

## 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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22780117

研究課題名（和文）

神経細胞分化シグナルを活性化する食品成分

研究課題名（英文）Food-derived components that enhances neuronal differentiation

研究代表者

柴田 貴広 (SHIBATA TAKAHIRO)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：80447838

研究成果の概要（和文）：

神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) などの神経栄養因子は、中枢神経および末梢神経系における神経細胞の成長、分化、生存、機能維持などに関与する重要な因子として知られている。また、神経栄養因子は、神経変性疾患や虚血などのストレス状態における細胞死を軽減する作用も有している。本研究では、神経細胞の分化を促進する食品成分として、レスベラトロールを同定した。PC12細胞にレスベラトロールを低濃度のNGFとともに投与すると、神経突起の伸長および分化マーカーであるニューロフィラメントの発現上昇が認められた。またその分化誘導には、p38MAPキナーゼが関与している可能性が示唆された。

一方で、神経細胞の分化を促進するアラキドン酸代謝産物として、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>)を同定し、その作用機構解析を行った。その結果、15d-PGJ<sub>2</sub>は細胞外からのカルシウムイオン流入を介して神経分化を促進していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Neurotrophins, such as the nerve growth factor (NGF), play an essential role in the growth, development, survival and functional maintenance of neurons in the central and peripheral systems. They also prevent neuronal cell death under various stressful conditions, such as ischemia and neurodegenerative disorders. In the present study, we identified resveratrol as one of the food-derived neuritogenic enhancers. Resveratrol strongly enhanced the neurite outgrowth and neurofilament expression elicited by a low-concentration of NGF that alone was insufficient to induce neuronal differentiation. In addition, it was suggested that resveratrol-enhanced neuritogenesis was dependent on p38 MAP kinase.

We also identified 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), an arachidonic acid-derived metabolite, as neuritogenic enhancer and determined the mechanism of 15d-PGJ<sub>2</sub>-enhanced neurite outgrowth. 15d-PGJ<sub>2</sub> significantly enhanced the neuritogenesis via Ca<sup>2+</sup> influx.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：食品機能化学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：神経細胞、神経成長因子、食品成分、脂質メディエーター

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) に代表される神経栄養因子は、生体における神経細胞の分化促進や生存維持作用を担っており、神経回路を保全・修復し、高次神経機能の維持に関わっている。しかしながら、老化や疾病により NGF 発現量が減少することが知られていることから、NGF の作用を増強・代替することにより、神経変性疾患や認知症の予防につながると考えられる。

これまでに、ラット由来細胞株 PC12 細胞を用いた NGF 増強活性の評価法を確立し、それを用いたスクリーニングにより、沢ワサビに含まれるイソチオシアネート化合物に強い神経分化促進活性を見出した。さらにその作用機構解析の過程で、プロテインチロシンホスファターゼ 1B (PTP1B) が NGF 受容体である TrkA を負に制御する脱リン酸化酵素であることを明らかにしている (Shibata et al. J. Neurochem. 2008)。

さらに、PC12 細胞における神経細胞分化誘導の分子機構解析の過程で、細胞内カルシウム濃度が顕著に上昇することを見出しており、ある種のカルシウムチャンネルを介した細胞外からのカルシウムイオンの流入が神経細胞の分化に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、NGF シグナリングを増強しうる食品成分の探索とその作用機構の解明を目的とした。また、脂肪酸代謝物であるプロスタグランジン類による神経細胞の分化促進活性を評価し、さらに細胞内カルシウムイオンを介した作用メカニズムについて解析を行うこととした。

3. 研究の方法

神経細胞の分化を評価するため、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた。この細胞は、神経成長因子 (NGF) の処理により、細胞膜上の NGF 受容体 TrkA を介して分化が誘導されることが広く知られており、神経細胞分化のモデルとしてよく利用されている細胞である。PC12 細胞に、それ自身では分化誘導しない極低濃度の NGF と低分子化合物とを同時に無血清培地中で 48 時間処理し、その後細胞の長径よりも長い神経突起を有している細胞を分化細胞としてカウントし、全体の細胞における分化細胞の割合として評価した。

4. 研究成果

1) 神経細胞の分化を促進する食品成分

14 種類の食品成分を低濃度 NGF とともに PC12 細胞に投与し、48 時間後に神経突起の伸長を評価したところ、ポリフェノールのひとつであるレスベラトロールに強い促進活性を見出した (図 1)。

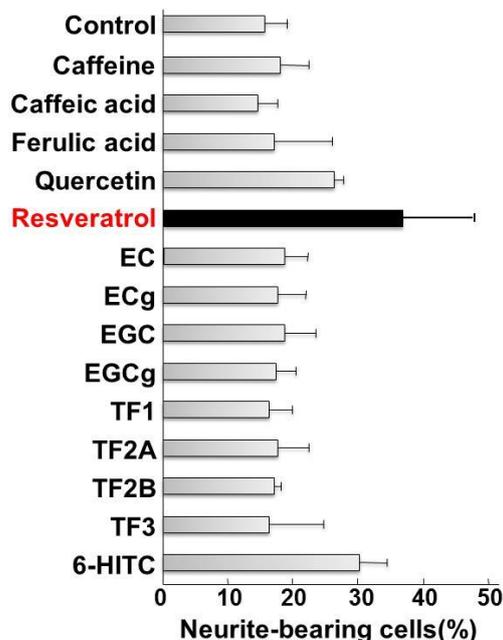


図 1. 食品成分による神経細胞分化促進活性

レスベラトロールは、赤ワインなどに含まれるポリフェノールであり、様々な活性を有する機能性食品成分として近年注目を集めている化合物である。そこでレスベラトロールに注目し、さらに検討を進めた。レスベラトロールを 0-50 μM の各濃度投与すると、神経細胞分化が濃度依存的に促進されることが確認された (図 2)。また、この活性は NGF 依存的であり、NGF 非存在下では分化が誘導されないことも明らかとなった (図 2)。

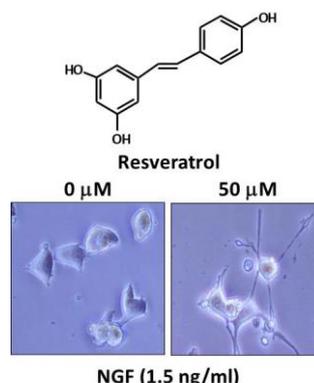


図 2. レスベラトロールによる神経突起伸長

さらに、分化促進活性の生化学的な評価をするため、分化マーカータンパク質として知られるニューロフィラメント L の発現を指標として、ウェスタンブロット法により検討を行った。その結果、レスベラトロールの投与時間依存的に、ニューロフィラメント L の発現が亢進することが明らかとなった(図3)。また、レスベラトロールの投与濃度依存的にニューロフィラメント L の発現が亢進することも明らかとなった(図3)。

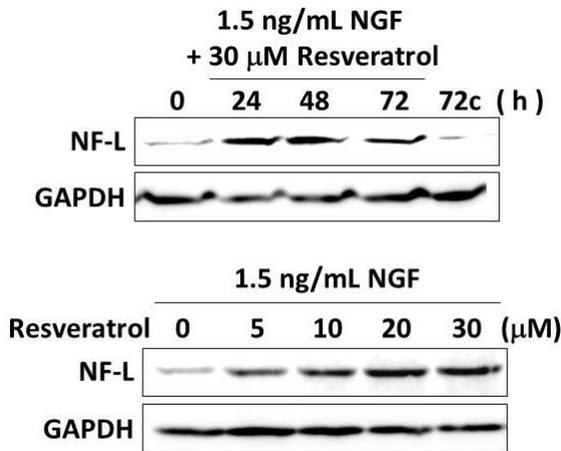


図3. ニューロフィラメントの発現誘導

さらに、抗ニューロフィラメント L 抗体を用いた免疫細胞染色を行った結果、レスベラトロールの投与によりニューロフィラメント L が細胞体や神経突起に発現することも確認された(図4)。

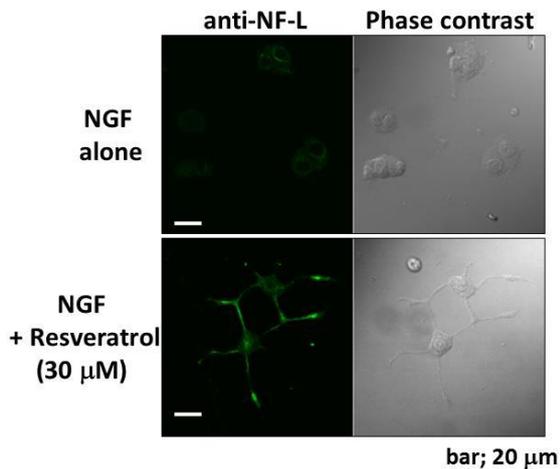


図4. ニューロフィラメントの免疫染色

次に、レスベラトロールによる分化促進機構について検討することとした。特に、NGF シグナル伝達機構に関与すると考えられる PI3 キナーゼ、PKC、MEK、p38MAP キナーゼについて、それぞれに対する特異的阻害剤を用いて検討を行った。その結果、MEK および PI3 キナーゼの阻害剤である PD98059 および

Wortmannin 処理では、レスベラトロールによる神経突起伸長促進活性に全く影響を与えなかった。また、PKC の阻害剤である GF109203X 処理では、部分的ではあるが抑制される傾向であった。一方で、p38MAP キナーゼの阻害剤である SB203580 の前処理により、伸長促進活性が顕著に抑制された(図5)。これらの結果から、レスベラトロールによる神経突起伸長促進活性に、p38MAP キナーゼが関与している可能性が示唆された。

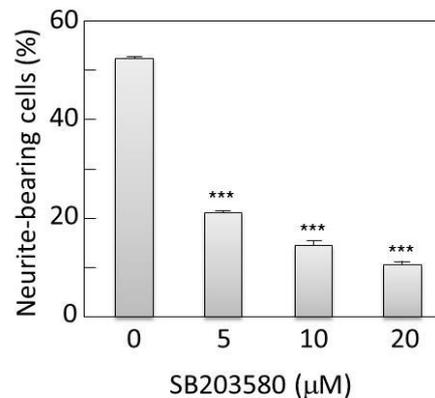


図5. p38MAP キナーゼ阻害剤による影響

## 2) 神経細胞の分化を促進する脂肪酸代謝物

PC12細胞に低濃度NGFとともに様々なアラキドン酸代謝物を投与し、神経突起伸長促進活性を評価したところ、シクロペンテン構造を有するPGJ<sub>2</sub>、Δ<sup>12</sup>-PGJ<sub>2</sub>および15d-PGJ<sub>2</sub>に活性が認められた(図6)。

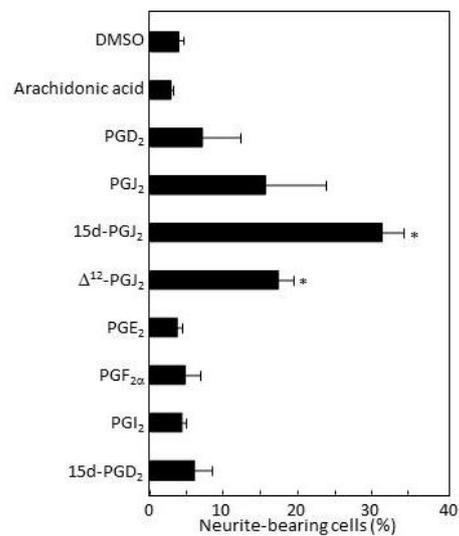


図6. PG類による神経細胞分化促進活性

また、15d-PGJ<sub>2</sub>による伸長促進活性は投与濃度依存的であることも確認した。15d-PGJ<sub>2</sub>のシクロペンタン型アナログで

