

機関番号：32809

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700758

研究課題名（和文）記憶障害に対するルチンの保護的役割とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Protective effects of rutin against toxicant-induced memory dysfunction and elucidation of the molecular mechanisms

研究代表者

小宇田 智子（KODA TOMOKO）

東京医療保健大学・看護学部・講師

研究者番号：30391098

研究成果の概要（和文）：ラットにトリメチルスズ（TMT）を単回経口投与すると記憶障害が誘導され、主にソバに含まれるフラボノイドであるルチンの摂食は、この記憶障害に対して保護的役割を示した。細胞および分子レベルの実験により、記憶形成に重要な脳の領域である海馬において、ルチンは抗炎症作用により TMT 投与で誘導された神経細胞死を抑制し、記憶障害を保護していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rutin is one of flavonoids and buckwheat is known as a major source of rutin. We demonstrated that oral administration of rutin has a protective effect against trimethyltin (TMT)-induced memory dysfunction in rats. Furthermore, we suggested that anti-inflammatory function of rutin revealed protective effects against TMT-induced neuron loss in the hippocampus which plays an important role in memory using cellular and molecular biological techniques.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	800,000	240,000	1,004,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,514,000

研究分野：環境保健学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品、神経科学

1. 研究開始当初の背景

近年、フラボノイド類の摂食による記憶能への有益な影響がヒトや動物実験で報告されている。我々は、記憶障害モデルラットを作成し、主にソバに含まれているフラボノイドであるルチンの摂食が記憶障害を保護することを行動学的試験により明らかにした。フラボノイド類の生体への有益な影響の作用機序は抗酸化活性によるものであることが指摘されているが、吸収されたフラボノイド類の代謝産物の抗酸化活性は著しく低下す

る。そのため、フラボノイド類の記憶能への有益な影響について、抗酸化活性以外の作用機序を検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

海馬傷害による記憶障害のモデルラットに対するルチンの影響を、細胞レベルで検討する。また、その分子作用機序をルチンの抗炎症作用および長期増強の誘導に関わる因子に着目して検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 行動学的実験による記憶能の測定と脳組織のサンプリング

①行動学的実験：4週齢のSD系雄ラットに粉末飼料を与え、6週齢目にトリメチルスズ(TMT)を単回経口投与するTMT群、ルチンを添加した粉末飼料を与え、6週齢目にTMTを投与するR-TMT群、粉末飼料を与え、TMTの溶媒のみを投与するVH群、ルチン添加粉末飼料を与え、溶媒を投与するR群の4群に分けた。TMT投与から2週間後にモリス水迷路試験により空間記憶能を測定した。水を入れたプールにラットを入水させ、水面下2cmに置いたプラットフォームに逃避するまでの時間を1日2回、4日間連続して行った。水には白い絵の具を溶かし、ラットからプラットフォームが見えないようにした。その翌日に、プラットフォームを除去してラットを120秒間泳がせ、プラットフォームが存在していた全体の4分の1にあたる象限に滞在していた時間を指標として空間記憶能の測定を行った。

②脳組織のサンプリング：モリス水迷路試験終了後、屠殺したラットの左側の脳をドライアイスで素早く凍結し、クライオスタットを用いて17 μ mの凍結切片を作成した。右側の脳からは海馬を取り出し、トータルRNAを抽出し、濃度を測定した。

(2) ルチン摂食による海馬神経細胞への細胞および分子レベルでの影響の検討

①脳の凍結切片を用いてヘマトキシリン・エオシン染色を行い、神経細胞を海馬の領域(CA1、CA3a、CA3b、CA3c)ごとに数えた。また、細胞増殖マーカーであるPCNA(proliferation cell nuclear antigen)の抗体を用いた免疫染色法により歯状回の増殖細胞を、TUNEL法によりアポトーシス細胞を海馬の領域(CA1、CA3a、CA3b、CA3c)ごとに検出した。

②海馬より抽出したトータルRNAを用いて、リアルタイムPCR法により活性化ミクログリアのマーカーであるOX-42、アストロサイトのマーカーであるGFAP(Glial fibrillary acidic protein)、炎症性サイトカイン類(IL-1 β ；Interleukin-1 β 、IL-6；Interleukin-6、TNF- α ；Tumor necrosis factor- α)、神経栄養因子類(BDNF；Brain-Derived Neurotrophic Factor、bFGF；Basic fibroblast growth factor)、グルタミン酸受容体類(GluR1；AMPA receptor subunit、NR2A；NMDA receptor subunit)、グルタミン酸輸送体類(GLT-1；Glutamate

transporter subtype 1、GLAST；Glutamate aspartate transporter)のmRNA発現量を定量した。

4. 研究成果

(1) 行動学的実験

TMT群ではVH群やR群と比べて空間記憶能が低下し、R-TMT群はTMT群に比べて記憶能の低下が抑制されていた。

(2) ルチン摂食による海馬神経細胞への細胞および分子レベルでの影響の検討

①行動学的実験により、ルチン摂食の記憶能低下抑制作用が明らかとなったため、行動実験後のラットの脳組織より作成した凍結切片を用いて、TMT投与およびルチン摂食による神経細胞数、アポトーシス細胞数および増殖細胞数の変化を検討した。神経細胞数はCA3bとCA3c領域ではTMT群とR-TMT群の神経細胞数が減少していた。また、CA3b領域ではR-TMT群の神経細胞数はTMT群に比べて統計学的に有意に多く(図1)、CA3c領域では多い傾向が見られた。アポトーシス細胞数についてはVH群とR群では検出できなかったため、TMT群とR-TMT群の比較を行った。その結果、CA3bおよびCA3c領域ではR-TMT群のアポトーシス細胞数はTMT群と比べて統計学的に有意に減少していた。増殖細胞は歯状回でのみ検出された。TMT群とR-TMT群でVH群およびR群に比べて増殖細胞数の増加が見られたが、両群間に増殖細胞数の違いは見られなかった。

