

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00828

研究課題名(和文) ストレスおよび糖尿病による脳の老化促進の機構解明と食品成分によるその予防

研究課題名(英文) Mechanism of brain aging promotion by stress and diabetes mellitus and its prevention by food components

研究代表者

海野 けい子 (Keiko, Unno)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：10106437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：(1)緑茶中のカフェイン量を減少させることによりテアニンのストレス軽減効果を高めた場合、マウスならびにヒトにおいて有意なストレス軽減効果が認められた。
(2)エピガロカテキンガレート(EGCG)及びその代謝物について、血液脳関門透過性並びに培養神経細胞(SH-SY5Y)に対する神経突起伸長作用を検討した結果、EGCG並びにその代謝物が神経細胞の分化を誘導している可能性を見出した。
(3)老化促進モデルマウス(SAMP8)では、ストレス負荷によりベータアミロイドの比率(42/40)が有意に高まっていたことから、ストレスはアルツハイマー病の進行を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) Stress-reducing effect was demonstrated in mice and humans that ingested green tea with reduced caffeine, because the stress-reducing effect of theanine was enhanced by the suppression of antagonistic effect of caffeine.
(2) EGCG and its metabolites were investigated for blood-brain barrier permeability and neurite outgrowth action on cultured neurons (SH-SY5Y). We found that both EGCG and its metabolites enhanced the differentiation of nerve cells.
(3) In the senescence-accelerate model mouse (SAMP8), the ratio of A₄₂ to A₄₀ was significantly increased by stress load, suggesting the involvement of stress on the progression of Alzheimer's disease.

研究分野：老化生物学

キーワード：ストレス 脳老化 テアニン カテキン 認知症予防

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会となったわが国において、脳の老化予防は認知症対策の重要な柱である。一方、脳の老化を促進することが疫学的に明らかとなってきたものとして、「ストレスの蓄積」ならびに「糖尿病の関与」があるが、しかしこれらの十分な機構解明ならびに予防対策の確立には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者がこれまでに「ストレス」ならびに「糖尿病」に対する予防効果を明らかにしてきた食品成分(テアニン、カテキン等)に着目し、脳の老化予防に対する作用の機構解明、ならびに食品成分の脳に対する機能性解明をめざすこととした。

3. 研究の方法

ストレスの評価は、マウスの縄張り意識を利用してマウスに社会心理的ストレスを負荷すると、代表的なストレス応答器官である副腎が有意に肥大することに基づき比較を行った [Unno K et al, 2013]。すべての臨床研究は静岡県立大学研究倫理審査委員会の承認を得て行われた。唾液アミラーゼ活性の測定、主観的ストレス等を指標に、抗ストレス作用を評価した。睡眠の状態は携帯型脳波計を用いて測定した。

血液脳関門(BBB)透過性は、in vitro アッセイキット(ファーマコセル(株))を使用した。培養神経細胞はヒト神経芽細胞腫由来のSH-SY5Y細胞を使用した。

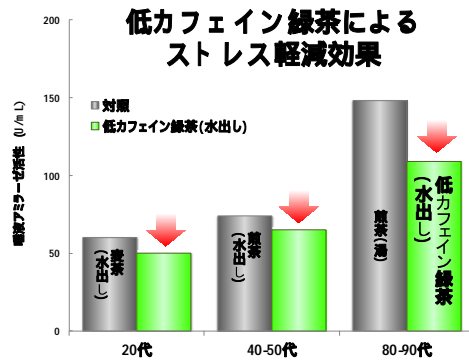
4. 研究成果

(1) テアニンによるストレス軽減を介した脳の老化予防

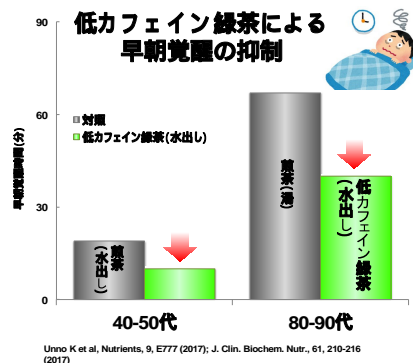
緑茶に含まれる主要なアミノ酸であるテアニンは優れた抗ストレス作用を示すが、テアニンの抗ストレス作用は緑茶の主要な成分であるカフェインやカテキンの共存によって阻害されることをこれまでに明らかにしてきた [Unno K et al, 2011, 2013]。そこで本研究では、緑茶の抗ストレス作用を評価するとともに、緑茶中に含まれる各成分のテアニンに対する相互作用を検討した。テアニン、カフェイン、EGC、EGCG、およびアルギニンを組み合わせた場合の抗ストレス作用を比較した結果、テアニンの抗ストレス作用はカフェインおよびEGCGによって打ち消されるが、アルギニンはテアニンの作用を補助し、またEGCはEGCGと拮抗することでテアニンの作用を補助することを明らかにした [Unno K et al, 2016]。

次に、煎茶中のテアニンやカテキン量は変わらず、カフェイン量のみを低下させた「低カフェイン緑茶」を作製し、それを水出しした場合について、臨床研究を行った。病院あるいは薬局実習を行う20代の学生について、ストレスを軽減できるか検討を行った結果、プラセボ群に比べ低カフェイン緑茶を飲ん

でいた学生ではストレスが有意に軽減していた [Unno K et al, 2017a]。80-90代の高齢者を対象とし、低カフェイン緑茶のストレスならびに睡眠への影響を検討した結果、低カフェイン緑茶摂取時は通常の緑茶摂取時に比べ、起床時のアミラーゼ活性が有意に低下した。また、睡眠の各パラメータについても変化が認められた。低カフェイン緑茶摂取によりアミラーゼ活性が低下した被験者では、入眠潜時、早朝覚醒が減少し、総睡眠時間が増加していた。これにより、睡眠効率が有意に高まっていた [Unno K et al, 2017b]。更に40-50代の中高齢者について、低カフェイン緑茶の摂取によるストレス並びに睡眠に対する影響を検討した結果、煎茶(水出し)を摂取していた対照群に比べストレスが軽減されるとともに、睡眠の質が高まっていることが見出された [Unno K et al, 2017c]。これらのことから、カフェインを低下させた緑茶の摂取は、ストレス軽減や睡眠の改善を通して老化を予防する優れた方策であることが示唆された。



Unno K et al, Biol. Pharm. Bull., 40, 902-909 (2017); Nutrients, 9, E777 (2017); J. Clin. Biochem. Nutr., 61, 210-216 (2017)



Unno K et al, Nutrients, 9, E777 (2017); J. Clin. Biochem. Nutr., 61, 210-216 (2017)

抹茶にはテアニンが多く含まれているが、カフェインも多く含まれている。またそれらの成分組成は銘柄等により大きく異なる。そこで、どのような組成の抹茶がストレス軽減作用を示すのか、動物実験ならびに臨床試験により検討した。その結果、抹茶のストレス軽減作用は、テアニン及びアルギニンの両者の含有量が高いほど効果が高まることが明らかとなった。一方カフェインおよびEGCGは、テアニンに対する相対量が各々2.2以下、及び3以下である必要があった(投稿中)。

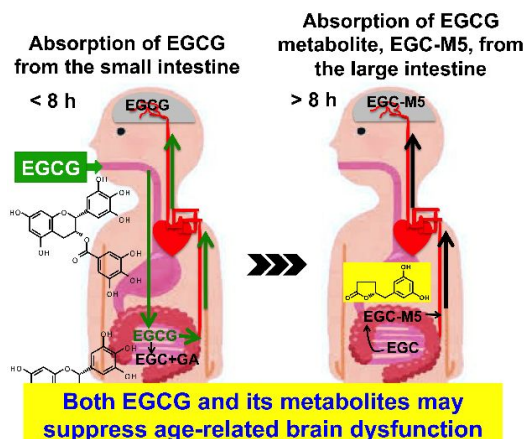
(2) 緑茶カテキンによる脳機能低下の抑制

緑茶カテキンを摂取することにより、加齢に伴う脳機能の低下を予防できることを、われわれはこれまでに老化促進モデルマウス(SAMP10)を用い明らかにしてきた [Unno K et al, 2004, 2007, 2008; Kishido T et al, 2007]。そこで、緑茶カテキンを摂取していたマウスの脳内および血清中の酸化傷害の程度、カテキン成分による血液脳関門(BBB)透過性の違い、ならびに培養神経細胞に対する作用を調べることにより、カテキン類の脳に対する作用について機構解明を試みた。

緑茶カテキン中の主成分である EGCG は経口的に摂取した時、一部はそのまま血液中に取り込まれるが、大部分は腸内細菌により EGC および没食子酸 (GA) に分解される。そこで EGCG、EGC および GA の脳機能に対する作用の違いを検討した結果、EGCG を摂取していたマウスでは有意な学習能低下抑制作用が認められたが、EGC あるいは GA 摂取群では脳に対する改善作用は認められなかった。これらの BBB 透過性を比較した結果、EGCG および EGC は GA に比べ BBB 透過性が低いものの、BBB を透過することが示された。次に SH-SY5Y 細胞に対する作用を比較した結果、EGC や GA に比べ EGCG はより低濃度で細胞の分化・増殖を促進した。また、EGCG、EGC あるいは GA を摂取していたマウスでは、血清中の脂質酸化傷害マーカーのレベルが対照群に比べ顕著に低かった。これらのことから、脳内に取り込まれる EGCG は僅かであるが、直接的に脳の神経細胞に作用し分化・増殖を誘導していることが考えられた。一方で、血流を介してカテキン類は生体内の酸化傷害を軽減する作用を及ぼしていることも示唆された [Pervin M et al, 2016]。

経口的に摂取した EGCG は小腸からごく少量がそのままの形で取り込まれ、血流を介して運ばれるが、大部分の EGCG は小腸の腸内細菌で EGC と GA に分解される。EGC は大腸でさらに分解されて 5-dihydroxyphenyl-valerolactone (EGC-M5) が主要な分解産物として生成することが報告されている [Kohri T et al, 2001]。EGC-M5 が血流を介して脳に至った時、実際に脳内に取り込まれるのかどうか調べた結果、EGC-M5 は EGCG や EGC より高い透過性を示し、抱合体になると透過性が低下することが見出された。SH-SY5Y 細胞を用い、EGC-M5 やその抱合体について細胞の増殖や分化に対する影響を調べた結果、EGC-M5 も増殖を促進することが見出された。以上のことから、緑茶として EGCG を摂取した場合、まず初めに小腸から取り込まれた EGCG は血流を介して脳に至り、神経細胞の分化を促進するものと考えられるが、比較的速やかに排泄されてしまう。一方摂取後 8 時間以上経過すると EGCG の分解産物である EGC-M5 が大腸から吸収され、血流を介して脳に至り、これも神経細胞の分化を促進する

ものと考えられる。従って、EGCG とその代謝物である EGC-M5 の両方が作用することによって、加齢に伴う脳機能の低下を抑制しているのではないかと考えられる [Unno K et al, 2017d]。



(3) アルツハイマー病に対するストレスの影響

アルツハイマー病のモデルの一つと考えられている老化促進モデルマウス(SAMP8)を用いて、ストレス負荷の影響を検討した。雄マウスの縄張り意識を利用した対面飼育による社会心理的ストレスを 4 ヶ月間負荷した。長期のストレス負荷による脳機能への影響をステップスルー受動回避試験により検討した場合、有意な影響は認められなかったが、大脳皮質中のアミロイド量について市販キット(Wako)を用い測定した結果、アミロイド(A₄₂)の A₄₀ に対する比率(42/40)がストレス負荷により有意に高まっていた。SAMP8 では A₄₂ が加齢に伴い増加し脳内での凝集が高まることから [Del Valle J et al, 2010]、長期にわたるストレスの負荷は A₄₂ の凝集を促進し、アルツハイマー病の進行を亢進する可能性が示唆された。

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 7 件)

