

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780121

研究課題名(和文) 学習・記憶障害の抑制効果を持つカフェオイルキナ酸の有用性の解明

研究課題名(英文) Research for Caffeoylquinic acid on the inhibitory effects of leaning and memory disorder

研究代表者

ハン ジュンギョ (HAN, Junkyu)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40455928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：SH-SY5Yを用い、ADの代表的な原因物質であるAβとグルタミン酸で併用処理することにより学習・記憶障害の細胞を作成した。その細胞を用いてマイクロアレイを行った結果、Aβ分解、抗酸化、細胞周期、抗アポトーシスに関わる遺伝子発現が低下した。しかし、NMDA受容体関連遺伝子の発現変化は確認できなかった。1231N1のApoE4産生におけるCQAの影響を調べるため、ELISAを行ったが、ApoE4の分泌量が微量のため、検出できなかった。CQAを30日間経口投与したSAMマウスの脳において、ApoE4抗体を用いた免疫染色を行った結果、SAMマウスの海馬においてApoE4の発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：SH-SY5Y cells were used to prepare the cell model of defects of leaning and memory by co-treatment with Aβ and the glutamic acid that were a representative causative agent of AD. In microarray result using the cell model, it was founded that the expression of genes concerning with Aβ resolution, anti-oxidation, a cell cycle and anti-apoptosis were decreased. However, the NMDA receptor-related gene expression was not changed. To check influence of CQA in the ApoE4 production of 1231N1 cells, ELISA was performed. But ApoE4 was not detected, because the quantity of secretion of ApoE4 was very few. As a result of having performed the immunostaining using the ApoE4 antibody in the brain of the SAM mice with CQA or al administration for 30 days, I confirmed expression of ApoE4 in the hippocampus of the SAM mouse.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アルツハイマー型認知症予防 カフェオイルキナ酸 抗老化

## 1. 研究開始当初の背景

カフェオイルキナ酸 (Caffeoylquinic acid; CQA) はコーヒー豆から初めて単離された成分であり、コーヒー豆の他にサツマイモ、果物、野菜などに多く含まれる成分である。高い抗酸化性を有する CQA は抗腫瘍、抗高血糖、抗炎症などの効果が報告されている (*Euro. J. Pharma. Sci.* 2005, 26, 62-70; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005, 13, 5814-5818)。

ところが、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease; AD) は、主な発病原因の一つとして神経毒性を持つアミロイドβ (Aβ) タンパク質がフリーラジカルの増加を誘導し、ミトコンドリア障害による神経細胞死が挙げられる。申請者は食品成分である CQA の高い抗酸化性に着目し、Aβが誘導するフリーラジカル増加から CQA が神経細胞を保護する可能性があるかと推測した。学習・記憶障害が特徴である AD は、後期高齢社会である日本において2025年にはADの患者数が220万人までに達すると予測されている(平成20年、厚生労働省「患者調査」)。さらに、高齢化による医療費増大の背後にある社会保障費負担の問題から、病気になる前に予防する「予防医療」の推進策が医療費抑制策の一つとして注目されている。特に、食事(食品或は食品成分)は予防医療において核になりうる重要なポイントであり、予防医療の推進にはより多くの人々が普通の生活に取り入れやすい手軽な方法や食品、或は食品成分を用いることが予防医療の推進には重要であると考えられる。その点において食品成分である CQA は AD に対する予防医療の有効な食品成分になる可能性が高い。

本研究では、コーヒー豆や各種野菜や果物に含まれている CQA を用いて神経細胞保護や学習・記憶障害抑制に関する有用性及びその作用機序を明らかにする。今まで申請者は、Aβにより誘発される神経細胞傷害から CQA が神経細胞を保護することを始め、老化促進モデルマウスの学習・記憶障害を有意に CQA が抑制することを見出した(特許; PCT/JP2007/052151 等、原著論文; *Neuroscience*, 2010, 169, 1039-1045; *Chem.Pharm.Bull.*, 2011, 59, 502-507; *Cytotechnology*, 2011, 63, 191-200 等)。CQA を経口投与した老化促進モデルマウスは学習・記憶障害抑制効果が見られ、フラットホームまでの回避時間が実験期間後半には著しく短縮された。そこで本申請では、食品成分である CQA の学習・記憶障害抑制における作用機序の一端を明らかにするため、神経細胞及びマウスを用いた学習・記憶障害モデルを作成し、分子生物学手法による分析を行う。特に、学習・記憶に深く関与する長期増強 (Long-term potentiation; LTP) の形成障害抑制における CQA の効果を中心に研究を行った。

## 2. 研究の目的

コーヒー豆や各種野菜や果物に含まれているカフェオイルキナ酸 (CQA) を用いて神経細胞保護や学習・記憶障害抑制に関する有用性及びその作用機序を明らかにし、CQA の学習・記憶障害抑制に対する新しい生理活性機能を提案する。さらに、本研究により明らかにした CQA の学習・記憶障害抑制に関する作用機序はアルツハイマー型認知症の病因解析にも応用できる可能性がある。食品成分であるカフェオイルキナ酸の学習・記憶障害抑制に関する有用性を解明し、食品成分によるアルツハイマー型認知症予防の可能性を提案する。

## 3. 研究の方法

初年度には、神経細胞モデルを用いた *in vitro* 実験を中心に行った。学習・記憶障害細胞モデル (AD 原因物質による神経細胞損傷モデル) を作成し、大きく2つの実験を行った。

(1) 学習・記憶障害細胞モデルの作成及び神経細胞保護効果について; ヒト由来神経芽細胞である SH-SY5Y 細胞を用い、AD の代表的な原因物質である Aβとグルタミン酸で併用処理することにより学習・記憶障害の細胞モデルを作成する。上記細胞モデルにおける CQA の神経細胞傷害保護作用を明らかにするため、MTT アッセイにて細胞生存率の測定を行う。

(2) マイクロアレイ手法による作用機序の解析について; Aβとグルタミン酸で併用処理による神経細胞傷害に対する CQA の保護効果に関する作用機序をマイクロアレイ手法にて明らかにする。上記細胞モデルにおける全遺伝子の発現変動を調べるため、細胞から Total RNA を抽出し、CQA とグルタミン酸処理により発現が変動した遺伝子を分析した。

平成25年度では、老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8; SAM-P8) を用いた *in vivo* 実験を中心に行った。CQA を経口投与し、老化促進モデルマウスの脳、特に学習・記憶能を制御する器官である海馬や *in vitro* 実験においてはアストロサイト細胞を対象に下記の実験を行った。

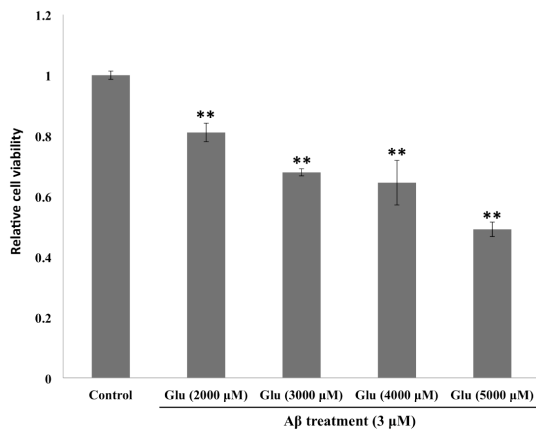
(1) 老化促進モデルマウスの海馬における NMDA 受容体の発現及び局在の変化について; *in vivo* レベルにおける CQA の LTP 形成障害抑制に及ぼす影響を明らかにするため、CQA 溶液を30日間経口投与した老化促進モデルマウス群や非処理老化促進モデル群及び正常マウス群から脳を摘出し、ミクロトームにて海馬の切片を作製した。ApoE4 の抗体を用いた海馬切片の免疫染色を行い、海馬における ApoE4 の発現及び局在に対す

る CQA の影響を *in vivo* レベルで調べた。

(2) アストロサイトにおける ApoE4 の発現を ELISA にて調べた。ヒト由来アストロサイトーマ細胞である 1321N1 細胞を CQA で処理し、12、24h 処理後の Human ApoE4 タンパク質の量を測定した。

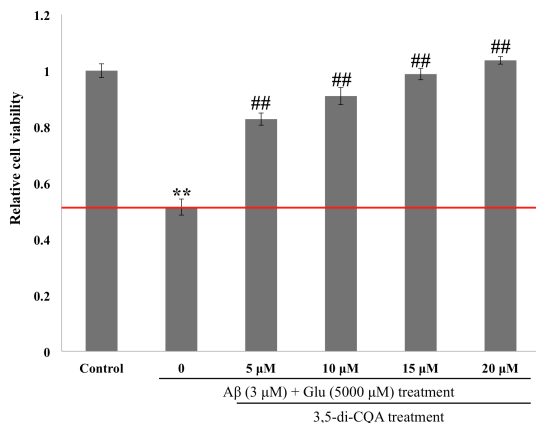
#### 4. 研究成果

アミロイドβとグルタミン酸 (5 mM) の併用処理によるアルツハイマー型認知症細胞モデルの構築をヒト由来神経細胞を用いて行った。その結果、アミロイドβとグルタミン酸併用処理が、既存のアミロイドβ単独処理において神経細胞損傷 (IC50) が誘導された 10~20 μM より低い 3 μM において神経細胞損傷が誘導された (図 1)。



【図 1】アミロイドβとグルタミン酸の併用処理によるヒト由来神経細胞の損傷誘導

さらに、構築したアミロイドβとグルタミン酸併用処理によるアルツハイマー型認知症細胞モデルを用いて CQA の神経細胞保護効果の確認を行った。その結果、CQA 濃度 5, 10, 15, 20 μM において神経細胞保護効果が確認された (図 2)。



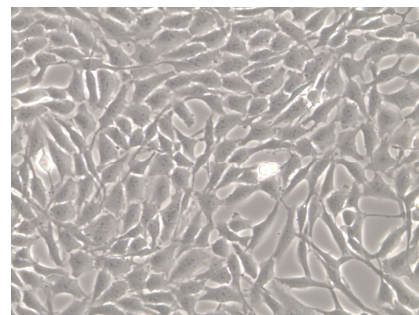
【図 2】アミロイドβとグルタミン酸の併用処理に対する CQA の神経細胞保護効果

アミロイドβとグルタミン酸併用処理に対する CQA の神経細胞保護効果の作用メカニズムを解明するため、網羅的遺伝子発現の分析が可能なマイクロアレイ手法を用いた。アミロイドβとグルタミン酸併用処理のみの細胞における遺伝子発現群 (Aβ + Glu) に比べ、神経細胞保護効果が誘導された CQA 処理群 (Aβ + Glu + di-CQA) でその遺伝子発現が低下している遺伝子を調べた結果 (表 1)、Aβの分解に関わる遺伝子である **SCPEP1** (Serine carboxypeptidase 1) と抗酸化性に関わる遺伝子である **SOD1** (Superoxide dismutase 1)、**NQO1** (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1)、**MT2A** (Metallothionein 2A)、**HSPA1A** (Heat shock 70 kDa protein 1A) の発現が低下し、細胞周期に関わる遺伝子である **NQO2** (NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2)、**MALAT1** (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) と抗アポトーシスに関わる遺伝子である **NQO1**、**NQO2**、**MT2A** の発現が低下した。しかし、NMDA 受容体関連遺伝子の発現の変化は確認できなかった。

【表 1】マイクロアレイの分析結果

	Aβ+Glu	di-CQA	Aβ+Glu+di-CQA	機能
SCPEP1	-1.40816**	-1.16017*	-1.17695*.#	Aβの分解
SOD1	-1.47547*	1.02148	-1.30541	
NQO1	-1.40255**	-1.04813	-1.03901##	抗酸化性
MT2A	-1.45959**	1.08017	-1.11428#	
HSPA1A	-3.01988**	-1.07877	-1.88387*.#	
NQO2	-1.4747**	-1.16819**	-1.15432**.,##	細胞周期
MALAT1	-1.55263**	1.02991	-1.15907*.,##	
NQO1	-1.40255**	-1.04813	-1.03901##	
NQO2	-1.4747**	-1.16819**	-1.15432**.,##	抗アポトーシス
MT2A	-1.45959**	1.08017	-1.11428#	

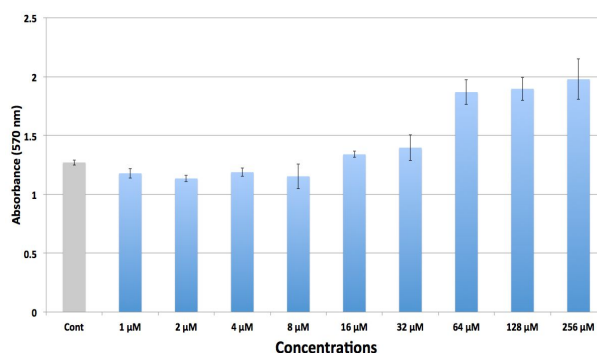
以上の結果から NMDA 受容体関連以外の作用が CQA による神経細胞保護効果に関する可能性が高いため、新しい生体因子ターゲットを検討した。その結果、アルツハイマー型認知症の発症と深く関与し、神経モデルにおいて細胞エネルギーにも深く関与するアストロサイト由来の ApoE4 に注目した。本研究では、アストロサイトーマである 1321N1 細胞 (図 3) を用いて実験を行った。



【図 3】アストロサイトーマ細胞 (1321N1) の写真

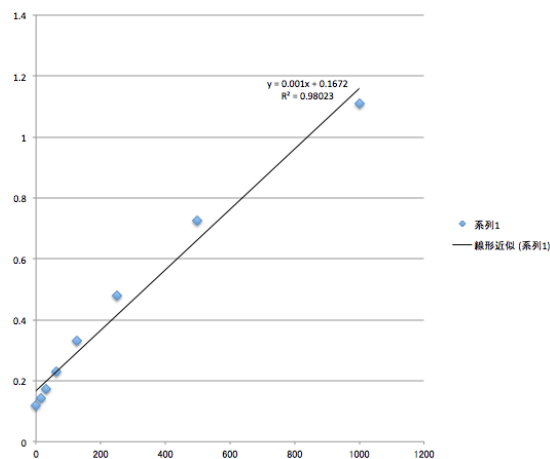
まず、CQA のアストロサイトーマにおけ

る影響を調べるため、MTT 試験を行った。その結果、CQA 処理濃度 32, 64, 128, 256  $\mu\text{M}$  においてアストロサイトーマの増殖促進効果が見られた(図4)。この効果はヒト由来神経細胞でも見られた効果である。



【図4】CQA のアストロサイトーマの細胞増殖に及ぼす影響

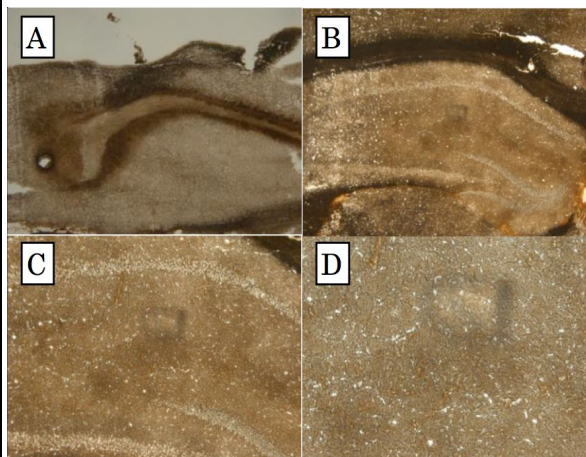
さらに、アストロサイトーマの ApoE4 タンパク質産生における CQA の影響を調べるため、ApoE4 の ELISA を用いた。その結果、図5のように ApoE4 スタンダードは測定できたが(図5)、CQA 処理時間 12h と 24h 後の培地に分泌された ApoE4 は測定できなかった。その理由としては分泌される ApoE4 の量が少ないことが考えられる。現在、細胞から抽出する方法を検討中である。



【図5】ApoE4 ELISA のスタンダード測定の結果

*in vivo* 実験では、老化促進モデルマウス (SAM-P8) において学習・記憶障害抑制効果を誘導した CQA 濃度である 6.7 mg/Kg・Day を 30 日間経口投与した老化促進モデルマウス (SAM-P8) とその正常マウス (SAM-R1) から脳を摘出し、ApoE4 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、CQA を 30 日間経口投与した SAM マウスの海馬において ApoE4 の発現が確認できた(図6)。特に、SAM マウスの海馬において ApoE4 の発現が増加することを見出した。今後、SAM マウスの脳における ApoE4 発現に対する局

在の分析を行う予定である。



【図6】ApoE4 抗体による老化促進モデルマウスの海馬における免疫染色写真：(A)海馬部位、(B)海馬×5、(C)海馬×10、(D)海馬×20

## 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)

[学会発表](計 1件)

12<sup>th</sup> ISANH International Conference on Oxidative Stress, Redox States & Antioxidants, 2013年7月3日~7日, フランス, パリ, HAN Junkyu, IMPROVEMENT EFFECT OF CAFFEOYLQUINIC ACID ON MEMORY AND LEARNING IMPAIRMENTS.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

ハン ジュンギユ (HAN, Junkyu)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：40455928