

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617014

研究課題名(和文) 脳において抗老化および抗ストレス作用を示す食品由来成分の探索および機能解明

研究課題名(英文) Study of dietary components that have anti-senescence and anti-stress effects in brain

研究代表者

海野 けい子 (UNNO, Keiko)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：10106437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：緑茶に含まれるカテキン、ミカンに含まれるβ-クリプトキサンチンは、老化を抑制し加齢に伴う脳機能低下を抑制することを、マウスを用い明らかにした。この摂取量から推測して、緑茶カテキンやβ-クリプトキサンチンはヒトにおいて脳老化を予防すると考えられた。またストレスの蓄積は脳老化を促進するが、緑茶に含まれるテアニンはストレスを軽減して脳の老化促進を抑制することをマウスの実験系で明らかにした。テアニンはヒトにおいても優れた抗ストレス作用を示したことから、マウスと同様にヒトにおいて、ストレス蓄積に起因する脳の老化促進を予防できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Catechins in green tea and beta-cryptoxanthin in Japanese mandarin orange suppressed senescence and age-related brain dysfunction in aged mice. The effective dose of these components suggests that green tea catechin and beta-cryptoxanthin prevent age-related brain dysfunction in human. Although accumulation of psychosocial stress accelerated brain senescence in mice, theanine, an amino acid in tea, suppressed stress-related brain dysfunction. Theanine had significant anti-stress effect in university students during pharmacy practice, suggesting that theanine prevents stress-related brain dysfunction in human.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：脳 老化 酸化ストレス 社会心理ストレス

1. 研究開始当初の背景

高齢者が急速に増加しているわが国において、高齢者の脳の老化予防は緊急を要する課題である。「脳の老化」には多くの要因が関与しているが本研究では、酸化ストレスを軽減するため、強い抗酸化作用を有する緑茶カテキン、および温州ミカンに豊富に含まれる抗酸化物質のβ-クリプトキサンチン等に着眼し、その摂取の効果を検討した。また、心理的ストレスの蓄積は老化をもたらし、長期のストレスは寿命を短縮すると考えられている。ストレスの影響について「寿命」を指標とした研究はこれまでも行われてきたが、脳の老化の特徴である「脳の形態的および機能的退行」を指標としたストレスの影響に関する研究はほとんど行われていない。ストレスの脳に対する影響を解明するため、社会心理的ストレスを長期にわたり負荷したマウスを用い、脳への影響を検討する必要があると考えられる。そこで抗ストレス作用が報告されているテアニン(緑茶中のアミノ酸)について、ストレスに起因する脳の老化について検討した。

脳の老化研究に適した実験動物として、本研究では老化促進モデルマウス(SAMP10)を使用した。SAMP10は加齢に伴い脳の萎縮、学習・記憶能の低下を示し、寿命も1~1.5年とやや短くホ乳類での脳老化・寿命研究に適している。またSAMP10で脳の老化が促進されている一因として活性酸素の発存量が多いこと(Sasaki et al, 2008)を明らかにしている。

2. 研究の目的

わが国は近年高齢者が急速に増加しているが、高齢者の心身の健康維持、特に「脳の老化予防」に関する学術的エビデンスに基づいた情報発信は十分とは言えない。本研究では、脳機能低下抑制作用を有する食品成分を中心とした有効成分を探索し、それら作用機序を分子レベルで解明することにより、脳の老化予防を通してわが国の長寿社会の発展に貢献することを目的とした。老化の一因として酸化ストレスの重要性が指摘されており、また社会心理的ストレスの蓄積は老化を促進すると考えられていることから、本研究では「酸化ストレス」および「社会心理的ストレス」に焦点を当て、下記に示す3つの研究項目を柱として、脳老化の機構解明および有効な予防手段の構築を目的とした。

- (1) 緑茶カテキン摂取による脳機能低下抑制作用の解明
- (2) β-クリプトキサンチン摂取による脳機能低下抑制作用の解明
- (3) テアニンによる抗ストレス作用と脳機能低下抑制作用の検討

3. 研究の方法

(1) 緑茶カテキン

通常の水を摂取しているコントロール群と、緑茶カテキンを摂取しているカテキン群の老化促進モデルマウス(SAMP10)を用意した。カテキン群は、0.2 mg/ml あるいは0.05 mg/ml の濃度のカテキン水を4週齢から自由摂取させ、寿命を測定した。

