

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07791

研究課題名(和文) トランスサイレチンに起因するアミロイド形成を阻害する食品機能成分の抗老化作用

研究課題名(英文) Anti-aging effect of transthyretin stabilizing food-derived bioactive compounds

研究代表者

松原 主典 (Matsubara, Kiminori)

広島大学・教育学研究科・准教授

研究者番号：90254565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う疾病の原因となるアミロイドの形成を抑制することは、老化の進行を抑制し、健康寿命の延伸に重要である。そこで、アミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチン(TTR)を安定化する食品機能成分の探索を行った。その結果、複数のポリフェノール類およびその代謝物がTTR安定化作用を持つことを見出した。これらの成分の幾つかを老化促進マウスに経口投与し、脳機能保護効果と変形性膝関節症予防効果を検討した。その結果、ローズマリーのカルノシン酸(CA)が脳機能保護効果を示した。また、脳内でのTTR沈着を抑制する機能成分も見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴って増加する疾病には、体内に不溶性のタンパク質(アミロイド)が蓄積されることによって引き起こされるものが多い。したがって、アミロイド形成を抑制することは健康寿命の延伸につながる。本研究では、アミロイド形成タンパク質の一つであるトランスサイレチンに注目し、トランスサイレチンを安定化する食品機能成分の探索と評価を行った。その結果、ローズマリーに含まれるカルノシン酸にトランスサイレチン安定化効果と実験動物への経口投与での有効性を見出した。他にもトランスサイレチンを安定化する成分を見出すことができた。これらの機能成分は加齢に伴う疾病の予防や進行抑制に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Transthyretin (TTR) is one of the major amyloidogenic proteins. To stabilize TTR is a useful strategy to prevent age-related diseases. We screened bioactive compounds in food that stabilize TTR and prevent its amyloid formation. Several phenolic compounds and their derivatives exert TTR stabilizing effect. Two compounds were evaluated by oral administration to senescence-accelerated mice (SAM). Carnosic acid (CA) from rosemary prevented the age-associated decline of brain function. We also found that a food-derived compound prevented TTR deposition in the brain.

研究分野：食品機能

キーワード：トランスサイレチン アミロイド 食品機能成分

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた現在、高齢者に要する社会保障費は増加し続けており、その対策は日本だけでなく世界的に重要な課題となっている。高齢者の社会保障費の上昇率を抑制するには、加齢に伴う疾病のリスクを下げ、要介護・支援への移行を少しでも遅らせること、つまり健康寿命を延伸することが重要である。そのため、医療分野だけでなく健康と密接に関わる食品・栄養分野にも大きな期待が寄せられ、健康寿命延伸につながる食品機能成分の研究が盛んになっている。われわれは、健康寿命に大きな影響を与える脳や運動器の機能保護に貢献できる食品機能成分の研究に取り組んできている。本研究では、加齢に伴って臓器に蓄積し、臓器の機能低下をもたらす不溶性タンパク質(アミロイド)の形成を抑制する食品機能成分に焦点をあてて研究を進めることにした。

### 2. 研究の目的

加齢に伴う体内でのアミロイド蓄積として、アルツハイマー病(AD)患者の脳内に蓄積するアミロイドベータ(A $\beta$ )やパーキンソン病患者の $\alpha$ -シヌクレイがよく知られている。われわれは、アルツハイマー病や変形性膝関節症など加齢に伴い増加する疾患に関わるアミロイド形成タンパク質として注目されているトランスサイレチン(transsthyretin: TTR)に注目した。TTRはチロキシンやレチノール結合タンパク質を輸送するホモ4量体タンパク質で主に肝臓で合成される。近年、A $\beta$ を脳内から排出する働きが見出され、AD予防に関与する分子としても注目されている。しかし、比較的変性し易いタンパク質で、アミロイドを形成することによりADや変形性膝関節症の発症にも関与することが知られている。したがって、TTRを安定化させ、TTRによるアミロイド形成を抑制する食品機能成分は、加齢に伴って増加するADや変形性膝関節症に対して予防的に働くことが期待できる。

本研究では、TTRを安定化させる食品機能成分を見出し、その有効性を細胞および動物実験で明らかにすることを目的に実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) TTR安定化成分の探索

TTRによるアミロイド形成を抑制するには、TTRそのものの安定性を高める効果のある機能成分を見出すことが必要である。その際、微量で感度の良い方法を用いることが重要である。そこで、タンパク質の熱変性を蛍光色素であるSYPRO Orangeを用いて検出するthermal shift assay(TSA)法を用いてスクリーニングを行った。この方法では1サンプルにつき、5 $\mu$ M TTR溶液を5 $\mu$ l使用するだけで、TTR安定化作用について検討できる。

5 $\mu$ M TTR溶液5 $\mu$ lとサンプル溶液を5 $\mu$ l混合し、室温に10分間置いた。その後、温度を10 $^{\circ}$ Cから80 $^{\circ}$ Cまで0.5 $^{\circ}$ Cずつ上昇させ、TTR変性に伴う蛍光強度の増加を測定した。探索に用いた食品機能成分はポリフェノール類やその代謝物を中心に行った。

次に、TSA法でTTR安定効果が認められた機能成分について、酸による変性に対する安定作用も検討した。7.2 $\mu$ M TTR溶液にサンプル溶液を加え37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションした。この溶液にpH 4.2の酢酸溶液を加えてpHを4.4にし、37 $^{\circ}$ Cで反応させ24時間ごとにサンプルを回収した。回収したサンプルは電気泳動に供し、バンドのパターンから変性抑制効果を検討した。

#### (2) TTR産生への影響

TTR安定化作用を示す成分が神経細胞でのTTR合成を誘導するかどうか検討した。実験には神経モデル細胞であるSH-SY5Y細胞を使用し、一定時間処理をした後、RNAを抽出、cDNA合成を行い定量RT-PCRでTTR遺伝子発現量の変化を測定した。

また、ウェスタンブロット法および蛍光免疫染色法により、タンパク質レベルでの発現誘導効果も検討した。

#### (3) 経口摂取によるアミロイド形成抑制効果の検討

TTR安定化効果を持つ食品機能成分の摂取は、体内でのTTRによるアミロイド形成を抑制することが期待される。そこで、TTR安定化効果を示した食品機能成分を老化促進マウスに経口投与し、その効果を検討した。また、TTRによるアミロイド形成は炎症などによっても起こることが考えられる。そこで、TTR安定化効果はないものの、長期投与した食品機能成分のTTRアミロイド形成抑制効果についても検討した。TTRアミロイドについては脳内での形成について抗TTR抗体を用いた免疫組織染色法により検討した。また、変形性膝関節症にもTTRアミロイド形成が関与していることから、膝組織についても組織化学的に検討を行った。脳内でのTTRアミロイドの形成は脳機能の低下とも関連すると考えられることから、行動試験による脳機能の評価も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) TTR安定化成分の探索

TSP法でTTRの熱安定性をもたらす食品機能成分を探索した結果、複数の機能成分にTTR安定化作用、すなわち熱変性による蛍光強度の増加が高温側にシフトすることを見出すことができた。特にquercetinやdaidzeinといった日常的に摂取している機能成分にTTR安定化効果があったのは、これらの機能成分の効果を考えるうえで興味深い。また、daidzeinの代謝物である

equolにも効果が認められた。さらに、われわれが幾つかの新規生理作用を見出しているローズマリーに含まれる carnosic acid (CA) にも効果が認められた (図1)。

TTRの熱変性に対する安定化作用を示した機能成分について、TTRの酸変性に対する安定化作用も検討したところ、ほとんどの成分が同様に安定化作用を示した (図2)。また、極めて変性しやすい変異型 TTR に対しても安定化作用を示した。

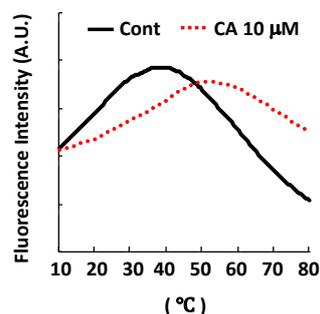


図1 TTRの熱変性への影響

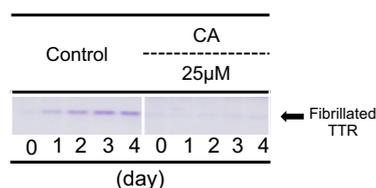


図2 TTRの酸変性への影響

### (2) TTR 産生への影響

SH-SY5Y 細胞における TTR 遺伝子発現誘導について検討したところ、いくつかの成分は TTR 遺伝子発現の上昇をもたらした (図3)。一方、抑制するものもあった。TTR 遺伝子発現上昇をもたらす成分についてはウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法でタンパク質レベルでの誘導についても検討した。ウエスタンブロット法では検出限界があり明確な誘導は確認できなかったが、蛍光免疫染色法ではタンパク質レベルでの誘導が確認できた。今後は、タンパク質レベルでの発現量増加を ELISA 法などで確認することが必要である。

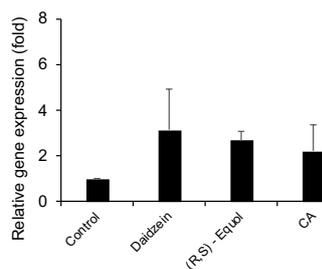


図3 TTR遺伝子発現への影響

### (3) 経口摂取によるアミロイド形成抑制効果の検討

TTR 安定化効果を示した機能成分のうち、equol と CA を老化促進マウスへ長期投与を行い評価した。行動試験において、equol には明確な有効性は認められなかったが、CA では新規物体認識試験などで脳機能保護効果が示された。回収した脳での TTR アミロイド形成について評価したところ、equol では明確な抑制効果は認められなかった。しかし、CA では対照群よりも TTR の沈着が少ない個体もあり、経口摂取による有効性が示唆された (図4)。

膝関節については両成分ともに明確な有効性は示されなかったが、摂取群の方が変形性膝関節症の悪化が抑制されていたことから、評価時期によっては明確な差が見られた可能性が示唆された (図5)。

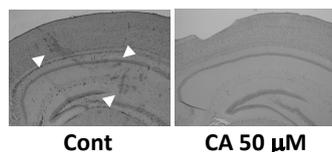


図4 脳でのTTRアミロイド形成

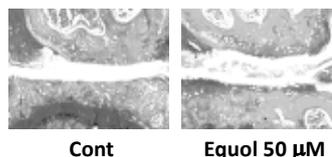


図5 変形性膝関節症への効果

一方、TTR 安定化効果のない機能成分を長期投与した老化促進マウスの脳を用いて TTR の免疫組織染色を行ったところ、TTR の沈着が抑制されているものもあった。ミクログリアの免疫組織化学染色により検討した結果、この機能成分を摂取していた群ではミクログリアの活性化が抑制されていた。この結果から、TTR 安定化作用が無い成分でも、脳での炎症を抑制することにより、脳での TTR アミロイド形成を抑制し脳機能保護効果を示すことが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsubara Kiminori, Okuda Mayumi, Shibata Sachi, Miyaki Shigeru, Ohkubo Takeshi, Izu Hanae, Fujii Tsutomu	4. 巻 82
2. 論文標題 The delaying effect of alpha-glycerophosphocholine on senescence, transthyretin deposition, and osteoarthritis in senescence-accelerated mouse prone 8 mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 647 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1403883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松原主典、柴田紗知、味八木茂	4. 巻 49
2. 論文標題 食品機能成分による加齢性疾患の予防効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 502 ~ 505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松原主典、柴田紗知、味八木茂	4. 巻 1
2. 論文標題 食品機能成分による加齢性疾患の予防効果	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 85 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroyuki Ishitobita, Yohei Sanada, Yoshio Katoc, Yasunari Ikutab, Sachi Shibata, Satoshi Yamasaki, Martin K. Lotz, Kiminori Matsubara, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi	4. 巻 830
2. 論文標題 Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.04.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 海切 弘子, 谷本 暁, 柴田 紗知, 味八木 茂, 松原 主典
2. 発表標題 トランスサイレチン安定化作用を持つカルノシン酸の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷本暁、奥田真友美、Nong Quynh Nga、松原主典
2. 発表標題 食品機能成分によるトランスサイレチンの安定化と加齢性疾患に対する有効性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萱島知子, 海野美月, 海切弘子, 松原主典
2. 発表標題 ローズマリー抽出物による抗ストレス効果の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sachi Shibata, Junya Ochi, Kanae Sakurai, Misa Hanasaki, Kiminori Matsubara
2. 発表標題 The effect of orally administered carnosic acid and piciferic acid in the P/8 line of the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)
3. 学会等名 26th International conference of FFC (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松原主典, 大久保剛, 藤井勉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 287
3. 書名 抗疲労・抗ストレス・睡眠改善食品の開発 第11章グリセロホスホコリン (GPC), S-アデノシルメチオニン (SAM)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	味八木 茂  (Miyaki Shigeru)  (10392490)	広島大学・病院(医)・講師    (15401)	