1. Unno K, Pervin M, Nakagawa A, Iguchi K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, Nakamura Y. Blood-Brain Barrier Permeability of Green Tea Catechin Metabolites and their Neurotogenic Activity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. Mol Nutr Food Res. 2017d, 61,1700294. doi: 10.1002/mnfr.201700294.
2. Unno K, Noda S, Kawasaki Y, Yamada H, Morita A, Iguchi K, Nakamura Y. Ingestion of green tea with lowered caffeine improves sleep quality of the

- elderly via suppression of stress. *J Clin Biochem Nutr.* 2017b, 61, 210-216. doi: 10.3164/jcbrn.17-6.
3. Unno K, Noda S, Kawasaki Y, Yamada H, Morita A, Iguchi K, Nakamura Y. Reduced Stress and Improved Sleep Quality Caused by Green Tea Are Associated with a Reduced Caffeine Content. *Nutrients.* 2017c, 9. pii: E777. doi: 10.3390/nu9070777.
 4. Pervin M, Unno K, Nakagawa A, Takahashi Y, Iguchi K, Yamamoto H, Hoshino M, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, Imai S, Nakamura Y. Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice. *Biochem Biophys Rep.* 2017,9,180-186. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.12.012. eCollection 2017 Mar.
 5. Unno K, Yamada H, Iguchi K, Ishida H, Iwao Y, Morita A, Nakamura Y. Anti-stress Effect of Green Tea with Lowered Caffeine on Humans: A Pilot Study. *Biol Pharm Bull.* 2017a, 40(6): 902-909. doi: 10.1248/bpb.b17-00141.
 6. Onishi S, Ishino M, Kitazawa H, Yoto A, Shimba Y, Mochizuki Y, Unno K, Meguro S, Tokimitsu I, Miura S. Green tea extracts ameliorate high-fat diet-induced muscle atrophy in senescence-accelerated mouse prone-8 mice. *PLoS One.* 2018, 13(4):e0195753. doi: 10.1371/journal.pone.0195753. eCollection 2018.
 7. Pervin M, Unno K, Nakayama Y, Ikemoto H, Imai S, Iguchi K, Minami A, Kimura Y, Nakamura Y. Improvement in Cognitive Function with Green Soybean Extract May Be Caused by Increased Neuritogenesis and BDNF Expression. *J Food Process Technol.* 2017, 8, 695.
- [学会発表](計 15 件)
1. Onishi S, Ishino M, Kitazawa K, Shimba Y, Mochizuki Y, Miura S, Unno K, Meguro S, Tokimitsu I. Green tea extracts ameliorate high-fat diet induced muscle atrophy in SAMP8 mice. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease*, 2017年5月17日
 2. Unno K, Noda S, Kawasaki Y, Yamada H, Morita A, Iguchi K, Nakamura Y. Improved Sleep Quality of the Elderly via Suppression of Stress: Effects of Green Tea Components. *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (Yokohama)*, 2017年5月18日
 3. Pervin M, Unno K, Nakagawa A, Iguchi K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, Nakamura Y. Prevention of age-related cognitive dysfunction: Mechanism of action of green tea catechins on mouse brain. *10th World Congress on Nutrition & Food Sciences (Osaka)*, 2017年5月29日
 4. 海野けい子, Monira Pervin, 中川愛美, 井口和明, 原 彩, 高垣 晶子, 南条 文雄, 中村 順行: 緑茶カテキンによる脳の老化抑制機構の解明. 第 17 回日本抗加齢医学会総会(東京), 2017年6月3日
 5. Unno K, Pervine M, Minami A, Iguchi K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Nakamura Y. Suppression of Decline in Cognitive Function by Green Tea Catechin. *日本基礎老化学会第 40 回大会(名古屋)*, 2017年6月16日
 6. 海野けい子, Monira Pervin, 井口和明, 中村順行: 緑茶カテキンによる SAMP10 の寿命延長ならびに脳機能低下抑制. 第 32 回老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術大会(岐阜) 抄録集, p.6, 2017年7月22日
 7. 海野けい子, 小西智一, 住吉 晃, 野中博意, 井口和明, 井之上浩一, 豊岡利正, 川島隆太, 林美智子, パービン・モニラ, 中村順行: 社会心理的ストレスによる脳の萎縮とその後の回復. 第 12 回臨床ストレス応答学会大会(東京) 抄録集, p. 38, 2017年11月5日
 8. 海野けい子: 緑茶カテキンの脳機能低下抑制作用における機構解明. 第 14 回日本カテキン学会年次学術大会2017(大阪), 2017年11月16日
 9. Pervin M, Unno K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Iguchi K, Minami A, Nakamura Y: Role of Green Tea Catechin Metabolites: A Study of the Blood-Brain Barrier Permeability and the Neuritogenic Activity. 第 14 回日本カテキン学会年次学術大会 2017(大阪) 抄録集, p.33, 2017年11月17日
 10. Unno K, Pervin M, Nakagawa A, Iguchi K, Hara A, Takagaki A, Nanjo F, Minami A, Nakamura Y: Mechanism of action of green tea catechins on the brain: Blood brain barrier permeability, cognitive function and nerve cell differentiation. *BIT's 5th Annual World Conference of Geriatrics and Gerontology-2017*, Fukuoka, 2017年12月5日
 11. 浜本伸吾, 大島大資, 仁井寛彦, 井口和

- 明、中村順行、海野けい子、山田浩：抹茶の飲用がストレス軽減に与える影響：ランダム化比較試験による検討。第33回茶学術研究会講演会（静岡）講演要旨集、p. 4、2018年3月5日
12. パービン・モニラ、海野けい子、井口和明、寺脇 彩、高垣晶子、南条文雄、中村順行：緑茶カテキンによる脳の老化抑制の機構解明。第33回茶学術研究会講演会（静岡）旨集、p.10、2018年3月5日
13. 海野けい子、浜本伸吾、大島大資、井口和明、山田 浩、森田明雄、堀江秀樹、中村順行：抹茶のストレス軽減作用：成分組成の違いの影響。第33回茶学術研究会講演会（静岡）講演要旨集、p.12、2018年3月5日
14. Pervin M, Unno K, Nakayama Y, Ikemoto H, Imai S, Iguchi K, Minami A, Kimura Y, Nakamura Y: Green soybean extracts increases neurite- genesis in SH-SY5Y cells and BDNF expression in mouse brain. 日本薬学会第138年会（金沢）2018年3月26日
15. 海野けい子、Monira Pervin、井口和明、南 彰、原 彩、高垣晶子、南条文雄、中村順行：緑茶カテキンによる認知機能低下予防のメカニズム。日本薬学会第138年会（金沢）2018年3月27日

〔図書〕(計 3 件)

1. Keiko Unno : Effects of Green Tea Catechins on Aging and Dementia. Health Benefits of Green Tea, An Evidence-based Approach. CABI, pp.178-184 (2017)
2. Keiko Unno : Effects of Theanine and Other Ingredients of Tea on Stress and Aging. Health Benefits of Green Tea, An Evidence-based Approach. CABI, pp.200-210 (2017)
3. 海野けい子 : 老化制御. 茶の事典 (大森正司・阿南豊正・伊勢村護・加藤みゆき・滝口明子・中村羊一郎編) . 朝倉書店、pp. 388-390 (2017).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：
 発明者：脳神経細胞増殖促進剤
 権利者：海野けい子、原 彩、高垣晶子
 種類：特許
 番号：特開 2017-61438
 出願年月日：2017 年
 国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

海野けい子 (UNNO Keiko)
 静岡県立大学・薬学部・准教授
 研究者番号：10106437

(2) 研究分担者

木村洋子 (KIMURA Yoko)
 静岡大学・農学部・教授
 研究者番号：80291152

(3) 研究分担者

住吉 晃 (SUMIYOSHI Akira)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：80612530

(4) 研究協力者

石井さなえ (ISHII Sanae)
 パービン・モニラ (PERVIN Monira)
 中村順行 (NAKAMURA Yoriyuki)