

令和 元年 9 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05096

研究課題名(和文) 柑橘類果皮成分ノビレチンの認知症改善・予防への活用を目指した基礎研究

研究課題名(英文) Basic research for application of nobiletin, a citrus peel constituent, in improvement and/or prevention of dementia

研究代表者

根本 清光(NEMOTO, Kiyomitsu)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：90189366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：柑橘類果皮成分ノビレチンは、特定の遺伝子・タンパク質の発現・活性を制御することで神経分化を促進すること、アルツハイマー型認知症の病理的特徴である酸化ストレスや小胞体ストレスを増悪させるチオレドキシン相互作用タンパク質(TXNIP)の発現を顕著に低下させることを明らかにするとともに、その低下作用の機序の一部を明らかとした。しかし、認知症モデルマウスに対して低用量のノビレチンを長期間経口投与したが、認知症予防効果を示すことができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた研究成果は、ノビレチンおよびノビレチンを高含有する柑橘類果皮エキスの認知症改善・予防への活用につながる科学的エビデンスとなるのみならず、本研究で挙げたタンパク質や遺伝子は、認知症改善や予防の分子標的となり得ると思われる。したがって、これら分子標的を活用することにより、ノビレチン以外の食品成分や医薬品の認知症改善・予防への応用につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated that nobiletin, a citrus peel component, can induce the neuronal differentiation through modulation of expression and activities of particular genes and proteins, and suppress the expression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP), which deteriorates oxidative and endoplasmic reticulum stress, being a pathological characteristics of Alzheimer's disease (AD). However, dementia-protective effect could not be proved in a trial of prolonged oral administration of nobiletin with AD model mice.

研究分野：分子毒性学

キーワード：脳神経疾患 認知症 アルツハイマー病 神経科学 農林水産物 疾患予防 遺伝子発現 疾患モデル動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

柑橘類果皮由来ポリメトキシフラボノイドであるノビレチン（図1）は、種々認知症病態モデル動物において記憶（認知機能）障害を強力に改善することが示されている¹⁾。その認知症改善効果の発現機序を示しうる知見として、① 認知症病態モデル動物の脳組織や、培養ラット海馬ニューロン、海馬スライス及び神経分化・機能のモデル培養細胞株である PC12 細胞、SK-N-SH 細胞などにおいて、学習・記憶を形成する過程で重要とされる cAMP/protein kinase A (PKA)-mitogen-activated

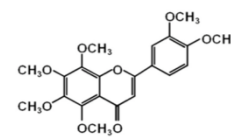


図1 ノビレチン

protein kinase kinase (MEK)-extracellular signal regulated kinase (ERK) シグナル経路の活性化とそれに続く cAMP response element binding protein (CREB)-cAMP response element (CRE) mediated transcription の活性化、ならびに海馬グルタミン酸シナプス伝達に関わる AMPA 受容体の活性化を引き起こすこと、② SK-N-SH 細胞においてアミロイドβ分解酵素ネプリライシンの mRNA およびタンパク質の発現を促進すること、③ 老化促進モデルマウスの記憶障害に対する改善作用発揮時に、アルツハイマー型認知症 (AD) で見られる病理的特徴とされる酸化ストレスやタウの過剰リン酸化を改善すること、などが明らかとなっている。また、本研究代表者である根本は、④ SK-N-SH 細胞など数種の細胞株を用いた DNA マイクロアレイ法での網羅的遺伝子発現の解析により、ノビレチンは、AD の病理的特徴である酸化ストレスや小胞体 (ER) ストレスを増悪化させる thioredoxin-interacting protein (TXNIP) の発現を顕著に低下させること²⁾、⑤ SK-N-SH 細胞を用いた研究から、ノビレチンは、小胞体ストレス誘発性アポトーシスを抑制し、この作用に TXNIP 発現抑制作用が関わる可能性が考えられること³⁾、などを報告している。しかし、①～⑤の事象の相互間の、さらにはそれら事象と認知症改善への直接的な関連付けはまだ不十分である。

2. 研究の目的

本研究では、ノビレチンがどのように遺伝子発現やタンパク質発現・活性に変化をもたらすか、そして、それら変化がどのように認知機能改善効果につながるかを神経分化・機能のモデル培養細胞や認知症病態動物で検討し、ノビレチンおよびノビレチンを高含有する柑橘類果皮エキスの認知症改善・予防への活用につながる科学的エビデンスを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ法

種々刺激を与えた PC12 細胞から調製した total RNA について Agilent 社製 DNA チップ(約 4 万遺伝子のプローブ搭載)を用いて DNA マイクロアレイ法を実施した。

(2) タンパク質発現解析

細胞から調製したタンパク質を用いたタンパク質発現解析は western blot 法で、細胞内のタンパク質発現は免疫蛍光細胞染色にて実施した。

(3) 転写プロモーター領域のクローニング

実験計画は「東邦大学遺伝子組換え実験安全委員会」から承認を受け(承認番号: 遺承 16~18-53-318)、「東邦大学遺伝子組換え実験安全管理規程」を遵守し、実験を実施した。

(4) 転写活性の測定

ルシフェラーゼの発光強度をルミノメーターで測定した。

(5) 動物実験

実験計画は「東邦大学遺伝子組換え実験安全委員会」および「東邦大学動物実験委員会」から承認を受け(承認番号: 遺承 16~18-53-330 号、動承 16~18-53-330 号)、「東邦大学遺伝子組換え実験安全管理規程」ならびに「東邦大学動物実験取扱規定」および「動物の愛護および管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号)」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)」、「文部科学省が策定した「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針(平成 18 年 6 月)」を踏まえて十分倫理面に配慮して実験を行った。

(6) 認知機能評価

Y 字迷路試験にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) ノビレチンおよび神経成長因子 (NGF) 刺激によるラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞の遺伝子発現変化: マイクロアレイ法による解析

PC12 細胞を 100 μM ノビレチンあるいは 50 ng/mL NGF で刺激後、0.5 時間、3 時間、6 時間後の total RNA に対して、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現変動の網羅的解析を実施した。対照群として無刺激細胞の total RNA を用いた。

結果として、ノビレチン刺激と NGF 刺激に共通して発現低下(対照群の 0.5 倍以下)する遺伝子(表 1)、発現上昇(対照群の 2 倍以上)する遺伝子(表 2)、が同定された。

表 1 ノビレチン刺激および NGF 刺激で共通して発現低下する遺伝子

GeneName	Description
G0s2	G0/G1switch 2
Gls	glutaminase (Gls), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1
Gnrh1	gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)
Klhdc8a	kelch domain containing 8A
RGD1566141	similar to CG016 (predicted)
TC594817	NADH dehydrogenase subunit 2
TC612583	Probable transcriptional regulator
Txnip	thioredoxin interacting protein

表 2 ノビレチン刺激および NGF 刺激で共通して発現上昇する遺伝子

GeneName	Description
Ankrd1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
Cyp4f5	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 5
Dusp6	dual-specificity protein tyrosine phosphatase (rVH6)
Egr1	Early growth response protein 1 (Protein Krox-24) (Transcription factor Zif268) (Nerve growth factor-induced protein A)(NGFI-A)
Egr2	early growth response 2
Etv5	ets variant 5
Fos	Fos
Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)
Metnl	meteorin, glial cell differentiation regulator-like
Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
Odc1	ornithine decarboxylase 1
Pcdh21	protocadherin 21
Slc16a10	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)
Slc4a11	solute carrier family 4, (sodium bicarbonate transporter-like, member 11)
Snf1lk	Serine/threonine-protein kinase SIK1 (Salt-inducible protein kinase 1) (Serine/threonine-protein kinase SNF1-like kinase 1) (Protein kinase KID2)
Srf	serum response factor (c-fos serum response element-binding transcription factor)
TC608889	Possible transposase
TC633124	Hmg20a protein
Tph1	tryptophan hydroxylase 1
Tuft1	tufelin 1

Egr1、*Egr2*、*Fos*、*Nr4a1*、*Tph1* 遺伝子は、NGF 刺激による PC12 細胞の神経様分化誘導の初期に発現上昇する遺伝子としてよく知られている。ノビレチンは、これら遺伝子を含め、NGF に類似して遺伝子の発現を誘導することで、PC12 細胞の神経様分化誘導に関与している可能性が考えられた。一方、NGF 刺激による PC12 細胞の神経様分化誘導の初期に発現低下する遺伝子については、これまでにあまり議論されていない。われわれは、これまでにノビレチンが強い TXNIP 発現低下作用を有しているものとして注目しているが、この遺伝子が NGF 刺激においても発現が低下することは、極めて興味深い。

また、データは割愛するが、ノビレチンのみで発現上昇あるいは低下する遺伝子も同定することができた。これら遺伝子と併せ、上記、NGF 刺激と共通して発現変動する遺伝子がコードするタンパク質が、神経分化、神経機能維持、さらには、認知症改善にどのように関わっているのか、さらに追究する予定である。

(2) ノビレチン刺激による TXNIP 発現低下に関わる可能性のあるタンパク質の発現変動：ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞および PC12 細胞での解析

TXNIP 遺伝子の発現誘導に関わるとされている転写因子 ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) は AMPK によってリン酸化を受けて核移行が妨げられるとされている。このことから AMPK 活性化が TXNIP 発現抑制の要因になるものと推定される。そこで、AMPK ならびに AMPK 活性化に関わるタンパク質 LKB1、さらにその上流にある MEK1/2、ERK1/2、p90RSK の活性体(リン酸化)について、まず、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞で western blot 法にて検討を行った。その結果、ノビレチン刺激によって、LKB1、MEK1/2、ERK1/2、p90RSK のいずれのリン酸化タンパク質も、刺激開始後 5 分で発現の顕著な増加が認められた(図 2)。中でも LKB1 のリン酸化は刺激開始後 12 時間まで持続した。他のタンパク質のリン酸化は一過的であった。AMPK のリン酸化については結果がバラツキ、明確な変動を確定することはできなかった。PC12 細胞においても同様の結果が得られた。また、これま

で、SK-N-SH 細胞、ヒト肝がん細胞 Huh7、ラット線維芽細胞 3Y1 で検出されたノビレチン刺激による TXNIP の発現低下は PC12 細胞においても観察された。

このことから、TXNIP 遺伝子およびそのタンパク質発現のノビレチン刺激による低下は、AMPK の関与は不明確だったものの、MEK1/2→ERK1/2→p90RSK→LKB1 の一連の活性化経路が関わっている可能性が考えられた。今後は、初代神経細胞におけるノビレチン刺激によるこれらタンパク質のリン酸化や TXNIP の発現低下について検討を行い、神経細胞でのノビレチン作用の追究を進める予定である。

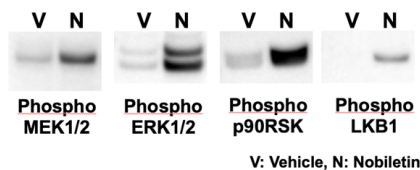


図2 30 μ M ノビレチン刺激 5 分後のリン酸化タンパク質の発現
用いた細胞は、SK-N-SH 細胞

(3) ノビレチン刺激による TXNIP および CHOP タンパク質の細胞内発現変化の解析

Western blot 法により、ノビレチン刺激が TXNIP の発現量を低下させることをこれまでの研究や本研究で示している。本研究では、さらに本研究では、SK-N-SH 細胞内での TXNIP 発現量を免疫蛍光細胞染色法により検討した。その結果、ノビレチン刺激により細胞内 TXNIP 量が少なくなることが確認された。図3は 100 μ M ノビレチン刺激 6 時間後の結果を示したものである。コントロール (Veh: vehicle) 群に比しノビレチン刺激群では著しく発光強度が减弱していた。また、TXNIP は細胞内のミトコンドリアと思われる部位に偏在していることも併せて確認された。

