考察

医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスを調整し、確認試験および純度試験を行ってから、AGEsの形成抑制作用を検討するのはとても手間がかかる。また、医薬部外品原料規格に準じたルチンは大容量で購入しなければならず、コストが高い。そのため、本研究では、まず、リン酸緩衝液で調整したセロリエキス、ルチンを用いて予備的な実験を行った。その結果、1%セロリエキスと100 $\mu$ Mルチンがそれぞれの抗糖化活性を高め、併用して使用することではじめてAGEsの形成が有意に抑えられることが見い出された。ついで、①医薬部外品原料規格に準じた0.1%セロリエキスと100 $\mu$ MルチンにもAGEs形成抑制作用が認められること、②医薬部外品原料規格に準じた0.5%セロリエキスにはAGEs形成抑制作用は認められなかったものの、当該エキスは医薬部外品原料規格に準じた100 $\mu$ Mルチンの抗糖化作用を増強すること（図2；100 $\mu$ Mルチン vs. 100 $\mu$ Mルチン+0.5%セロリエキス、 $p < 0.05$ ）が明らかにされた。今回、われわれは、セロリエキスとルチンの抗糖化活性をグリセルアルデヒドに由来するAGEs形成能で評価した。われわれ以前に、グリセルアルデヒドに由来するAGEsが血管障害や炎症、非アルコール性脂肪性肝炎の活動度、インスリン抵抗性、直腸がんなど各種老年病のバイオマーカーになりうることを報告してきている<sup>2)8)28)</sup>。以上のことから、医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスとルチンの併用は、老年徴候や老年病と関わりの深いAGEsの形成を効果的に抑える一手段だと言えるかもしれない。

われわれは以前にフラボノールであるケルセチンが、スルフォラファン<sup>8)24)25)</sup>のAGEs形成抑制作用を増強することを報告している<sup>8)24)25)</sup>。ケルセチンはB環に水酸基を2つもち、この部分が抗糖化活性に寄与することが推定されている<sup>8)</sup>。ルチンもケルセチンの配糖体の1つで同部位に水酸基を2つもつことから、ケルセチン同様にAGEs形成抑制作用を示したものと考えられる。Muthennaらは、ウエスタンブロット法により、目レンズ蛋白質におけるフルクトースによるカルボキシメチルリジンの形成が、25~100 $\mu$ Mルチンで抑制されることを報告しており、今回のわれわれの結果と符合するものと言える<sup>29)</sup>。

これまで、セロリエキスの抗糖化作用については一切報告がない。一方で、セロリエキスには試験管内で酸化活性があることが報告されており、Yaoらはセロリエキスに含まれるアピゲニンやルテオリンなどのフラボンが酸化活性を担っている可能性について言及している<sup>30)31)</sup>。酸化反応によりAGEs形成が促進されること、アピゲニンやルテオリンに抗糖化作用があることが知られている<sup>32)33)34)35)</sup>。したがって、セロリエキスのAGEs形成抑制作用の一部にアピゲニンやルテオリンが関与しているのかも知れない。

今後は、医薬部外品原料規格に準じたセロリエキスとルチンを組み合わせることで、抗糖化活性をもったシャンプー・リンスや育毛剤の開発につなげていきたい。

## 本研究の限界

医薬部外品原料規格による検討では、セロリエキス0.1%で有意なAGEsの形成抑制作用が認められたが、0.5%セロリエキスでは有意な効果は認められなかった。なぜ、用量依存性の効果が得られなかったかは不明である。しかし、一般的に医薬部外品原料規格としてセロリエキスが用いられる場合は、0.1%以下の低用量で使用されることが多いようである。他の濃度、たとえば、1%や0.05%セロリエキスの効果についても将来的には検討が必要かもしれない。

25~100 $\mu$ MルチンでAGEsの1つであるカルボキシメチルリジンの形成が抑えられることが報告されている<sup>29)</sup>。そのため、本研究では100 $\mu$ Mルチンを実験に用いた。他の濃度のルチンがAGEs形成にどのような影響を及ぼすかは明らかでない。

## 利益相反

河北は株式会社アップワードの社員である。

## 文献

1. Yamagishi S. Role of Advanced Glycation End Products (AGEs) in Osteoporosis in Diabetes. *Curr Drug Targets*. 2011; 12: 2096-102.
2. Yamagishi S. Potential Clinical Utility of Advanced Glycation End Product Cross-Link Breakers in Age- And Diabetes-Associated Disorders. *Rejuvenation Res*. 2012; 15: 564-72.
3. Ward MS, Fortheringham AK, Cooper ME, et al. Targeting Advanced Glycation Endproducts and Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13: 654-61.
4. Bucala R. Diabetes, Aging, and Their Tissue Complications. *J Clin Invest*. 2014; 12: 1887-8.
5. Vlassara H, Uribarri J. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? *Curr Diab Rep*. 2014; 14: 453.
6. Yamagishi S, Matsui T, Fukami K. Role of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Its Ligands in Cancer Risk. *Rejuvenation Res*. 2015; 18: 48-56.
7. Yamagishi S, Matsui T. Pathologic Role of Dietary Advanced Glycation End Products in Cardiometabolic Disorders, and Therapeutic Intervention. *Nutrition*. 2016; 32: 157-65.
8. Yamagishi S, Matsui T, Ishibashi Y, et al. Phytochemicals Against Advanced Glycation End Products (AGEs) and the Receptor System. *Curr Pharm Des*. 2017; 23: 1135-41.
9. Yamagishi S, Fukami K, Matsui T. Evaluation of Tissue Accumulation Levels of Advanced Glycation End Products by Skin Autofluorescence: A Novel Marker

of Vascular Complications in High-Risk Patients for Cardiovascular Disease. *Int J Cardiol.* 2015; 185: 263-8.

