

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 17 日現在

機関番号：23901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650494

研究課題名(和文) コマツナ種子成分によるアミロイド 誘導細胞死の抑制機構：アルツハイマー症への挑戦

研究課題名(英文) Inhibition mechanism of the amyloid beta induced-cell death by komatsuna seed extracts: Challenge to Alzheimer's disease

研究代表者

岡田 悦政 (OKADA, Yoshinori)

愛知県立大学・看護学部・准教授

研究者番号：60224036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：コマツナ種子抽出成分(KSE)がA $\beta$ による神経細胞死を抑制した。その機構として「A $\beta$ による細胞死は、A $\beta$ による糖代謝阻害の関与」を考え、吸収スペクトル、電気泳動、インスリン(Ins)量及び、KSEによるA $\beta$ 修飾によるグルコース(Glu)消費量及び取込量に影響を及ぼすのかという観点から細胞死抑制機構を検討した。結果、KSEによるA $\beta$ への修飾反応により吸収スペクトル変化が検出され、電気泳動法からA $\beta$ モノマーバンドが検出できなかった。また、KSE修飾A $\beta$ はInsレセプターへ結合せず、Ins取込促進が見られた。一方、海馬神経細胞においてKSEによるA $\beta$ 修飾によりGlu消費量及び取込量を改善した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is characterized by large deposits of amyloid beta (Abeta) peptide. Abeta is known to increase reactive oxygen species (ROS) production in neurons, leading to cell death. In this study, we investigated the effects of komatsuna seed extracts (KSE) on Abeta (1-42)-induced neurotoxicity and on the regulation of cell death processing in hippocampus neurons (HN). RESULTS: No bands of Abeta were recognized in Komatsuna by electrophoresis. In addition, Abeta modified by KSE did not bind to the insulin (Ins) receptor. In other words, promotion of the Ins uptake was seen. KSE showed enhancement of cell survival, compared to that of the control level, amounting to a 100% blockade of Abeta-induced cell death. Furthermore, intracellular ROS accumulation resulting from Abeta treatment was reduced when cells were treated with KSE. KSE improves glucose uptake by Abeta in HN. CONCLUSION: From these results, we suggest that KSE offers protection against Abeta-mediated cell death.

研究分野：総合領域

キーワード：コマツナ種子 アミロイド 海馬神経細胞 アルツハイマー型認知症 インスリン グルコース 細胞死 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

アミロイドβタンパク(Aβ)は、難可溶性のβシート構造を持つタンパク質であり、老化などによるAβ分解酵素の分泌低下のため蓄積され、結果として神経細胞死が起こることアルツハイマー症(AD)が進行すると考えられている<sup>1)2)</sup>。Kuhlaらは、Aβの生成が促進されると、一連のカスケード反応の進行とともに常に炎症反応が繰り返されることを報告している<sup>3)</sup>。これらの反応によるROSの発生が推測され、これが細胞死へ誘導する引き金になることが考えられる。しかしながら、細胞死へ繋がる段階の機構は、未だ推論の域を出ない。

また、Aβタンパクは、インスリンと注目すべき共通点がある。両者は、アミロイド形成をなす共通のペプチド配列を持っており、さらに、Aβとインスリンはインスリンレセプター(IR)に対し競合し<sup>4)</sup>、Aβはインスリン分解酵素によって分解される<sup>5)</sup>。

## 2. 研究の目的

ここで、Xieらによる「AβとインスリンはIRに対し競合する」という報告<sup>4)</sup>から推論して一つの仮説を立てるならば、Aβによる海馬神経細胞死の機構には、Aβによる糖(glucose)代謝の調節阻害が関係している可能性があると考えた。脳内におけるインスリンは直接糖の取り込みに関与しないものの、グルコーストランスポーターを介した糖代謝、軸索の再生に関与する。また、インスリンを介した糖の取り込みを行う細胞においては、Aβの存在によって、糖の取り込み阻害による細胞死の可能性もある。

先行研究において、食由来成分によるアルツハイマー症(AD)の抑制を目的として、Aβ誘導による細胞死を15種の食用植物種子が抑制するか否か、パイロット的スクリーニングを行い、すでに興味深い知見を得た<sup>6)</sup>。その結果、コマツナ種子熱水抽出成分(KSE)においてAβによって誘導された細胞死に対し、高い抑制効果が認められた。そのため、本研究においては、KSEの細胞死抑制機構を探るとともに、仮説とした「Aβが誘導する細胞死の機構には、Aβによる糖(glucose)代謝阻害が関係しているか否か」の検証を行い、KSEがその阻害に対し、影響を及ぼすのか否かについて明らかにすることで、細胞死抑制機構にアプローチする。

## 3. 研究の方法

以下の課題を焦点として行った。

【課題1】KSEはAβを修飾するのか。

KSEの細胞死抑制機構は、AβタンパクにKSEが修飾することで、構造的変化を起こさせることが考えられるため検討した。

【課題2】Aβとインスリンの競合に対し、KSEは影響を及ぼすのか。

共通のペプチド配列を持つため、またXieらによる「AβとインスリンはIRに対し競合す

る」ということから、両者の関係に対し、KSEの存在はどのように働くのか。

【課題3】AβはGlucoseの取り込み量に影響を及ぼすのか。

Aβ誘導の細胞死には、「糖代謝阻害」が関与するという仮説を検証するとともに、KSEの存在によってどう変化するのか検討を行った。

## [方法]

### (1)サンプル及び細胞の調製

KSEは熱水抽出し、濾過後サンプルとした。

細胞調整：線維芽細胞(ヒト皮膚由来)及びマウス海馬神経細胞を、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下にて一定期間培養し調整後、以下(3)-の実験を行った。

### (2)試験管内における検討

KSEのAβへの修飾検討

a)吸収スペクトル測定：Aβに対して親和性のあるCongo red(CR)を用い、Aβと結合したCRピークの変化を追う。KSEと31.765μg/mL Aβ(25-35)を混合しincubation後CRを加え、CRピークの変化を300~700nmのレンジ幅においてスキャンした(Thermo Scientific Multiskan GO)。

b)分子量測定：SDS-polyacrylamideゲルによる電気泳動(SDS-PAGE, ATTO)を行った。

### (3)細胞内における検討

線維芽細胞におけるインスリン量の測定：Insulin assay kitによる測定を行った。

マウス海馬神経細胞におけるglucose消費量測定：サンプル投与1h後、その後Aβ(1-42)暴露48h後において、BioVision Glucose assay kitによる測定を行った。

マウス神経細胞におけるglucose取り込み測定：Glucose Uptake Cell-based assay kitにおいて、サンプル投与及びAβ(1-42)暴露を行い、1h後測定を行った。

