

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830056

研究課題名(和文)フラボノイド配糖体による脱髄回復効果の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Effect of flavanone glycosides on myelin repair

研究代表者

清和 千佳(Seiwa, Chika)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60399459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生薬・陳皮は脳の脱髄を回復させる効果をもっていることから、脱髄回復効果の分子メカニズムを明らかにするため、陳皮の有効成分の1つであるヘスペリジン(Hes)を用いて髄鞘形成担当細胞の前駆細胞(OPC)への効果を培養系で検討した。その結果、Hesの投与で髄鞘形成に必須であるRNAヘリカーゼDdx54分子を発現するOPCが増加することが明らかになった。再髄鞘化に関与するOPCは老化に伴って減少するがHesによってOPCを増やすことができることから、脱髄に関与する難治性脳疾患が陳皮によって改善される可能性が期待された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that demyelination was prevented by herbal medicine chinpi, a type of dried citrus peel and showed that RNA helicase Ddx54 protein interact with myelin basic protein (MBP) mRNA. Furthermore, Ddx54 knockdown caused a significant decrease on the MBP, suggesting play an important role in CNS myelination.

In this study, we have investigated whether administration of hesperidin (one of the major active constitution of chinpi) accelerate Ddx54-expressing OPCs proliferation. We observed that BrdU incorporation rate when OPCs were cultured in the presence of hesperidin (10uM) for 24 hour. Ddx54 positive OPCs were markedly increased by treatment of hesperidin in comparison with control cultures. The stimulation of functional OPCs with hesperidin could serve as a valuable tool for repairing functional damage caused by demyelinating diseases suggesting a possible therapeutic herbal medicine.

研究分野：神経生物学

キーワード：OPC フラボノイド Ddx54

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳を守るミエリン

神経軸索の周囲を取り巻くミエリン（髄鞘）は、哺乳類の脳において高速で正確な情報処理を行うために必須の存在である。それだけでなく近年の研究により、ミエリンを形成するオリゴデンドロサイト (OL) とその前駆細胞 (OPC) は、神経細胞の生存や正常な働きの維持のため、能動的に働くことがわかってきた。脳の中で OL の働きに異常が生じ、ミエリンが壊れる（脱髄）と、多発性硬化症のような QOL を著しく低下させる重篤な病気を引き起こす。さらに最近の研究では、アルツハイマー病や統合失調症のような今まで神経細胞の異常について研究されてきた病気でさえ、OL とミエリンの変化（脱髄など）が実は関与することが報告されるようになってきた。ミエリンと OL の機能を明らかにすることが脳の働きの解明や脳の病気の治療法確立に重要となってきた。

(2) 壊れたミエリンを治す漢方薬

申請者らは脳においてミエリン形成を行うオリゴデンドロサイト (OL) とその前駆細胞 (OPC) の働きの重要性に着目し、OPC から OL への分化とミエリン形成に至るシグナル伝達の分子メカニズムを中心に研究を続けており、その過程で、漢方薬の人参養栄湯に壊れたミエリン（脱髄）を回復させる効果があることを見いだした。具体的には 30 ヶ月齢の老齢ラットに漢方薬・人参養栄湯を投与すると、電子顕微鏡下で観察される老齢特有の髄鞘の異常が改善されること、髄鞘形成担当細胞の前駆細胞 (OPC) の数が増加すること、およびその分子メカニズムの解明にはミエリン塩基性タンパク質 (MBP) の発現調節機構が重要であることを明らかにした (Kobayashi, Seiwa et al., Int. Immunopharm., 2003, Seiwa et al., J. Neurosci. Res., 2007)。

(3) 漢方薬の何が効くのか？

漢方薬は数種類の生薬から配合されているので、人参養栄湯に含まれる生薬のうち何が最も脱髄回復に効果があるのか調べた結果、ウンシュウミカンの果皮から作られる陳皮（チンピ）であることがわかった。さらにチンピに含まれる有効成分を明らかにするために、チンピの水溶液を高速液体クロマトグラフィーによって解析したところ、有効成分はヘスペリジンとナリルチン (H/N) という 2 種類のフラボノイド配糖体であることを明らかにした (Sato, Seiwa, et al., eCAM, doi:10.1093/ecam/neq 001, 2011)。また、私たちはミエリン再生に必須の MBP の発現を制御する、OL 特異的な RNA ヘリカーゼタンパク (Ddx54) を発見し、Ddx54 を RNA 干渉によりノックダウンするとミエリン形成が行われなことを明らかにした (Ueki, Seiwa et al., J. Neurosci. Res., 2011, Zhan, Seiwa et al., J. Neurosci. Res., 2012)。H/N によって OL の Ddx54 の発現が促進することがミエリン再生の鍵となると考えられる。

