

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32619

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19184

研究課題名(和文) 難吸収性ポリフェノール摂取による青斑核 ノルアドレナリン神経刺激作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of activation on the locus coeruleus-noradrenaline system by polyphenol

研究代表者

越阪部 奈緒美 (Naomi, Osakabe)

芝浦工業大学・システム理工学部・教授

研究者番号：30554852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)： 難吸収性ポリフェノールであるBタイププロシアニジン混合物投与直後のマウスから抜脳し、ノルアドレナリン合成酵素であるTHおよびDBH、またノルアドレナリントランスポーターであるVMAT2のmRNA発現をISH法を用いて観察したところ、顕著な発現の増加が認められたが、この変化は投与15分後には消失した。また難吸収性ポリフェノールであるカテキン四量体を10日間反復摂取させたマウスを位置認識試験に供したところ、カテキン四量体投与群では移動させた物体への探索時間の延長が認められた。以上の結果から、難吸収性ポリフェノールの摂取刺激は青斑核を活性化させ、認知機能の向上作用を示すことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、難吸収性ポリフェノールであるB-typeプロシアニジンの摂取刺激が、青斑核に入力され、脳全体にノルアドレナリンが投射されることが明らかとなった。またこれらの刺激が、認知機能の維持・向上に有益である可能性が示唆された。今後は、更に研究を進展させ、社会的に大きな問題となっているうつ病や認知症などの精神疾患の予防および治療への応用へとつなげていく。

研究成果の概要(英文)： By the method of ISH, we observed the mRNA expression in the brain taken from a mouse after a single oral administration of B-type procyanidins mixture which are poorly absorbed from GI tract. mRNA expression of TH and DBH, noradrenaline synthases, and VMAT2, a noradrenaline transporter, was markedly increased in locus ceruleus soon after administration but not 15 min after administration. In addition, we examined the object location test for the mice which were repeated oral administration of catechin tetramer for 10 days. A constant period in that for the object of a different location in the vehicle group. In contrast, A2 treated mice exhibited significant longer exploring for the object of a different location. These results suggested that the ingestion of poorly absorbed polyphenols such as B-type procyanidins including catechin tetramer activate locus ceruleus directly, and this stimulation induces improvement of cognitive function.

研究分野：食品機能性

キーワード：ポリフェノール 難吸収性 青斑核 ノルアドレナリン 認知機能

1. 研究開始当初の背景

近年行われた介入試験において、プロシアニジンやアントシアニンを豊富に含む食品を摂取した数十分後において、作業記憶が向上し、陰鬱な気分を改善するという報告が相次いでいる¹⁾。これらの化合物は消化管から吸収されにくいという特徴を有することから、難吸収性ポリフェノールと呼ばれている。我々はこれまでに、難吸収性ポリフェノールがストレス応答反応を惹起すること^{2,3)}、またその結果、交感神経活動を亢進することで、末梢臓器に生理学的な変化を誘導することを見出している^{4,5)}。難吸収性ポリフェノールの血圧・脂質代謝・糖代謝におよぼす有益な作用はこの交感神経活動亢進作用によって説明することが可能となった。一方、中枢神経への難吸収性ポリフェノールの作用については未だ不明である。

交感神経活動亢進はストレス応答反応として発現することが知られている⁶⁾。温度や湿度といった外部環境の変化は、刺激として視床下部や青斑核に入力され、ストレス応答反応を惹起し、交感神経だけでなく中枢神経に対しても顕著な変化を示すことが明らかとなっている⁷⁾。

2. 研究の目的

本研究は難吸収性ポリフェノールの摂取刺激が、ストレス制御や認知機能を制御する青斑核-ノルアドレナリン神経 (**Lotus ceruleus-noradrenaline system: LC-NA**) を直接的に賦活化することを明らかにすることを第一の目標とする。またその結果、ストレス交差耐性の獲得や学習記憶の向上を促すことを実験動物を用いて検証することを第二の目標とする。尚、本実験では、難吸収性ポリフェノールのモデル化合物として **B** タイププロシアニジン混合物またはその **4** 量体 (**cinnamtannin A2; A2**) を用いた。

