

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：37119

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700771

研究課題名（和文） 赤ワインポリフェノールの交感神経系へ及ぼす影響

研究課題名（英文） Red wine polyphenols on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells.

研究代表者

坂巻 路可（SAKAMAKI RUKA）

西南女学院大学・保健福祉学部・准教授

研究者番号：80389486

研究成果の概要（和文）：本研究では、赤ワインに含まれる様々なポリフェノール化合物のなかで、カテコールアミン神経系への作用を示すフラボノイド化合物について検討した。フラボノイド化合物であるシリマリル、ケンフェロール、ケルセチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体、電位依存性 Na チャネル、電位依存性 Ca チャネルのそれぞれ異なったイオンチャネルを阻害することによりカテコールアミン分泌を抑制することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the study is to examine the effects of red wine polyphenols on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. Our findings suggest that flavonoids such as silymarin, kaempferol, quercetin modulate the functions of the adrenal medulla and probably noradrenergic neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：ポリフェノール、赤ワイン、副腎髄質細胞、フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

近年、植物成分はその機能が再評価され、特定保健用食品として注目を集めているものが多く存在している。その中でも疫学調査や動物実験により、ポリフェノールの抗酸化作用を代表する生理機能に関心が高まっている。ポリフェノールとは、同一分子内に2個以上のフェノール性水酸基を有する化合物で、光合成によって作り出された植物の樹皮、表皮、種子に多く含まれる色素、苦味の

成分である。赤ワインに含まれるポリフェノールの種類は数が極めて多く、現在400種類程度の存在が知られている。生理機能として抗酸化作用の他に、生体内酸化ストレス抑制、抗炎症作用、血小板凝集の抑制、がん、心疾患、糖尿病など各種疾病に対する抑制、予防作用などが次々と発見され報告されているが、神経機能への作用についての報告は、研究代表者の知る限りほとんど見当たらない。本研究では、赤ワイン

に含まれる様々なポリフェノールの中で、カテコールアミン神経系機能へ作用を示すものを細胞レベルで同定し、実験動物を用いた系で生体内での影響を解析して、最小有効摂取量や作用機序を多角度から検討していくことを目的としている。

2. 研究の目的

フラボノイドはフラバンの誘導体を総称し、代表的なポリフェノールで、果物の果皮や種子に高濃度に含まれる。生体の生理機能については、活性酸素の消去作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用、脂質代謝の改善などが報告されている。赤ワインの摂取量が多いフランスでは、脂肪摂取量が多いにもかかわらず、虚血性心疾患による死亡率が他のヨーロッパ諸国に比べて低いという「フレンチパラドックス」についての研究があり、心血管疾患におけるフラボノイドの作用に注目が集まっている。赤ワインには多様なフラボノイドが含まれ、類似構造を示す化合物も多く存在する。疫学研究や動物実験において、その有用性が検討されている一方で、神経系への作用についての報告は極めて少ない。赤ワインに含まれるレスベラトロールについては血小板凝集抑制、血栓症予防、アルツハイマー病のリスク低減等が報告され、その有効性に注目が集まっている。本研究室においてもレスベラトロールがイオンチャンネルを阻害して、カテコールアミン分泌を抑制することを以前に報告した。

赤ワインには他にも多くのフラボノイドが存在することが知られている。本研究では、神経堤由来のウシ副腎髄質初代培養細胞を用いて、赤ワインの様々なフラボノイド化合物について、カテコールアミン神経系への作用を検討する。

3. 研究の方法

(1) ウシ副腎髄質細胞の分離と培養

副腎髄質細胞はウシ副腎髄質切片をコラゲナーゼ処理により分離し、Eagle's MEM 培養液を用いて、CO₂ インキュベーター内で培養した。

(2) 培養ウシ副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌反応及び定量

培養ウシ副腎髄質細胞を刺激して、反応液中に遊離されたカテコールアミンは水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法にて蛍光定量した。

(3) 細胞内[Ca²⁺]_i 変動の測定

培養ウシ副腎髄質細胞に Fura-2-AM を取り込ませ、刺激による [Ca²⁺]_i 変動をレシオイメージングシステムにて測定した。

4. 研究成果

(1) フラボノイド化合物の中で シリマリリン (Silymarin), ケンフェロール (Kaempferol), アピゲニン (Apigenin), ケルセチン (Quercetin) はアセチルコリン受容体刺激によるカテコールアミン分泌を抑制した (Fig. 1)。

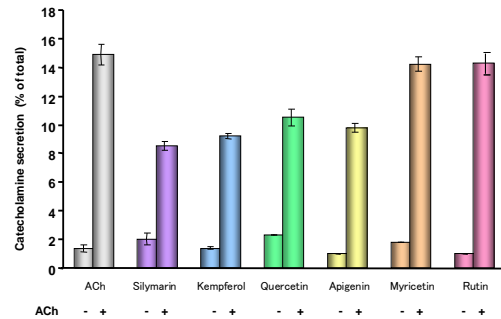


Fig.1 Effect of various flavonoids on acetylcholine-induced catecholamine secretion

(2) シリマリリンは、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激、電位依存性 Na チャネルの活性化によって引き起こされるカテコールアミン分泌を濃度依存的 (10-100 μM) に抑制した (Fig. 2)。

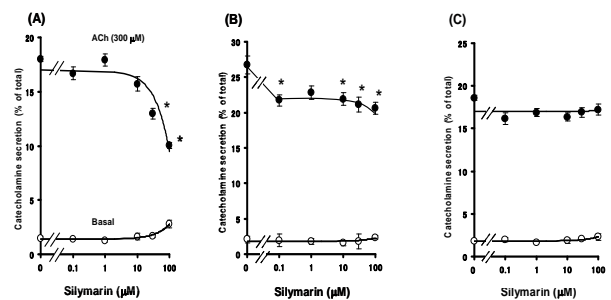


Fig.2 Concentration-inhibition curves of Silymarin for acetylcholine, veratridine and highK⁺ induced catecholamine secretion

(3) ケルセチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激、電位依存性 Na チャネルの活性化によって引き起こされるカテコールアミン分泌を濃度依存的 (10-100 μM) に抑制した (Fig. 3)。Fura-2 を用いた細胞内 Ca²⁺濃度変動 ([Ca²⁺]_i) の測定においてニコチン性アセチルコリン受容体刺激時の [Ca²⁺]_i をケルセチンは抑制した (Fig. 4)。

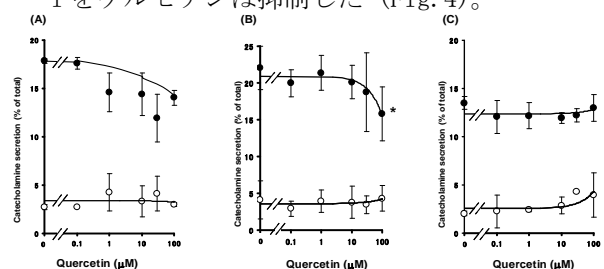


Fig.3 Concentration-inhibition curves of Quercetin for acetylcholine, veratridine and highK⁺ induced catecholamine secretion

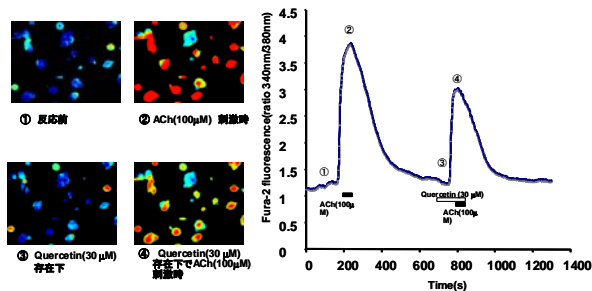


Fig.4 Effect of quercetin on the Ca^{2+} rise induced by acetylcholine in bovine adrenal medullary cells.

(4) ケンフェロールは、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激、電位依存性 Na チャネル、電位依存性 Ca チャネルの活性化によって引き起こされるカテコールアミン分泌を濃度依存的 (10-100 μM) に抑制した (Fig. 5)。また、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ をケンフェロールは抑制した (Fig. 6)。

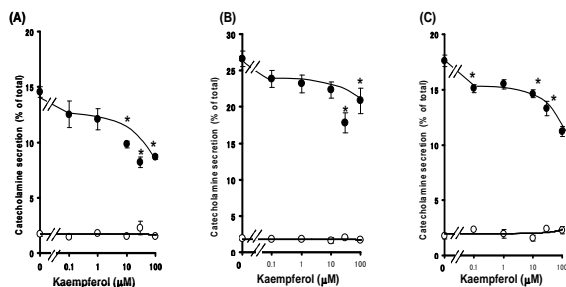


Fig.5 Concentration-inhibition curves of kaempferol for acetylcholine, veratridine and high K^{+} - induced catecholamine secretion

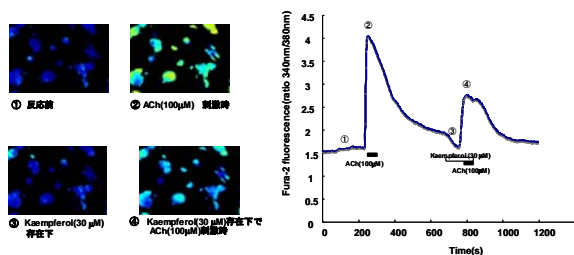


Fig.6 Effect of kaempferol on the Ca^{2+} rise induced by acetylcholine in bovine adrenal medullary cells.

以上の結果より、フラボノイド化合物であるシリマリル、ケンフェロールは、ニコチン性アセチルコリン受容体、電位依存性 Na チャネルを阻害することにより、ケルセチンはニコチン性アセチルコリン受容体、電位依存性 Na, Ca チャネルを阻害して、交感神経系機能解析のモデル系である副腎髄質細胞におけるカテコールアミン分泌を抑制することを明らかにした。

これらのフラボノイド化合物が交感神経系機能に影響する可能性が示唆された。

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 2 件)

① Ruka Sakamaki, Yumiko Toyohira, Kenji Toyama, Nobuyuki Yanagihara, Effect of red wine flavonoids on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. , Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, Supplement 1 Vol.118, 2012, 240P

② Yumiko Toyohira, Ruka Sakamaki, Hideki Itoh, Go Obara, Kojiro Takahashi, Susumu Ueno, Kenji Toyama, Nobuyuki Yanagihara, Effect of quercetin and auraptene, citrus polyphenol, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. , Journal of Pharmacological Sciences, 査読有, Supplement 1 Vol. 115, 2011, 149P

[学会発表] (計 6 件)

① 坂巻路可、赤ワイン含有のフラボノール類のカテコールアミン分泌に及ぼす影響、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 16、国立京都国際会館

② 豊平由美子、赤ワインポリフェノールのレスベラトロールがノルアドレナリントランスポーター機能に及ぼす影響、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 14、国立京都国際会館

③ 坂巻路可、培養ウシ副腎髄質細胞におけるカテコールアミン分泌に対するフラボノール類ケルセチンやケンフェロールの作用、第 29 回産業医科大学総会、2011. 10. 18、産業医科大学

④ 豊平由美子、柑橘類ポリフェノールのカテコールアミン分泌に及ぼす影響、第 84 回日本薬理学会年会、2011. 3. 22-24 (誌上開催)、パシフィコ横浜

⑤ 坂巻路可、培養ウシ副腎髄質細胞のポリフェノール化合物の作用、第 28 回産業医科大学総会、2010. 10. 12、産業医科大学

⑥豊平由美子、柑橘系機能成分のカテコール
アミン分泌に及ぼす影響、第4回トランス
ポーター研究会九州部会、2010.9.11、ハ
ウステンボス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂巻 路可 (SAKAMAKI RUKA)
西南女学院大学・保健福祉学部・准教授
研究者番号：80389486

(2) 研究分担者

なし

連携研究者

豊平 由美子 (TOYOHIRA YUMIKO)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：90269051
柳原 延章 (YANAGIHARA NOBUYUKI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：80140896
外山 健二 (TOYAMA KENJI)
西南女学院大学・保健福祉学部・教授
研究者番号：60249620