

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22798

研究課題名（和文）脳腸軸を介し脳を活性化するポリフェノールの探索

研究課題名（英文）The metabolism and bioavailability of polyphenols and their effect on brain function

研究代表者

小林 彰子（Kobayashi, Shoko）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授

研究者番号：90348144

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：経口投与後各臓器に含まれるRA、およびその代謝物であるカフェ酸（CAA）、フェルラ酸（FA）、クマル酸、ヒドロ-m-クマリン酸、ロスマリン酸メチル（RM）をLC-MS/MSを用いて測定した。血漿中ではRA、CAA、FAのみが検出され、RA濃度が最も高かった。脳ではRAがほとんど検出されなかった一方、CAA、FAが検出された。肝臓や腎臓ではRA、CAA、FA、RMが検出され、RMが最も高濃度に検出された。以上の結果から、RAは経口摂取後、速やかに代謝を受け、肝臓、腎臓では主にRM、脳ではCAA及びFAとして存在していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりポリフェノールの1種であるロスマリン酸の生体内における代謝、動態、および分布が明らかとなった。摂取後わずか15分で血中のみならず様々な臓器で代謝物が検出された。特に脳内で代謝物が検出されたことは、実際の生体内ではロスマリン酸は代謝物が速やかに生成し、それらが作用している可能性を示している。このことは、ロスマリン酸のみならず、体内へと吸収されにくいポリフェノールの作用機作として、代謝物を介することが重要である可能性を示しており、現在明らかにされていない食品ポリフェノールの多様な生理作用の解明、また食品として利用する際の安全性の確保に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：After oral administration, rosmarinic acid (RA) and its metabolites, caffeic acid (CAA), ferulic acid (FA), cumaric acid, hydro-m-coumaric acid, and methyl rosmarinate (RM), were determined in various organs using LC-MS/MS. Only RA, CAA, and FA were detected in plasma, with RA concentrations highest. RA was hardly seen in the brain, while CAA and FA were detected. RA, CAA, FA, and RM were detected in the liver, kidney, and RM at the highest concentration. These results indicate that RA is rapidly metabolized after oral intake and exists mainly as RM in the liver and kidney and CAA and FA in the brain.

研究分野：食品科学

キーワード：ポリフェノール 脳機能 バイオアベイラビリティ

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では超高齢化社会を迎え、健康寿命の延伸が求められている。健康寿命とは自立して生活を送ることのできる期間のことであり、平均寿命との差は即ち、要支援・要介護状態の期間を指す。今後さらに高齢者人口が増加し、要支援・要介護高齢者に対する国家的負担および経済的損失が増加することが予測されており、健康寿命の延伸は国家的な課題である。健康寿命の延伸には身体機能を維持するとともに、脳機能を健康に保つことが重要とされる。

疫学調査によりポリフェノールには脳機能を健康に保ち、認知症を予防する効果が示唆されている。これまで我々のグループは、食品成分によるアルツハイマー病 (AD) 予防効果に着目し研究を進めてきた。中でもシソ科植物に含まれるポリフェノールの 1 種 rosmarinic acid (RA) を摂食させると、モデル動物を用いた系で、AD の主病態であるアミロイド β の沈着および過剰なタウのリン酸化を抑制し、認知機能低下を抑制する効果を示すことを見出した (*Sci Rep*, 2019、*Npi Sci Food*, 2021)。しかし、RA は経口摂取後脳内では検出されず、RA の *in vivo* での詳細な作用機序は不明なままである。

## 2. 研究の目的

上記の抗 AD 作用に繋がる機作として、RA 摂食後、マウス脳内においてドーパミン経路に位置する monoamine oxidase B や catechol-O-methyltransferase の発現が抑制されることでドーパミン経路が活性化し、モノアミン類が上昇すること、また脳内炎症が抑制されることにより JNK シグナルが抑制されることを報告している (*Sci Rep*, 2019、*Npi Sci Food*, 2021)。一方 RA は図 1 に示すように体内で主に腸内細菌により代謝されるため、RA 摂食後に体内で生成したこれらの代謝物が脳内へ到達し、生理機能を発揮している可能性も考えられた。そこで本研究では、RA とその代謝物の体内動態、特に脳内移行性を明らかにし、RA 経口摂取後の脳機能への作用機序の手がかりを得ることを目的とした。

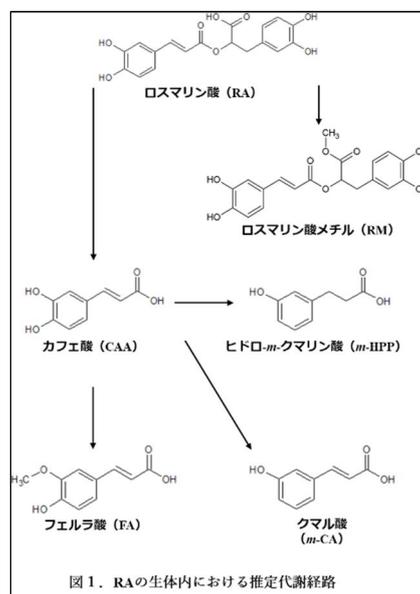


図 1. RA の生体内における推定代謝経路

## 3. 研究の方法

### 3-1. RA 経口投与マウスの血漿における体内動態解析

本研究における全ての動物実験は、東京大学動物実験委員会の承認を得て、それに遵守し実施した (承認番号: P18-112、P20-009)。C57BL/6J マウスに RA 溶液 60 mg/kg を投与した RA 群を、同量の水を投与したコントロール群 (C 群) と比較した。投与約 15 分、30 分、および 1、2、3、6、9、12 時間後にイソフルラン麻酔下で心採血した。採取した血液は、1、000 ×g、4°C で 10 分間遠心分離し、EDTA 血漿を得た。全ての血漿サンプルは、解析まで -80°C で保存した。

### 3-2. RA 経口投与マウスにおける体内分布解析

血液を採取した後に、各臓器を採取し、生理食塩水で洗浄した。小腸は内外を生理食塩水で洗浄した後、水気を抜き 2 mL チューブに入れ、液体窒素で凍結させた。全てのサンプルは、解析まで -80°C で保存した。

### 3-3. 臓器サンプルからの RA およびその代謝物の抽出

-80°C で凍結保存していたサンプルが入ったチューブに PBS を加え、ポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ホモジナイズ溶液を 12,000 ×g、4°C で 30 分間遠心分離し、得られた上清 (50 μL) を 1.7 mL 低吸着チューブに分注した。

### 3-4. 血漿および臓器抽出液の酵素処理

RA は経口摂取後、一部代謝され、代謝物共に抱合化 (グルクロン酸抱合または硫酸抱合) またはメチル化される。そのため、脱抱合化酵素 (グルクロニダーゼおよびスルファターゼを含む) による脱抱合処理し測定することで、抱合化された化合物 (抱合体) と抱合化されていない化合物 (アグリコン) の総濃度が測定できる。脱抱合処理を行っていないサンプルの測定値は、アグリコン濃度となる。脱抱合化酵素には、グルクロニダーゼおよびスルファターゼを含む β-グルクロニダーゼ H-5 を用いた。血漿および各臓器のホモジナイズ溶液から得られた上清と脱抱合化酵素溶液を混合し、37°C で 45 分間振盪しながらインキュベートした。その後 0.83 M 酢酸メタノールを加え 12、000 ×g、4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清を Millex-LH フィルターにて濾過し、5 μL を LC-MS/MS 測定に供した。

### 3-5. LC-MS/MS 測定

LC-MS/MS は Silex 社製の 3200Q TRAP を使用した。LC 部については、分析カラムは CAPCELL PAK C18 MGII S5 を 移動相は、A 液として 0.1%ギ酸含有水を、B 液として 0.1%ギ酸含有アセトニトリルを用い、グラジエント溶出にて分離した。カラム温度は 27°C、流速は 0.2 ml/min とした。MS 部については、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によるネガティブイオンモード、多重反応モニタリングにて検出した。

### 3-6. イメージング質量分析

コンパウンド剤で包埋した脳を、クリオスタットを用いて-20°Cで 10 μm 厚の凍結切片を作成した。スライドガラス上に切片をのせ、イメージング質量分析 (IMS) による測定まで-80°Cで保存した。脳は Sagittal 面の連続切片を作成した。サンプルを真空下で解凍した後、マトリックスを噴霧した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) rapifleX MALDI TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen Germany) を用いて、ネガティブイオンモード、レーザー照射間隔 120 μm で測定した。データ分析は、Fleximaging ソフトウェア (Bruker Daltonics GmbH) を用いた。

## 4. 研究成果

本研究で使用した LC-MS/MS における、図 1 に示す 6 成分の混合標準溶液の各化合物の検出限界濃度の範囲は、 $10^{-5} \sim 10^{-2} \mu\text{M}$  であった。また C 群において、RA および RA 代謝物は血漿および全ての臓器で検出されなかった。

血漿中では、アグリコンおよび抱合体の RA が最も高濃度で検出され、投与 30 分後に最も高濃度で検出された (図 2)。代謝物は、カフェ酸 (CAA) およびフェルラ酸 (FA) のみ、投与後 15 分~30 分後に検出されたが、RA と比較すると最大濃度でも 1/20 程度であった。小腸でもアグリコン抱合体共に RA および RA の濃度が最も高かった。また代謝物である、CAA、FA、および RM (RA メチル) は投与後 15 分から検出された。以上のことから、RA は摂取後小腸内で素早く代謝を受け速やかに吸収されること、しかし血中に存在する大部分は RA で CAA および FA は血中から RA よりも早く消失することが明らかとなった。一方、腎臓では RA は検出されず、代謝物である CAA、FA、および RM が検出された。腎臓で検出されるものは腸管から吸収された RA の体外への排泄の形であると考えられるため、体内へ吸収された RA は主にこれらに代謝を受け排泄されていることが推定された。しかし、本研究では尿を測定していないため、この仮説が正しいかどうかは断言できない。

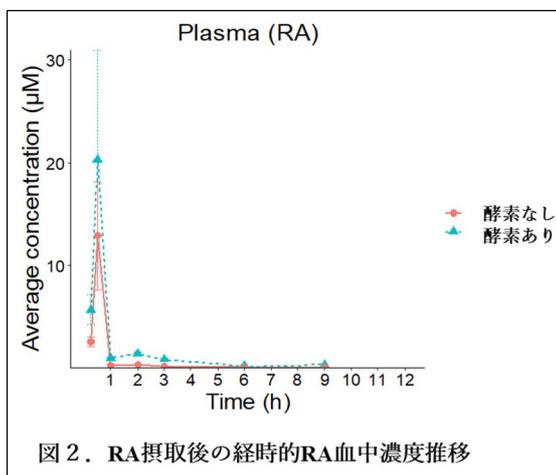


図 2. RA 摂取後の経時的 RA 血中濃度推移

脳での経時的な測定結果を図 3 に示す。RA は 30 分後にアグリコンで 2/6 個体でのみ検出され、それぞれ 0.086、0.087 μM であった。一方、投与後 15 分では 5/6 個体で、CAA および FA の抱合体がそれぞれ  $0.30 \pm 0.04$  および  $0.38 \pm 0.05$  であった。30 分後には CAA は全個体で検出され、濃度は  $0.39 \pm 0.09$  と最高に達し、FA は 3/6 個体のみであったものの、 $0.37 \pm 0.06$  であった。また FA は 1/3 個体のみであったが、この後 120 分後まで検出された。以上の結果から RA は個体によってはアグリコンでのみ少量検出されるものの、脳内へは移行しにくく、さらに個体差が大きいことが明らかとなった。また脳内へは主に代謝物である CAA および FA が移行し、すべて抱合体として存在し、これらは摂取後 15 分~30 分といった短時間で移行し速やかに消失していることが示唆された。

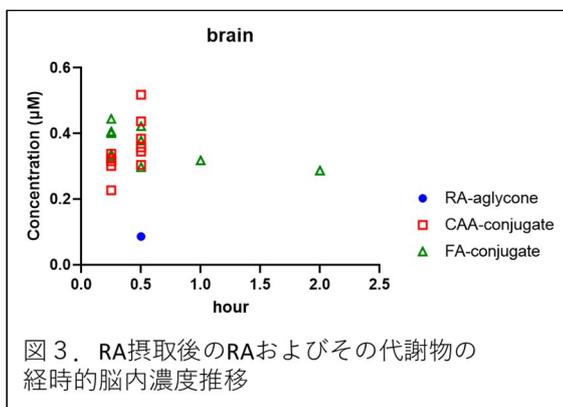


図 3. RA 摂取後の RA およびその代謝物の経時的脳内濃度推移

肝臓では、RM が主に検出された。RA は門脈から吸収され、まずは肝臓へ運ばれるが、血中では RM が検出されなかったのに対し、肝臓では多くが RM であったことは大変興味深い。このことから、RA の RM への代謝は主に肝臓で生じている可能性が考えられた。

次に血中に存在する CAA および FA が脳のどの部位に移行するかについて、イメージング質量分析 (IMS) を実施した。IMS の検出感度は高くないため、脳への移行性を高めるために CAA および FA を尾静脈投与した。IMS では FA はバックグランドが高く、明確なイメージング画像が得られなかった。一方 CAA は、嗅内皮質の一部や海馬体等の脳の特定の部位への蓄積が

観察された。従って、RA 摂取後末梢で生成した代謝物が脳内のこれらの部位に到達し、効果を発揮している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 小林 彰子	4. 巻 2
2. 論文標題 ロスマリン酸に期待されるアルツハイマー病の予防効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 129-131
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松澤 里帆, 平 修, 岡田 憲典, 阿部 啓子, 山田正仁, 小林 彰子.
2. 発表標題 シソ科植物に含まれるロスマリン酸とその代謝物のマウスにおける体内分布解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小松澤 里帆、平 修、岡田 憲典、阿部 啓子、小林 彰子
2. 発表標題 イメージング質量分析を用いたロスマリン酸の小腸における吸収と分布の可視化
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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