

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32809

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700927

研究課題名（和文） ルチンの記憶障害保護作用の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the protective effects against memory impairment of rutin

研究代表者

小宇田 智子 (KODA TOMOKO)

東京医療保健大学・看護学部・講師

研究者番号：30391098

研究成果の概要（和文）：

神経回路形成時に生じる前シナプスおよび後シナプスの形態学的、機能的変化を指標として、フラボノイド類が記憶形成に及ぼす影響を分子レベルで検討した。前シナプスに対する影響の検討を行うため、PC12 細胞の軸索伸長を指標とした。ルチンおよびケルセチンの培地への添加により軸索伸長が誘導される傾向がみとめられたが、リスベラトロールの添加ではそのような影響がみとめられなかった。後シナプスにおける AMPA 型受容体の細胞膜への移行は、リスベラトロールの添加により誘導される傾向がみられたが、ルチンおよびケルセチンの添加では影響がみとめられなかった。フラボノイドが与える記憶形成への影響は、分子レベルにおいてそれぞれが特異的な機序による可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Various phytochemical constituents have been widely investigated owing to their beneficial effects on health, especially on memory function. We have examined that the effects of some flavonoids (rutin, quercetin and resveratrol) on AMPA receptor trafficking to plasma membrane of hippocampal neurons and neurite outgrowth using PC12 cells. Resveratrol has tended to induce AMPA receptor trafficking to plasma membrane, however rutin and quercetin did not have that effect. On the other hand, rutin and quercetin have tended to induce the neurite outgrowth of PC12 cells, however resveratrol did not effect on neurite outgrowth. Each flavonoid may have specifically molecular mechanisms of memory function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
合計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、ルチン、記憶、神経回路、AMPA 型受容体

### 1. 研究開始当初の背景

近年、認知症の外来患者数は急増している。認知症の原因となる主な疾患はアルツハイマー病であり、この疾患では初期に海馬領域のコリン作動性神経細胞の脱落がみられ、初期症状として記憶障害がみとめられる。記憶障害は生活の質を低下させる主な要因となりうるため、その予防方法の確立は急務である。申請者はこれまでに、脳の海馬傷害による記憶障害モデルラットを用いて、フラボノイドのルチンが抗炎症作用により記憶能低下を予防することを見出した。本研究では、さらにその作用メカニズムを分子レベルで解明することが目的である。このことにより、ルチンをはじめとする食品成分を用いた安心で安価なサプリメントや創薬への応用が期待できる。

### 2. 研究の目的

脳の疾患による極端な神経細胞の脱落は、記憶の低下に繋がる。申請者らの研究でも、海馬神経細胞の脱落が記憶能を低下させ、神経細胞脱落の保護により記憶能の低下が抑制されることが明らかになっている。一方、動物実験において、脱落した神経細胞機能を補うかのように、発達期と同様の神経回路形成による機能回復が認められている。つまり、記憶能は神経細胞数のみに依存しているわけではないと考えられる。本研究では、前シナプスおよび後シナプスの神経回路形成の過程に着目し、ルチンをはじめとするフラボノイド類の、神経回路形成の過程におよぼす影響を、前シナプスおよび後シナプスの両方の面から検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

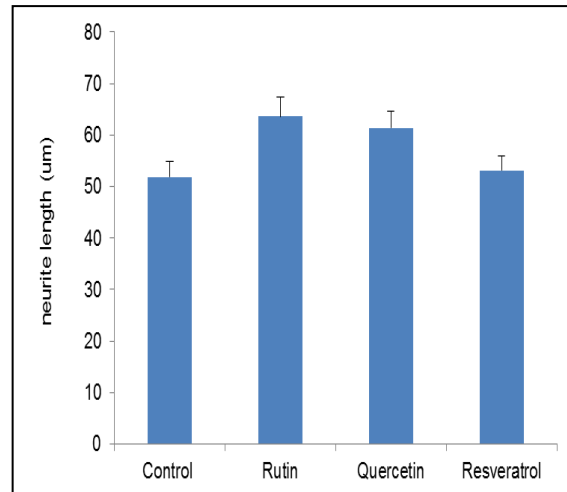
(1)ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF: Nerve growth factor) で処理することで軸索を伸長することから、神経細胞の軸索伸長モデルとして幅広く用いられている。PC12 細胞を Poly-L-lysine コートしたカバーガラスを置いた 12 ウェルプレートに  $2 \times 10^4$  cells/well となるように播いた。およそ 12 時間後、最終濃度が 100 ng/ml となるように NGF を添加し、さらに 30 分後に DMSO に溶解したフラボノイド類を最終濃度が 50  $\mu$ M となるように添加した。5 日間培養後、10%パラホルムアルデヒドで細胞を固定し、神経軸索に特異的に発現するタンパク質である  $\beta$ -tubulin のモノクローナル抗体で免疫染色し、蛍光標識の 2 次抗体を用いて、蛍光顕微鏡下で 1 well あたり 10 枚程度の画像を撮影し、100 細胞以上の軸索伸長を測定して、フラボノイドが誘導する軸索伸長を比較した。

(2)ラット胎児海馬神経細胞を用いて、フラ

ボノイド類の後シナプス AMPA 型受容体の細胞膜表面以降への影響を検討した。具体的には、妊娠ラットを購入し、妊娠 18 日目にネンブタール麻酔科で全胎児を素早く取り出し、クリーンベンチ内で胎児の海馬より神経細胞を分離した。細胞は  $0.1 \times 10^6$  cells/well の濃度で poly-L-lysine コートしたカバーガラスを置いた 6 ウェルのプレートに播いた。2 日おきに培地交換を行い、培養から 2 週間目に DMSO に溶解したフラボノイド類を添加し、40 あるいは 60 分間インキュベートした。その後、神経細胞表面の全タンパク質をビオチンでラベルし、低温で AMPA 型受容体の細胞膜移行を停止させ、超音波処理により細胞を融解してアビジンをカップリングしたビーズで細胞表面に存在するタンパク質のみを回収した。AMPA 型受容体の海馬における主要なサブユニットである GluR1 の抗体を用いてウェスタンブロット法にて化学発光によりバンドを検出し、全 GluR1 サブユニットと細胞表面に発現した GluR1 サブユニットの発現量の比を求め、相対的に比較定量を行った。

### 4. 研究成果

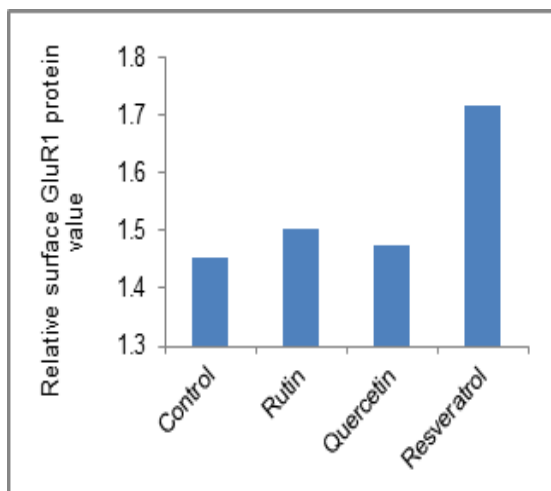
(1)ルチンおよびケルセチンの添加により、PC12 細胞の軸索伸長が誘導される傾向がみとめられた。一方でリスベラトロールの添加では PC12 細胞の軸索伸長に対する影響はみとめられなかった。



(2)ルチンおよびそのアグリコンであるケルセチンの添加は、ラット胎児海馬神経細胞の細胞膜における AMPA 受容体のタンパク質発現量に対する影響はみとめられなかった。一方で、リスベラトロールの添加により、細胞膜における AMPA 受容体タンパク質の発現量は上昇する傾向がみとめられた。しかしながら、数回にわたる実験の結果が安定しないた

め、再度確認する必要がある。

記憶能は神経細胞数が非常に重要である



が、そのみに依存しているわけではなく、神経細胞どうしのネットワークシステムにより形成される神経回路や、その機能が大きく関与していると考えられる。申請者はこれまでに、ラットを用いた *in vivo* の実験としてルチンの摂食が記憶能低下を抑制することを報告しており、その作用メカニズムが抗炎症作用である可能性を明らかにした。本研究では、神経細胞の機能面から、前シナプスおよび後シナプスに着目し、ルチン、ケルセチンおよびリスベラトロールの記憶能低下抑制作用の分子メカニズムについて検討した。その結果、フラボノイドの種類により、作用メカニズムに違いがあり、主に前シナプスに対する影響が大きい場合と、それとは逆に後シナプスへの影響が大きい場合が存在する可能性が示唆された。このようにフラボノイドによる作用メカニズムの違いや、影響の大きさの違いなどについて、培養細胞を用いて今後より詳細に検討していく予定である。

本研究で検討したフラボノイド類は日常的に摂取している食品に多く含まれているものであり、例えば、ルチンは主にソバの外皮に存在する色素である。ケルセチンはルチンのアグリコンであり、リスベラトロールはブドウの皮の赤色色素である。そのためこれらの機能をサプリメントあるいは創薬として応用した場合、十分な生産量の確保や安全性が期待できる。

本研究は、世界で最初に超高齢社会を迎えた日本において喫緊の課題である認知症対策を考える上で有用な情報を提供できた。

## 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 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tomoko Koda, The effects of flavonoids on AMPA receptor-mediated calcium entry, Neuroscience 2012, October 13-17, 2012, New Orleans, LA, USA.
- ② Tomoko Koda, The effects of flavonoids on AMPA receptor trafficking to plasma membrane of hippocampal neurons, Neuroscience 2011, November 12-16, 2011, Washington D.C., USA.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宇田 智子 (KODA TOMOKO)  
東京医療保健大学・看護学部・講師  
研究者番号：30391098

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：