緑茶カテキンの摂取開始時期および摂取期間を変え、学習能に対する作用を検討した。学習能はマウスが暗所を好む性質を利用し、明室から暗室に移動したら弱い電気ショックを与え、暗室に入らないことを学習させた。学習に要した時間を測定し、学習能を評価した。

緑茶カテキンはエピガロカテキンガレート(EGCG)を主成分として、多くのカテキンから構成されていることから、EGCGおよびエピガロカテキン(EGC)について、脳機能に及ぼす効果を比較した。

緑茶カテキンを摂取したSAMP10マウス海馬からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ測定に用いた。

(2) β-クリプトキサンチン(-CRX)

-CRXは0~5μg/mlの濃度で、0.5%Tween 20溶液としてマウスに自由摂取させた。温州ミカン果汁は含まれる-CRXが、精製-CRX溶液の場合と同じ濃度になるように0~38%の濃度とし、2%カルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)溶液に懸濁した。-CRXおよびミカン果汁を摂取したSAMP10マウス大脳皮質について、酸化傷害の程度を8-oxo-deoxyguanosine(8-oxodG)のdGに対する比として求めた。

(3) テアニン

マウスへの社会心理的ストレス負荷は、雄マウス間の縄張り意識を利用した「対面飼育」により行った。8月齢で学習能を測定し、9月齢で解剖し、副腎および大脳湿重量を測定した。大脳皮質について8-oxodG量を測定した。

学生ボランティアによる試験では、静岡県立大学倫理委員会の承認を得た。協力を依頼した学生には十分な説明と、研究協力に関する同意文書を得た上で行った。実習を開始する1週間前から、1日2回(朝、昼)テアニン錠あるいはプラセボ錠を服用し、実習開始時から10日間、起床後と実習終了時の2回、唾液中のアミラーゼ活性を測定した。またストレス感を0~10の段階で表した。

4. 研究成果

(1) 緑茶カテキン摂取による脳機能低下抑制作用

緑茶カテキンの寿命に対する作用

緑茶カテキンの抗老化作用を、SAMP10マウスにおける寿命延長効果として評価した。50%生存期間を比較した結果、コントロール

群は 10.8 月齢であったのに対し、0.2mg/ml カテキン群では 14.9 月齢、0.05mg/ml カテキン群では 15.8 月齢と、いずれも有意に寿命が延長していた。マウスが摂取していたカテキンの濃度は、ヒトの場合に想定すると煎茶 2-3 杯から 7-8 杯に相当する摂取量であると考えられた。このことから、緑茶の摂取はヒトにおいても寿命延長効果をもたらしている可能性が示唆された。

緑茶カテキンの摂取期間の検討

緑茶カテキンの脳老化抑制作用として、緑茶カテキンをどれくらいの期間継続して摂取する必要があるのか検討した。摂取開始時期および摂取期間を変化させ、緑茶カテキン (EGCG) 摂取による学習能低下抑制作用を比較した。その結果、EGCG を 5 ヶ月以上摂取していた SAMP10 マウスは有意に脳機能低下が抑制されることが明らかとなった (図 1)。それ以上の摂取期間では差が認められなかった。一方、3 ヶ月間以下では脳機能の低下を抑制する傾向が認められた。また、摂取開始時期は若齢期からでも中高齢期からでも、5 ヶ月以上であれば有意な学習能低下抑制作用が認められた。これらのことから、緑茶カテキンの摂取は摂取開始時期にかかわらず、ある程度継続していれば脳に対する効果が期待できることが示唆された。ヒトの場合も中高齢から緑茶カテキンの摂取を開始すれば、摂取期間に応じて脳に対する効果が期待できることが考えられた。

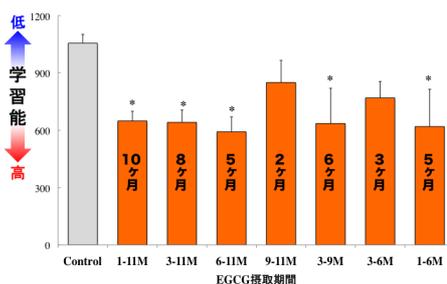


図 1. EGCG 摂取期間の違いによる学習能低下抑制作用の違い

カテキン中の有効成分の検討

緑茶カテキンはエピガロカテキンガレート (EGCG) を主成分として、多くのカテキンから構成されている。カテキンの構造の違いが脳機能に及ぼす効果との関係について検討した。緑茶カテキンは、カテキン混合物として 0.2mg/ml の濃度でマウスに自由摂取させた場合、脳機能低下抑制効果が認められる。その中には EGCG として 60 μ g/ml、EGC として 30 μ g/ml が含まれていることから、これらのカテキンを単独で摂取した場合の作用を比較した。その結果、EGCG はカテキン混合物の場合と同程度の脳機能低下抑制作用を示したが、EGC には作用が認められなかった。一

方、緑茶として摂取した場合も緑茶カテキンのみを摂取した場合と同様の効果が認められることが示され、緑茶として摂取することの有効性が示された。

DNA マイクロアレイ解析

緑茶カテキンを摂取した若齢および老齢マウスの海馬について、緑茶カテキン摂取の有無による遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより測定し、主成分分析により解析した。その結果老齢群で、カテキン摂取により発現が有意に変化した遺伝子は 973 個あり、若齢マウスでもカテキン摂取により有意に発現が変化した遺伝子が 655 個あった。それら遺伝子は、若齢と老齢では大きく異なり、共通して変化していた遺伝子は 50 個程度であった。これらの中から学習・記憶能と関連があると考えられる遺伝子について更に解析を進めている。

(2) β -クリプトキサンチン (β -CRX) 摂取による脳の老化抑制作用

学習能低下抑制作用

学習に要した時間から学習能を比較した結果、対照群に比べ β -CRX あるいはミカン果汁を摂取していた群において、濃度の増加に伴い学習に要する時間の短縮が認められ、特に 5.0 μ g/ml の β -CRX および 38.0% のミカン果汁摂取群では、対照群に比べ有意に学習能が改善した (図 2)。これらの摂取量は、ヒトの場合ミカン 2-3 個/日 程度に相当すると考えられた。

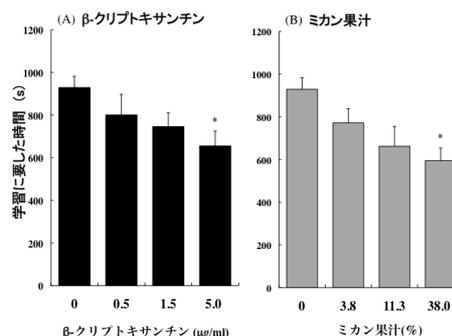


図 2. β -CRX (A) またはミカン果汁 (B) を摂取していたマウスの学習能

(学習に要した時間が短いほど学習能が高いことを意味する。)

DNA 酸化傷害抑制

酸化傷害のマーカーとして、大脳皮質 DNA 中の 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) のレベルを測定し、酸化傷害の程度を比較した。対照群に比べ β -CRX あるいはミカン果汁を摂取していた群において、大脳皮質における DNA の酸化傷害の程度は減少していることが示された (図 3)。

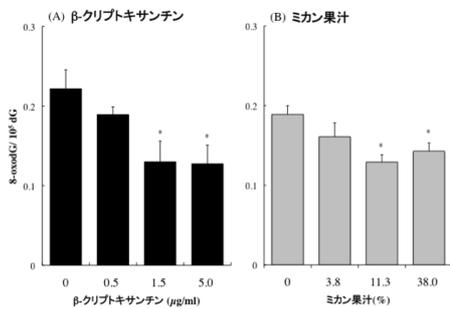


図 3. マウス大脳皮質の酸化傷害

生存期間延長

-CRX あるいはミカン果汁を摂取していたマウスについて生存期間を比較した結果、中高齢期に相当する 9 月齢の時点で、対照群に比べ -CRX およびミカン果汁摂取群では生存率が有意に高まっていた。そこで平均寿命を比較した結果、対照群の平均寿命が 17.6 月齢であったのに対し、-CRX (1.5 μg/ml) 摂取群では 20.4 月齢と約 3 ヶ月延長し、中高齢期から初老期における生存率が高まることが見いだされた。