2. 研究の目的

生薬チンピの有効成分フラボノイド配糖体（ヘスペリジン/ナリルチン）がミエリン形成担当細胞の前駆細胞にどのような分子メカニズムを介してミエリン形成を促進させるのかその薬効作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織染色

shiverer mutant mouse (2 ヶ月齢) に 1 ヶ月間 0.5%チンピを飲水で与えた後、麻酔下で 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) を用いて灌流固定を行った。大脳を取り出し、さらに 4%PFA にて後固定とパラフィン包埋の作製を行い、マイクロトームで脳梁部位を含む coronal 切片を作った。脱パラフィンを行った切片に抗 olig2 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

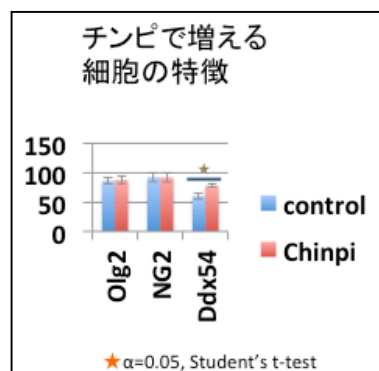
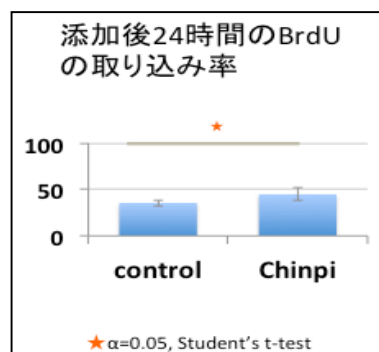
(2) 培養実験

- ① 妊娠17日目のICRマウスの胎児の脳より primary culture を行い、mix cell を5日間培養した。その後 passage を行い、清和らの方法 (J. Neurosci. Res., 2002) によって OPC を採取した。OPC にチンピ (0.1%)、ヘスペリジン (10 μ M) を添加し、抗 olig2 抗体、抗 NG2 抗体、抗 Ddx54 抗体で細胞免疫染色を行った。
- ② 同様の方法で OPC を採取し、チンピ、ヘスペリジンを添加した後 24 時間 BrdU を取り込ませて、抗 BrdU 抗体によって免疫染色を行い、細胞の増殖を調べた。
- ③ 同様の方法で OPC を採取し、ヘスペリジン、ナリルチン (各 10 μ M)、Farnesyltransferase inhibitor (FTI-277) (5 μ M)、Farnesylpyrophosphate (0.5 μ M)、Lovastatin (1 μ M) を添加し、24 時間後または 48 時間後に細胞数を測定した。
- ④ 抗ヘスペリジン抗体の作製
非タンパク質であるヘスペリジンに対するポリクローナル抗体を作製するため、抗原に BSA/KLH を結合させる方法 (Barthe et al., Phytochemistry, 27, 249-254, 1988) を行った。
- ⑤ ウェスタンブロット解析
ディッシュ上の OPC を収穫し、RIPA バッファーを加えてホモジネートしてサンプルを作製した。
サンプルを抗 transferase 抗体、抗ヘスペリジン抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。

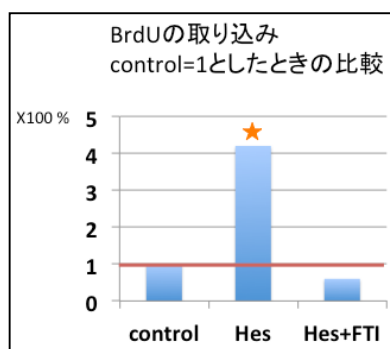
4. 研究成果

組織免疫染色：チンピの効果を明らかにするため、0.5%のチンピ水溶液をミエリン形成不全マウス (shiverer mouse, adult) に投与、1ヶ月後の脳切片 (脳梁付近の冠状断面) を OPC のマーカーで免疫染色した結果、チンピ投与で OPC が顕著に増加したことがわかった

(2) 培養実験：チンピの効果を vitro の系で明らかにするため、培養 OPC にチンピを添加して 24 時間の BrdU の取り込みを調べた結果、無添加に比べてチンピを添加すると OPC の増殖が促進されており、またそれらの細胞の特徴を免疫細胞染色法によって調べると特に Ddx54 陽性の OPC が増えていることがわかった (下図)。



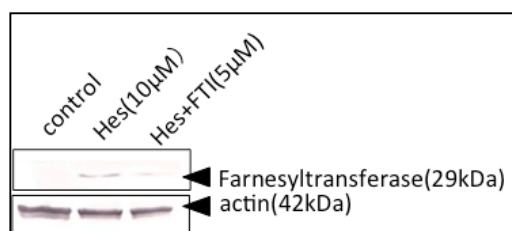
さらに、培養 OPC にチンピの有効成分の一つであるヘスペリジンを単独で 10 μ M で添加し、24 時間の BrdU の取り込みを調べた結果、無添加と比べ、ヘスペリジンを添加した OPC には増殖効果がみられた (下図)。



また、MBP 遺伝子を欠損したミエリン形成不全マウス (shiverer mouse) 胎児脳由来 OPC

にヘスペリジン(10 μ M)を添加し、24 時間後に抗 Ddx54 抗体を用いて細胞免疫染色を行い、Ddx54 陽性の OPC 数を比較したところ、野生型マウス由来 OPC と同じようにヘスペリジン添加によって OPC の増殖が促進することがわかった。

(3) ウェスタンブロット解析：チンピによる OPC の増殖効果の分子メカニズムを明らかにするため、培養 OPC にヘスペリジン/ナリルチン (各 10 μ M) 添加し 24 時間後、48 時間後に細胞数をカウントした。そのさい、過去の DNA マイクロアレイの結果から (未発表データ)、プレニル化に関する分子がチンピの投与によってマウス的大脑で変化がみられたため、ヘスペリジン/ナリルチン添加と同時にファルネシル基転移酵素 (Farnesyltransferase) のインヒビターである FTI (5 μ M) を添加すると、ヘスペリジン/ナリルチンによる OPC 増殖効果抑えられることがわかった (下図)。



さらにヘスペリジンの OPC 細胞内での標的分子を探索するため、抗ヘスペリジンポリクローナル抗体をまず作製した。培養 OPC および培養アストロサイトにヘスペリジンを添加し 24 時間後に細胞を収穫、それらをサンプルとして抗ヘスペリジン抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、約 30, 75, 100 kDa の分子量の特異的なシグナルが示された。これらがヘスペリジンの標的分子である可能性が示唆された。

これらの研究成果により、in vivo、in vitro の系でミエリン形成不全のマウスであってもチンピとその有効成分であるヘスペリジンは OPC に対して増殖効果があること、

さらにそれらの増殖した細胞は Ddx54 陽性であることが示された。Ddx54 は脱髄/再ミエリン形成のさいに重要な鍵となる分子であるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) と密接な関係があり、RNA 干渉実験により Ddx54 の機能を阻害するとミエリン形成が正常に行われないため (Zhan et al., J.N.R., 91, 2013)、Ddx54 陽性の OPC は実際にミエリンを巻くことができる機能性の OPC であると考えられる。チンピとヘスペリジンはその機能的な OPC を増殖させることが示唆された。また、その増殖の分子メカニズムにはファルネシル化が関与していることが明らかになった。漢方薬、生薬の薬効の分子メカニズムは国内外の報告でもほとんど解明されておらず、本研究により、生薬に含まれるフラボノイド配糖体の薬効分子メカニズムにプレニル化が関与することが明らかになった点はインパクトがあると考えられる。今後はヘスペリジンの細胞内の標的を明らかにすることによって、さらに分子メカニズムの解明が進み、ミエリンが関与するアルツハイマー病など脳の難病の治療法に貢献できると思われる。

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 2 件)

- ① Uruse, M., Yamamoto, M., Sugawa, M., Matsuura, K., Sato, Y., Seiwa, C., Watanabe, K., Aiso, T. and Asou, H. (2014) Phase separation of myelin sheath in Triton X-114 solution: predominant localization of the 21.5-kDa isoform of myelin basic protein in the lipid raft-associated domain. J. Neurochem., 155(4), 265-271. Doi: 10.1093/jb/mvu005, 査読有。
- ② Zhan, R., Yamamoto M., Ueki, T., Yoshioka, N., Tanaka, K., Morisaki, H.,

Seiwa, C., Yamamoto, Y., Kawano, H., Tsuruo, Y., Watanabe, K., Asou, H. and Asio, T. (2013) A DEAD-box RNA helicase Ddx54 protein in oligodendrocytes is indispensable for myelination in the central nervous system. J. Neurosci. Res., 91, 335-348. Doi:10.1002/jnr.23162. Epub 2012 Dec 14. 査読有.

[学会発表] (計2件)

- ① 阿相皓晃、清和千佳 「チンピ^o (ウンシユウミカン果皮) による脱髄回復効果の作用機序解明」第12回日本機能性食品医用学会総会, 2014年, 12月14日, 京都、京都市、国立京都国際会館
- ② 清和千佳、山本雅浩、植木俊之、阿相皓晃「OPCの増殖を促すヘスペリジン/ナリルチン (チンピの有効成分) の分子機構にはプレ

ニル化が関与する」Neuro2013, 2013年, 6月20日-23日、京都、京都市、国立京都国際会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他] 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清和 千佳 (SEIWA Chika)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号: 60399459

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし