

令和元年6月27日現在

機関番号：37119

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00935

研究課題名(和文)メンタルヘルス不調の予防・改善作用を有するポリフェノールの探索と有効性の解析

研究課題名(英文) Analysis of the efficacy of polyphenols with preventive effects on mental health disorders

研究代表者

坂巻 路可 (Sakamaki, Ruka)

西南女学院大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：80389486

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)：シリマリンの構成成分であるシリビンは、副腎髄質細胞において、ニコチン性アセチルコリン受容体イオンチャネルの機能を阻害してカテコールアミン分泌を抑制すること、カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の活性とリン酸化を抑制することを明らかにした。シリビンは膵細胞からのグルコース取り込み(Glut2)を抑制して、細胞内へのCa²⁺流入を阻害し、インスリン分泌を抑制する可能性を明らかにした。これらの作用機序については現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シリビンはストレス負荷により増加する副腎髄質からのカテコールアミン分泌を抑制することにより、過度のストレスに対して予防作用を発揮する可能性が示唆された。シリビンはストレス負荷が増悪要因となっている糖尿病患者のインスリン抵抗性を低下させることが報告されているが、膵細胞からのインスリン分泌を抑制する可能性があるため、インスリン分泌機能低下がある患者においては慎重に使用すべきではないかと考える。シリビンはストレス負荷により増悪するメンタルヘルス不調に予防効果を発揮する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Silymarin, a complex of flavonolignans derived from the seeds of the milk thistle, contains mainly silybin (50-70%), silychristin (20%), silydianin (10%). Silybin, the principal flavonoid contained in silymarin and a mixture of almost equal amount of silybin A and silybin B, showed antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic properties. The therapeutic effect of silybin on insulin resistance has been reported in both clinical studies and experimental liver injury models.

Silymarin and silybin inhibited acetylcholine-induced catecholamine secretion by suppression of nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in bovine adrenal medulla cells. Silybin suppressed tyrosine hydroxylase activity. Silybin decreased glucose-induced insulin secretion through suppressing glucose uptake in MIN6-cells. It was suggested that silybin might have a preventive effect on mental health disorders that are exacerbated by stress load.

研究分野：臨床栄養

キーワード：ポリフェノール カテコールアミン インスリン分泌 メンタルヘルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メンタルヘルス不調になると、生産性低下・病欠・失職を引き起こすなど、業務遂行能力を十分発揮できなくなる。企業や学校では長期休業者の3~5割がメンタルヘルス不調によると言われており、大きな社会的負担となっている。また、現代社会において、食の欧米化やストレス社会の影響により、生活習慣病は年々増加の一途を辿っている。代表的な生活習慣病として、糖尿病、高血圧、脂質異常症、動脈硬化性疾患、がん、高尿酸血症、歯周病等があるが、これらの疾患のいくつかは、うつ病などのメンタルヘルスの不調によっても誘発され、しばしば増悪(重症化)するため、メンタルヘルス対策の必要性が重視されている。

病気の予防や健康維持に重要な役割を担っている植物性食品の「色」「香り」「苦味」等の成分であるフィトケミカルが第7の栄養素として注目を集めている。代表的な食品の機能性成分であるポリフェノールは、植物の色素や苦味の成分で、いずれも強い抗酸化力を持つことが示されている。抗酸化作用を有するポリフェノールについて、生活習慣病予防効果に関する研究報告が多数なされており、併せてこれらの機能性成分によるメンタルヘルス不調改善効果も期待されている。

ハーブティーとして広く飲用される香草は、リラックス効果や精神鎮静効果があることが古くから知られている。カモミールティーやローズマリーティーに高濃度に含まれるポリフェノールにはルテオリン、アピゲニン、カルノシン酸がある。動物実験においてカルノシン酸は、肥満および脂肪肝の予防に寄与する可能性が示唆されている(Wang Ting, *Hepatol Res*, 2011)。肥満、メタボリック症候群、糖尿病といったエネルギー過剰摂取に基づく病態とうつ病とが双方向性の関連をもつことが指摘され(功刀浩, *分子精神医学*, 2015)、また糖尿病患者の心理状態は、自己管理の程度や血糖コントロールに影響することが示されている(石井均, *最新医学*, 2015)。このような研究報告から、メンタルヘルス不調の改善は生活習慣病予防・治療における優先順位が高く、必須と考えられる。

