

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750058

研究課題名(和文) 糖尿病性認知機能障害の防御を目指した柑橘類由来成分の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of citrus-derived components focused on the defense of the hyperglycemia-induced cognitive dysfunction

研究代表者

奥山 聡 (OKUYAMA, SATOSHI)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：40550380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6マウスの総頸動脈流を一時的に止め、再灌流することで作製した全脳虚血モデルに対し、河内晩柑果皮乾燥粉末を投与したところ、脳海馬においてミクログリアならびにアストロサイトの活性化、および神経細胞死を抑制することができた。また、近年増加が懸念されている糖尿病と脳疾患の合併症に注目し、河内晩柑果皮、およびその果皮に多く含まれているオーラプテンとナリンギンが高血糖誘発脳機能障害を改善できるか、C57BL/6マウスにストレプトゾトシンを単回投与して作製した高血糖モデルで検討したところ、高血糖による誘発される神経細胞に発現するタウタンパク質の過剰なリン酸化が、サンプルの投与により抑制された。

研究成果の概要(英文)：Dried peel powder of Kawachi-bankan was orally administered to transient global cerebral ischemia mice, and microglia and astrocyte activation in the hippocampus were suppressed. Moreover, it also inhibited neuronal cell death in the hippocampus. Kawachi-bankan dried peel powder and its contents auraptene and naringin were orally administered to streptozotocin-induced hyperglycemia mice. These mice showed hyper-phosphorylation of Tau protein in neurons in the hippocampus; however, those sample administration suppressed the Tau phosphorylation.

研究分野：天然物薬理学

キーワード：柑橘由来成分 河内晩柑 脳機能障害 高血糖 脳虚血 海馬 神経細胞 タウタンパク質

1. 研究開始当初の背景

近年、健康増進を図る上で食品成分のもつ生体調節機能が重要であると認識されるようになってきた。柑橘類についても、発がん抑制作用や抗アレルギー作用などの末梢作用をもつ成分が次々と見出され報告されてきたが、中枢神経系に作用する成分についてはほとんど研究されてこなかった。しかし最近になり、温州ミカンやシークワーサーの皮などに含まれるノビレチンの抗認知症作用をはじめ、国内外を問わず柑橘由来成分の中枢神経系に対する作用の研究が活発に行われてきている。我々もこれまでに柑橘果皮には脂溶性低分子の化合物が多く、中枢神経組織に移行し直接神経細胞などに作用する可能性が高いと考え、愛媛県特産柑橘の果皮を材料として、神経細胞における Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 活性化を指標とする *in vitro* スクリーニングを実施した結果、複数の候補物質を見出すことができた。In vitro スクリーニングで効果があった化合物の中でも、「河内晩柑」果皮に含まれているポリメトキシフラボンの一種である 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) やクマリン化合物であるオーラプテン (AUR) に注目し、全脳虚血モデルやリポ多糖誘発脳内炎症モデルなどの *in vivo* 実験を進めてきた結果、中枢神経系においては初めての知見が多く得られた。また、河内晩柑にはフラバノン配糖体の一種であるナリンギン (NGI) も高濃度含まれており、これら三つの成分を高含有する柑橘類は河内晩柑のみである。

2. 研究の目的

これまでに我々は、河内晩柑果皮含有成分である HMF が、脳虚血後の脳内で脳由来神経栄養因子 (BDNF) の産生を促進、また抗炎症、神経細胞死抑制など様々な形で脳保護作用を示すことを明らかにしてきた。また同様に高含有成分の AUR についても脳虚血の系で、抗炎症作用と神経細胞死抑制作用があることを見出した。本研究の一つ目の目的は、これまでに中枢神経系における様々な効果を見出してきた HMF と AUR は脂溶性が高い化合物であるが、末梢組織に投与されてから脳組織に移行するかどうかを確認すること。二つ目の目的は、これらの成分を多く含む河内晩柑果皮が全脳虚血に対して脳保護作用を持っているかどうか、効果を明らかにすること。また三つ目の目的として近年増加が懸念されている糖尿病と脳疾患の合併症に注目し、河内晩柑果皮、もしくは HMF、AUR、NGI が糖尿病病態を改善し、さらに高血糖誘発性脳機能障害の進行に対し抑制効果を示すか作用メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) HMF、AUR の脳移行性の検討

ICR マウスに HMF または AUR を 50mg/kg の量で腹腔内投与し、5、10、30 および 60 分後に PBS で全身灌流後、解剖により脳組織を得た。全脳を水でホモジナイズ (脳 1g に対し、水 1mL) し、100 μ L のホモジネートに 150 μ L のメタノールを加えボルテックス後に遠心分離し、得られた上清溶液を HPLC で分析した。

(2) 中枢神経系病態モデルの作製

① 全脳虚血モデル

河内晩柑果皮乾燥粉末を 1.2g もしくは 2.4g/kg/day の量で 5 日間経口投与を行い、その後全脳虚血手術を行った。全脳虚血モデルは、イソフルラン麻酔下で C57BL/6 マウスの総頸動脈流をクリップで 12 分間一時的に止め、再灌流することで作製した。虚血手術後も 3 日間サンプル投与を継続し、その後解剖により脳組織を摘出し、免疫組織化学染色法により解析を行った。河内晩柑果皮 2.4g/kg/day に含まれる AUR と NGI を投与する群 (それぞれ 9.8 mg/kg/day、106mg/kg/day) も設定した。

② 高血糖誘発脳障害モデル

C57BL/6 マウスに、膵臓の β 細胞を破壊して高血糖を誘発するストレプトゾトシン (STZ; 165mg/kg) を単回腹腔内投与することで作製した。STZ 投与 7 日後より河内晩柑果皮乾燥粉末 (KB1.2; 1.2g/kg/day) を 1 日 1 回 7 日間経口投与した。また HMF (100mg/kg/day)、AUR (50mg/kg/day)、NGI (100mg/kg/day) および陽性対照として pioglitazone (PIO; 30mg/kg/day) は、それぞれ 1 日 1 回 14 日間経口投与した。河内晩柑果皮投与群は STZ 投与後 14 日目に、HMF、AUR、NGI、PIO 投与群は 21 日目に解剖し、脳組織を免疫組織化学染色法、およびウエスタンブロット法により評価した。

(3) 脳組織を用いた組織学的解析

特異的抗体を用いアストロサイトやミクログリア、神経細胞の形態変化について免疫組織化学染色法で解析を行った。また神経細胞に多量に存在し、脳の神経ネットワークを構成する神経軸索の機能に必須なタウタンパク質や、新規産生神経細胞のマーカーについても同様の方法で解析を行った。

(4) 脳組織を用いた生化学的解析

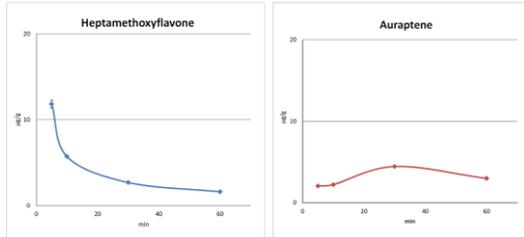
脳海馬を中心に、タウタンパクのリン酸化レベルやペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR γ) 発現量をウエスタンブロット法で調べた。

4. 研究成果

(1) HMF、AUR の脳移行性

脳組織中の HMF と AUR の量を測定した結果、HMF は投与直後の 5 分後に、AUR は 30 分後に最も高い濃度が検出され (図 1)、HMF、AUR 共に腹腔内投与後、脳組織に移行することが明らかとなった。

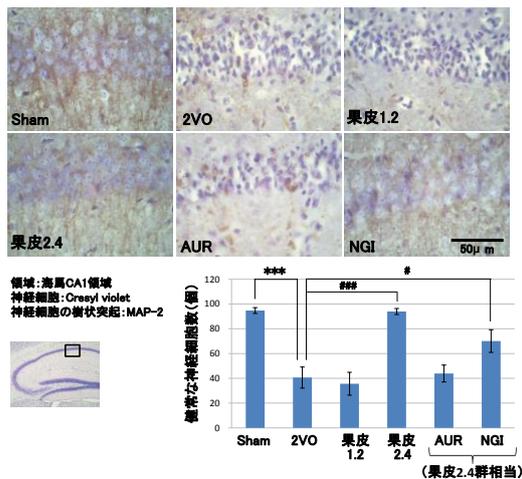
図1. 脳組織に移行したHMF、AURの量



(2) 全脳虚血モデル

脳虚血後の海馬において、酸化ストレス産生や炎症反応等に関するミクログリアとアストロサイトの変化について調べたところ、虚血手術群 (2VO) では偽手術群 (Sham) と比較して両細胞が有意に活性化されたが、果皮 2.4 群では有意な活性化抑制が見られた。また、神経細胞は酸化ストレスや炎症反応等によるダメージを受けやすく、特に影響の大きな海馬 CA1 領域における健全な神経細胞数をカウントして評価したところ、2VO 群では健全神経細胞数が有意に減少したが、果皮 2.4 群では神経細胞死を抑制していた。また、AUR 群では抑制作用が見られなかったが、NGI 群では強い抑制作用が見られた (図 2)。

図2. 河内晩柑果皮の神経細胞死抑制に及ぼす影響



(3) 高血糖誘発脳障害モデル

① 河内晩柑果皮の効果

STZ 投与により血糖値は有意に高い値となったが、河内晩柑果皮を投与しても血糖抑制効果は見られなかった。STZ 投与により海馬

においてミクログリアが有意に活性化されたが、KB1.2 群においては有意な活性化抑制作用が認められた。過剰なミクログリアの活性化は高血糖によって誘発される炎症反応や酸化ストレスの増悪を助長するものと考えられるが、抗炎症及び抗酸化作用に参与する PPAR γ 発現量が STZ 投与により海馬で減少していたのに対し、KB1.2 群ではその減少を抑制する傾向が見られた。また神経細胞に発現するタウタンパク質は、高血糖により通常レベルよりも過剰なリン酸化 (Thr231、Ser396 など) が引き起こされると、結果的に神経細胞のダメージを引き起こすが、KB1.2 群では過剰なリン酸化を抑制していた (図 3)。また高血糖により神経新生も影響を受けるが、STZ 投与で有意に抑制された海馬歯状回における doublecortin 陽性新生神経細胞数も河内晩柑果皮投与により改善されていた (図 4)。

図3. 海馬における河内晩柑果皮のタウリン酸化抑制作用

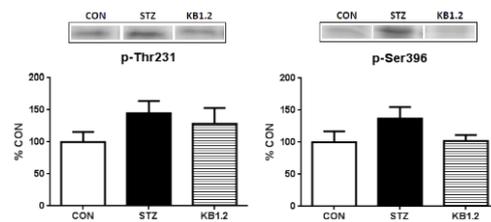
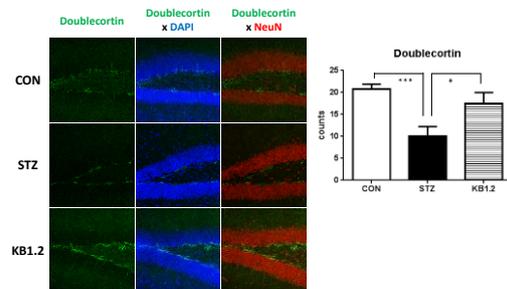


図4. 海馬における神経新生促進作用



② HMF、AUR、NGI の効果

STZ 投与により血糖値は有意に高い値となったが、HMF、AUR および NGI を投与しても血糖抑制効果は見られなかった。STZ 投与により海馬においてアストロサイトが有意に活性化されたが、HMF、AUR および NGI 群において有意な活性化抑制作用が認められた。アストロサイトの活性化もミクログリア同様に高血糖によって誘発された過剰な炎症反応や酸化ストレスの影響によるものと考えられるが、PPAR γ 発現量が STZ 投与により海馬で有意に減少していたのに対し、NGI 群では減少を抑制する傾向が見られた (図 5)。また

タウタンパク質のリン酸化は、AUR 群 (Thr231 と Ser396) および NGI 群 (Thr231) では有意に抑制されていた (図 6)。また STZ 投与で有意に抑制された doublecortin 陽性新生神経細胞数も AUR 群と NGI 群では抑制が改善されていた。

図5. 海馬におけるNGIのPPAR γ 発現促進作用

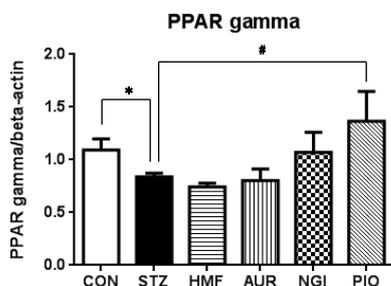
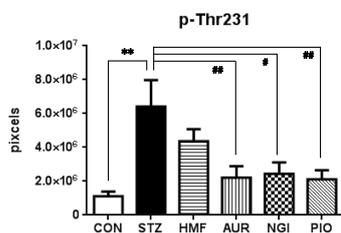
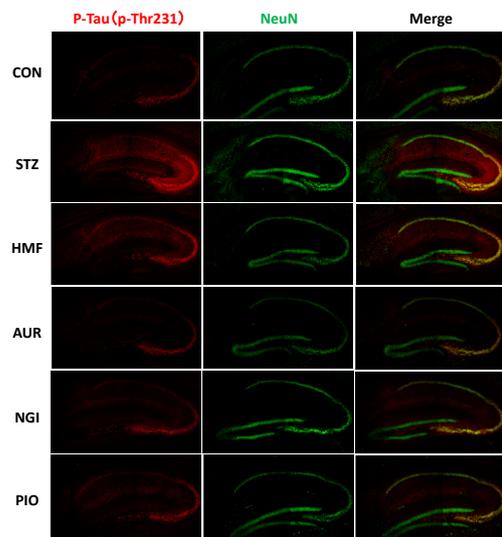


図6. 海馬におけるAURおよびNGIのタウリン酸化抑制作用



全脳虚血モデルと高血糖誘発脳障害モデルを用いた解析結果から、河内晩柑果皮および果皮に含まれるオーラプテン、ナリンギンには抗酸化や抗炎症を介した神経細胞保護作用があることが期待される。またこれらの作用の一部に、PPAR γ 産生促進が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (査読付き論文 計 4 件)

- ① [Okuyama S.](#), Morita M., Kaji M., Amakura Y., Yoshimura M., Shimamoto K., Ookido Y., Nakajima M., Furukawa Y. Auraptene acts as an anti-inflammatory agent in the mouse brain. *Molecules*, 20, 20230–20239 (2015)
DOI: 10.3390/molecules201119691.
- ② [Okuyama S.](#), Miyoshi K., Tsumura Y., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M., Furukawa Y. 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, a citrus polymethoxylated flavone, attenuates inflammation in the mouse hippocampus. *Brain Sci.*, 5, 118–129 (2015)
DOI: 10.3390/brainsci5020118.
- ③ [Okuyama S.](#), Morita M., Sawamoto A., Terugo T., Nakajima M., Furukawa Y. Edaravone enhances brain-derived neurotrophic factor production in the ischemic mouse brain. *Pharmaceuticals*, 8, 176–185 (2015)
DOI: 10.3390/ph8020176.
- ④ [Okuyama S.](#), Morita M., Miyoshi K., Nishigawa Y., Kaji M., Sawamoto A., Terugo T., Toyoda N., Makihata N., Amakura Y., Yoshimura M., Nakajima M., Furukawa Y. 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int.*, 70, 30–38 (2014)
DOI: 10.1016/j.neuint.2014.03.008.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 奥山聡、中島竜三、中村公美、澤本篤志、中島光業、古川美子 「高血糖誘発脳障害モデルマウスに及ぼす柑橘由来成分の効果」 第 136 回日本薬学会年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜
- ② 古川美子、奥山聡、中村公美、中島竜三、澤本篤志、中島光業 「薬物誘発性高血糖モデルマウスの脳に及ぼす河内晩柑果皮乾燥粉末の効果」 第 136 回日本薬学会年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜
- ③ [Okuyama S.](#), Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Sawamoto A., Nakajima M., Furukawa Y. “Neuroprotective effect of

heptamethoxyflavone in the mouse brain.”
250th American Chemical Society National
Meeting, 8/20/2015, Boston (USA)

- ④ 奥山聡、山本加奈、森浩智、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子 「脳虚血モデルマウスにおける河内晩柑果皮乾燥粉末の脳保護作用」 第 135 回日本薬学会年会、2015 年 3 月 28 日、デザインクリエイティブセンター神戸
- ⑤ 山本加奈、奥山聡、森浩智、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子 「脳虚血障害モデルマウスに対する河内晩柑果皮の脳保護効果」 第 53 回日本薬学会中国四国支部学術大会、2014 年 11 月 8 日、広島国際会議場
- ⑥ Okuyama S., Nakajima M., Furukawa Y. “A citrus flavonoid on protection against memory impairment and neuronal cell death in a global cerebral ischemia.” International Symposium on Spinal Cord Sciences, 2014 年 8 月 9 日、国際ホテル宇部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 聡 (OKUYAMA SATOSHI)
松山大学・薬学部・助教
研究者番号：40550380