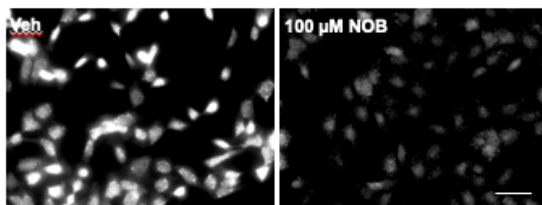


図3 ノビレチン (NOB) 刺激後の TXNIP の細胞内発現
(白い bar は 50 μ m を示す)

小胞体ストレス誘導剤である tunicamycin 処理後に小胞体ストレスマーカーである CHOP の発現が亢進する。われわれはこれまでに、ノビレチン刺激によって tunicamycin が誘導する CHOP の発現が减弱し、小胞体ストレスが抑制される可能性を見いだしている。本研究においては、CHOP の細胞内発現変動についても SK-N-SH 細胞を用いて免疫蛍光細胞染色法により解析を行った。結果を図4に示す。0.5 μ g/mL tunicamycin 処理 6 時間後に CHOP の発現は核で発現が上昇するが、tunicamycin と共にノビレチンを処理することにより CHOP の核内での発現が减弱することが示された。

以上、TXNIP および CHOP の発現に対するノビレチンの影響について、western blot 法のみならず免疫蛍光細胞染色法によっても示すことができた。今後は、他のタンパク質についても免疫蛍光細胞染色法で評価し、ノビレチンのタンパク質発現や細胞内局在性に対する作用を推定するものとする。

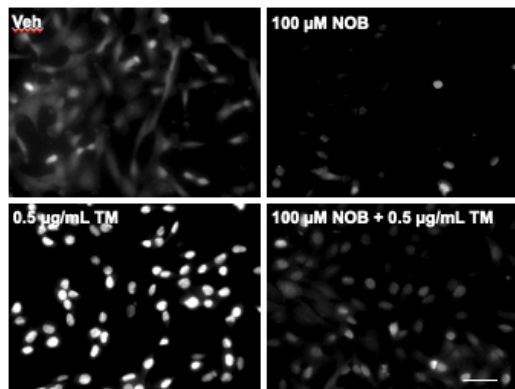


図4 ノビレチン (NOB) および tunicamycin (TM) 刺激後の CHOP の細胞内発現
(白い bar は 50 μ m を示す)

(4) ノビレチンの TXNIP 遺伝子転写抑制機構の解析

ノビレチンによる TXNIP 発現抑制機構を明らかにすることを目的として、以下の研究を実施した。

まず、転写阻害剤 actinomycin D を用いた実験から、ノビレチンは、TXNIP mRNA の安定性に影響する可能性は少ないものと判断した。そこで、ヒト TXNIP 遺伝子の転写開始点から -811/+310 の転写調節領域をホタルルシフェラーゼ (Luc) 発現ベクターに挿入したヒト TXNIP レポータープラスミドを作製し、ノビレチンの TXNIP 転写活性に対する影響を解析した。この結果、ノビレチンは、そのプロモーター活性を抑制することが明らかとなった。次いで、転写調節領域を様々な長さで欠失させた変異プラスミドを作製し、これらを用いた解析を行った。その結果、ノビレチンによる TXNIP 発現抑制作用には、-110 と -90 bp の間の TXNIP 遺伝子転写調節領域が関与していることが明らかとなった。ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞株の検討のみならず、ヒト肝がん由来 HuH-7 細胞株、ラット線維芽細胞由来 3Y1 細胞株でも同様の結果を得た。-110 と -90 bp の間の TXNIP 遺伝子転写調節領域内には、CCAAT box に相当する配列が存在していた (図 5)。

今後、本研究結果を基に、ノビレチンの TXNIP 遺伝子転写抑制に関与する転写因子の同定とその因子の機能に対するノビレチンの調節機構を明らかにする予定である。

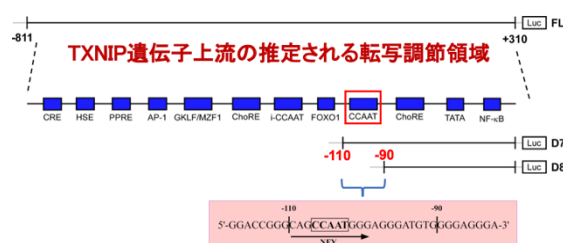


図 5 ノビレチンが TXNIP 遺伝子の転写抑制に関わる配列

(5) アルツハイマー病病態モデルマウスの認知機能低下に対するノビレチンの影響について

ノビレチンの認知症予防への応用を目指して、認知症病態モデル動物に低用量、経口摂取、長期間での投与を行うことを目指した。

まず、認知症病態モデル動物として、2016年11月に理化学研究所で作出された APP NL-G-F マウス (tm 3 マウス) (理研登録番号 No. RBRC06344) ⁴⁾ を選択し、理化学研究所バイオリソースセンターから入手した。このモデルマウスは、アミロイドβ配列のヒト化に加え、家族性アルツハイマー病変異の Swedish 変異、Iberian 変異、さらに Arctic 変異を加えたノックインマウスであり、6ヶ月齢から Y 字迷路試験で認知機能の低下が認められるヒトのアルツハイマー病モデルマウスとして極めて優れたものとされている。ノビレチン含有被験試料投与に備え繁殖を開始した。

被験試料として、農林水産技術会議「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」委託研究プロジェクト「柑橘類果皮を利用した抗認知症機能性食品の開発に向けた基盤技術の開発」(代表者:大泉康)にて作製され、ラットおよび健常人による試験で安全性が確認された太田ポンカン果皮濃縮エキス粉末を用いることとした。このエキス粉末には約 7% のノビレチンが含有している。このプロジェクトで実施された健常人による安全性確認試験で実施した投与量や食経験のある陳皮のノビレチン含有量を参考に、ノビレチン換算量にして 3.5 mg/kg body weight を tm 3 マウスに経口投与することとした。なお、これまでにノビレチンの抗認知症作用を示したモデル動物の実験では、ノビレチン単体で 50~100 mg/kg body weight を腹腔内に数週間程度を投与したものであることから比べ、はるかにヒトに対しより安全性とより現実的な投与量で実施することとした。また、投与期間は予防効果を見るために、5ヶ月程度を目指した。

4週齢から1群5~10匹として投与を開始し、2ヶ月齢、4ヶ月齢、6ヶ月齢まで週5日の割合で経口投与し、Y字迷路試験によりノビレチンの抗認知症作用を評価した。非投与群と比べ有意な差を認めることはできなかった。

低用量、長期経口投与は、ノビレチンによる認知症の予防を目指すためには避けては通れない事項である。モデル動物とヒトとの吸収効率や体内代謝の違いなどもあるため、可能な限り投与量の変更(増量)、投与期間の延長を行い、さらなる評価を実施する予定である。また、研究開始時には、tm 3 マウスは、2ヶ月齢からアミロイドβの蓄積が、4ヶ月齢からシナプスの欠落が認められるとされることから、ノビレチン投与 tm 3 マウスにおいてもこれらを指標として検討する予定としていたが、これら指標の評価手技の確立に至らなかった。早急に確立を行い、評価を実施する予定である。

〈引用文献〉

1) Nakajima A *et al.* Anti-dementia Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid: A Review of Animal Studies. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2014;12(2): 75-82.

- 2) Nemoto K *et al.* Characteristics of nobiletin-mediated alteration of gene expression in cultured cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431(3): 530-534.
- 3) Ikeda A *et al.* Suppressive effect of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid that downregulates thioredoxin- interacting protein expression, on tunicamycin-induced apoptosis in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 2013; 549: 135-139.
- 4) Saito T *et al.* Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 2014; 17: 661-663

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

加賀 由里子、池田 絢香、菅野 裕一郎、粕谷 ひかる、大泉 康、出川 雅邦、根本 清光
柑橘類成分ノビレチンの thioredoxin-interacting protein 遺伝子転写抑制機構
日本薬学会第 138 年会 2018 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：菅野 裕一郎

ローマ字氏名：KANNO, yuichiro

所属研究機関名：東邦大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：40453849

研究分担者氏名：佐藤 忠章

ローマ字氏名：SATOU, tadaaki

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80287549

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大泉 康

ローマ字氏名：OHIZUMI, yasushi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。