

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：23603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02377

研究課題名(和文)ポリフェノール代謝産物の神経血管ユニットにおける酸化ストレス抑制機序を解明する

研究課題名(英文)Elucidation of the oxidative stress suppression mechanism in the neurovascular unit of polyphenolic metabolites

研究代表者

石井 陽子 (Ishii, Yoko)

長野県立大学・健康発達学部・教授

研究者番号：00361949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳内で高いbioavailabilityと検出性を備えたポリフェノール代謝産物の神経保護メカニズムを解明することを目的とし、培養細胞株の2層性共培養モデルを使用して、酸化ストレス性細胞死に対するポリフェノール代謝産物の作用を検討した。Gallic acid, Urolithin-AはROSレベルの減衰を介して神経細胞の生存率を維持し、SOD活性を増加させた。これらの抗酸化ストレス作用は、単層神経細胞よりも星状膠細胞との共培養神経細胞で増加したため、細胞間相互作用の存在が示唆され、検討の結果Nrf2/ARE経路の増強が細胞間相互作用因子の1つであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の原因の多くを占めるアルツハイマー病では、脳内で発生する酸化ストレスや炎症が病態を悪化させることが知られている。ポリフェノール代謝産物は抗酸化作用から神経保護効果が期待されているが、神経保護のメカニズムの詳細は明らかにされていない。本研究は、脳内で高いbioavailabilityと検出性を備えたポリフェノール代謝産物であるGallic acidとUrolithin-Aが神経保護作用を示すことと、その作用は星状膠細胞との細胞間相互作用を介して発揮されることを培養細胞系において明らかにした。同分子の前駆体を含む茶やベリー類等は酸化ストレス性神経障害を低減させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate that polyphenol metabolites with high bioavailability in the brain protect neurons from oxidative stress via cell-cell interaction in neurovascular units. The effect of polyphenol metabolites on oxidative stress-induced cell death was investigated using a two-layer co-culture model of cultured cell lines of neurons and astrocytes or vascular endothelial cells. Gallic acid and Urolithin-A maintained neuronal viability and increased SOD activity through attenuation of ROS levels. These antioxidant stress effects were increased by co-cultured astrocytes and neurons rather than monolayer neurons. The Nrf2/ARE signal was enhanced by Gallic acid and Urolithin-A in co-cultured astrocytes, suggesting that the signal might be one of the intercellular factors. Regarding the polyphenol metabolites examined in this study, the cell-cell interaction between neurons and vascular endothelial cells in co-culture was unclear.

研究分野：食生活学

キーワード：酸化ストレス 神経細胞 ポリフェノール

## 1. 研究開始当初の背景

認知症の原因の約60～80%を占めるアルツハイマー病では、脳内で発生する酸化ストレスや炎症が病態を悪化させることが知られている。脳の神経細胞は血液脳関門で循環血液より隔てられ、神経血管ユニット（Neuro-Vascular Unit）という構成単位を通して酸化ストレス抑制反応や神経新生が制御されている。神経保護作用の解明には神経血管ユニット構成細胞すなわち神経細胞・血管系細胞・グリア細胞の相互作用を考慮した検証が必要とされる。多くの疫学的研究にて、脳血管障害、心臓血管疾患、認知症の発生率と野菜および果物の摂取量との間に逆相関があることが報告され、特にフェノール性ヒドロキシ基をもつ植物成分の総称であるポリフェノールは、その抗酸化能から食品機能性研究の大きなターゲットの一つとされている。難消化性のポリフェノールが効果を示すことは「ポリフェノールパラドックス」とされてきたが、消化吸収と代謝の研究より、Bioavailability（生物学的利用能）の高いポリフェノールが存在することや腸内細菌叢による代謝産物などが見出され、実験動物では摂取後に脳組織で検出される代謝産物の存在も報告されてきた。