3. 研究の方法

実験1) 難吸収性ポリフェノール経口摂取後の脳内ニューロトランスミッター挙動の解明

C57BL/6J 雄性マウス (10 週齢) に精製水または **B** タイププロシアニジン混合物 (**25mg/kg** 体重) を経口投与した直後に断頭し、抜脳した。摘出した脳は **OCT compound** を用いて凍結包埋し、サジタル面で薄切し切片を作成した。**Tyrosine hydroxylase (TH)・Dopamine β hydroxylase (DBH)・Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2)** の *in situ hybridization* は **RNAscope®** (ACD 社製) を用いて行い、また同時に **4',6-diamidino-2-phenylindole(Dapi)** 染色後、キーエンス社製オールインワン顕微鏡 (**BZ-X**) を用いて **mRNA** 発現を観察した。

実験2) 難吸収性ポリフェノール経口摂取による認知機能への影響

C57BL/6J 雄性マウス (10 週齢) を二週間馴化後、精製水または **A2 100μg/kg** を 10 日間経口投与した。投与後にマウスを **45 cm×45cm** のオープンフィールドに入れ、**10** 分間自発行動を観察した。またその後、**10** 分間記憶トレーニングを行い、その **24** 時間後に位置認識試験を実施した。マウスの行動は **MATLAB** で作成したソフトウェアを用いて解析した。

4. 研究成果

実験1) 難吸収性ポリフェノール経口摂取後の脳内ニューロトランスミッター挙動の解明

図1に示すように、**B** タイププロシアニジン混合物投与直後の青斑核においては、ノルアドレナリン合成酵素である **TH** および **DBH**、またノルアドレナリントランスポーターである **VMAT2** の顕著な **mRNA** 発現が認められた。また、摂取 **15** 分後では、これらの変化が消失した。

以上の結果から、**B** タイププロシアニジンの摂取刺激は摂取直後に青斑核に入力されることが明らかとなった。

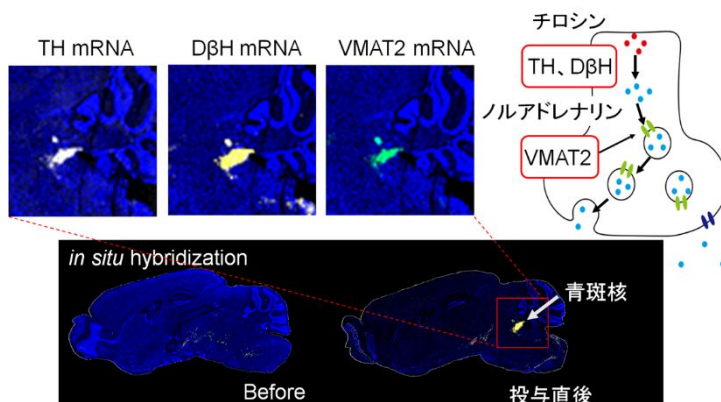
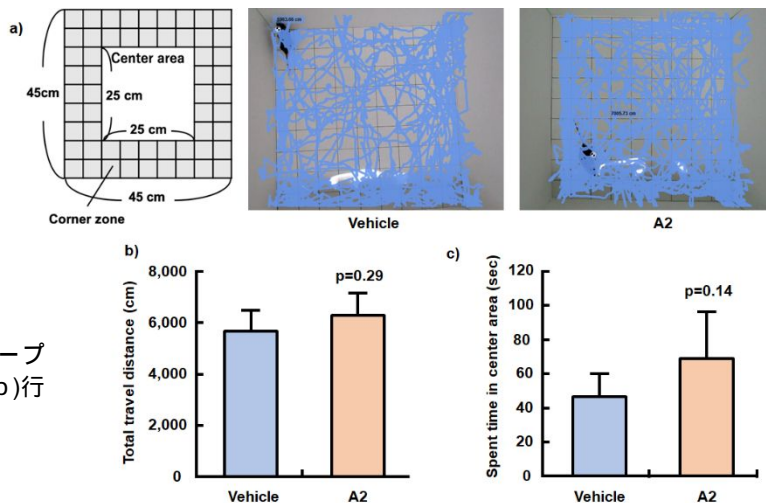