脳内への取り込み

摂取濃度に比例して脳および肝臓内に -CRX が取り込まれていることが見いだされた。肝臓に比べ脳への取り込み量は低かったが、脳内にも取り込まれていることが確認された。-CRX は肝臓に取り込まれた後、血流を介して脳および体内の各部位に送られると考えられる。-CRX 摂取量に比例して学習能が改善していたことから、脳機能の低下抑制には脳内に取り込まれた -CRX が関与している可能性が示唆された。アルツハイマー病においてビタミン A の不足が関与している可能性が示唆されている。高齢者のヒトの脳内におけるカロテノイド類の濃度の測定結果から、-CRX はヒトの前頭皮質において 8-17 ng/g 程度存在していること、認知症の患者においては -CRX を含む血漿中のカロテノイド濃度が正常の人より低下していることが報告されている。これらのことから、-CRX はプロビタミン A として脳機能維持に関与している可能性が考えられた。

(3) 社会心理的ストレス負荷による脳の老化促進作用の解明

寿命への影響

雄マウス間の縄張り意識を利用した「対面飼育」により、社会心理的ストレス負荷を行った。対面飼育下にあったマウスでは成熟後早い時期から死に始めるマウスが見られた。これら早期に死亡したマウスに外傷はなかった。対面飼育群のマウスの平均生存期間は 13.6 月齢であった(図 4 a)。一方、群飼育群のマウスの平均生存期間は 17.6 月齢であ

ったことから、対面飼育のマウスでは群飼育のマウスに比べ 3/4 の寿命に短縮していることが見いだされた。次に対面飼育の条件下で、マウスの飲水中にテアニンを 20 μg/ml の濃度に溶解し自由摂取させた。対面飼育下にあるにもかかわらず、テアニン摂取群では平均生存期間が 17.9 月齢に延長しており、群飼育の場合とほぼ同じ平均生存期間となった(図 4 b)。群飼育群のマウスに同様にテアニンを摂取させた結果、16.9 月齢であり水摂取群と変わらない平均生存期間であった。テアニンの寿命延長効果は、対面飼育により生じた寿命短縮作用を打ち消しているものであり、通常飼育下でストレスを殆ど感じていない場合は、それ以上の寿命延長効果は示さないことが示唆された。

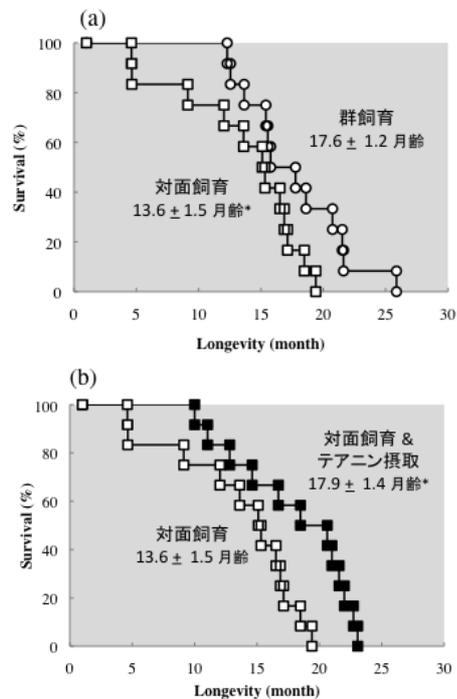


図 4. 対面飼育によるマウスの寿命短縮ならびにテアニン摂取によるその予防

ストレスによる副腎の肥大と脳の萎縮

副腎は感受性の高い重要なストレス応答器官であり、ストレスの指標の一つとして副腎の肥大が共通して見られる。対面飼育を行ったマウスについて、9 月齢の時点で副腎湿重量を比較した結果、対面飼育群では群飼育群のマウスに比べ副腎の湿重量が有意に増加していた(図 5 a)。一方、テアニンを摂取していたマウスでは対面飼育条件下でも、副腎の肥大は観察されなかった。

SAMP10 の場合、寿命の短縮に加え、加齢に伴い大脳が萎縮するという特徴を示すことから、大脳の湿重量を測定した。その結果、9 月齢の対面飼育群のマウスでは群飼育群に比べ有意に大脳の萎縮が促進していることが見いだされた(図 5 b)。一方、テアニンを摂取していた場合は、対面飼育条件下でも大脳の萎縮は促進していなかった。

