

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590129

研究課題名(和文) 植物由来化合物のカテコールアミン神経機能と寿命に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of chemical compounds derived from plants on the functions of catecholaminergic neurons and life span

研究代表者

高橋 浩二郎 (TAKAHASHI KOJIRO)

産業医科大学・大学病院・部長

研究者番号：70389477

研究成果の概要(和文)：交感神経系のモデル実験である培養ウシ副腎髄質細胞を用いて植物由来化合物のカテコールアミン(CA)動態について検討した。その結果、蜜柑の果皮成分のノビレチン、タバコの葉の成分ニコチン及び大豆成分のゲニステインは、それぞれCA合成・分泌や再取り込みに影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの化合物は、日常生活において食物や嗜好品として摂取しており、その薬理的な影響については今後注意深く見守らなければならない。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of chemical compounds derived from plants on catecholamine dynamics in cultured bovine adrenal medullary cells used as a model of sympathetic neurons. We found that nobiletin (a flavonoids of citrus fruits), nicotine (one of major components of cigarette smoke), and genistein (one of the major soy phytoestrogens) had various effects on catecholamine synthesis, secretion, and reuptake in cultured bovine adrenal medullary cells. Because of nutritionally relevant concentrations used in the present study, we must pay an attention to the pharmacological effects of these plant chemical compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬用資源学、植物由来化合物

1. 研究開始当初の背景

私達の体は気温の変化や精神的ストレスなどの外界からの刺激に対応して、体の状態を一定に保つために自律神経が作動する。一方、私達が摂取する植物由来化合物の中には、大豆成分であるダイゼインのような植物性エストロゲンやタバコの葉の主要成分であるニコチン、さらには漢方などでも使用される蜜柑の果皮の中に含

まれるノビレチンなどがある。私達は、普段これら植物由来化合物を食物や嗜好品として摂取しているのにもかかわらず、これら植物由来化合物が自律神経機能にどのような影響を及ぼしているかについてあまり詳しくわかっていない。

2. 研究の目的

今回の研究では、自律神経系の1つである

交感神経系の神経伝達物質であり副腎髄質での内分泌ホルモンであるカテコールアミン(CA)の動態に及ぼす影響について、交感神経系のモデル実験である培養ウシ副腎髄質細胞を用いて植物由来化合物の影響を検討する。すなわち植物由来化合物のCA生合成や分泌反応、細胞内情報伝達への影響について解析する。

3. 研究の方法

(1) 培養ウシ副腎髄質細胞での検討

- ① 食肉センターより供与されたウシ副腎髄質から細胞を分離し、さらにEagle's MEM及び仔牛血清を用いてCO₂インキュベーター内で培養する。
- ② ノルエピネフリントランスポーター(NET)活性の検討: CA再取り込みには、³H-ノルエピネフリン(NE)の副腎髄質細胞内への取り込みを測定する。NETmRNAはRT-PCR法(サーマルサイクラー, Bio-Rad社)を用いて定量する。
- ③ CA生合成及び分泌の検討: CA生合成やチロシン水酸化酵素活性の定量には¹⁴C-tyrosineを用いて定量する。アセチルコリン受容体刺激によるCA生合成、分泌に対して植物由来化合物等の影響を検討する。

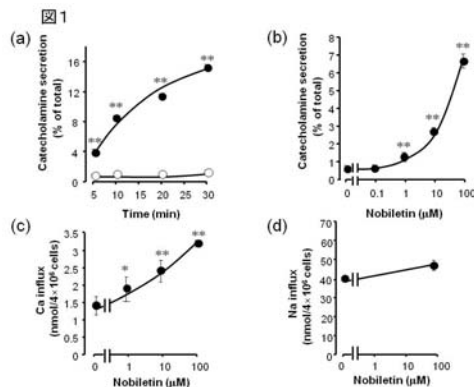
(2) トリプルNOS-KOマウスでの検討

野生型及びトリプルNOS-KOマウスを用いて検討する。尚、このトリプルNOS-KOマウスの作成については、それぞれ産業医科大学動物実験審査委員会及び遺伝子組換え実験安全委員会の承認(承認番号AE07-027及び組換えDNA承認番号017-054)を受けている。

