

令和 2 年 2 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02894

研究課題名(和文) フェニルプロパノイド系ポリフェノールが腸管を介して脳機能を改善する効果の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of phenylpropanoid improving brain function by gut-brain interactions

研究代表者

小林 彰子 (Kobayashi, Shoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：90348144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポリフェノールにはアルツハイマー病(AD)を予防する疫学的知見が報告されているが生体内でのメカニズムは不明なことが多い。ADモデルマウスに、ロスマリン酸(RA)を摂食させると、脳内アミロイド(A $\beta$ )の凝集が抑制された。本マウス脳のトランスクリプトミクスによりRA群において、脳内でA $\beta$ 凝集抑制活性を有するモノアミン類の濃度が上昇する可能性が示唆された。野生型マウスを用いた試験では、RA摂食によりこの化合物の濃度が上昇し、さらにその分解酵素の抑制が示唆された。以上の結果からRA摂食により脳内においてモノアミン類の濃度が上昇することにより、ADを予防している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野菜や果物を多く摂取し、ポリフェノールを多く含む食品を摂取する食習慣がAD発症予防に繋がる可能性が、多くの論文により示されている。しかしこれらについては疫学的な知見が多く、メカニズム等の科学的なエビデンスは少ないのが現状である。本研究は、シソやローズマリーに含まれるポリフェノール的一种、ロスマリン酸を摂取すると、脳内で一部のモノアミン類が濃度上昇し、それらがA $\beta$ 凝集を抑制するという、新たなメカニズムを見出した。

研究成果の概要(英文)：There have been many epidemiological studies of polyphenols to prevent Alzheimer's disease (AD). However, the mechanisms are not clear. When AD model mice were feed rosmarinic acid (RA), the aggregation of amyloid (A $\beta$ ) decreased. The transcriptomics analysis of these mice brain suggested that monoamines, which inhibit A $\beta$  aggregation, were increased in a brain. Measuring by HPLC analysis was evidence of RA feed mice increased monoamines and the decomposition enzymes also decreased. These data suggested that RA intake increases monoamines concentration by reducing enzymes expression, and consequently prevent AD.

研究分野：食品機能学

キーワード：アルツハイマー病 ロスマリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

ポリフェノールにはアルツハイマー病 (AD) を予防する疫学的知見が報告されている。AD の主病態は脳のアミロイド  $\beta$  蛋白 ( $A\beta$ ) 沈着であることから、我々の研究グループは *in vitro* および *in vivo* の検討で独自に、シソ科ハーブに含まれるポリフェノールの一種、ロスマリン酸 (RA、図1) が  $A\beta$  線維形成・伸長抑制、及び  $A\beta$  線維不安定化作用を示すこと、また脳内  $A\beta$  の沈着および神経細胞障害を抑制することを見出した。これまで AD 予防の可能性が報告されているポリフェノールに関しては、生体における作用メカニズムが詳細に解明されているものは少ない。

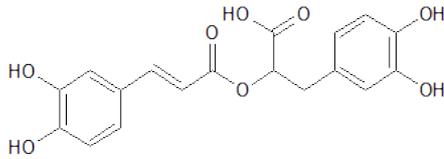


図1. ロスマリン酸 (RA) の構造式

作用メカニズムとして、RA が直接脳内で  $A\beta$  凝集を抑制している作用も考えられるが、我々の検討においては、RA の腸管吸収率は約 1% 程度と低く、さらに脳には血液脳関門が存在するため、RA の脳内濃度は低いことが予測されたため、RA の抗 AD 作用は脳内で直接  $A\beta$  に結合する以外のメカニズムも存在することが考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、トランスクリプトーム解析を行い、RA の脳機能改善および AD 予防効果に関する新たな作用メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1 トランスクリプトーム解析

既に我々の研究グループは、AD モデルマウスである Tg2576 に 10 か月間 0.5% RA を含む普通食で飼育すると、普通食群に比べ脳内  $A\beta$  の沈着が抑制されることを報告している (Hamaguchi et al., *Am J Pathol.* 2009)。この Hamaguchi らが飼育し、RA 摂食により脳内  $A\beta$  凝集抑制が確認されたマウス脳から totalRNA を抽出し DNA マイクロアレイを実施した。