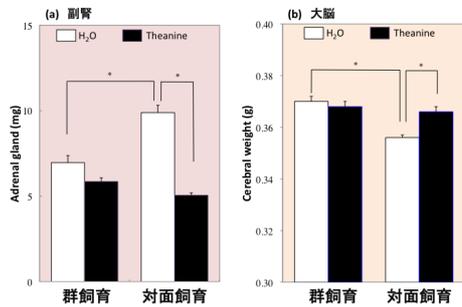


図 5. 対面飼育によるマウスの副腎の肥大(a)と大脳の萎縮(b), ならびにテアニン摂取による予防

ストレスによる脳機能の低下促進と酸化傷害の蓄積

対面飼育群のマウスについて、8月齢の時点で対面飼育群と群飼育群のマウスの学習能を比較した結果、対面飼育群で顕著に学習能が低下していた。SAMP10の場合、通常の群飼育では8月齢の時点ではまだ有意な学習能の低下は観察されないことから、対面飼育により脳機能の低下が促進されることが見いだされた。一方、テアニンを摂取していた対面飼育群のマウスでは、脳機能の低下は認められなかった。

9月齢のマウスについて、大脳皮質 DNA の酸化傷害の程度を調べた。8-oxodG のレベルを比較した結果、対面飼育群では同じ月齢の群飼育群のマウスに比べ有意に酸化傷害が高まっていた。しかし、テアニン摂取により対面飼育下でも酸化傷害の蓄積は有意に抑制されていた。テアニンには直接的な抗酸化作用は見られないことから、テアニン摂取による DNA の酸化傷害抑制作用は、脳内における ROS 産生/消去のバランス保持に対し、間接的に作用しているものと考えられた。

ヒトにおけるテアニンの抗ストレス作用

薬学部5年生の学生を対象として、学外での病院および薬局での実習時における学生のストレスを、テアニンが軽減できるかどうか、単盲検ランダム化比較試験により検討を行った。唾液中のアミラーゼを測定することにより、ストレスの程度を評価した結果、病院および薬局実習時にプラセボ群の学生は朝から高いアミラーゼ活性を示していたのに対し、テアニン群では平常時と同じであった。実習終了時にはアミラーゼ活性が高まっていたが、プラセボ群ほど高くないことが明らかとなった(図 6)。このことからテアニンの服用は、実習前の学生の過度の緊張を抑制しているものと考えられた。学生が実習後に感じたストレス感と、唾液アミラーゼ活性との間には有意な相関性が認められ、ストレス感の評価値においてもテアニン群で有意に低いことが示された。

テアニンはヒトにおいてもストレスを軽

減できることが明らかとなった。このことからテアニンは、ストレス蓄積に起因する脳の老化促進を予防できると考えられた。

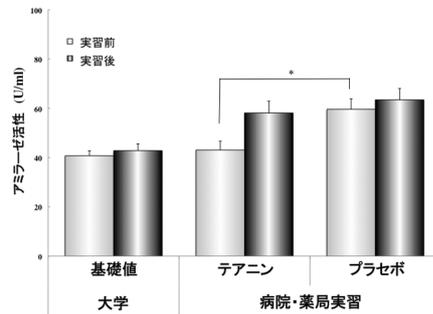


図 6. 学外実習時における学生の唾液アミラーゼ活性変化とテアニン服用によるストレス抑制作用

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 11 件)

- Unno K, Tanida N, Ishii N, Yamamoto H, Iguchi K, Hoshino M, Takeda A, Ozawa H, Ohkubo T, Juneja LR, Yamada H: Anti-stress effect of theanine on students during pharmacy practice: Positive correlation among salivary -amylase activity, trait anxiety and subjective stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 査読有、111, 128-135 (2013). doi: 10.1016/j.pbb.2013.09.004.
- Unno K, Iguchi K, Tanida N, Fujitani K, Takamori N, Yamamoto H, Ishii N, Nagano H, Nagashima T, Hara A, Shimoi K, Hoshino M.: Ingestion of theanine, an amino acid in tea, suppresses psychosocial stress in mice. *Exp Physiol.* 査読有、98, 290-303 (2013). doi: 10.1113/expphysiol.2012.065532.
- Unno K, Yamamoto H, Ohtaki T, Ishikawa Y, Noda S, Maeda K, Fujitani K, Miyazaki H, Takabayashi F, Sasaki T, Hoshino M: Active Component in Green Tea Catechins and Effective Intake Period for Prevention of Age-related Brain Dysfunction. *Anti-Aging Medicine.* 査読有、8, 75-81 (2011). [http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2011/8\(6\)75-81.pdf](http://www.anti-aging.gr.jp/english/pdf/2011/8(6)75-81.pdf)
- Unno K, Fujitani K, Takamori N, Takabayashi F, Maeda K, Miyazaki H, Tanida N, Iguchi K, Shimoi K, Hoshino M: Theanine intake improves the shortened lifespan, cognitive dysfunction and behavioral depression that are induced by chronic psychosocial stress in mice. *Free Radical Res.*, 査読有、45, 966-974 (2011).

doi: 10.3109/10715762.2011.566869.

