

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19482

研究課題名(和文) 中枢神経系高次機能に及ぼす食物由来オリゴ核酸化合物の新規生理活性

研究課題名(英文) Novel biological activity of food-derived oligonucleotides in central nervous systems

研究代表者

加藤 将夫 (Kato, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：30251440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：サケ白子抽出物や、抽出物由来の核酸画分を正常マウスに摂取させると、記憶学習能の向上が観察された。記憶学習を司る脳海馬に含まれる核酸化合物シトシン、シチジン、デオキシシチジンの濃度が抽出物摂取によって顕著に増加し、記憶学習効果を裏付けた。海馬における遺伝子発現を検討した結果、神経幹細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイトのマーカーが増加後、神経細胞のマーカーが増加した。海馬由来の初代培養神経幹細胞にサケ白子抽出物や核酸画分を添加するとその細胞増殖が促進された。以上より、核酸画分は神経幹細胞の増殖を促進することで、脳のさまざまな細胞の機能をバランス良く増やすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食物に含まれる成分を利用し病気の予防に役立てることを目指している。この場合、たんに食物に含まれる化合物やその働きを解明するだけでなく、当該化合物の体内への暴露を、薬学的見地から定量的に明らかにする必要がある。本研究はサケ白子抽出物に含まれる核酸画分に、記憶・学習力を高める働きのあることを解明した。たんに働きを解明しただけでなく、経口摂取しても効果があること、摂取した核酸が脳の海馬に到達することを示唆した点で、体内への暴露を定量的に示している。今後、どの程度の量を摂取すれば記憶学習効果が得られるかをさらに解明することで、脳の健康を永く維持する食生活に役立て、健康長寿社会実現へ貢献する。

研究成果の概要(英文)：Effect of hydrolyzed salmon milt extract (HSME) and its nucleic acid fraction (NAF) on object recognition and object location memory was examined in mice under normal conditions. A diet containing HSME and NASF induced to devote more time to exploring novel and moved objects than in exploring familiar and unmoved objects, as observed during novel object recognition and spatial recognition tests, respectively, suggesting that nucleic acids may promote brain function under normal condition. Gene expression of the markers for neural stem cells, astrocytes, oligodendrocytes, and microglia, followed by that of neurons, was increased in the hippocampi on an HSME diet. Oral administration of HSME increased concentrations of cytosine, cytidine, and deoxycytidine in the hippocampus. NAF also induces growth of neuronal stem cells in primary culture. Overall, nucleic acids may enhance learning and memory, and this activity is at least partially mediated by promotion of neural regeneration.

研究分野：医療系薬学

キーワード：核酸 神経新生 神経成熟 神経変性疾患 創薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢や神経変性疾患に伴う脳機能低下の抑制や脳機能の改善は、高齢化を迎えた現代において大きな社会的意義を持つ。本申請研究は、食物由来成分である核酸が神経細胞の成熟や脳機能にどのように影響するかに焦点を絞り、その作用機構や記憶学習能力の向上作用、消化管吸収機構を示すことによって、脳機能改善につながる新たな分子標的の解明を目指す。核酸はタンパク質、脂質、炭水化物に次ぐ主要な細胞構成成分である。生体内での核酸の役割はこれまで、遺伝子ないしその調節機構としての働きを中心に解明されてきた。一方で、食物として摂取された核酸の生体内での運命や生理作用については、食物主成分の一つであるにもかかわらず、多くが謎である。核酸はサプリメントとして主にその強力な抗酸化作用が注目される(1)が、一方で老化促進マウス(senescence-accelerated mice; SAMP8/TaSlc)に混餌投与すると記憶学習能力の低下を抑制し(2)、前脳基底底部損傷ラットへの経口投与によって記憶学習能力低下を抑制する(3)など、脳機能改善作用が報告される。酵母由来ポリ核酸は消化管から吸収後大部分(>80%)が分解され体外へ排泄されるが、ごく微量は再び体内で DNA 等のポリ核酸合成に使われる(4)。これらの結果は、食物由来の核酸成分が脳機能に対し積極的な作用を持つことを示す。したがって、核酸の持つ生体機能を明らかにし、食生活において必要な種類を必要量摂取することによって病気の予防や健康維持につなげようとする研究は重要である。

2. 研究の目的

本研究では、食物成分である核酸が経口摂取後に脳機能、特に記憶学習にどのような影響を与えるかを明らかにすること、また、その作用を裏付けるため、経口摂取後の核酸成分の循環血や脳への移行を明らかにすること、脳でどのような細胞に影響を与えるかを解明することを目的とする。本研究は、これまで栄養成分としてほとんど着目されてこなかった核酸に焦点を当て、その生理作用と体内への暴露、さらには作用メカニズムの解明を目指すことで、生理活性物質としての核酸という新たな概念を提唱し、核酸の分子栄養学的側面を解明する。

3. 研究の方法

(1)記憶学習能力に及ぼす効果

サケ白子抽出物 (hydrolyzed salmon milt extract, HSME) ならびにその核酸成分 (nucleic acid fraction, NAF) とアミノ酸混合物 (amino acids mixture, AAM) をマウスに混餌投与し、新規物体認識試験 (novel object recognition test, NORT) および空間認識試験 (spatial recognition test, SRT) を行うことにより記憶学習能力を評価する。NORT および SRT では、マウスをアクリル製のチャンバーの中に一定時間放置し、その四隅のうちの対角線上の二隅に入れてある2個の同じ物体を記憶学習させる。その後、一定時間マウスを繁殖ケージに戻して休ませたのち、再度、チャンバーに入れて探索時間を測定した。この時、NORT では、2個の物体のうちの1個を別のものに置換し、SRT では2個の物体のうち1個を他の四隅に移動させ、これら変化させた物体への探索時間を、記憶学習能力として判定した。

(2)脳内で変化する各種マーカー遺伝子の探索

記憶学習能力に対する効果を定量的に裏付けるため、行動試験終了後にマウス海馬を採取し定量 PCR によって各種遺伝子発現を定量した。

(3)神経幹細胞の増殖に及ぼす効果

マウス海馬由来初代培養神経幹細胞に HSME および NAF を 10 ないし 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加後、細胞増殖を MTT アッセイおよび ATP 量測定により評価した。

(4)記憶学習能力の向上作用が得られるトリ核酸濃度の評価。

LC-MS/MS を用いた 4-5 種類の塩基、ヌクレオシド、デオキシヌクレオシド、デオキシヌク

レオチドの一斉分析系を確立し、HSME をマウスに経口投与後の血漿中および海馬中に含まれる濃度を測定した。

4. 研究成果(5-6)

HSME を 2.5%含む餌を 14 日間与えたのち、NORT および SRT を行い、既知および新規物体に対する探索時間を調べたところ、普通餌(対照群)においては既知物体と新規物体の探索時間に差がなかった一方、サケ白子抽出物を与えた群では新規物体の探索時間が有意

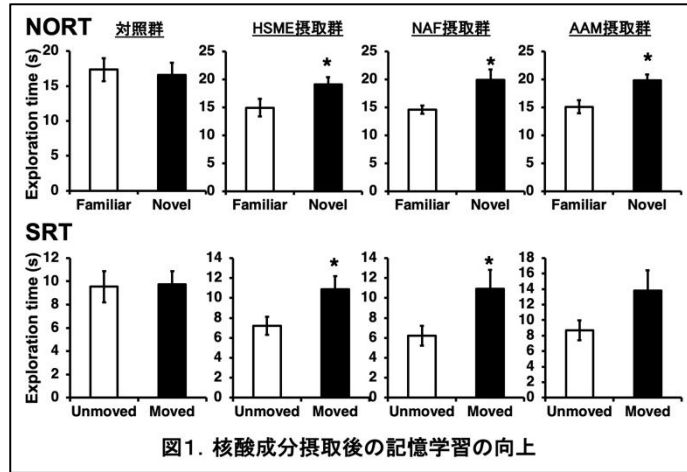


図1. 核酸成分摂取後の記憶学習の向上

に延長したことから、サケ白子抽出物に記憶学習を高める成分が含まれることが示された(図1)。その成分を明らかとするため、NAF と AAM をそれぞれ 2.5%含む餌を同様に摂取させたところ、ともに新規物体の探索時間が有意に延長した(図1)。

どの核酸化合物がどの程度存在するかを定量するため、塩基、ヌクレオシド、デオキシヌクレオシド、デオキシヌクレオチドの一斉分析系の確立を、LC-MS/MSを用いて試みた。種々の検討の結果、adenine、thymine、uracil、guanine、cytosine、adenosine、uridine、guanosine、cytidine、deoxyadenosine、thymidine、deoxyuridine、deoxyguanosine、deoxycytidine、dAMP、dTMP、dUMP、dGMP、dCMP を、二種類の分析方法を組み合わせることで一斉分析する系を確立し、

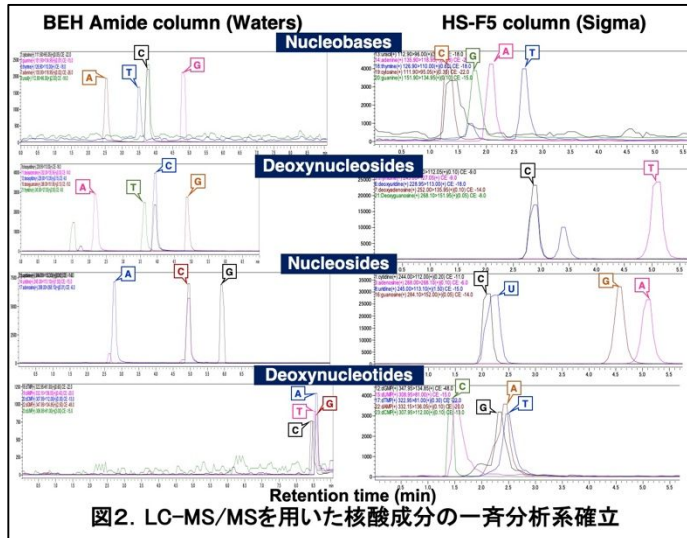


図2. LC-MS/MSを用いた核酸成分の一斉分析系確立

実験に供することが可能となった(図2)。

確立された一斉分析系を用い核酸による記憶学習メカニズムを解明する目的で、核酸塩基、ヌクレオシド、デオキシヌクレオシド、デオキシヌクレオチドの合計 19 種類の核酸化合物の脳海

馬中濃度を測定したところ、cytosine, cytidine, deoxycytidine のサケ白子抽出物摂取後の濃度が普通餌と比べて高く、核酸による効果を裏付けた(図3)。さらに、海馬における遺伝子発現を検討したところ、摂取開始 2 日後には、神経幹細胞のマーカ-Nestin、グリア細胞のマーカ-GFAP、ミクログリアのマーカ-CD11b、オリゴデンドロサイトのマーカ-

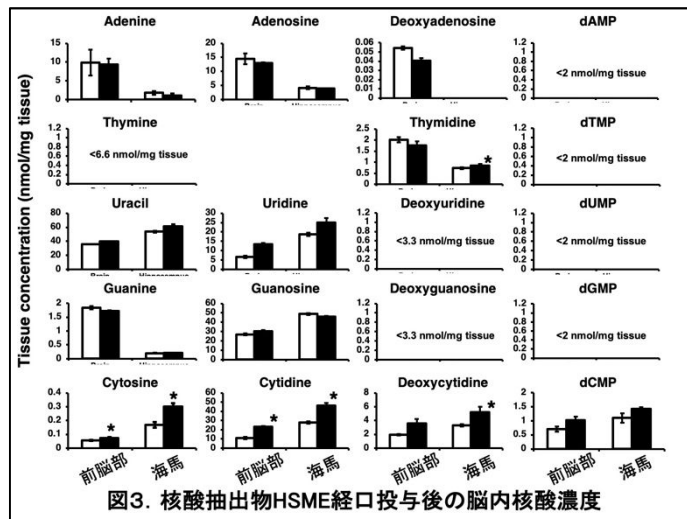


図3. 核酸抽出物HSME経口投与後の脳内核酸濃度

MBP1, MBP2、未分化細胞のマーカーSOX2 の発現が普通餌に比べて有意に高く、4 日後には神経細胞のマーカーSynapsin1, BIII tubulin の発現が高い傾向にあった。また海馬由来初代培養神経幹細胞にサケ白子抽出物や核酸成分を添加すると細胞増殖が促進した。したがって、核酸は神経幹細胞の増殖や分化を促進する可能性が示された。

【引用】

1. 加藤久典、加藤将夫編「核酸の分子栄養学」エヌ・ティー・エス（2019年5月17日発行）
ISBN: 9784860436148
2. Chen TH et al. J Nutr 130, 3085, 2000.
3. Mitazaki S et al. Life Sci 64, 45, 1999
4. Burrige PW et al. Can J Biochem 54, 500, 1976
5. Nakamichi N et al. J Med Food 22, 408, 2019.
6. 2019年2月28日（木）産経新聞（首都圏）15面 第11回これからの健康と栄養を考える
シンポジウム 自分の体はジブンで守る～健康を支える食と核酸の可能性～

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakamichi Noritaka, Nakao Shunsuke, Masuo Yusuke, Koike Ayaka, Matsumura Naoto, Nishiyama Misa, Al-Shammari Aya Hasan, Sekiguchi Hirotaka, Sutoh Keita, Usumi Koji, Kato Yukio | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Hydrolyzed Salmon Milt Extract Enhances Object Recognition and Location Memory Through an Increase in Hippocampal Cytidine Nucleoside Levels in Normal Mice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medicinal Food | 6. 最初と最後の頁 408 ~ 415 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jmf.2018.4285 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Physiological roles of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in neural cells | 4. 巻 40(8) |
| 2. 論文標題 Nakamichi Noritaka, Kato Yukio | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 1146 ~ 1152 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00099 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ehrhardt Carsten, Beckman Per, Couet William, Edwards Chris, Forbes Ben, Frid?n Markus, Gumbleton Mark, Hosoya Ken-Ichi, Kato Yukio, Nakanishi Takeo, Takano Mikiyama, Terasaki Tetsuya, Yumoto Ryoko | 4. 巻 106 |
| 2. 論文標題 Current Progress Toward a Better Understanding of Drug Disposition Within the Lungs: Summary Proceedings of the First Workshop on Drug Transporters in the Lungs | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences | 6. 最初と最後の頁 2234 ~ 2244 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2017.04.011 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 増尾友佑、小池彩花、加藤将夫 |
| 2. 発表標題 Comparison of Intestinal Absorption of Nucleic Acids: Comprehensive Quantification-based Analysis using Mass Spectrometry |
| 3. 学会等名 第33回日本薬物動態学会 / 第22回MD0シンポジウム合同国際学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 小池彩花、増尾友佑、中道範隆、加藤将夫 |
| 2. 発表標題 モノ核酸関連化合物の網羅的定量による消化管吸収評価 |
| 3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第129回例会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 加藤 久典、加藤 将夫 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 205 |
| 3. 書名 核酸の分子栄養学 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 分子薬物治療学研究室 http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunyaku/ |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究協力者 | 中道 範隆 (Nakamichi Noritaka) (10401895) | 高崎健康福祉大学・薬学部・教授 (32305) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|------------------------------------|----|
| 研究 協力者 | 増尾 友佑 (Masuo Yusuke) (90708140) | 金沢大学・薬学系・助教 (13301) | |
| 研究 協力者 | 石本 尚大 (Ishimoto Takahiro) | 金沢大学・薬学系・助教 (13301) | |