### 3-2 野生型マウスを用いた表現型の確認

DNA マイクロアレイにより RA 摂食群で示唆された表現型について、野生型マウスを用いて確認した。C57BL/6J マウスを普通食および 0.5% RA を含む普通食で 7 週間、あるいは 11 日間飼育し、それぞれコントロール (C) 群および RA 群とした。脳を部位別に採取し、

脳内モノアミン量を HPLC-クーロメトリック式 ECD (HPLC-ECD) にて測定した。またモノアミン合成経路に位置する酵素の発現量を RT-qPCR により定量した。

### 3-3. *in vitro* 系による $A\beta$ 凝集抑制試験

SensoLyte<sup>®</sup> Thioflavin T  $\beta$ -Amyloid (1-42) Aggregation Kit を用いてモノアミン類の  $A\beta$  凝集抑制能を評価した。

### 3-4 野生型マウスを用いた体内 RA 濃度の検討

7 週間飼育した C 群および RA 群の脳、血中、および消化管上皮の RA 濃度を HPLC-ECD にて測定した。また、14 時間絶食後に RA を経口投与し、消化管を摘出し、各部位上皮における RA 濃度を測定した。

## 4. 研究成果

### 4-1 トランスクリプトーム解析

得られたデータについて Rank products 法による 2 群間比較を行い、FDR < 0.05 を満たす有意に変動した遺伝子 (DEG) を抽出した。これらをウェブ解析ツール Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery に供し、FDR < 0.05 を満たす gene ontology (GO) term を抽出した。コントロール群と比較し RA 群で変化している機能として、神経系の発達 (GO: nervous system development, GO: brain development)、神経伝達 (GO: chemical synaptic transmission, GO: neurotransmitter secretion) および記憶 (GO: long-term memory) に関連する GO term が抽出された。さらに DEG を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析に供した。変動が高いと予測された上位 10 個のパスウェイの中で、dopaminergic synapse に着目した。これまでに、認知症患者の脳内においてドーパミン (dopamine, DA) の産生が減少し、そのことが認知機能低下に影響を与えるとする報告が存在したからである。KEGG パスウェイ: dopaminergic synapse に含まれる遺伝子を精査すると、DA 合成酵素である DOPA decarboxylase (Ddc) および DA 受容体である dopamine receptor D2 (Drd2) が上方制御されている一方、DA 分解酵素の 1 つ catechol-O-methyltransferase (Comt) が下方制御されていた。これらの遺伝子の変動より、RA 摂食マウスの脳内において、ニューロンのシナプス前終末における DA の合成と放出が上方制御されている可能性が考えられた。

### 4-2 野生型マウスを用いた表現型の確認

7 週間 RA 食を摂食させた RA 群の脳内 (全脳) では levodopa (L-DOPA) および 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC) が有意に高値を示した。DA は黒質および腹側被蓋野において合成され、主に線条体および前頭大脳皮質に投射される。そこで、RA 摂

食後これらの部位を採取しモノアミン類を測定した。RA を高濃度に含むローズマリー抽出物を 1 週間 ICR マウスに投与すると、大脳皮質において、norepinephrine (NE)、DA、セロトニンの濃度が有意に上昇するという報告が存在したことから、摂食日数を 11 日間に設定した。11 日間の摂食により大脳皮質において、RA 群において L-DOPA、NE、DOPAC が上昇、および DA が上昇傾向を示した (図 2)。

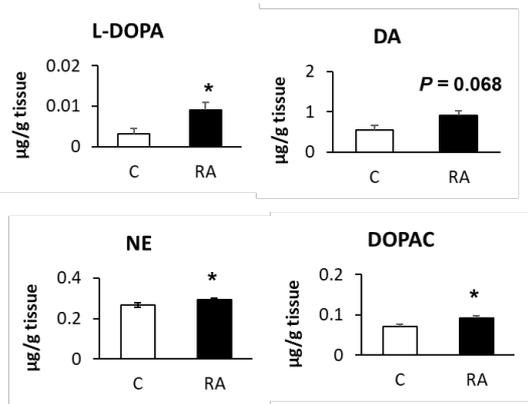


図 2 . RA 摂食後の大脳皮質におけるモノアミン類の定量

DA 合成経路に位置する酵素の発現を調べた。RA 摂食 11 日後の大脳皮質における Th、Comt、Mao-b、Ddc、Dbh の mRNA の発現量を qPCR により定量したがいずれの酵素も有意差は認められなかった。大脳皮質は DA の投射先であるため、DA 合成部位である黒質および腹側被蓋野におけるこれらの酵素の発現量を調べた。その結果、黒質では Comt および Mao-b が、腹側被蓋野では Mao-b が低下していた (図 3)。

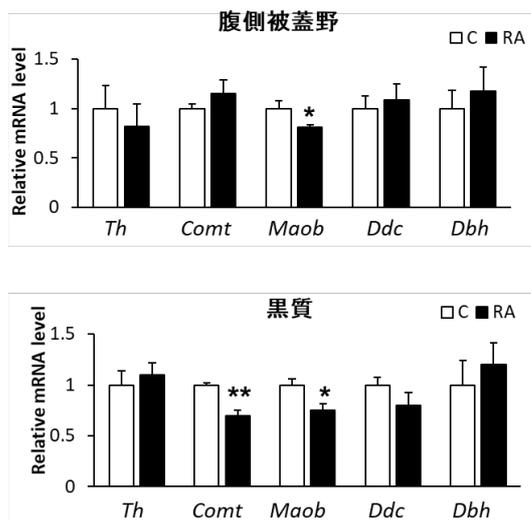


図 3 . 黒質・腹側被蓋野における DA 合成経路に位置する酵素の発現量

#### 4-3 *in vitro* における $\text{A}\beta$ 凝集抑制試験

RA 摂食により濃度が上昇していたモノアミンの  $\text{A}\beta$  凝集抑制試験を、Thioflavin T  $\beta$ -Amyloid Aggregation Kit を用いて検討した。その結果、RA 摂食により大脳皮質で濃度が上昇した L-DOPA、DA、DOPAC および NE は  $\text{A}\beta$  凝集抑制活性を示し (図 4)、RA 摂食によりこれらのモノアミン濃度が上昇することにより脳内  $\text{A}\beta$  凝集が抑制される可能性が考えられた。

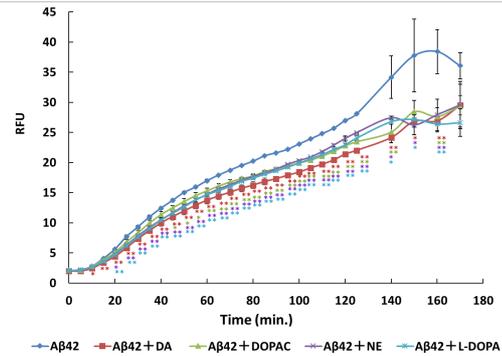


図 4 . モノアミン類の  $\text{A}\beta$  凝集抑制試験

#### 4-4 野生型マウスを用いた体内 RA 濃度の検討

C 群においては血中および脳内において RA は検出されなかった。また RA 群では、血中では検出されたが、脳内では検出限界以下であった。消化管では各部位でみられたが摂食時間をコントロールしなかったため個体差が大きかった。そこで、14 時間絶食後に RA を経口投与し、消化管を摘出し、各部位上皮における RA 濃度を測定した。RA は胃で最も高値を示し、十二指腸でも値は高かったが、小腸中部および下部、盲腸、および大腸でも検出された。以下に HPLC-クーロメトリック式 ECD 分析における RA のクロマトグラムを示す (図 3)。

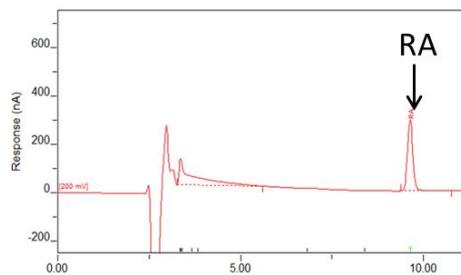


図 3 .HPLC-クーロメトリック式 ECD 分析における RA のクロマトグラム

#### まとめ

RA 摂食により DA の合成部位である黒質および腹側被蓋野において、それぞれ Comt および Mao-b が低下することにより、DA の投射部位である大脳皮質において L-DOPA、NE、DOPAC が上昇、DA が上昇傾向を示す

ことが明らかになった。これらのモノアミン類は、 $\text{A}\beta$  凝集抑制活性を示したことから、RA 摂食により脳内においてこれらモノアミン類が濃度上昇することにより、脳内  $\text{A}\beta$  凝集が抑制される可能性があることを見出した。また、7 週間 RA を摂食したマウス脳内において RA は検出限界以下であった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1) Hase T, Shishido S, Yamamoto S, Yamashita R, Nukima H, Taira S, Toyoda T, Abe K, Hamaguchi T, Ono K, Noguchi-Shinohara M, Yamada M, Kobayashi S\*: Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid  $\beta$  aggregation by increasing monoamine secretion. *Sci. Rep.* **9**:8711 (2019), 査読有。

2) Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Iwasa K, Nagai T, Kobayashi S, Nakamura H, Yamada M: Pharmacokinetics, safety and tolerability of rosmarinic acid in healthy individuals. *PLOS One* **10**(5): e0126422 (2015), 査読有。

3) Kobayashi S\*, Kato T, Azuma T, Kikuzaki H, Abe K: Anti-allergenic Activity of Polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Functional Foods*, **13**, 100-107(2015), 査読有。

[学会発表](計 15 件)

1) 山本 宗, 篠原 もえ子, 浜口 毅, 山田 正仁, 小林 彰子, ロスマリン酸の抗アルツハイマー作用に関する検証, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018/03/16.

2) 山下 玲, 長谷 知輝, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 阿部 啓子, 小林 彰子, エネルギー代謝改善を介したロスマリン酸の認知機能低下に対する効果, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018/03/16.

3) 山下 玲, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 阿部 啓子, 小林 彰子, 認知機能低下に対するロスマリン酸の効果, 日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会, 2017/9/2.

4) 山本 宗, 篠原 もえ子, 浜口 毅, 山田 正仁, 小林 彰子, ロスマリン酸の抗アルツハイマー病効果に関する研究, 日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会, 2017/9/2.

5) 小林 彰子, 篠原 もえ子, 浜口 毅, 山田 正仁, ロスマリン酸による脳機能改善効果の解析. 第 69 回日本生物工学会大会, 2017/9/13.

6) 小林 彰子, ポリフェノールのアルツハイマー病遅延効果と商品化への道のり, BioJapan2017, 2017/10/14.

7) 山本 宗, 篠原 もえ子, 浜口 毅, 山田 正仁, 小林 彰子, ロスマリン酸の抗アルツハイマー病効果に関する研究, 第 36 回日本認知症学会学術集会, 2017/11/24-26.

8) 石川 和樹, 小川 真奈, 石井 剛志, 阿部 啓子, 小林 彰子, テアフラビンが胆汁酸吸収トランスポーター活性に与える影響, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/03/18.

9) 山下 玲, 長谷 知輝, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 阿部 啓子, 小林 彰子, 認知機能低下を軽減するロスマリン酸の効果, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/03/18.

10) 小林 彰子, コレステロールおよび胆汁酸の腸管吸収機構と食品成分によるその制御, 日本農芸化学会 2017 年度大会シンポジウム, 招待講演, 2017 年 3 月 18 日.

11) 小林 彰子, ポリフェノールのアルツハイマー病遅延効果, 食の安全研究センター創立 10 周年記念シンポジウム, 2017.2.22

12) 小林 彰子, 篠原 もえ子, 山田 正仁, ポリフェノールのアルツハイマー病遅延効果, 日本ポリフェノール学会, 招待講演, 2016.8.4.

13) 小林 彰子, ポリフェノールのアルツハイマー病遅延効果, ILSI Japan 寄付講座「機能性食品ゲノミクス」III 期研究成果シンポジウム「食と健康」に関わる統合食品科学のニューフロンティア, 招待講演, 2016 年 9 月 14 日.

14) 小林 彰子, ポリフェノールのアルツハイマー病遅延効果, BioJapan2016 次世代農林水産業創造技術「次世代機能性農林水産物・食品の開発」研究の夢と進展, 招待講演, 2016 年 10 月 14 日.

15) 穴戸 駿, 山下 玲, 豊田 集, 濱口 毅, 篠原 もえ子, 小野 賢二郎, 山田 正仁, 阿

部 啓子, 小林 彰子, ロスマリン酸による脳機能改善機作の解明, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016.3.30.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

東京大学, 農学生命科学研究科, 准教授.

小林彰子 ( SHOKO Kobayashi )

研究者番号 : 90348144

(2)研究分担者

金沢大学, 医学系, 教授

山田正仁 ( MASAHITO Yamada )

研究者番号 : 80191336