10. Fokkens BT, Smit AJ. Skin Fluorescence as a Clinical Tool for Non-Invasive Assessment of Advanced Glycation and Long-Term Complications of Diabetes. *Glycoconj J.* 2016; 33: 527-35.

11. Schmidt AM. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019; 39: 558-68.

12. Vlassara H, Striker GE. AGE Restriction in Diabetes Mellitus: A Paradigm Shift. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7: 526-39.

13. Isami F, West BJ, Nakajima S, et al. Association of Advanced Glycation End Products, Evaluated by Skin Autofluorescence, With Lifestyle Habits in a General Japanese Population. *J Int Med Res.* 2018; 46: 1043-51.

14. van Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, et al. Skin Autofluorescence Predicts Incident Type 2 Diabetes, Cardiovascular Disease and Mortality in the General Population. *Diabetologia.* 2019; 62: 269-80.

15. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, et al; ACTION I Investigator Group. Randomized Trial of an Inhibitor of Formation of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 32-40.

16. Little WC, Zile MR, Kitzman DW, et al. The Effect of Alagebrium Chloride (ALT-711), a Novel Glucose Cross-Link Breaker, in the Treatment of Elderly Patients With Diastolic Heart Failure. *J Card Fail.* 2005; 11: 191-5.

17. Doggrell SA. ALT-711 Decreases Cardiovascular Stiffness and Has Potential in Diabetes, Hypertension and Heart Failure. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001; 10: 981-3.

18. Yamagishi S, Matsui T. Therapeutic Potential of DNA-aptamers Raised Against AGE-RAGE Axis in Diabetes-related Complications. *Curr Pharm Des.* 2018; 24: 2802-9.

19. 山岸昌一, 松井孝憲, 上家明美, 他. 皮膚AGEs値は, 見た目年齢と相関する. *Pharma Medica.* 2015; 33: 91-5.

20. Yumi Abe, Wakako Takabe, Masayuki Yagi, et al. Melanin synthesis induction by advanced glycation end-products (AGEs) without  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) or UV exposure. *Glycative Stress Research.* 2016; 3: 229-35.

21. Miyata M, Mifude C, Matsui T, et al. Advanced Glycation End-Products Inhibit Mesenchymal-Epidermal Interaction by Up-Regulating Proinflammatory Cytokines in Hair Follicles. *Eur J Dermatol.* 2015; 25: 359-61.

22. Christensen K, Thinggaard M, McGue M, et al. Perceived Age as Clinically Useful Biomarker of Ageing: Cohort Study. *BMJ.* 2009; 339: b5262.

23. Christoffersen M, Frikke-Schmidt R, Schnohr P, et al. Visible Age-Related Signs and Risk of Ischemic Heart Disease in the General Population: A Prospective Cohort Study. *Circulation.* 2014; 129: 990-8.

24. 深水 圭, 松井孝憲, 山岸昌一. スルフォラファンは, 試験管内において終末糖化産物 (AGE) 形成を抑制する. *Diabetes Frontier Online* 1, e1-001, 2014.

25. 石橋裕治, 松井孝憲, 西 秀博, 他. ケルセチンの終末糖化産物 (AGEs) 形成阻害作用. *Diabetes Frontier Online* 2, e1-012, 2015.

26. Ferenczyova K, Kalocayova B, Bartekova M. Potential Implications of Quercetin and Its Derivatives in Cardioprotection. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 1585.

27. Matsui T, Joo HD, Lee JM, et al. Development of a Monoclonal Antibody-Based ELISA System for Glyceraldehyde-Derived Advanced Glycation End Products. *Immunol Lett.* 2015; 167: 141-6.

28. Yamagishi S, Nakamura N, Suematsu M, et al. Advanced Glycation End Products: A Molecular Target for Vascular Complications in Diabetes. *Mol Med.* 2015; 21 Suppl 1(Suppl 1): S32-40.

29. Muthenna P, Akileshwari C, Sarawat M, et al. Inhibition of Advanced Glycation End-Product Formation on Eye Lens Protein by Rutin. *Br J Nutr.* 2015; 107: 941-9.

30. Kooti W, Daraei N. A Review of the Antioxidant Activity of Celery ( *Apium Graveolens* L). *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2017; 22: 1029-34.

31. Yao Y, Sang W, Zhou M, et al. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of 11 Celery Cultivars. *J Food Sci.* 2010; 75: C9-13.

32. Kaida Y, Fukami K, Matsui T, et al. DNA Aptamer Raised Against AGEs Blocks the Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2013; 62: 3241-50.

33. Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, et al. RAGE-Aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 2017; 66: 1683-95.

34. Wu CH, Yen GC. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 3167-73.

35. Liu L, Xie Y, Song Z, Shang S, et al. Influence of Dietary Flavonoids on the Glycation of Plasma Proteins. *Mol Biosyst.* 2012; 8: 2183-7.