

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06618

研究課題名（和文）プロシアニジンによる老化抑制のメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism of lifespan extension by procyanidins in *C. elegans*

研究代表者

井上 英史（Inoue, Hideshi）

東京薬科大学・生命科学部・名誉教授

研究者番号：20184765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カカオ種子由来プロシアニジンは、線虫 *C. elegans* の寿命を延長する。その活性は、ある種の感覚神経とその細胞内シグナル伝達に関わる因子、感覚神経下流の介在神経、神経細胞・非神経細胞の CaMKII と p38 MAPK 経路、および浸透圧ストレス耐性に関連する因子に依存する。寿命延長の活性成分は、シナナムタンニン A2 などの四量体以上のプロシアニジンである。四量体以上のプロシアニジンには浸透圧ストレス耐性を付与する作用も示す。種々の遺伝子欠損株等を用いた検証から、寿命延長と浸透圧ストレス耐性付与のメカニズムは関連していた。ただし、必ずしも因果関係にはないと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高齢化が進み、健康寿命を保つことが重要である。線虫 *C. elegans* は老化研究によく使われるモデル生物であり、ポリフェノール類が線虫の寿命を伸ばすという報告は多い。しかし、関与する遺伝子は必ずしも一致せず、さまざまな機構が想定される。この研究では、プロシアニジンが線虫の寿命を延長する際に、神経系を介することを初めて明らかにした。しかも、その作用は四量体以上のプロシアニジンに依存している。高重合度プロシアニジンの人への作用が近年着目されるようになったが、そのメカニズムは不明である。この研究で得た知見が、高重合度プロシアニジンが人の健康にどのように寄与するかの理解へつなげるのが期待される。

研究成果の概要（英文）：The cacao liquor procyanidins (CLPr) were found to extend the lifespan of *C. elegans*. This effect was observed in the fraction containing tetrameric and higher procyanidins, but not in the fraction containing lower procyanidins. Tetrameric cinnamtannin A2 showed a similar effect. The activity requires the sensory neurons AWC, the interneurons AIB, and proteins involved in signal transduction in the neuronal cells and synaptic transmission. Additionally, expressions of CaMKII and p38 MAP kinase in both neural and non-neural tissues were required. It is important to note that procyanidins with a molecular weight of over 1000 can prolong the lifespan of *C. elegans* through the nervous system. CLPr also enhances tolerance to osmotic stress, depending on factors shared with lifespan extension. While it is not likely a direct cause, the CLPr-induced lifespan extension and stress tolerance have a mechanistic relevance.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：抗老化 ポリフェノール プロシアニジン 線虫 神経

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化が進む中、健康寿命をいかに伸ばすかが重要である。そのため、食品成分のもつ健康寿命への効果は注目される。この研究課題に先立って、モデル生物として線虫 *C. elegans* を用い、カカオ種子由来プロシアニジン画分 (CLPr) が寿命延長作用を示すことを見出していた。そして、その活性が高重合度プロシアニジンと感覚神経に依存することに着目した。

(1) 老化制御と感覚神経について

子孫を残して種を繋ぐことは、生物の本質である。外界の環境が繁殖に適しているかどうかは、生物にとって重要である。そのため、生物は、外界の環境のさまざまな要因 (食餌、温度、浸透圧など) を感知して生殖に適した環境であるかを判別することにより、生殖と生存のいずれを優先するかを選択していると考えられる。環境が生殖に適さない場合は、良い環境を求めて移動するか、環境が好転するまで何らかの手段で生きようとする。この過程には感覚神経が関与していることが考えられる。ヒトのような高等動物では複雑であるが、このような性質は、下等生物では解析が容易な現象として観察することができる。環境感知と生存戦略の選択に寄与する基礎生物学的なメカニズムは、高等な動物においても何らかのはたらきをしていることが考えられる。

線虫などのモデル生物において、さまざまな医薬品・生薬や食品成分が寿命延長作用を示すことが報告されている。その作用機序は物質によって多様であるが、感覚神経を介して寿命延長をしている例はほとんど知られていない。感覚神経を介して寿命延長作用を示す化合物は、環境に適した生存戦略の選択や、老化抑制のメカニズム研究に寄与すると考えられる。

(2) 高重合度プロシアニジンの生物活性

プロシアニジンは、エピカテキンやカテキンが縮合した縮合型タンニン的一种である。果実等、植物由来のさまざまな食品に含まれている。プロシアニジンの生物学的機能については、ポリフェノールとしての抗酸化作用などが報告されているが、三量体以下のものに関する報告が主であり、四量体以上についてはあまりよくわかっていなかった。四量体以上の重合度のもの (ここでは高重合度とよぶ) は、膜を透過して細胞内に取り込まれることは考え難いとされる。しかしながら近年、高重合度プロシアニジンの生物活性が着目されるようになった。

(3) これまでの研究の経緯

この研究課題の開始時点では論文未発表であったが、我々は、CLPr が線虫の寿命を延長することを見出していた。種々の遺伝子欠損変異株を用いた実験から、CLPr の寿命延長作用は、Wilson ら (引用文献) が報告していたブルーベリー由来プロシアニジンと同様の遺伝子依存性を示した。すなわち、寿命延長に関わる因子として代表的な *daf-16/FOXO* や *sir-2.1/Sirtuin*、*skn-1/NRF* などは重要でなく、*unc-43/CaMKII* や *osr-1* に依存していた。プロシアニジンによる線虫の寿命延長に関しては、リンゴ由来のものについての報告 (引用文献) があるが、その遺伝子依存性は CLPr と異なる。また、いずれの報告においても、神経系の関与に関しては述べられていない。

我々は、CLPr について詳細な解析を進め、その作用は、特定の神経 (感覚神経 AWC と下流の介在神経 AIB) に依存し、神経細胞と非神経組織のそれぞれにおいて CaMKII-p38 MAPK 経路を必要とするという知見を得ていた。また、非神経組織 (腸や下皮) において浸透圧ストレス応答・グリセロール合成に関連する遺伝子群に依存するという結果を得ていた。さらに、CLPr を分子サイズによって分画すると、寿命延長作用は三量体以下の画分にはなく、四量体以上の画分に見られた。これらのことをまとめると、図 1 のようになる。しかし、四量体以上のプロシアニジンが活性の本体であることや、非神経組織におけるどのようなメカニズムが寿命延長作用の本質であるか、例えば CLPr の浸透圧耐性付与活性と寿命延長活性の間に因果関係があるのか等については、さらに検証が必要であった。

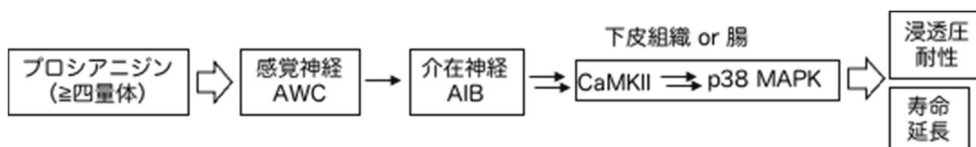


図 1 CLPr による *C. elegans* の寿命延長において想定された経路

2. 研究の目的

環境の変化に応じて生存戦略を制御する仕組みが老化抑制と関連しており、高重合度プロシアニジンは、そのような仕組みを介して線虫の寿命を延長していることが考えられた。また、「高重合度プロシアニジンが寿命延長を惹起する」ことは、線虫特異的な現象であったとしても、高重合度プロシアニジンが神経に inputs するメカニズムを理解することは、食品成分プロシアニジンのヒトに対する未知の作用を明らかにする端緒となる。そこで、下記の三つを、本研究課題における主な目的とした。

目的 1：CLPr の作用機構に關与する介在神経に關する検証

既に、感覚神経 AWC とその下流で機能する介在神経 AIB が CLPr による寿命延長に必要であることを示唆する結果を、それらの神経細胞を除去した線虫を用いた実験によって得ていた。AWC は、AIB の他に介在神経 AIA と AIY にもシナプス結合をしている。そこで、AIA と AIY の寿命延長作用への寄与について検証することとした。

目的 2：CLPr の寿命延長作用と浸透圧ストレス耐性付与作用の關連に關する検証

CLPr を投与すると、慢性浸透圧ストレスに対する耐性が向上する。感覚神経 AWC や介在神経 AIB のいずれかを除去した変異体では、CLPr による寿命延長も浸透圧耐性付与も見られない。GFP レポーターを用いた実験から、CLPr を投与は *gpdh-1* (グリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼ) 遺伝子の発現を増加することが示唆された。*gpdh-1* は浸透圧ストレスに应答して発現し、グリセロール代謝に關連する。そこで、このことが CLPr の作用機序の本質であるか否かを検証することとした。また、*gpdh-1* 遺伝子を欠損すると CLPr による寿命延長が見られなくなることを見出ししていた。ただし、これは FUDR 存在下で行なった実験であった。FUDR が浸透圧ストレス耐性に影響することが報告されている。そこで、FUDR の有無と、CLPr による寿命延長や浸透圧ストレス付与における *gpdh-1* の寄与とが、どのように關連しているかを検証することとした。

目的 3：四量体プロシアニジンが CLPr と同様の作用を示すことの検証

CLPr および四量体以上のプロシアニジンを含む画分は、線虫の寿命を延長する活性をもつ。四量体以上の重合度をもつプロシアニジンが活性の本体であると推定されるが、このことを検証する目的で、市販品の入手が可能な四量体プロシアニジンであるシンナムタンニン A2 (CTA2) を用い、CTA2 は寿命延長作用を示すか、また、CLPr と同様の遺伝子依存性や神経細胞依存性を示すかを検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 寿命測定

線虫の培養には、汎用される NGM 寒天培地を用い、餌として、大腸菌 OP50 株の生菌を与えた。CLPr や CLPr を分画した画分、あるいは CTA 2 は、共溶媒として DMSO を用いて溶かし、線虫培養用の寒天培地に、典型的には最終 10 µg/mL となるように添加した。vehicle コントロールとして最終濃度 0.017% の DMSO を用いた。FUDR を用いるときは、最終濃度 40 µM とした。線虫は 2 日ごとに新しい寒天培地に植え継ぎ、生存数・死亡数を計測した。Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、CLPr 投与群と非投与群の相違を OASIS2 を用いて解析した。log-rank test を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意差があるものと判定した。

(2) 浸透圧ストレス耐性アッセイ

急性ストレス耐性

線虫 (成虫 1 日目) を 24 時間、寿命測定と同様の条件で培養した後、餌や CLPr を含まない寒天培地上に移して 500 mM NaCl に暴露し、時間ごとに各個体の運動性の有無を観察した。その時間変化を log-rank test を用いて解析した。

慢性ストレス耐性アッセイ

500 mL NaCl の有無以外は寿命測定と同様に線虫を培養し、72 時間後の生存率を測定した。統計的な有意差の判定には、Student's t-test を用いた。

4. 研究成果

(1) CLPr による線虫の寿命延長には、感覚神経 AWC、およびその下流で機能する介在神経のうち AIB が必要であり、AIA や AIY は重要ではない。

AWC 等の感覚神経で細胞内シグナル伝達に機能する遺伝子が、CLPr による寿命延長に必要である。

遺伝子欠損変異株を用いた実験から、CLPr による寿命延長は、AWC などの感覚神経の分化や機

能に関与する遺伝子を必要とすることが示唆されていたが、本研究課題において、論文投稿のために実験データの補充や確認等を行った。得られた知見をまとめると次のとおりである。

unc-43/CaMKII の欠損変異株では、CLPr による寿命延長が見られない。この遺伝子はさまざまな細胞で発現しているため、神経細胞では摂食法 RNAi が効果を示さない野生型 N2 株と、神経細胞でのみ摂食法 RNAi が効果を示す TU3401 株を用いて *unc-43*/CaMKII の RNAi を行ったところ、いずれの株においても CLPr による寿命延長が見られなかった。このことは、神経細胞および非神経細胞のいずれにおいても *unc-43*/CaMKII が発現していることが、CLPr による寿命延長に必要であることを示している。*unc-43*/CaMKII は感覚神経 AWC などの非対称分化や機能に必要であることが知られている。そこで、AWC 等の感覚神経の機能に必要な *odr-3*/G-protein α の欠損変異株や神経特異的 RNAi による検証を行ったところ、いずれにおいても CLPr による寿命延長が見られなかった。そこで、*odr-3* の下流の cGMP シグナル経路の因子である *odr-1*/guanylyl cyclase および *tax-4*/cGMP-gated channel subunit の欠損変異株を用いて検証したところ、やはり CLPr による寿命延長が見られなかった。

感覚神経 AWC とその下流の介在神経 AIB が CLPr の寿命延長作用に必要である。

上記の結果から感覚神経 AWC が CLPr による寿命延長に寄与している可能性が考えられたので、カスパーゼを強制発現させることによって AWC 神経を除去する PY7502 株を用いてその寄与を検証した。その結果、CLPr による寿命延長が見られなかった。AWC 神経は介在神経 AIA, AIB, AIY に対してシナプス結合していることが知られている。そこで、それらをそれぞれ選択的に除去する JN579, JN578, JN580 株を用いて検証したところ、AIB 神経除去体において CLPr による寿命延長が最も顕著に阻害された。また、AWC から AIB へ、グルタミン酸を伝達物質とした神経伝達が行われることが知られているが、*eat-4* (グルタミン酸トランスポーター) および *glr-1* (グルタミン酸受容体) 遺伝子の欠損変異体ではいずれも、CLPr による寿命延長が見られなかった。

(2) CLPr による線虫の寿命延長と浸透圧ストレス耐性付与のメカニズムは関連するが、因果関係にあるとはいえない。

CLPr による寿命延長に必要な遺伝子には、p38 MAPK 経路や *osr-1* など、浸透圧ストレス耐性に関与するものが多く含まれる。FuDr は、寿命測定実験において子世代の混入を防ぐためによく用いられる試薬である。しかしながら、浸透圧ストレス耐性に影響するとの報告がある。そこで、FuDr を投与しないとときと投与したときとで、CLPr による寿命延長や浸透圧ストレス耐性付与がどのように影響されるかを検証した。

CLPr 投与は、急性浸透圧ストレス耐性と慢性浸透圧ストレス耐性の両方を感覚神経 AWC・介在神経 AIB 依存的に亢進する。

CLPr 投与によって野生型の寿命が延長され、また、急性ストレス耐性、慢性ストレス耐性がいずれも亢進する。また、感覚神経 AWC あるいは介在神経 AIB のいずれかを除去した変異体では、CLPr による寿命延長も浸透圧耐性付与も見られないことから、AWC と AIB は、CLPr による寿命延長と浸透圧耐性付与の両方に関与していると考えられる。

FuDr 存在下においても CLPr は同様の機序で寿命延長作用を示すが、浸透圧ストレス耐性 CLPr の有無にかかわらず亢進していた。

線虫の寿命測定実験において、生殖による子世代の混入を防ぐ目的で、FuDr がよく用いられる。FuDr 存在下においても CLPr は同様の機序で線虫の寿命を延長することが確認された。しかし、FuDr 投与下では、CLPr の有無によらず急性浸透圧ストレス耐性が亢進していた。CLPr によるさらなる耐性付与は見られなかった。このことから、慢性ストレス耐性付与に関する検証は、FuDr 非存在下でのみ行なうこととした。

CLPr 投与による浸透圧ストレス耐性付与は、グリセロール濃度の上昇によるものではない。*gpdh-1* 遺伝子は、CLPr 投与によって発現が誘導されることが、レポーター遺伝子を用いた実験で確認された。また、*gpdh-1* 欠損株では CLPr による慢性浸透圧ストレス耐性の亢進が見られなかった。線虫の浸透圧耐性に関与するオスモライトとして、グリセロールやトレハロースが知られている。*gpdh-1* はグリセロール代謝と関連することから、CLPr 投与によって線虫体内のグリセロール量が変化しているかを、生化学的な方法で検証した。CLPr 投与群と非投与群とでグリセロール量を比較したところ、投与後 24 時間後および 72 時間後のいずれにおいても有意差は見られなかった。浸透圧耐性の上昇は、CLPr 投与後 24 時間の時点でも見られることから、CLPr 投与による浸透圧耐性の変化にグリセロール量の変化は関連していないことが明らかになった。

CLPr 投与による寿命延長作用と浸透圧ストレス耐性付与活性のメカニズムは関連するが、必ずしも一致しない

CLPr による慢性浸透圧ストレス耐性付与は、*gpdh-1* 欠損変異株において見られなかった。そこ

で、この株における寿命延長作用を検証したところ、有意な寿命延長が見られた。しかし、FUdR 存在下においては、CLPr 投与による *gpdh-1* 欠損変異株の寿命延長は見られなかった。CLPr による寿命延長作用と浸透圧ストレス耐性付与にはメカニズム的な関連性が多く観察されるが、FUdR や *gpdh-1* との関連性においては、相違が見られる。寿命延長と浸透圧ストレス耐性付与はメカニズム的に関連するが、条件によっては分離して観察されることから、因果関係にはないと考えられる。このことは、Duesら（引用文献）が、「ストレス耐性と寿命延長は共通の経路を介しているが、必ずしも関連せず実験的に分離して観察されることがある」と述べていることと一致する。

(3) CLPr の寿命延長作用は、少なくとも四量体以上の重合度をもつプロシアニジンに依存する。

CLPr による寿命延長作用と慢性浸透圧ストレス付与活性は、四量体以上のプロシアニジンを含む画分に依存する。

CLPr を分子サイズによって二つに分画した。低分子画分は、単量体エピカテキンとカテキン、およびエピカテキンが縮合した二量体および三量体のプロシアニジンを含む。一方、高分子画分は、エピカテキンが四量体以上の重合度で縮合したプロシアニジンを含む。これらを線虫に投与したところ、寿命延長作用は高分子画分でのみ見られた。また、CLPr による寿命延長と同様に、*unc-43/CaMKII* 欠失変異株や AWC 神経除去株では寿命延長が見られなかった。さらに慢性浸透圧に対する耐性付与活性も、低分子画分には見られないが、高分子画分に見られた。

四量体プロシアニジンである CTA2 は、CLPr と同様の機序で線虫の寿命を延長する。CLPr による寿命延長には、四量体以上の重合度をもつプロシアニジンが寄与していると考えられた。四量体以上のプロシアニジンとしては CTA2 の市販品が入手可能であった。そこで CTA2 について、寿命延長作用を示すかを検証した。その結果、10 µg/mL の濃度で、9~10% の寿命延長が見られた。1 µg/mL では寿命延長は見られず、20 µg/mL に濃度を上げた場合も、さらなる寿命延長率の上昇は見られなかった。このような濃度依存性は、CLPr を用いた場合と同様であった。ただし、寿命延長率は、CLPr による場合の半分程度であった。作用機構に関しては、CLPr と同様に AWC 神経や CaMKII に依存しており、*daf-16/FOXO* や *sir-2.1/Sirtuin* には依存しなかった。以上の結果から、少なくとも四量体プロシアニジンである CTA2 は CLPr による寿命延長の活性成分の一つであり、複数種の四量体以上のプロシアニジンが CLPr による寿命延長を担っていることが考えられる。

(4) 結論

カカオ由来プロシアニジンは、線虫 *C. elegans* の寿命を感覚神経 AWC 等に依存して延長する活性をもち、シンナムタンニン A2 などの四量体以上のプロシアニジンがその活性成分である。また、四量体以上のプロシアニジンには浸透圧ストレス耐性を付与する作用もあり、そのメカニズムは寿命延長作用と関連している。しかし、必ずしも因果関係にはないと考えられる。

<引用文献>

- Wilson MA, et al. (2006) Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. Aging Cell. 5, 59-68.
- Sunagawa T, et al. (2011) Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Planta Med. 77, 122-127.
- Dues DJ, et al. (2019) Resistance to stress can be experimentally dissociated from longevity. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 74, 1206-1214.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ohmine Keiya, Morinaga Yuki, Kobayashi Sarina, Matsubara Aika, Sadanaga Kaito, Tohtani Shuhei, Saeki Hideaki, Horiuchi Hiroto, Fujikawa Yuta, Sumi Koichiro, Natsume Midori, Inoue Hideshi	4. 巻 79
2. 論文標題 Cacao Procyanidins-Induced Lifespan Extension in <i>Caenorhabditis elegans</i> in a Nervous System and CaMKII-Dependent Manner	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 glae050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/gerona/glac050	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大峰 京也、堀内 寛人、盛永 侑希、小林 咲里奈、定永 魁斗、遠谷 修平、佐伯 英昭、角 一郎、夏目 みどり、井上 英史
2. 発表標題 カカオ・プロシアニジンによる <i>C. elegans</i> の寿命延長における神経系の関与
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 盛永 侑希、小林 咲里奈、定永 魁人、遠谷 修平、佐伯 英昭、雨笠 航介、角 一郎、夏目 みどり、井上 英史
2. 発表標題 カカオ・プロシアニジンは感覚神経を介して <i>C. elegans</i> の寿命を延長する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 盛永 侑希、小林 咲里奈、定永 魁人、遠谷 修平、佐伯 英昭、雨笠 航介、角 一郎、夏目 みどり、井上 英史
2. 発表標題 カカオ・プロシアニジンは感覚神経を介して <i>C. elegans</i> の寿命を延長する
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大峰京也, 松原愛華, 盛永侑希, 角公一郎, 夏目みどり, 井上英史
2. 発表標題 プロシアニジンによる線虫 <i>C. elegans</i> の 寿命延長機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上 英史、尹 永淑	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 200
3. 書名 基礎講義天然物医薬品化学	

〔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
---------	---------