4. 研究成果

(1) 蜜柑果皮成分であるノビレチンによるCA生合成・分泌に及ぼす影響

植物由来化合物の1つである蜜柑の果皮成分であるノビレチンを培養ウシ副腎髄質細胞と反応させると、濃度依存性に細胞からのCA分泌とCa²⁺流入が促進した(図1)。



この促進作用は、細胞外Ca²⁺除去により完全に抑制され、またL型及びN型電位依存性Ca²⁺チャンネル阻害剤(nitrendipine及び

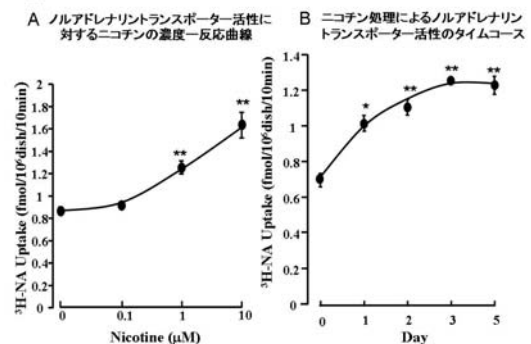
ω-conotoxin GIVA)、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体阻害剤(amiloride又はSN-6)により抑制された。ノビレチンはアセチルコリン(ACh)及びベラトリジン刺激によるCA分泌、²²Na⁺及び⁴⁵Ca²⁺流入を濃度依存性に抑制した。さらにノビレチンは、高濃度(56 mM)K⁺溶液刺激によるCA分泌及び⁴⁵Ca²⁺流入を濃度依存性に抑制した。ノビレチンはα3β4 nAChRを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において、ACh誘発電流を濃度依存性に抑制した。

以上の結果より、培養ウシ副腎髄質細胞においてノビレチン単独ではCA分泌及び⁴⁵Ca²⁺流入を促進し、その機序として電位依存性Ca²⁺チャンネル(L型とN型)およびNa⁺/Ca²⁺交換輸送体を介していることが示唆された。一方、ノビレチンはnAChR、電位依存性Na⁺チャンネルおよび電位依存性Ca²⁺チャンネルを介した細胞外からのNa⁺及びCa²⁺流入を抑制することによりCA分泌を抑制すると考えられた。これらの結果から、ノビレチンは交感神経系の活動に対して二相性の作用、すなわちそれ単独では促進作用を、一方強いストレスなどの中枢神経興奮による反応には抑制作用を示すことが考えられ、特に後者はノビレチンの心血管疾患の予防やその改善作用の一端を説明するものである可能性が示唆された。

(2) タバコの葉の成分であるニコチンの長期処理によるノルエピネフリントランスポーター(NET)活性に及ぼす影響

タバコの活性成分であるニコチンは、主に喫煙によって摂取され、ストレス対応能力、注意力、学習・記憶力、情報処理能力など多くの神経機能を増強し、さらにニコチン依存や退薬症候を引き起こすことが知られている。一方、NETはシナプス間隙へ遊離されたノルエピネフリン(NE)の大部分を神経終末へ再び取り込み、その神経伝達を終了させる機能蛋白質である。ニコチン依存等の研究から、ドパミントランスポーターにおける研究は多数報告されているが、NETにおけるニコチンの作用を検討した報告は、ほとんどない。そこで今回、ニコチン持続処理したウシ副腎髄質細胞でのNET機能に及ぼす影響について検討した。

図2



その結果、ウシ副腎髄質細胞における $[^3\text{H}]$ NE 取り込みは、ニコチン処理により時間(24~120hr)および濃度(0.1~10 μM) 依存性に増加した(図2)。 $[^3\text{H}]$ NE 取り込みの Eadie-Hofstee 解析から、ニコチン処理(10 μM , 48 hr)は、 $[^3\text{H}]$ NE 取り込みのみかけ上の K_m (ミカエリス定数) 値を変化させずに V_{max} (最大反応速度) を増加させた。ニコチン処理による $[^3\text{H}]$ NE 取り込み増加は、転写阻害薬

