

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：34505

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590225

研究課題名（和文） 植物化学物質（ファイトケミカル）の老化及び疾患関連変性神経細胞への影響

研究課題名（英文） Influences of phytochemicals on age- and disease-related degenerative neurons

研究代表者

後藤 隆洋 (GOTOW TAKAHIRO)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：20135693

研究成果の概要（和文）： 植物化学物質の中で効果の期待できる赤ワインポリフェノールのレスベラトロール（RSV）に限定して、その影響を老化促進マウス P10（SAMP10）の神経細胞と肝細胞及びラットの培養神経細胞（PC12 細胞）で解析した。RSV 投与で老齢 SAMP10 の神経細胞の変性度が減少したが、肝細胞でより明確な細胞老化/変性の改善効果がみられた。培養細胞での直接作用で、RSV がミトコンドリアとオートファジー（自食作用）を活性化することにより細胞寿命の延長に貢献することが示唆された。

研究成果の概要（英文）： We selected red wine polyphenol, resveratrol (RSV), among phytochemicals in this study, and analyzed its effects on neurons and hepatocytes in a neurodegeneration-related senescence-accelerated mouse P10 (SAMP10) and rat neuronal cell line (PC12 cells). When treated with RSV, in the SAMP10 degenerative neurons of the brain were significantly recovered, and as expected in the liver hepatocytes were much more improved. We analyzed more direct influence of RSV on the PC12 cell, and have proposed that RSV may promote cell survival by activations of mitochondria and autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成 22 年度	600,000	180,000	780,000
平成 23 年度	600,000	180,000	780,000
平成 24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：レスベラトロール、老化促進マウス、PC12 細胞、肝細胞、活性酸素消去酵素、細胞寿命関連タンパク質、ミトコンドリア、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは神経細胞死のメカニズムを老化/神経変性疾患モデル動物でニューロフィラメント(NF)及びミトコンドリアの性質の変化に注目し解析してきた。その結果、NFの神経細胞体と軸索での貯留とNF-Hタンパク質のリン酸化レベルの上昇、Bcl-2ファミリータンパク質の発現変化、軸索ミトコンドリアの増加に加えて、リソソームとオートファジーの指標であるオートファゴソーム/オートリソソームとその関連タンパク質のカテプシンDの発現とLC3-II/LC3-Iの割合も増加することを見出した。リソソーム/オートファジー系による細胞内不要物処理/再利用システムは細胞変性/細胞死の抑制に貢献することがカテプシンD欠損やオートファジー関連遺伝子欠損マウスの解析で示唆されている。従来の解釈と異なり、神経細胞の変性過程での細胞骨格系/ミトコンドリアの変化やオートファジー/リソソーム系の活性化は神経細胞の障害に対する抵抗かもしれない。私たちは細胞骨格/ミトコンドリア系とリソソーム/オートファジー系の解析を融合させることで、神経変性機構を明らかにし、それに対する緩和・改善機構を検討することができると考えている。老化/変性疾患モデル動物で、リソソーム/オートファジー関連構造がニューロンの細胞体と軸索への貯留、それらの関連タンパク質の発現の増加、細胞骨格系の変化、軸索終末の変性がわかり、神経変性の際には分解系が亢進すると考えられるが、この現象が神経細胞死を促進するのがあるいは逆に細胞死を遅らせるのか不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は抗酸化能をもつファイトケミカルが、細胞の老化関連変性/細胞死を緩和あるいは遅らせることが可能なのかを、主として神経細胞と培養系の細胞を用いて解析することが目的である。この化学物質による細胞内分解系の機能亢進/抑制が変性/細胞死を誘導するのか、逆に抑制するのかを明らかにする。ファイトケミカルとして最も細胞への影響・効果が期待されるレスベラトロールを選び、それを神経老化促進マウス(SAMP10)及び培養神経細胞のモデルとしてラット副腎髄質褐色細胞腫のPC12細胞に投与し、細胞エネルギー代謝系への影響も含みどのようなメカニズムで細胞生存あるいは細胞死を引き起こすのかを明らかにする。オートファジーの多くは飢餓状態で細胞成分を分解、再利用し生存を維持する機構であるので、カロリー制限様作用を持つレスベラトロールはオートファジー/ミトコンドリア系を活性化させ、細胞変性/細胞死を抑制し、老化及び神経変性疾患の緩和に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

レスベラトロールの投与は、老化促進マウス(SAMP10)(寿命約1年)は2種類の期間(6週齢から30週齢と35週齢から20週齢)餌に混ぜて(0.04%)投与し、培養細胞(PC12細胞)は、未分化細胞はそのまま、分化細胞はNGFで1日処理後、それぞれ2日間投与し解析した。SAMP10では同定の容易な小脳プルキンエ細胞、海馬錐体細胞、脊髄前角細胞を解析対象とする。レスベラトロールのカロリー制限様作用から判断して、肝臓への影響についても解析する。またPC12細胞では野生型に加えてオートファジー及び寿命関連遺伝子の発現を低下させた細胞も解析する。使用する方法は以下の通りである。形態学的手法は、光顕、電顕切片法では灌流固定し、通常の切片作製後、顕微鏡で検索する。生細胞の観察は位相差顕微鏡で行い、細胞の生死の比率も解析する。免疫組織細胞化学法は組織の場合は灌流固定後蔗糖浸透、凍結切片作成後、培養細胞の場合は固定後、抗体反応し、共焦点レーザー顕微鏡で解析する。SDS-PAGE/イムノブロット法では組織を取り出し、蔗糖緩衝液でホモジナイズ、細胞の場合は破碎し、遠心後、SDS-PAGE及びECLシステムで、タンパク質の発現を解析する。RNA干渉法(RNAi)はPC12細胞を用いsiRNAをリポフェクタミン法で細胞に導入後、各ターゲットmRNAの発現を低下させ上記の手法で解析する。

## 4. 研究成果

レスベラトロールのSAMP10への寿命への影響を解析した。若いマウスの場合、すなわちレスベラトロールを6週齢から30週齢投与した動物ではレスベラトロールを投与したマウスの方が死ぬ個体が多かった。中齢から老齢期のマウス、すなわちレスベラトロールを35週齢から20週齢投与したマウスでは逆にレスベラトロールを投与した方が死にくかったが、統計的な有意差は認められなかった。後者の場合、レスベラトロール投与マウスの方が食餌摂取量は多い傾向にあったが、体重の増加は認められなかった(図1)。

神経細胞への影響では若齢期にレスベラトロールを投与した場合は障害的に作用したが、老齢期に投与した場合神経老化の改善効果がみられた。すなわち、加齢により増加するリポフスチン顆粒や細胞骨格系のタンパク質の発現が抑制され、加齢で発現が減少するシナプス関連タンパク質、ミトコンドリア局在活性酸素消去酵素(SOD2)、細胞死抑制タンパク質(Bcl2ファミリー)の増加が起こり、細胞老化抑制効果がみられた。従って、レスベラトロールは若年期に投与すると、そのカロリー制限様作用のため神経細胞には

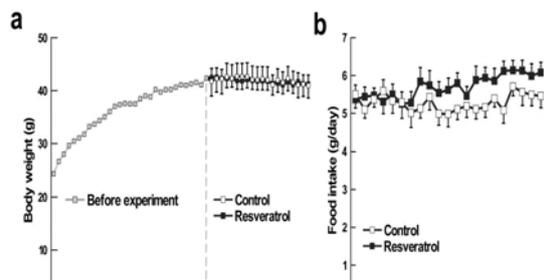


図1 SAMP10の体重(a)と食餌摂取量(b)

害的に作用するが、老齢期には神経細胞老化を緩和することがわかった。レスベラトロールの寿命自体の延長効果はなかったが、死ぬまで脳の活性化が持続していることが示唆され、この物質のヒトへの健康寿命延長への貢献が期待される。

上記 SAMP10 でレスベラトロールの神経細胞への影響を解析すると同時に肝細胞への影響も同様に解析した。レスベラトロールのカロリー代謝関連機構への影響について、この化学物質が生体内の代謝の中心である肝細胞でどのようなメカニズムで細胞機能を改善させるか検討した。レスベラトロールを老齢期のマウスに投与した場合、肝細胞では細胞1個当たりの脂肪滴が有意に減少し、ミトコンドリアの数が増加した。さらに脂肪の代謝に関しては、合成経路が抑制され、分解経路が促進されることがわかった(図2)。興味深いことに、脂肪滴の周囲にミトコンドリアが集積し、1個の脂肪滴に直接接触するミトコンドリアの数も増加した(図3、4)。

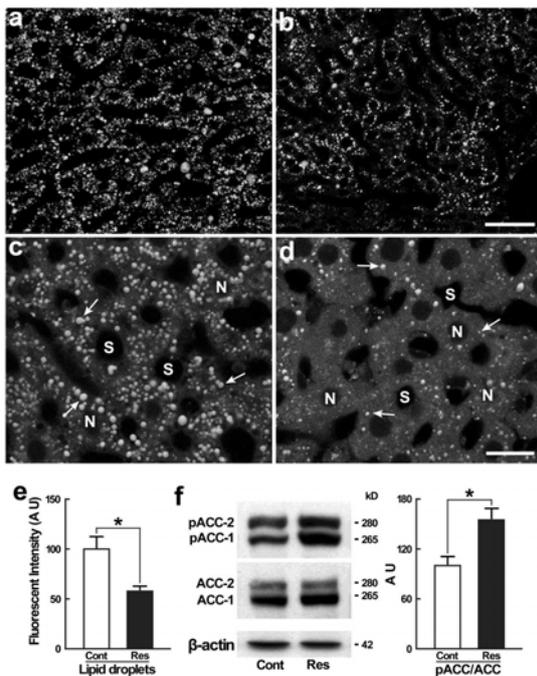


図2 レスベラトロール (Res) によるSAMP10

マウスの肝細胞の脂肪滴の減少とアセチルCoAカルボキシラーゼ (ACC) の脂肪酸合成の抑制 (ACCのリン酸化 (pACC) により抑制)、a~dのレーザー顕微鏡写真で白い斑点が脂肪滴で、bとdがRes処理

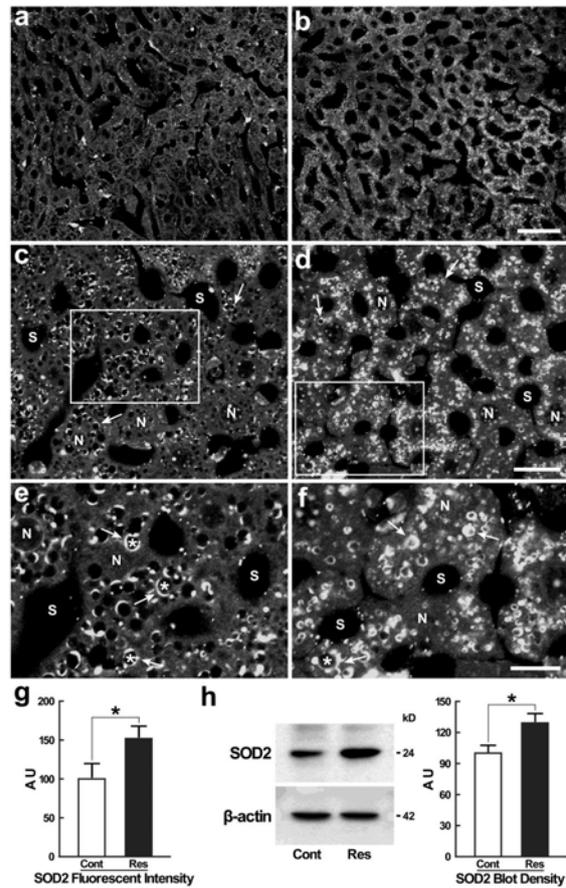


図3 レーザー顕微鏡写真 (a~f) はミトコンドリアに局在するSOD2の免疫染色、レスベラトロール (Res) 処理でミトコンドリアが脂肪滴 (丸いの染色像の中央の黒色部) の周囲に集まることわかる

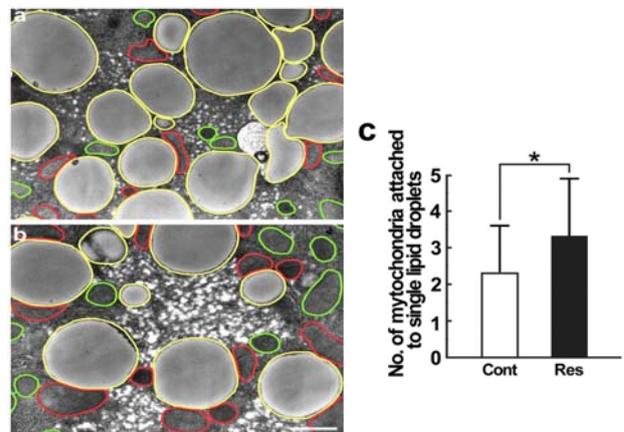


図4 Res処理で脂肪滴 (黄線) に直接接触ミトコンドリア (赤線) が増加する (下図) 同時に肝細胞ではミトコンドリアの3つの

タンパク質、すなわちATP合成酵素、SOD2及び細胞死抑制タンパク質(Bcl-xL)の発現が増加した。SIRT1の発現に変化がなかったが、ミトコンドリアに局在するSIRT3は有意に増加したので、レスベラトロールはSIRT3を介してミトコンドリアを活性化し細胞老化を遅延させることが示唆された。すなわち、レスベラトロールはミトコンドリアを脂肪滴に接触させ加齢で増加する脂肪を分解してATP合成能を促進させ、このことがさらにミトコンドリアを活性化させ、肝細胞を若返らせると考えられる。レスベラトロールの細胞老化抑制にどのようにミトコンドリアが関与するかを初めて明らかにした(図5)。

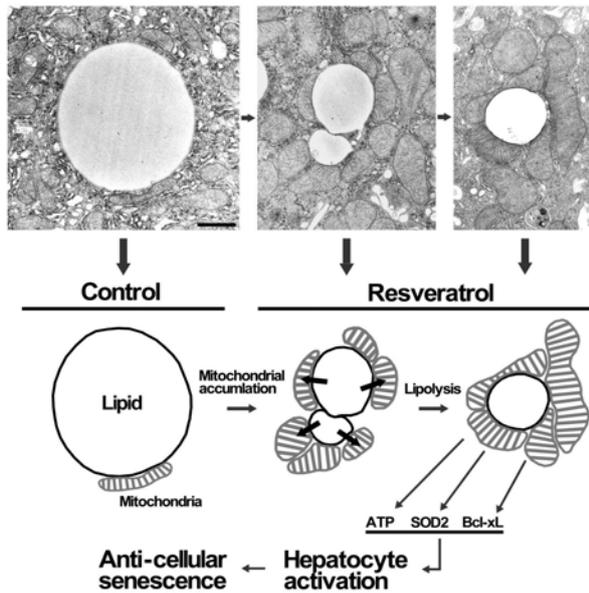


図5 肝細胞の実際の電顕像(上の写真)からの脂肪滴とミトコンドリアとの関係の模式図、レスベラトロール投与によりミトコンドリアが脂肪滴に接着し、脂肪分解(β酸化)によりさらにミトコンドリアが活性化し、細胞老化を抑制すると考えられる

SAMP10の特に肝細胞でレスベラトロールがミトコンドリアを活性化させ細胞老化の抑制に関与することが強く示唆されたので、レスベラトロールの直接効果を解析するため、ラット副腎褐色細胞腫の細胞株であるPC12細胞に濃度を変えて(1, 10, 100 μM)投与し、この化学物質のミトコンドリアへの作用機序について解析した。PC12細胞は本来腫瘍性であるが、NGFで処理すると、神経細胞様に分化するので、レスベラトロールの抗腫瘍性と神経保護の作用を同一の細胞株で解析できる。位相差顕微鏡で生細胞を解析すると、レスベラトロールは未分化PC12細胞では細胞死を促進させ、分化PC12細胞では神経突起伸展作用を示し、より細胞を分化させることがわかった。

しかし高濃度レスベラトロール(100 μM)では両細胞とも障害された(図6)。

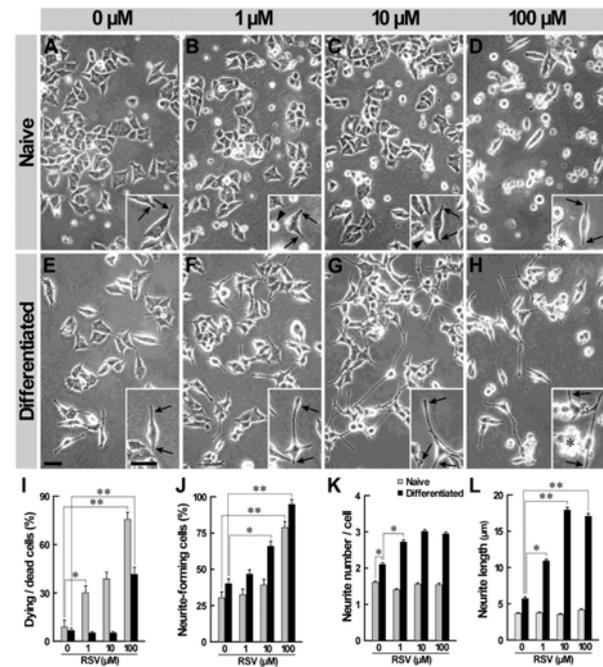


図6 レスベラトロール(RSV)のPC12細胞への影響を未分化(上)と分化(下)細胞で比較(位相差顕微鏡による解析)

レスベラトロールの細胞の分化度の違いにおけるこの逆の作用がどのタンパク質の発現変化と対応しているか解析した。生化学的解析で、両者の細胞で発現変化に有意差のあるタンパク質は、SIRT1(未分化細胞で減少)、AMPK(活性型が未分化細胞で減少、分化細胞で増加)、SOD2(分化細胞で増加)、ミトコンドリアATP合成酵素βサブユニットタンパク質(未分化細胞で減少、分化細胞で増加)、オートファジー関連タンパク質LC3-II/LC3-Iの割合(未分化細胞で減少、分化細胞で増加)であった。最後の2種類のタンパク質(ミトコンドリアとオートファジー関連タンパク質)については、電顕で解析したミトコンドリアの数(未分化細胞で減少、分化細胞で増加)とオートファジーの形態的指標であるオートファゴゾームの数(未分化細胞で減少、分化細胞で増加)と一致した(図7)。

従って、レスベラトロールは腫瘍細胞ではSIRT1を抑制し、AMPKを不活性化させ、ミトコンドリアとオートファジーの機能を低下させ、細胞死を引き起こすが、正常細胞では逆にSIRT1を促進し、AMPKを活性化させ、ミトコンドリアとオートファジーの機能を亢進させ、細胞生存を促進すると考えられる(図8)。

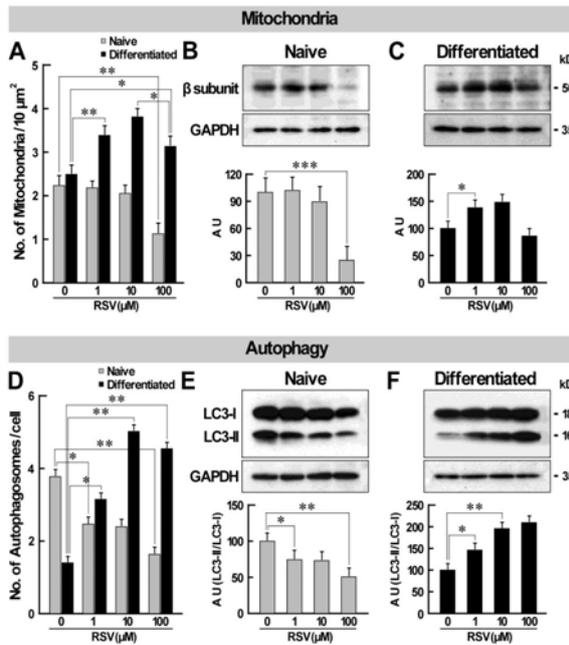


図7 電顕写真によるミトコンドリアとオートファゴゾームの数の変化の定量解析とミトコンドリアATP合成酵素βサブユニットタンパク質とオートファジー関連タンパク質LC3-II/LC3-Iの発現変化

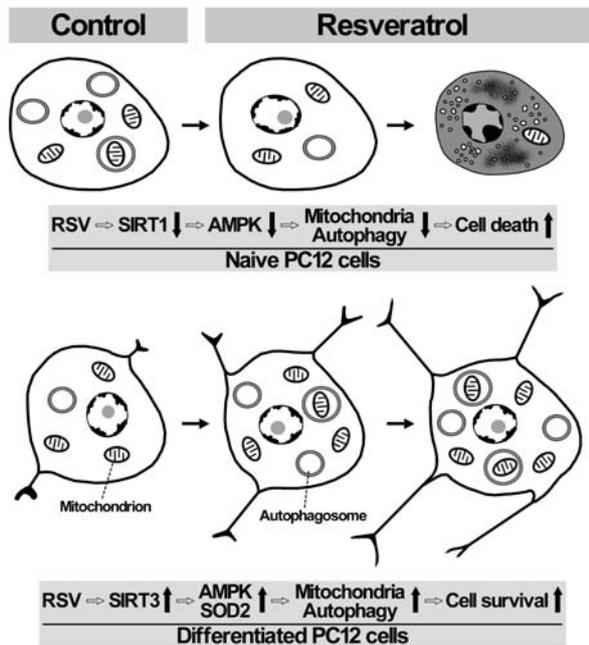


図8 レスベラトロール (RSV) の未分化 (上) と分化 (下) PC12細胞への作用機序の私たちの新仮説。RSVが何故腫瘍細胞は殺し、分化細胞には保護的に作用するのかを説明 (ミトコンドリアとオートファゴゾームの分布数の違いに注目)

以上より、レスベラトロールの細胞の分化度によって逆の作用はミトコンドリアとオートファジーへの逆の作用に起因するものと思われる、現在オートファジー関連遺伝子の1種であるLC3Bを初め、ミトコンドリア関連遺伝子も含め、各種の細胞生存/細胞死、エネルギー代謝関連遺伝子 (mRNA) のノックダウン細胞を作成し、解析を進めている。

現時点でLC3BのmRNAノックダウン細胞では、レスベラトロール処理で細胞生存関連タンパク質のSIRT1とAktの発現が未分化と分化両細胞で極めて亢進し、オートファジーが引き起こされることがわかった。しかし、この場合、両細胞共にオートファジーが亢進しているにもかかわらず、未分化細胞では細胞死が、分化細胞では細胞生存・分化が促進され、今後、オートファジーの細胞生存あるいは細胞死に結びつく働きをミトコンドリアの機能変化と関連づけることにより解明し、ファイトケミカルのヒトの健康寿命延長効果に貢献できる所見を提案・検討したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

1. Hyakawa N., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Matsuura N., Gotow T.: Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *Eur. J. Cell Biol.* 92: 30-43, 2013 doi: 10.1016/j.ejcb.2012.10.002. 査読有
2. Shiozaki M., Hayakawa N., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Closer association of mitochondria with lipid droplets in hepatocytes and activation of Kupffer cells in resveratrol-treated senescence-accelerated mice. *Histochem. Cell Biol.* 136: 475-489, 2011 doi: 10.1007/s00418-011-0847-6. 査読有
3. Gotow T.: Neurofilament cross-bridge — A structure associated specifically with the neurofilament among the intermediate filament family. Chapter 10 in "Cytoskeleton of the Nervous System". In *Advances in Neurobiology* Vol. 3, eds. R.A. Nixon, A. Yuan, Springer, New York, pp. 225-247, 2011 doi:10.1007/978-1-4419-6787-9-10 査読無
4. Garcia M.L., Rao M.V., Fujimoto J., Garcia V.B., Shah S.B., Crum J., Gotow T.,

- Uchiyama Y., Ellisman M., Calcutt N.A., Cleveland D.W.: Phosphorylation of highly conserved neurofilament medium KSP repeats is not required for myelin-dependent radial axonal growth. *J. Neurosci.* 29: 1277-1284, 2009 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3765-08.2009. 査読有
5. 塩崎元子、竹内翔一、早川直哉、後藤隆洋: レスベラトロールの細胞機能及び細胞老化の改善効果. *トップフードテクノロジー* (奥野製薬) 13: 1-20, 2009 <http://www.okuno.co.jp/technofocus/food techno013.html> 査読無
  6. Miyamoto K., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Very high dose  $\alpha$ -tocopherol supplementation increases blood pressure and causes possible adverse CNS effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Neurosci. Res.* 87: 556-566, 2009 doi: 10.1002/jnr.21851. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 早川直哉、森本美幸、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: レスベラトロールによるミトコンドリア/オートファジー機能制御と細胞寿命との関係、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高松) 2013 年 3 月 28 日
2. 早川直哉、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: レスベラトロールの細胞生存及び細胞死の調節機構、第 88 回日本解剖学会・近畿支部学術集会 (神戸) 2012 年 12 月 1 日
3. Hayakawa N., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: PC12 cells are influenced differently by resveratrol depending on their differentiation. The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience ((New Orleans, USA), October 18, 2012
4. Hayakawa N., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Resveratrol is harmful to naïve PC12 cells but beneficial to differentiated ones. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya), September 18, 2012
5. 早川直哉、塩崎元子、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: レスベラトロールは老化促進マウス (SAMP10) 肝細胞の脂肪滴を減少させミトコンドリアを増加させる、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (横浜) 2011 年 3 月 30 日
6. 塩崎元子、竹内翔一、早川直哉、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: レスベラトロールは SAMP10 の神経細胞及び肝

細胞の老化関連変化を改善する、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (岡山) 2009 年 3 月 30 日

7. 竹内翔一、塩崎元子、早川直哉、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: レスベラトロールの未分化及び分化 PC12 細胞における影響、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (岡山) 2009 年 3 月 30 日
8. Shiozaki M., Takeuchi S., Hayakawa N., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Resveratrol is beneficial to senescence-accelerated mouse neurons and to differentiated but not naïve PC12 cells. The 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, USA), October 22, 2009
9. Takeuchi S., Shiozaki M., Hayakawa N., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Resveratrol is harmful to naïve PC12 cells but beneficial to the differentiated ones. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya), September 17, 2009
10. Shiozaki M., Takeuchi S., Hayakawa N., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Resveratrol improves age-related changes in SAMP10 CNS. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Nagoya), September 18, 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 隆洋 (GOTOW TAKAHIRO)  
甲子園大学・栄養学部・教授  
研究者番号: 20135693

##### (2) 研究分担者

小池 正人 (KOIKE MASATO)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 80347210

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)  
新潟大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号: 10343253