図1 B タイププロシアニジン混合物強制経口投与直後の脳内ノルアドレナリン合成酵素 mRNA 発現 (左) 投与前、(右) 投与直後

実験2) 難吸収性ポリフェノール経口摂取による認知機能への影響

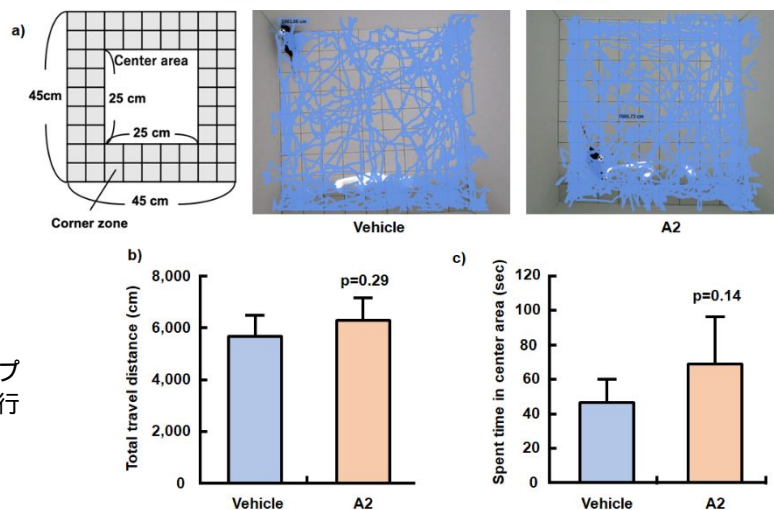
10 日間の **A2** 経口投与後のオープンフィールド試験においては、マウスの自発行動量に変化は認められなかったが、オープンフィールド中央部滞在時間とコーナーゾーン滞在時間を比較したところ、**A2** 投与群では中央部滞在時間の延長傾向が認められ、**A2** 投与によって、不安行動が軽減される可能性が示唆された (図 2)。

図 2 cinntamtannin A2(A2)反復投与直後のオープンフィールド試験 (a) マウスの行動軌跡、(b)行動量、(c) 滞在時間



また自発行動を観察した後に **2** つの物質をフィールド内に配置し **10** 分間記憶させた。その **24** 時間に **2** つのうち **1** つを移動させ、それぞれの物体に対する探索時間を計測したところ、**図 3** に示すように、**A2** 群では移動させた物体への探索時間の延長傾向が認められたことから、作業記憶が向上する可能性が示唆された。

図 3 cinntamtannin A2(A2)反復投与直後のオープンフィールド試験 (a) マウスの行動軌跡、(b)行動量、(c) 滞在時間



本研究の結果、難吸収性ポリフェノールの摂食刺激が、青斑核に入力されること、また記憶・学習に有益である可能性が示唆された。今後は、更に研究を進展させ、社会的に大きな問題となっているうつ病や認知症などの精神疾患の予防および治療への応用につなげていく。

