

## 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5月15日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580140

研究課題名（和文） 神経栄養因子を模倣する食品成分の探索研究

研究課題名（英文） Exploring of food components with neurotrophic activity

## 研究代表者

伊東 秀之（ITO HIDEYUKI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70253002

## 研究成果の概要（和文）：

先に当研究グループによって、ラット胎仔海馬の初代培養神経細胞において神経突起伸展促進作用を有することを報告しているカテキン類について、経口摂取後、実際に脳内に活性成分が移行するかを検討した。Catechin をラットに経口投与後、脳では Catechin そのものは検出されなかったが、その代謝物である 3'-O-Methylcatechin が検出された。このことから、Catechin は生体内で代謝変換されて活性を示す可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We have previously reported that chlorogenic acid, catechin and epicatechin were found to promote neuronal differentiation by using primary cultures of fetal rat hippocampal neurons in a serum-free medium. In this project, we evaluated brain absorption of these active compounds after oral administration to rat. Catechin was not detected in brain after catechin ingestion to rat, whereas its metabolite 3'-O-methylcatechin was observed by HPLC-ESI-MS/MS method. Our findings raise the possibility that studying the bioavailability of natural products is important to clarify the bioactive principles of their biological activities.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：農芸化学，食品化学

キーワード：ポリフェノール，カテキン，キサントン，海馬，神経突起伸展作用，アルツハイマー型認知症，脳内移行

## 1. 研究開始当初の背景

現在国内において、認知症の患者数は 200 万人を超え、2020 年には 300 万人を超える勢いで増加すると推計されている。認知症はアルツハイマー病型と脳血管性の 2 種に大別され、その半数以上はアルツハイマー型認知症が占めている。アルツハイマー型認知症は海馬や大脳皮質の萎縮、神経細胞の脱落、老人斑、さらに神経伝達物質アセチルコリンなどの著しい減少が原因として挙げられているが、最近では老年性発症型に限らず、65 歳以下の若年性および初老年性発症型も現れ、本痴呆症は決して老年のみが対象ではなくなっている。アルツハイマー型認知症のリスク因子として環境的要因が大きく、なかでも食生活による影響が重要と考えられている。そのリスク軽減には、魚類に含まれる EPA、DHA や、緑黄色野菜およびワインなどに含まれる各種ポリフェノールなどの摂取の有効性が示唆され、それら関連研究の結果が報告されている。さらに厚生労働省は「健康日本 21」を提示し、生活習慣病およびその原因となる生活習慣等の国民の健康増進および疾病を予防する「一次予防」に重点を置いた対策を推進している。

このような背景から、アルツハイマー型認知症をはじめとする認知症予防には、食事による影響も重要なファクターのひとつであり、食品や天然薬物などの天然素材から、認知症予防に貢献する天然資源の探索は益々重要な研究課題になると考えられる。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー型認知症の治療および予防効果が期待される物質のスクリーニング試験として、神経細胞突起伸展作用を評価する方法が広く採用されている。そのスクリー

ニング法には PC12 細胞がよく利用されているが、PC12 細胞は本来腫瘍細胞であり、神経栄養因子などに応答して神経様細胞に分化することや、さらに継代培養し易く取り扱いが容易なこともあり、神経突起伸展作用などの評価に汎用されている。しかし PC12 細胞は神経細胞の代用だけではなく、末梢の交感神経様の性質を示すことなど、中枢作用をターゲットとする評価系としては多くの問題点が指摘されている。

当研究グループでは、脳において記憶や学習行動を司る重要な部位である海馬領域の神経細胞を神経突起伸展の評価方法を確立し、フードポリフェノール関連化合物についてスクリーニングを行った結果、Chlorogenic acid や *m*-Coumaric acid をはじめとする Catechin および Epicatechin に神経突起伸展活性を有することを見出し、報告している。また精神安定や健忘の改善作用があるとされ、加味帰脾湯および人參養榮湯などに配合されている遠志に注目し、そのブタノールエキスにラットにおける Scopolamine 誘発性空間認知障害を有意に改善する効果も見出し、報告している。さらに海馬神経細胞突起伸展活性を指標に、分離、精製し、3,6'-di-*O*-sinapoylsucrose やキサントン配糖体の 2-*C*-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-1,3,6-trihydroxy-7-methoxyxanthone を活性成分として単離し、それらの化学構造を明らかにしている。

このように、いくつかのポリフェノールに海馬細胞の神経突起伸展活性が *in vitro* 実験系によって認められてきているが、これらの化合物を摂取した場合、血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) を通過し、実際に脳神経を賦活し得る活性成分の量が脳内に到達するか、即ち脳内利用性について明

らかにすることは、次の研究戦略として最重要課題であると考えられる。本研究では、機能性天然物の生体内代謝物の知見も考慮に入れながら、さらに広く我々の食生活に身近な食品素材から、*in vitro* 実験系評価を基にした神経栄養因子を模倣する食品成分の探索を進めると共に、神経突起伸展作用を有する天然成分の脳内利用率についての検討を行う。

一方、遠志から得られたラット海馬神経細胞突起伸展活性を有するキサントン化合物に着目し、さらに強力な脳神経賦活作用物質、又はそのリード化合物となり得る天然物を探索するために、キサントン化合物を豊富に含むマンゴスチン (*Garcinia mangostana*, オトギリソウ科 Hypericaceae) からキサントン誘導体を単離し、各種活性試験に供試できる量を確保するための成分探索も行った。

### 3. 研究の方法

(1) 6~8週齢のSD系雄性ラットに Catechin を100 mg/kgの濃度で強制経口投与し、1, 3, 6, 12 時間後に全採血を行い、続いて全脳を摘出した。摘出した脳はメタノールでホモジナイズを行い、 $\beta$ -glucuronidase および sulfatase 処理後、酢酸エチルにより抽出し、分析サンプルとした。得られた血漿および脳サンプルは、HPLC-ESI-MS/MS により、Catechin およびそのメチル化代謝物である 3'-*O*-Methylcatechin, 4'-*O*-Methylcatechin, およびProtocatechuic acidの定量分析を行った。

(2) マンゴスチンのメタノールエキスを Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーおよび分取薄層クロマトグラフィーにより分離、精製を行い、キサントン系化合物および縮合型タンニンの単離を目指した。単離した化合物については、NMRおよびMSスペクトル解

析の結果に基づいて、それぞれの化学構造の解明を行った。

### 4. 研究成果

(1) SD系雄性ラットに Catechin を経口投与し、1, 3, 6, 12 時間後に全採血を行い、続いて全脳を摘出した。摘出した脳はメタノールでホモジナイズを行い、 $\beta$ -glucuronidase および sulfatase 処理後、酢酸エチルにより抽出し、分析サンプルとした。得られた血漿および脳サンプルは、HPLC-ESI-MS/MS により分析を行った。その結果、投与後1時間から、血漿中には Catechin およびその生体内代謝産物である 3'-*O*-Methylcatechin が検出され、ラットにおいて Catechin は、経口投与後、吸収されて、その生体内代謝産物の 3'-*O*-Methylcatechin と共に血中に存在することが明らかとなった。一方、脳ではいずれの時間においても Catechin の存在は確認できなかったが、投与後1時間において、3'-*O*-Methylcatechin が検出されたことから、Catechin の脳神経賦活作用においては、その生体内代謝産物も含めた活性評価を行う必要性が示された。以上の結果から、Catechin は吸収後、生体内で代謝され、その生体内代謝産物の一つである Methylcatechin として脳内に移行する可能性が示唆された。

(2) マンゴスチンのメタノールエキスを Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーおよび分取薄層クロマトグラフィーにより分離、精製を行い、6種の化合物を単離した。単離した化合物は、NMR および MS スペクトル解析に基づき、キサントン類の  $\alpha$ -Mangostin,  $\gamma$ -Mangostin, Garciniafuran, および 1, 3, 6, 7-Tetrahydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)xanthone, さらにカテキン類の

Epicatchin および Procyanidin B-2 であると同定した。今後、脳神経賦活作用などの各種活性試験に供試できるキサントン化合物を得ることができた。

本研究により、ラットにおいて Catechin は吸収後、生体内で代謝を受け、その生体内代謝産物の一つである 3'-*O*-Methylcatechin として脳内に移行する可能性が示唆され、天然物の生体内代謝物の活性評価の重要性が示された。また、マンゴスチンからは脳神経賦活作用を有する天然物として期待されるマンゴスチン誘導体を得ることができた。今後、天然ポリフェノールの新たな機能開拓の一面として、脳神経賦活作用の裏付けに向けた研究の進展が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 26 件)

- ① Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., and Ito, H., Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有, 76, 2012, 395-399.
- ② González-Barrio, R., Truchado, P., Ito, H., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., UV and MS identification of urolithins and nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals, *J. Agric. Food. Chem.*, 査読有, 59, 2011, 1152-1162.
- ③ Kimura, Y., Ito, H., Hatano, T., Effects of Mace and Nutmeg on Human Cytochrome P450 3A4 and 2C9 Activity, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 33, 2010, 1977-1982.
- ④ Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., and

Hatano, T., Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity, *Food Chem. Toxicol.*, 査読有, 48, 2010, 429-435.

〔学会発表〕 (計 59 件)

- ① Hideyuki Ito, Metabolites of Ellagitannins and Their Antioxidant Activity, 7th Tannin Conference, August 29- September 2, 2010, Berlin, Germany.
- ② Hideyuki Ito, Xiu-Lan Sun, Makiko Watanabe, Motoi Okamoto and Tsutomu Hatano, Neurotrophic Activity of Polyphenols and Related Compounds using Primary Cultures of Fetal Rat Hippocampal Neurons, 25th International Conference on Polyphenols, August 24-27, 2010, Montpellier, France.
- ③ 伊東秀之, 孫 秀蘭, 渡辺真紀子, 岡本 基, 波多野 力, 遠志成分の海馬初代培養細胞における神経突起伸展作用, 日本薬学会第 130 年会, 2010. 3. 28-30. (岡山)
- ④ 伊東秀之, ポリフェノールの生体内代謝物とその生理機能, 第 121 回日本薬学会中国四国支部例会, 2009. 6. 20. (岡山)

〔図書〕 (計 4 件)

- ① Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., and Ito, H. (2009) Ellagitannins renewed the concept of tannins, Edited by Quideau, S., *Chemistry and biology of ellagitannins -An underestimated class of bioactive plant polyphenols-*, World Scientific, Singapore, 1-54.
- ② Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., and Okuda, T. (2009) Structural diversity and antimicrobial activities of ellagitannins, Edited by Quideau, S., *Chemistry and biology of ellagitannins -An*

underestimated class of bioactive plant polyphenols-, World Scientific, Singapore, 55-93.

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 秀之 (ITO HIDEYUKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70253002