## 4. 研究成果

### 【課題1】

KSEはAβに修飾するのか。

CRを用いた吸収スペクトルからの検討

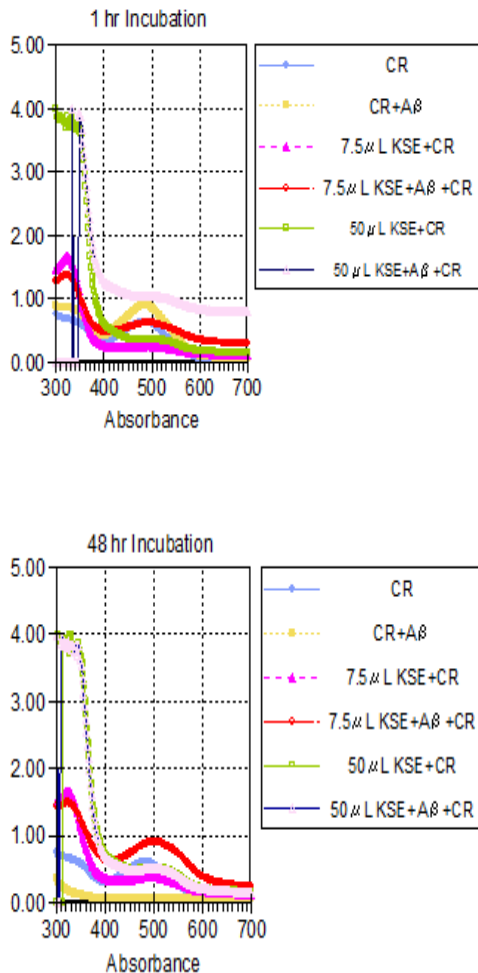
Fig.1 1h後と48h後の比較

Aβ+CRはCR単独より長波長側へのピーク移動が認められた。KSE+Aβ+CRは、Aβ+CRよりも、さらにピーク位置が長波長側に存在した(Fig.1)。

CRはAβと結合し、長波長側にシフトすることから、さらに、KSEの介在によってAβの分子に変化を及ぼした可能性が示唆された。

Fig.1のように、1h後のCR単一のピークは、482nm、CR+Aβピークは486nmと4nm長波長側にシフトした。7.5μL KSE+Aβ+CRは、CR+Aβピークよりさらに、6nm長波長側にピークが存在した。50μL KSE+Aβ+CRは、CR+Aβより2nm長波長にCRピークが存在

した。これが 48h 後になると、CR 単一のピークは変化せず、CR + A $\beta$  のピークは、488nm と 6nm 長波長にシフトした。時間経過と共に両者の結合が進行する可能性が示唆された。7.5 $\mu$ L KSE + A $\beta$  + CR は、1h 後の同一の混合物よりも、6nm 長波長シフトした。50 $\mu$ L KSE + A $\beta$  + CR は、1h 後のピークよりも 10nm 長波長側にピークが移動した。CR + A $\beta$  の示す結果は、アミロイドと水素結合し易い CR の特性と、KSE が加えられることでさらに、radical scavenger としての働きを有する KSE の水素供与あるいは、引き抜きの結果が示されたと考えられた。



**Fig.1.** Absorption spectra of water-soluble extracts from komatsuna seeds in the presence of A $\beta$ (1-42).

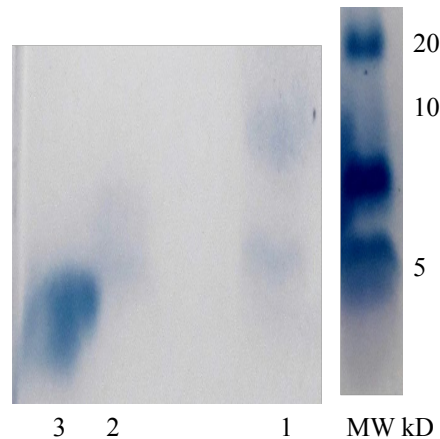
#### 分子量からの検討

A $\beta$  + KSE 混合物を、20 時間インキュベーション後、サンプルにおける SDS-PAGE による結果を以下 Fig.2 に示す。

- Lane.1 : A $\beta$  + KSE
- Lane.2: 50 $\mu$ M EGCG (Epigallocatechin 3-gallate) + A $\beta$
- Lane.3 : A $\beta$  only

Lane.3 の A $\beta$  の約 4.5kDa のバンドと比較して lane.1 は明らかに A $\beta$  のバンドが認識されなかった。また、比較物質である EGCG (lane.2)においても同様な結果が認められた (Fig.2)。KSE の存在によって、A $\beta$  に影響を及ぼすことが示唆された。

KSE が radical scavenger であることを確認している<sup>10)</sup>ことから、細胞死抑制機構が ROS 除去によるインダイレクトな機構であると当初考えられたが、Fig.2 の結果から、A $\beta$  が構造的な変化に影響を及ぼしていることが否定できない。



**Fig.2.** Effect of water-soluble extracts from komatsuna seeds on A $\beta$  (1-42)

1. KSE + A $\beta$
2. EGCG + A $\beta$
3. A $\beta$ (1-42)単独

#### 【課題 2】

インスリンを介して glucose の取り込みを行う場合、A $\beta$  (1-42)はインスリンと競合するの。

線維芽細胞において、一定量のインスリン、A $\beta$  及び濃度を変えた KSE 混合物の細胞投与におけるインスリン量の変化を測定する。インスリン量 (上澄み) は、KSE によって影響を受けるの。

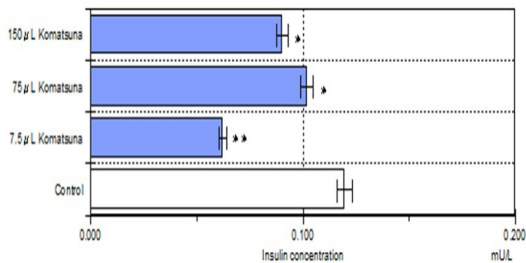
- a) 10 $\mu$ M-A $\beta$  (Control)
- b) 7.5 $\mu$ L-KSE + 10 $\mu$ M-A $\beta$
- c) 75 $\mu$ L-KSE + 10 $\mu$ M-A $\beta$
- d) 150 $\mu$ L-KSE + 10 $\mu$ M-A $\beta$

a) ~ d) のサンプルをヒト皮膚由来線維芽細胞に加え、24h 培養した後の上澄みにおけるインスリン量を測定した ( $\lambda_{ex}$ 485 nm/ $\lambda_{em}$ 535 nm)。

測定結果は、以下 Fig.3 に示す。

Control は最も上澄み中のインスリン濃度が高く、細胞がインスリンを使用していないことが示唆された。Control と比較して、b)の場合、有意(0.01%)に上澄みのインスリン量が減少した。また、b), c), d)の関係から KSE の濃度依存は認められなかった。至適濃度の存在が示唆される。最も有意に減少

させた b)において、細胞がインスリンを使用している結果となり、つまり、糖が取り込まれたと考えられた。c)の場合、最も細胞がインスリンを使用しておらず、結果として上澄みにインスリンが存在していたと考えられた。



**Fig.3.** Insulin levels in the presence of Aβ (1-42).

**【課題 3】**

AβはGlucoseの取り込みに影響を及ぼすのか。

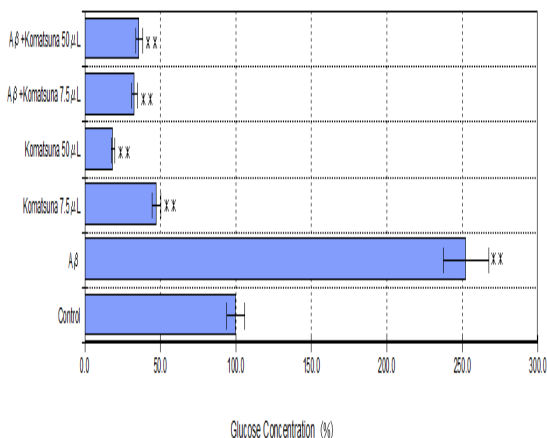
Glucose量(上澄み)からの検討

- a) Control (何も加えない)
- b) 10μM-Aβ 単独
- c) 7.5μL-KSE 単独
- d) 50μL-KSE 単独
- e) 7.5μL-KSE + 10μM-Aβ
- f) 50μL-KSE + 10μM-Aβ

b) ~ f)のサンプルをマウス海馬神経細胞に加え、48h 培養した後の上澄みにおけるGlucose量を570 nmにて測定した(Fig.4)

結果は control と比較して、それぞれ、b) 252.4%, c) 47.4%, d) 18.7%, e) 33.0%, f) 36.0%を示した。b)のAβ単独と比較してKSEの投与により、c), d), e), f)とも有意(0.01%)に減少した。

上澄み中の glucose 濃度が低いほど、逆に細胞における glucose の消費が大きいたことが考えられ、これらの結果は Aβ による glucose 消費の抑制を KSE が改善したことを示唆した。



**Fig.4.** Effect of KSE on glucose level in culture

supernatant of hippocampus neurons.

細胞内 Glucose 取り込み量の検討

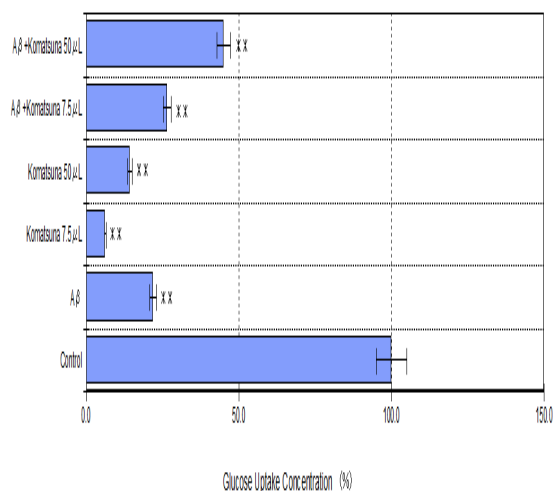
- a) Control (何も加えない)
- b) 10μM-Aβ 単独
- c) 7.5μL-KSE 単独
- d) 50μL-KSE 単独
- e) 7.5μL-KSE + 10μM-Aβ
- f) 50μL-KSE + 10μM-Aβ

b) ~ f) のサンプル及び非放射性

2-deoxyglucose を Glucose free 培地中のマウス海馬神経細胞に加え、1h 培養した後の非放射性 2-deoxyglucose の細胞内への取り込み量を測定( ex485 nm / em535 nm)した(Fig.5)

【課題 3】- において、上澄みにおけるそれぞれの取り込みを検討することとともに、細胞内への実際の取り込み量を確認するために行った。

Fig.5 において示すように、測定結果は Control と比較して、それぞれ b) 21.9%, c) 6.2%, d) 14.3%, e) 26.6%, f) 45.5%を示した。KSE は、濃度依存傾向が認められた。b)のAβ単独に比べ、Aβ+KSEのe), f)は、細胞内への glucose 取り込み量が高いため、Aβは glucose の取り込み障害に働く可能性が示された。また、e), f)の場合、KSEの濃度が高い方が glucose の取り込みが改善され、KSE単独の場合においても同様に濃度依存傾向が見られた。KSE単独は、Control また、Aβ+KSEの値よりも低い値を示した。b)のAβ単独よりもKSE+Aβ混合物のほうが高い値を示したことは、Aβに対してKSEが影響を及ぼした結果、例えば、Fig.1、Fig.2に示したようにKSEがAβの構造に対して変化を及ぼし、それらの機構によって、糖(glucose)代謝のコントロールを改善させた可能性が否定できない。



**Fig.5.** Effect of KSE on glucose uptake in hippocampus neurons.

[References]

- 1) Khandogin J and Brooks CL 3rd, (2007) PNAS.104(43), 16880-16885.
- 2) Ha C and Park CB, (2006) Langmuir. 22(16), 6977-6985.
- 3) Kuhla B et al.,(2003) J Neural Transm.,111(3), 427-439.
- 4) Xie L et al., (2002) J Neurosci. 22(10):RC221.
- 5) Kurochkin IV and Goto S, (1994) FEBS Lett. 345(1), 33-37.
- 6) Okada Y and Okada M, (2013) J Pharm Bioallied Sci. 5(2), 141-147.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Okada Y and Okada M, Komatsuna seed extracts protection against amyloid  $\beta$  (1-42)-induced neuronal cell death. J Diabetes Metab, 査読有, Vol. 5(5), 2014. DOI: 10.4172/2155-6156.1000368

〔学会発表〕(計 4 件)

岡田悦政、岡田瑞恵

食用植物種子抽出物によるアミロイド  $\beta$  誘導線維芽細胞死の抑制、日本家政学会第 66 回大会、2014.5.23 ~ 2014.5.25、福岡

岡田悦政、岡田瑞恵

Influence by the Japanese mustard spinach seed extract on amyloid  $\beta$  structure. 第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11 ~ 2013.9.13、横浜

岡田悦政、岡田瑞恵

植物種子抽出物によるアミロイド  $\beta$  構造への影響、日本家政学会第 65 回大会、2013.5.17 ~ 2013.5.19、東京

岡田悦政、岡田瑞恵

コマツナ種子抽出物のアミロイド  $\beta$  (1-42) 誘導神経細胞死の抑制、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.15 ~ 2014.10.18、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田悦政 (OKADA, Yoshinori)

愛知県立大学・看護学部・准教授

研究者番号：60224036

(2) 研究協力者

岡田瑞恵 (OKADA, Mizue)

中部学院大学非常勤講師、Yms Laboratory