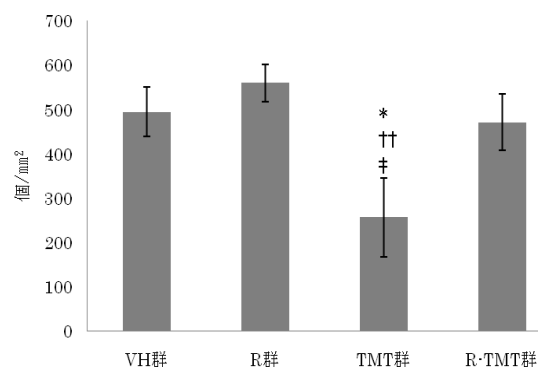


図1 海馬CA3b領域の神経細胞数

* $p < 0.05$ vs VH群、†† $p < 0.01$ vs R群、‡ $p < 0.05$ vs R-TMT群

一元配置分散分析(ANOVA)およびFisher's PLSD testの多重比較検定を用いて平均値の差を解析した

②活性化ミクログリアの指標となるOX-42のmRNA発現量は、VH群とR群に比べてTMT群およびR-TMT群で増加したが、R-TMT群では、TMT群のOX-42のmRNA発現量の増加を有意に抑制していた(図2)。

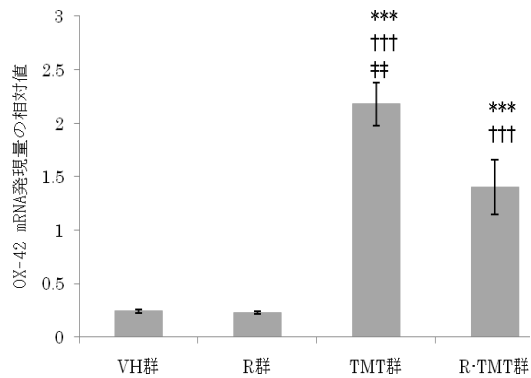


図2 海馬領域のOX-42 mRNA発現量

***p<0.001 vs VH群、†††p<0.001 vs R群、††p<0.01 vs R-TMT群

一元配置分散分析(ANOVA)およびFisher's PLSD testの多重比較検定を用いて平均値の差を解析した

アストロサイトのマーカーであるGFAPのmRNA発現量はVH群とR群に比べてTMT群とR-TMT群で増加していたが、TMT群とR-TMT群の間に発現量の違いは見られなかった。炎症性サイトカインであるIL-1 β とIL-6のmRNA発現量はVH群とR群に比べてTMT群およびR-TMT群で増加し、R-TMT群では、TMT群のIL-1 β およびIL-6のmRNA発現量の増加を抑制する傾向が見られた(図3)。TNF- α のmRNA発現量はVH群とR群に比べてTMT群で増加傾向が見られたが、TMT群とR-TMT群の間に発現量の違いはなかった(図3)。神経栄養因子であるBDNFのmRNA発現量については、TMT投与やルチン摂食による変化は見られなかった。グルタミン酸受容体類のサブユニットであるGluR1およびNR2A、グルタミン酸輸送体類のGLT-1のmRNA発現量はVH群とR群に比べてTMT群とR-TMT群で減少したが、TMT群とR-TMT群の間で発現量に有意な違いは見られなかった。また、グルタミン酸輸送体類のGLASTは4群間で有意なmRNA発現量の違いは見られなかった。

以上の結果より、ルチン摂食による記憶能低下保護効果は、海馬における分子レベルでの機能修復、つまり記憶の生理学的基盤の一つとされる長期増強の誘導に関わる因子に影響を与えるのではなく、海馬の神経細胞に対する抗炎症作用による神経細胞傷害の保護

によるものである可能性が示唆された。

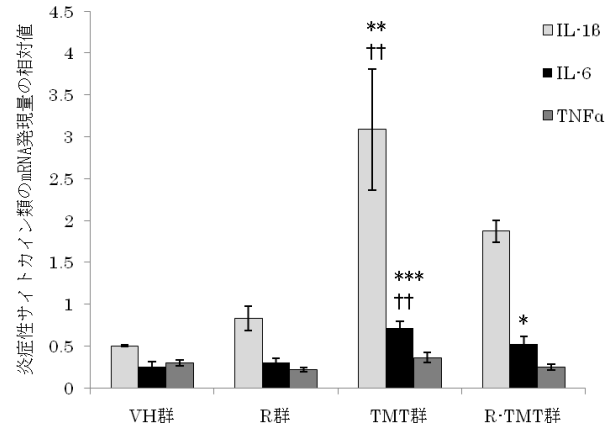


図3 海馬領域の炎症性サイトカイン類のmRNA発現量

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001 vs VH群、†p<0.01 vs R群

一元配置分散分析(ANOVA)およびFisher's PLSD testの多重比較検定を用いて平均値の差を解析した

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小宇田智子、今井秀樹、Protective effects of flavonoids against toxicant-induced memory dysfunction and hippocampal injury in rats、東北大学脳科学国際シンポジウム、2011年1月21日、東北大学生命科学プロジェクト研究棟

(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宇田 智子 (KODA TOMOKO)
東京医療保健大学・東が丘看護学部・講師
研究者番号：30391098

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：