## 2. 研究の目的

ポリフェノールはその抗酸化能から神経保護作用が想定されるが、その機序の詳細は明らかでない。本研究は、神経血管ユニットにおける細胞間相互作用に着目し、ポリフェノールのうち特に生物学的利用能の高いものと、その代謝産物を用いて、酸化ストレスに対する神経保護の作用機序を解明することを目的とした。国内外におけるポリフェノールなどの機能性研究は概ね以下のような手順でなされている。試料食品のポリフェノールを同定、その化学構造に基づき機能を予測、推測した機能を動物実験で証明、体内吸収、代謝産物より生物学的利用能を解析、作用機序を培養細胞などで解明する。本研究は、このうちの のアプローチより、ポリフェノール等の神経保護の作用機序を解明することに位置づけられる。本研究の検証をもとに、認知症を予防・抑制する治療法や食生活の開発・推進に基礎研究の面から貢献することを目指した。

## 3. 研究の方法

研究対象は生物学的利用能の高いポリフェノールおよび代謝産物で、経口摂取後に脳組織で検出されることなどが報告されている次の4種類とした。Gallic acid（茶葉等に含まれるEGCG、EGCの加水分解産物）、Ellagic acid（ベリー類、ブドウ等に含まれるEllagitanninの加水分解産物）、Urolithin-A（Ellagitanninの腸内細菌による代謝産

物)、Equol (4',7-Isoflavandiol, 大豆などに含まれる Daidzein の腸内細菌による代謝産物)。培養細胞株は神経細胞 (PC12)、アストロサイト (KT-5)、血管内皮細胞 (HUVEC-C) の3種類を用いた。トランズウェルを用いた2層性共培養モデルにて細胞間相互作用を検討した。酸化ストレスは過酸化水素を用いて誘導した。細胞生存率計測には CellQuanti-MTT™ Cell Viability Assay Kit を用いた。抗酸化能は SOD-Assay kit WST、GSSG/GSH Quantification Kit、ROS Assay Kit を用いて検討した。抗酸化経路の Nrf2/ARE 活性化の検討には Nrf2 Transcription Factor Assay Kit を用いた。

#### 4. 研究成果

Gallic acid、Ellagic acid、Urolithin-Aは、酸化ストレス性細胞死からの神経細胞の生存率を維持し、ROSレベルを減衰させ、SOD 活性とグルタチオン活性を増加させた。これらの抗酸化ストレス作用は、単層神経細胞よりも星状膠細胞と神経細胞の共培養神経細胞で有意に増加したため、細胞間相互作用の存在が示唆された。Equolは血液脳関門透過性があるとされ、神経保護効果が期待されたが、星状膠細胞の細胞生存率を維持したものの、神経細胞への効果は有意ではなかった。神経細胞と共培養された星状膠細胞においてNrf2/ARE 経路はGallic acid とUrolithin-A によって増強されたが、Ellagic acidとEquolによる同経路の増強は有意ではなかった。Nrf2/ARE 経路の増強は、Gallic acid とUrolithin-Aの星状膠細胞を介した神経細胞保護作用のメカニズムの一つであることが示された。本研究にて検討したポリフェノール代謝産物に関しては神経細胞と血管内皮細胞の共培養での細胞間相互作用は明らかではなかった。培養方法・検出方法等を再検討する必要があるが、他のポリフェノール代謝産物を用いた検討に切り替える必要性も考えられた。

Gallic acid とUrolithin-Aの星状膠細胞を介した神経細胞に対する抗酸化ストレス効果より、茶やベリー類などのこれらの分子の前駆体を含む食品は神経細胞の酸化ストレス性障害を軽減する潜在的な機能性食品である可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石井 陽子、石井 遥	4. 巻 3
2. 論文標題 主観的健康感と食要因との関連性における年代と性別による相違	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本未病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 38-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 石井 陽子	4. 巻 79
2. 論文標題 ポリフェノール代謝産物による酸化ストレスに対する神経細胞保護作用の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 栄養学雑誌	6. 最初と最後の頁 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 陽子
2. 発表標題 Neuroprotective effects of bioavailable polyphenols and derived metabolites
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 陽子
2. 発表標題 ポリフェノール代謝産物による酸化ストレスに対する神経細胞保護作用の検討
3. 学会等名 第68回日本栄養改善学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------