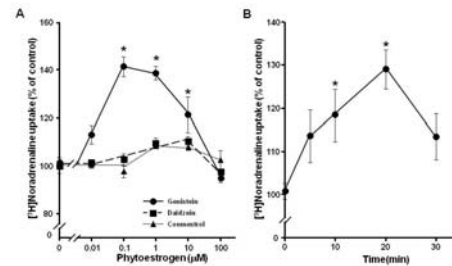
(actinomycin D) では抑制されず、蛋白質合成阻害薬(cycloheximide)により抑制された。さらに、ニコチンにより NET mRNA 発現量も変動しなかった。ニコチンによる NET 機能の増加は、 $\alpha 3 \beta 4$ nicotinic acetylcholine (nACh) 受容体阻害薬 (mecamylamine) によって抑制され、 $\alpha 7$ nACh 受容体阻害薬 (α -bungarotoxin) では抑制されなかった。このニコチンによる NET 機能の増加は、細胞内シグナル伝達系に關与する酵素系の阻害薬である protein kinase A 阻害薬 (H-89)、MAPK kinase 阻害薬 (U0126)、protein kinase C 阻害薬 (calphostin C) や、プロテアソーム阻害剤 (MG132) では抑制されなかったが、Rho kinase 阻害薬 (fasudil) にて一部抑制された。反応液から Ca^{2+} を除去すると、ニコチンの $[^3\text{H}]$ NE 取り込み増加作用は完全に抑制された。また、CaM kinase II 阻害薬 (KN-93) により、ニコチンによる $[^3\text{H}]$ NE 取り込みの増加作用が抑制されたが、その inactive analog である KN-92 でも取り込みの増加が抑制された。さらにニコチンによる細胞内への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入も、KN-93 および KN-92 により抑制された。タバコ喫煙者の喫煙後のニコチンの血中濃度は、数 100 nM に到達すると言われることから、今回使用したニコチン濃度は、薬理的に意味があると考えられる。今回の研究により、ニコチンは $\alpha 3 \beta 4$ nACh 受容体を介して NET 機能を増加させ、その作用部位として NET 遺伝子の転写以降の経路が考えられた。さらにその促進機序には、細胞内への Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たし、一部に Rho キナーゼの關与が示唆された。

(3)大豆成分のゲニステインのノルエピネフリントランスポーター活性に及ぼす影響

大豆成分ダイゼインの類似化合物であるゲニステインによる NET 活性に及ぼす影響について検討した。その結果、SK-N-SH (ヒト NE 神経芽細胞腫) 細胞において、ゲニステインは濃度依存的(0.01~10 μM) および時間 (5~30 分) 依存的に $[^3\text{H}]$ NE 取り込みを促進した(図3)。ゲニステインによる $[^3\text{H}]$ NE 取り込み促進は、 V_{max} (最大反応) の増加によるもので、 K_m (Michaelis 定数) の変化によるものでは

なかった。

図3



ゲニステインは $[^3\text{H}]$ nisoxetine 結合において K_d (解離定数) を変化させず、 B_{max} (最大結合) を増加させた。ゲニステインは非選択的チロチンキナーゼ阻害剤であるが、受容体型チロチンキナーゼ阻害剤 (Tyrophostin25) は NET 活性を促進したが、細胞質 src チロチンキナーゼ阻害剤 (PP2) は影響がなかった。

以上の結果より、大豆成分であるゲニステインは、NET 活性を増加させることにより NET 機能を促進させるが、その機序として細胞膜受容体型チロチンキナーゼの阻害作用が關与してい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 26 件)

- ① Itoh H., Toyohira Y., Ueno S., Saeki S., Zhang H., Furuno Y., Takahashi K., Tsutsui M., Hachisuka K., Yanagihara N. : Upregulation of norepinephrine transporter function by prolonged exposure to nicotine in cultured bovine adrenal medullary cells *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 382: 235 - 243, 2010 (査読有)
- ② Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Itoh H., Sakai N., Saito N., Takahashi K., Yanagihara N. : Stimulatory effects of the soy phytoestrogen genistein on noradrenaline transporter and serotonin transporter activity. *Mol Nutr Food Res.* 54 (4): 516 - 524, 2010 (査読有)
- ③ Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Shinohara Y., Itoh H., Furuno Y., Yamakuni T., Tsutsui M., Takahashi K., Yanagihara N. : Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells *J. Neurochem.* 114 (4): 1030 - 1038, 2010 (査読有)
- ④ 萩森奈央子、田崎正信、清末和子、富安真