< 引用文献 >

- Osakabe, N. & Terao, J. Possible mechanisms of postprandial physiological alterations following flavan 3-ol ingestion. *Nutr Rev*, doi:10.1093/nutrit/nux055 (2017).
- Fujii, Y., Suzuki, K., Adachi, T., Taira, S. & Osakabe, N. Corticotropin-releasing hormone is significantly upregulated in the mouse paraventricular nucleus following a single oral dose of cinnamtannin A2 as an (-)-epicatechin tetramer. *J Clin Biochem Nutr* **65**, 29-33, doi:10.3164/jcfn.19-19 (2019).
- Fujii, Y. et al. Single oral administration of flavan 3-ols induces stress responses monitored with stress hormone elevations in the plasma and paraventricular nucleus. *Neuroscience letters* **682**, 106-111, doi:10.1016/j.neulet.2018.06.015 (2018).
- Saito, A. et al. Onset of a hypotensive effect following ingestion of flavan 3-ols involved in the activation of adrenergic receptors. *Free radical biology & medicine* **99**, 584-592, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.008 (2016).
- Kamio, N., Suzuki, T., Watanabe, Y., Suhara, Y. & Osakabe, N. A single oral dose of flavan-3-ols enhances energy expenditure by sympathetic nerve stimulation in mice. *Free radical biology & medicine* **91**, 256-263, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.030 (2016).
- Goldstein, D. S. & Kopin, I. J. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocrine regulations* **42**, 111-119 (2008).
- Winkiewski, P. J., Radkowski, M., Wszedybyl-Winkiewska, M. & Demkow, U. Stress Response, Brain Noradrenergic System and Cognition. *Advances in experimental medicine and biology* **980**, 67-74, doi:10.1007/5584_2016_204 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishimura Yuya, Fukuda Yota, Okonogi Toya, Yoshikawa Soichiro, Karasuyama Hajime, Osakabe Naomi, Ikegaya Yuji, Sasaki Takuya, Adachi Takahiro	4. 巻 524
2. 論文標題 Dual real-time in?vivo monitoring system of the brain-gut axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 340 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.090	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 Fujii Yasuyuki, Suhara Yoshitomo, Sukikara Yusuke, Teshima Tomohiro, Hirota Yoshihisa, Yoshimura Kenjiro, Osakabe Naomi	4. 巻 24
2. 論文標題 Elucidation of the Interaction between Flavan-3-ols and Bovine Serum Albumin and Its Effect on Their In-Vitro Cytotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3667 ~ 3667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24203667	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Yasuyuki, Suzuki Kenta, Adachi Takahiro, Taira Shu, Osakabe Naomi	4. 巻 65
2. 論文標題 Corticotropin-releasing hormone is significantly upregulated in the mouse paraventricular nucleus following a single oral dose of cinnamtannin A2 as an (?)-epicatechin tetramer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Shota, Muguruma Hitoshi, Osakabe Naomi, Inoue Hitoshi, Ohsawa Tatsuya	4. 巻 300
2. 論文標題 Electrochemical determination with a long-length carbon nanotube electrode of quercetin glucosides in onion, apple peel, and tartary buckwheat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 125189 ~ 125189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.125189	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 Tsutsumi Ayaka, Horikoshi Yukari, Fushimi Taiki, Saito Akiko, Koizumi Ryo, Fujii Yasuyuki, Hu Qing Qiang, Hirota Yoshihisa, Aizawa Koichi, Osakabe Naomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Acylated anthocyanins derived from purple carrot (<i>Daucus carota</i> L.) induce elevation of blood flow in rat cremaster arteriole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food & Function	6. 最初と最後の頁 1726 ~ 1735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8fo02125b	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 藤井 靖之, 中尾 仁子, 伏見, 坂田純, 松永, 阿部 啓子, 平 修, 越阪部 奈緒美
2. 発表標題 Flavan 3-olsは青斑核-ノルアドレナリン作動性神経網を介して覚醒を維持する
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 鈴木健太、平嶋那由多、大山菜、藤井靖之、越阪部奈緒美
2. 発表標題 CinnamtanninA2の廃用性筋萎縮に対する作用
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 Nayuta Hirashima, Kenta Suzuki, Ryo Sukegawa, Yasuyuki Fujii, Ayaka Yamamoto, Tomoya Ueno, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Theaflavin induces browning in inguinal white adipose tissue
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) and the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2019). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taiki Fushimi, Ayaka Tsutsumi, Ryo Koizumi, Yasuyuki Fujii, Qing Qiang Hu2, Koichi Aizawa, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Anthocyanins derived from purple carrot affect on the hemodynamic changes through adrenomimetic action
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) and the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2019). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yota Fukuda, Naomi Osakabe, Takahiro Adachi
2. 発表標題 Elucidation of recognition mechanism of dorsal root ganglion for food factors
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) and the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2019). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Fujii, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Flavan 3-ols evoke locus coeruleus- noradrenaline neuron firing
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors(ICoFF2019) and the 12th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF2019). (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Kamino, Kenta Suzuki, Yuiko Ishii, Nayuta Hirashima, Minami Sakou, Shiori Oyama, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Cinnamtannin A2 induces skeletal muscle hypertrophy in mice
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuiko Ishii, Masaki Kamino, Tomohiro Teshima, Minami Sakou, Yasuyuki Fujii, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Flavan 3-ols represent browning ability in white adipose tissue.
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Suzuki, Nayuta Hirashima, Ryo Sukegawa, Yasuyuki Fujii, Ayaka Yamamoto, Tomoya Ueno, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Theaflavins delay the progression of disuse atrophy induced by hindlimbsuspension in mice
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Koizumi, Yuki Sato, Taiki Fushimi, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Comparison of B-type procyanidin oligomers on the sympathetic nerveactivation ability by the determination of hemodynamic alterations
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Fujii, Taiki Fushimi, Jun Sakata, Shoma Matsunaga, Shu Taira, Naomi Osakabe
2. 発表標題 Cinnamtannin A2 reduces anxiety behavior induced by social defeat stress and improves spatial memory
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naomi Osakabe, Yasuyuki Fujii
2. 発表標題 Astringency induces sympathomimetic physiological changes through excitation of locus coeruleus - noradrenaline system
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 中枢神経賦活剤	発明者 2020	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-53459号	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

Bio-Intelligence (BI) for well being コンソーシアム http://plus.shibaura-it.ac.jp/sitrpb/Lifesci/

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------