申請者は、「赤ワインポリフェノールの交感神経系へ及ぼす影響」の研究課題で平成22年~23年度科学研究費補助金若手研究(B)を受け、交感神経の機能モデル系として薬物の影響の解析に用いられている培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、赤ワインに含まれる様々なポリフェノール化合物のなかで、カテコールアミン神経系への作用を示すフラボノイド化合物について検討した結果、フラボノイド化合物であるシリマリニン、ケンフェロール、ケルセチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体、電位依存性Naチャンネル、電位依存性Caチャンネルのそれぞれ異なったイオンチャンネルを阻害することによりカテコールアミン分泌を抑制することを明らかにした。本研究では香草浸出液によるリラックス効果、精神安定効果に着目し、それらに多く含まれる、ポリフェノールを中心にカテコールアミン神経系へ及ぼす影響について検討を試みる。

近年、ハーブティーの健康効果が注目され、需要が高まってはいるが、これらに含まれるポリフェノールの詳細な成分や各物質固有の生理調節機能について、全て解明されているわけではない。

2. 研究の目的

ストレス負荷によるメンタルヘルス不調は生活習慣病においても増悪要因となっており、メンタルヘルス不調だけでなく生活習慣病も増加の一途を辿っている。ストレス関連疾患であるメンタルヘルス不調の予防薬や治療薬として、ストレス負荷によるメンタルヘルス不調や生活習慣病増悪に対して予防効果のある食品機能成分(ポリフェノール類)の探索、特定を目的としている。

うつ病や不安障害等に古くから民間療法として用いられているポリフェノール類がストレス関連疾患であるメンタルヘルス不調の予防薬、治療薬としての可能性を細胞レベルでカテコールアミン神経系へ作用を指標として特定して、有効性と作用機序の解析を多面的に行う。ストレス負荷により増加するカテコールアミン(CA)生合成・分泌への影響についてはウシ副腎髄質細胞を用いて、また同じくストレス負荷により上昇する血糖値への影響は膵β細胞由来細胞株MIN6細胞でのインスリン分泌への作用を指標として検討して、メンタルヘルス不調の予防薬、治療薬として有効なポリフェノールを特定する。

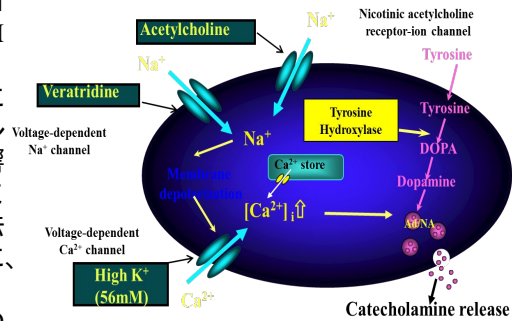
3. 研究の方法

以前の研究において、神経系へ作用する機能成分をスクリーニングした結果、シリマリニンが特定された。シリマリニンは、マリアアザミの抽出成分の総称で強い抗酸化作用を示し、古くから肝臓機能改善作用が注目されてきた。シリマリニンは、シリピン、シリクリスチン、シリジアニンと呼ばれるフラボノイドリグナン類から構成されている。シリマリニンの構成成分のストレス応答を検討する目的で、初代培養ウシ副腎髄質の初代培養細胞を用い、カテコールアミン神経系への作用及びマウス膵β細胞(MIN6)細胞を用いグルコース刺激によるインスリン分泌に対するシリマリニン類の直接作用を検討する。

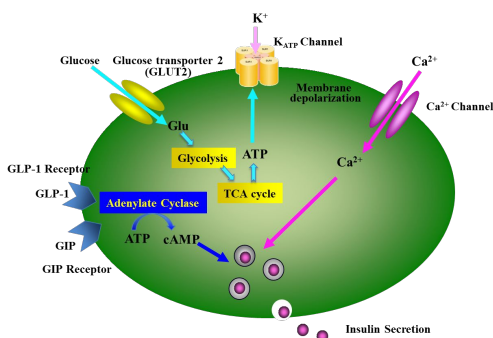
【カテコールアミン合成・分泌への影響】

- (1) 培養ウシ副腎髄質細胞はアセチルコリン(ニコチン性アセチルコリン受容体刺激)、56mM HighK (電位依存性 Ca チャネル活性化)、Veratridine (電位依存性 Na チャネル活性化) による刺激によって引き起こされるカテコールアミン分泌反応に対するシリマリン類の影響を検討する。カテコールアミンは水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法を用いて蛍光光度計にて測定する。各刺激時に、細胞内へ流入する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を液体シンチレーションカウンターにて測定し、イオンチャネルへの影響を検討する。
- (2) カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性は $1\text{-}^{14}\text{C}$ -tyrosine を基質として用いた酵素反応により、生成される $^{14}\text{CO}_2$ を測定する。
- (3) チロシン水酸化酵素(TH)のリン酸化は Western blotting 法を行い、リン酸化抗体を用いて測定した。

【カテコールアミン合成・分泌機構】



【MIN6 細胞におけるインスリン分泌機構】



【インスリン分泌への影響】

- (1) シリマリン存在の反応液で、Glucose (0 ~ 40 mM) やグリベンクラミド (1 mM) で MIN6 細胞を刺激する。刺激により分泌されたインスリンは、ELISA 法 (レビス インスリン-マウス T) を用いて発色させ、吸光度 (450 nm) を測定して、定量した。
- (2) Glucose やグリベンクラミドで刺激時の細胞内へ流入する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を測定する。
- (3) Glucose 刺激時に細胞内へ流入する ^3H -2-deoxy-D-glucose を測定する。

4. 研究成果

(1) 培養ウシ副腎髄質細胞におけるシリマリン類の影響

カテコールアミン神経系に影響を与えるシリマリン構成成分の選定

以前の研究において、アセチルコリンによるニコチン性アセチルコリン(nACh)受容体刺激による副腎髄質細胞からのカテコールアミン(CA)分泌をシリマリンが抑制し、電位依存性ナトリウムチャネル、電位依存性カルシウムチャネルを介した CA 分泌にはほとんど影響を与えないことを報告した (図 1)。シリマリンは 70% のシリピン、20% のシリクリスチン、10% のシリジアン等から構成されているが、シリピンがアセチルコリン受容体刺激によるカテコールアミン分泌に最も強い抑制効果を示した(図 2)。

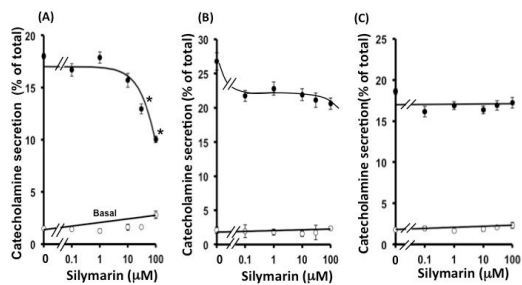


図 1. カテコールアミン分泌に及ぼすシリマリンの影響

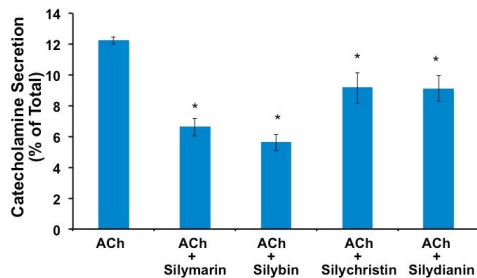


図 2. アセチルコリン刺激によるカテコールアミン分泌におけるシリマリン類の影響

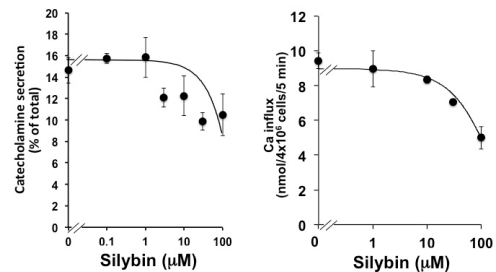


図 3. カテコールアミン分泌と Ca 流入におけるシリピンの影響

カテコールアミン分泌に及ぼすシリピンの影響

シリピンはシリマリンと同様に副腎髄質細胞における ACh 受容体を介した CA 分泌と Ca 流入を濃度依存性(10 -100 μM)に抑制した (図 3)。シリマリンの CA 分泌抑制作用はシリピンの作用であると考えられる。

チロシン水酸化酵素に及ぼすシリマリンの影響

カテコールアミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)活性をシリマリンは抑制し、シリピンも同様に抑制した。シリクリスチンとシリジアニンはほぼ影響を与えなかった(図4)。シリマリンとシリピンはTH活性を抑制し、アセチルコリン刺激によるチロシン水酸化酵素活性化も抑制した(図5)。

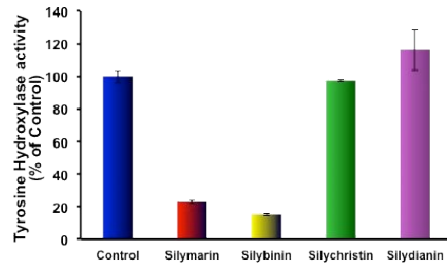


図4. チロシン水酸化酵素活性化におけるシリマリン類の影響

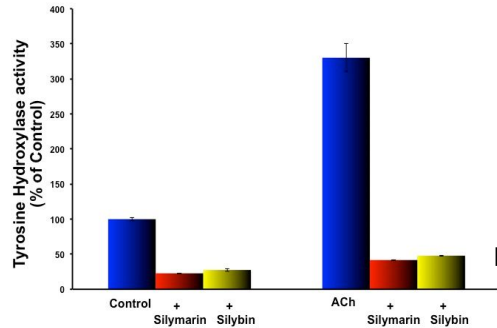


図5. アセチルコリン刺激によるチロシン水酸化酵素活性化におけるシリマリン類の影響

シリマリンはチロシン水酸化酵素のセリン 19、31 と 40 のリン酸化を抑制した。シリピンはセリン 31、40 のリン酸化は抑制したが、セリン 19 のリン酸化は活性化傾向が認められた(図6)。

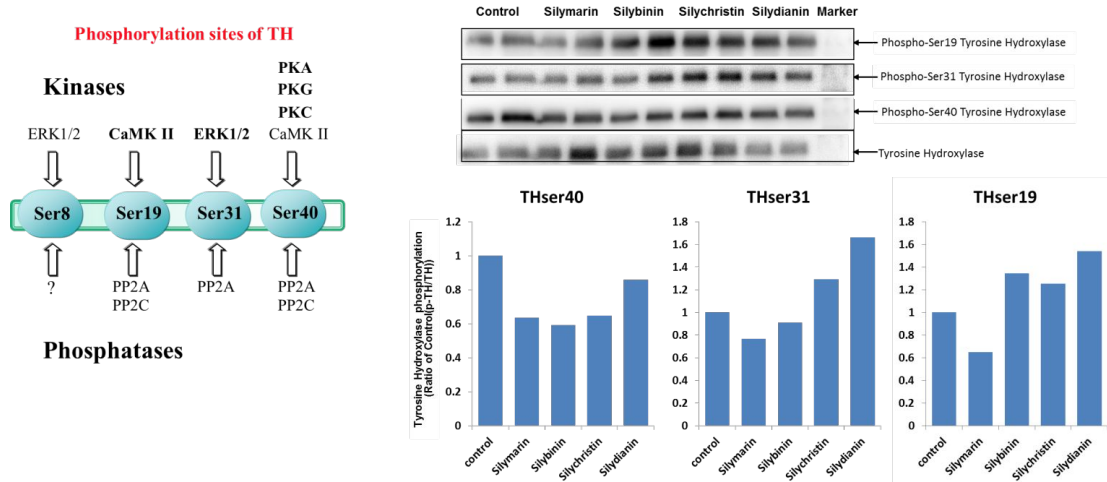


図6. チロシン水酸化酵素リン酸化におけるシリマリン類の影響

シリピンは副腎髄質細胞において、イオンチャネルの機能を阻害して CA 分泌を抑制することが示唆された。シリピンはTH活性とリン酸化に影響を及ぼすことは明らかになったが、その作用機序については検討中である。

(2) マウス膵細胞(MIN6)細胞におけるインスリン分泌に及ぼすシリマリンの影響

グルコース刺激によるインスリン分泌におよぼす影響

シリマリン、シリピン、シリクリスチンはグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制した(図7)。シリマリンはグルコース刺激によるインスリン分泌を濃度依存性に抑制した(図8A)。シリピンも同様にグルコース刺激によるインスリン分泌を抑制した(図8B)。シリマリンのインスリン分泌抑制作用はシリピンの作用であると考えられる。

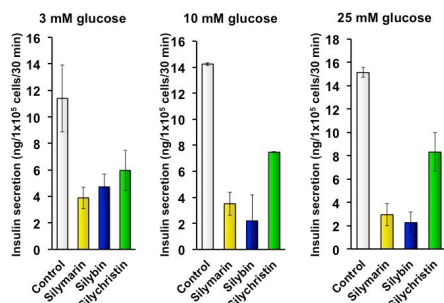


図7. グルコース刺激によるインスリン分泌におけるシリマリン類の影響

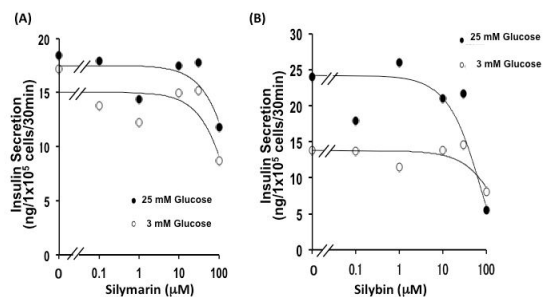


図8. インスリン分泌に及ぼすシリマリンの影響

シリピンによるインスリン分泌抑制機序の検討
 シリマリンとシリピンは、スルホニルウレア受容体(SUR1)を刺激するグリベンクラミドによるインスリン分泌をほとんど抑制しなかった(図9)。

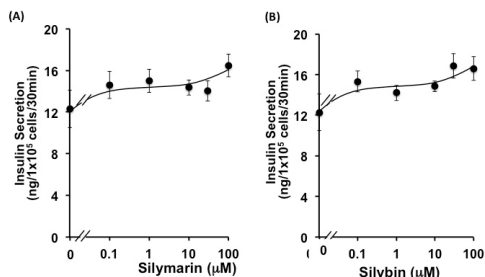


図9. グリベンクラミド刺激によるインスリン分泌におけるシリマリンの影響

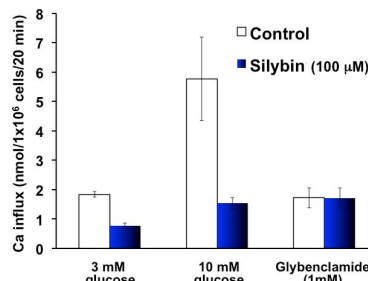


図10. 膵細胞へのCa流入におけるシリピンの影響

膵β細胞(MIN6)において、細胞外のグルコース濃度が上昇すると、グルコーストランスポーター(Glut2)を介して細胞内にグルコースが取り込まれ、解糖系などによって代謝されることでATPが産生されると、細胞膜上のSUR1とKir6.2からなるATP感受性K⁺チャンネルが閉鎖する。それにより細胞膜の脱分極が生じると電位依存性Ca²⁺チャンネルが開閉し、Ca²⁺が細胞内へ流入する。細胞内にCa²⁺が流入すると、インスリン顆粒と細胞膜との融合し、インスリンの開口放出が生じる。

グルコース刺激による細胞内へのCa流入をシリピンは抑制したが、グリベンクラミド刺激による細胞内へのCa流入は抑制されなかった(図10)。細胞内へのグルコース取り込みをシリピンは抑制した(図11)。

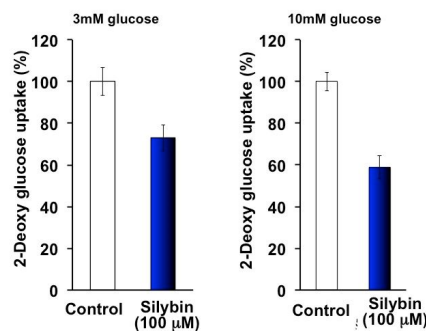


図11. グルコース取り込みにおけるシリピンの影響

シリピンはグルコース取り込み(Glut2)を抑制して、細胞内へのCa流入を阻害し、インスリン分泌を抑制する可能性が示唆された。Glut2阻害機序については現在検討中である。

シリピンはストレス負荷により増加する副腎髄質からのカテコールアミン分泌を抑制することにより、過度のストレスに対して予防作用を発揮する可能性が示唆された。シリピンはストレス負荷が増悪要因となっている糖尿病患者のインスリン抵抗性を低下させることが報告されているが、膵β細胞からのインスリン分泌を抑制する可能性があるため、インスリン分泌機能低下がある患者においては慎重に使用すべきではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Li X, Horishita T, Toyohira Y, Shao H, Bai J, Bo H, Song X, Ishikane S, Yoshinaga Y, Satoh N, Tsutsui M, Yanagihara N. Inhibitory effects of pine nodule extract and its component, SJ-2, on acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis in bovine adrenal medullary cells. J Pharmacol Sci. 133:268-275, 2017 (査読有) doi: 10.1016/j.jphs.2017.03.006

〔学会発表〕(計 12 件)

坂巻 路可 MIN6細胞からのインスリン分泌に及ぼすフラボノリグナン類シリピンの影響
 第92回 日本薬理学会年会 2019年3月14~16日 大阪

坂巻 路可 FlavonolignanであるSilybinのカテコールアミン分泌とインスリン分泌に及ぼす影響
 第71回 日本薬理学会西南部会 2018年11月17日 福岡

豊平 由美子 カテコールアミン動態に及ぼす柑橘類機能成分の影響 第71回日本薬理学会西南部会 2018年11月17日 福岡

坂巻 路可 フラボノリグナン類であるシリマリンがカテコールアミン分泌とインスリン分泌に及ぼす影響
 第13回トランスポーター研究会年会 2018年7月21~22日 福岡

豊平 由美子 柑橘類フィトケミカルのカテコールアミン生合成・分泌に及ぼす影響

第 13 回トランスポーター研究会年会 2018 年 7 月 21 ~ 22 日 福岡

坂巻 路可 マリアアザミのフラボノリグナン類のシリマリンが膵 β 細胞由来細胞株 MIN6 からのインスリン分泌に及ぼす影響 産業医科大学学会 2017 年 10 月 21 日 福岡

坂巻 路可 Effects of polyphenolic compounds of silymarin on catecholamine and insulin secretion response 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 03 月 15 日 ~ 2017 年 03 月 17 日 長崎

豊平 由美子 Effects of auraptin, citrus coumarin, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cell 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 03 月 15 日 ~ 2017 年 03 月 17 日 長崎

豊平 由美子 柑橘類機能成分のカテコールアミン動態に及ぼす影響第 46 回日本心臓血管作動物質学会 2017 年 02 月 10 日 ~ 2017 年 02 月 11 日 沖縄

坂巻 路可 β -carboline 化合物ノルハルマンの副腎髄質細胞におけるカテコールアミン動態に及ぼす影響 第 46 回日本心臓血管作動物質学会 2017 年 02 月 10 日 ~ 2017 年 02 月 11 日 沖縄

豊平 由美子 フラボン化合物のアピゲニンとルテオリンによるカテコールアミン合成・分泌調節作用の検討 第 60 回薬理学会西南部会 2016 年 11 月 26 日 愛媛

豊平 由美子 フラボンであるアピゲニンとルテオリンのカテコールアミン動態に及ぼす影響 第 9 回トランスポーター研究会九州部会 2016 年 10 月 01 日 宮崎

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：豊平 由美子

ローマ字氏名：Yumiko Toyohira

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁) : 90269051

(2)研究協力者

研究協力者氏名：李 暁佳

ローマ字氏名：LI, Xiaojia

研究協力者氏名：吉永 有香里

ローマ字氏名：YOSHINAGA, Yukari

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。