由美、長澤浩平、藤戸博、遠藤恵理華、高橋浩二郎、玉利一也、牛島由美子、白石和代、竹内綾子、北村美奈子、末廣勉、大西利彦：依頼者による医療施設の治験実施体制の評価と問題点

YAKUGAKU ZASSHI, 129, 537-548, 2009
(査読有)

- ⑤ Yanagihara N., Toyohira Y., Shinohara Y. : Insights into the pharmacological potential of estrogens and phytoestrogens on catecholamine signaling.

Annals of NY Academy Sciences 1129: 96-104, 2008 (査読有)

- ⑥ Matsuda T., Toyohira Y., Ueno S, Tsutsui M., Yanagihara N. : Simvastatin inhibits catecholamine secretion and synthesis induced by acetylcholine via blocking Na⁺ and Ca²⁺ influx in bovine adrenal medullary cells.

J Pharmacol Exp Ther 327:130-136, 2008
(査読有)

- ⑦ 篠原義剛、一木孝治、牛尾敏彦、五郎丸剛、江藤精二、高橋浩二郎：抗がん剤調製支援システムの構築、*日本病院薬剤師会雑誌*, 44, 261-264, 2008 (査読有)

- ⑧ 五郎丸剛、佐々木智也、藤井利加、一木孝治、高橋浩二郎、福長将仁、江藤精二：フルオロキノロン系抗菌剤に対する耐性乳酸菌および酪酸菌製剤の感受性について、*医療薬学*, 34, 59-63, 2008 (査読有)

- ⑨ 一木孝治、浦本秀隆、篠原義剛、北川直子、原禎博、木下貴之、牛尾敏彦、江藤精二、塚田順一、高橋浩二郎：産業医科大学病院におけるがん化学療法レジメンの管理体制、*産業医科大学雑誌*, 30, 47-54, 2008 (査読有)

- ⑩ 柳原延章、豊平由美子、筒井正人、篠原優子、劉民慧、植物性エストロゲンのカテコールアミン合成・分泌への影響
日本薬理学雑誌, 132: 150-154, 2008
(査読有)

[学会発表] (計 104 件)

- ① Yanagihara N., Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Takahashi K. New insights into the pharmacological potential of plant flavonoids on catecholamine signaling.
第 84 回日本薬理学会年会
(横浜, 2011. 3. 23)

- ② Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Itoh H., Takahashi K., Yanagihara N. Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavones, on catecholamine synthesis and secretion in cultured bovine adrenal medullary cells.

第 84 回日本薬理学会年会
(横浜, 2011. 3. 22)

- ③ Yanagihara N., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Takahashi K. : Stimulation of Noradrenaline Transporter and Serotonin Transporter Activity by Soy Phytoestrogen Genistein.

16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology
(Copenhagen, 2010. 7. 20)

- ④ Zhang H., Toyohira Y., Ueno S., Tsutsui M., Yamakuni T., Takahashi K., Yanagihara N. : Dual effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells

第 83 回日本薬理学会年会
(大阪, 2010. 3. 17)

- ⑤ Zhang H., Toyohira Y., Shinohara Y., Ueno S., Tsutsui M., Yamakuni T., Takahashi K., Yanagihara N. : Effects of nobiletin, a citrus polymethoxy flavone, on catecholamine secretion and synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells

第 82 回日本薬理学会年会
(横浜, 2009. 3. 18)

[図書] (計 1 件)

- ① 柳原延章、文光堂、高齢者の栄養管理ガイドブック (下田妙子編集) : 気をつけておくべき薬剤と食品・栄養剤との相互作用、2010、135

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 浩二郎 (TAKAHASHI KOJIRO)
産業医科大学・大学病院・部長
研究者番号：70389477

(2) 研究分担者

柳原 延章 (YANAGIHARA NOBUYUKI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：80140896
豊平 由美子 (TOYOHIRA YUMIKO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：90269051