5. Unno K, Sugiura M, Ogawa K, Takabayashi F, Toda M, Sakuma M, Maeda K, Fujitani K, Miyazaki H, Yamamoto H, Hoshino M: Beta-Cryptoxanthin, Plentiful in Japanese Mandarin Orange, Prevents Age-related Cognitive Dysfunction and Oxidative Damage in Senescence-accelerated Mouse Brain. Biol. Pharm. Bull, 査読有、34, 311-317 (2011).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372377>

〔学会発表〕(計 50 件)

1. 海野けい子: 食品成分による老化およびストレスの予防. 日本薬学会第 134 年会(熊本) 講演要旨集 1, p.192, 2014.3.29.
2. 海野けい子: 老化と認知症の予防について. お茶市民セミナー in 藤枝(藤枝), 2014.2.2.
3. 海野けい子, 石井直人, 谷田直輝, (他 9 名, 1 番目): テアニン摂取によるストレス軽減: 実務実習の学生における検討. 第 8 回臨床ストレス応答学会大会(松本) 抄録集 p.37, 2013.11.15.
4. Unno K, Konishi T, Hagiwara S, (他 6 名, 1 番目): Ingestion of green tea catechin and caffeine suppresses brain dysfunction in mice caused by high-fat diet feeding. The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science (Shizuoka) p. 77, 2013.11.8.
5. Takahashi Y, Konishi T, Unno K (他 6 名, 9 番目): Effect of green tea catechin on prevention of age-related brain dysfunction. The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science (Shizuoka) p. 75, 2013.11.8.
6. Ishii N, Tanida N, Unno K (他 9 名, 12 番目): Anti-stress effect of theanine in mice and human. The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science (Shizuoka) p. 74, 2013.11.8.
7. Ishii N, Sugiura M, Konishi T, Unno K (他 6 名, 10 番目): Anti-Aging Effect of β -Cryptoxanthin and Japanese Mandarin Orange in Brain of Mice. 13th International Conference of functional and medical foods with bioactive compounds, science and practical application (Kyoto), May 11-12, 2013
8. Unno K, Konishi T, Hagiwara S, (他 6 名, 1 番目): Ingestion of Green Tea Catechin and Caffeine Suppresses Pancreas and Brain Alterations in Mice Fed a High-Fat Diet. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto (Kyoto), p.20, April 23-26, 2013
9. 石井直人, 杉浦実, 小西智一, 海野けい子 (他 4 名, 8 番目): β -クリプトキサンチンの脳に対する抗老化および抗ストレス作用. 日本薬学会第 133 年会(横浜) 講演要旨集 3, p.74, 2013.3.30.

10. Unno K, Iguchi K, Yamamoto H, (他 9 名, 1 番目): Green tea components catechin and theanine are differently involved in the suppression of brain aging. The 1st International conference on Pharma and Food (Shizuoka), Abstract, p.109, Nov. 16, 2012

〔図書〕(計 4 件)

1. Unno K, Sasaki T, Hoshino M: Protection of brain senescence by consumption of green tea components. The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions (Ed by Toshio. Takeda), Elsevier, pp. 509-522 (2013)
2. 海野けい子: 老化と認知症【1】基礎新版 茶の機能(衛藤、富田、榛村、伊勢村, 原、山本(前田)編), pp.245-254 (2013)
3. 海野けい子: 老化抑制効果、認知症予防効果. 緑茶と健康のメカニズム~機能効用ナビゲーション:(伊勢村護, 監修・編集)pp. 48-50 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海野けい子 (UNNO, Keiko)
静岡県立大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10106437

(2) 研究分担者

杉浦実 (SUGIURA, Minoru)
農業生物系特定産業技術研究機構・果樹研究所・主任研究官
研究者番号: 10355406

(3) 研究分担者

小西智一 (KONISHI, Tomokazu)
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 00281650