ある9,10-dihydro-15d-PGJ<sub>2</sub>を用いて検討を行ったところ、促進活性を全く示さなかったことから、15d-PGJ<sub>2</sub>の親電子性が重要であることが示唆された (図7)。

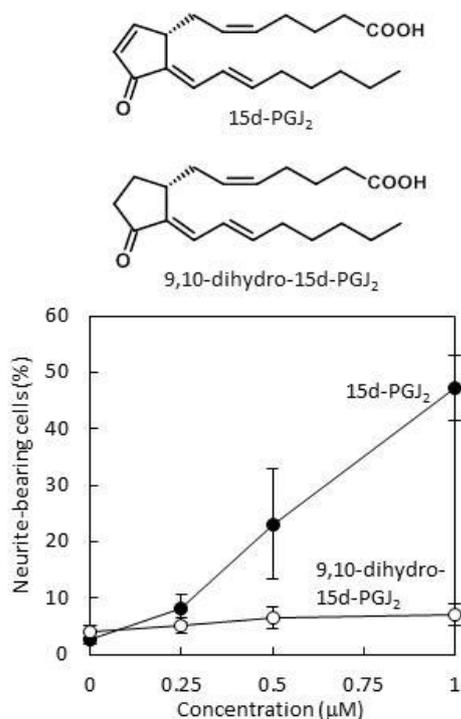


図7. 15d-PGJ<sub>2</sub>による神経突起伸長促進

またこの神経突起伸長は、細胞内カルシウムイオンのキレート剤であるBAPTA-AMの前投与や、EDTAによる細胞外カルシウムイオンのキレートにより有意に抑制されることから、15d-PGJ<sub>2</sub>によるPC12細胞の分化促進には細胞外からのカルシウムイオンの流入が重要である可能性が示唆された。さらに、カルシウムイオンに対する蛍光プローブを用いることにより、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定したところ、NGFと15d-PGJ<sub>2</sub>を同時に投与することにより、細胞内カルシウムイオン濃度の有意な上昇が認められた。

15d-PGJ<sub>2</sub>による細胞外からのカルシウムイオン流入に関与するカルシウムチャネルの探索を行ったところ、カプサイシン受容体としても知られているtransient receptor potential V1 (TRPV1) チャネルが示唆された。実際に、siRNAによってTRPV1発現を抑制することにより、15d-PGJ<sub>2</sub>による神経突起伸長が抑制されることも確認された。さらに、biotin標識

した15d-PGJ<sub>2</sub>を調製し、TRPV1との相互作用を解析したところ、細胞内において15d-PGJ<sub>2</sub>がTRPV1に結合することが明らかとなった。以上の結果から、15d-PGJ<sub>2</sub>はTRPV1を活性化させ、その結果細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することにより、分化を促進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7件)

- ① Shibata T, Kimura Y, Mukai A, Mori H, Ito S, Asaka Y, Oe S, Tanaka H, Takahashi T, Uchida K. (2011) Transthiocarbamylation of proteins by thiolated isothiocyanates. *J. Biol. Chem.* 286, 42150-42161. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 柴田貴広、石野孔祐、下津祐樹、脇田知佳、柴田亮行、小林慎雄、松田知成、町田幸子、Xiaochun Zhu、Lawrence M. Sayre、内田浩二、LOX-1リガンドとしての4-オキシ-2-ノネナール修飾タンパク質の解析. 第83回日本生化学会大会 2010年12月、神戸

- ② 高橋克弘、柴田貴広、河合慶親、松原唯、森仁志、高橋重成、森泰生、内田浩二、シクロペンテノン型プロスタグランジンによる神経分化促進機構. 第84回日本生化学会大会 2011年9月、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 貴広 (SHIBATA TAKAHIRO)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号：80447838

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし