

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500985

研究課題名(和文)アルツハイマー型認知症予防のための新規食品成分検索とその細胞内作用機構の検証

研究課題名(英文)Detection of Novel Food Components for Preventing Alzheimer's Disease and Evidence of its Action Mechanism

研究代表者

土井 裕司(DOI, Hiroshi)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：50106267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者の脳では微小管形成阻害が起こっていると考えられる。神経細胞モデルであるPC12細胞培養培地に脂質過酸化物質(P0)を添加した結果、細胞生育や微小管形成が阻害されることを確認した。この事実は、アルツハイマー病発症原因として脂質過酸化物質が考えられることを示しており、その予防のための食品成分として抗酸化物質が有効であるかと推察される。そこで、PC12細胞を脂質過酸化物質で劣化させたのち、抗酸化物質を添加して、細胞増殖の確認を行い、抗酸化系酵素の変動を観察した。その結果、アスコルビン酸やエピカテキン・カロテンの添加は生細胞数を増加させ、抗酸化酵素活性を元に戻した。

研究成果の概要(英文)：The impairment of the microtubule system is important to explain the pathogenesis of Alzheimer's disease(AD). We have reported on the inhibition of microtubule formation by phosphatidylcholine hydroperoxides(P0) in PC12 cells, which may be a good model of brain cells in the early stages of neurodegenerative diseases. This fact indicates that P0 may be one of the cause for AD. The microtubule assembly system was dependent on the antioxidative enzyme system in cells exposed to oxidative stress. It is suggested that antioxidant agents may be effective in preventing AD. In our experiments, PC12 cells were used after deterioration by P0. The addition of ascorbic acid, epicatechin or beta-carotene made increase of alive cell number, and made to recover the activities of antioxidative enzymes.

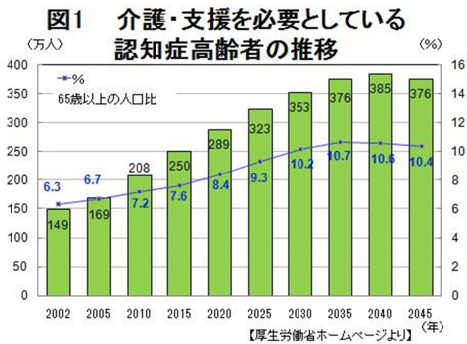
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：アルツハイマー型認知症 チュープリン 微小管 抗酸化系酵素 抗酸化物質 紅タデ アセチルコリン エステラーゼ

1. 研究開始当初の背景

図1は、厚生労働省のホームページに見ら



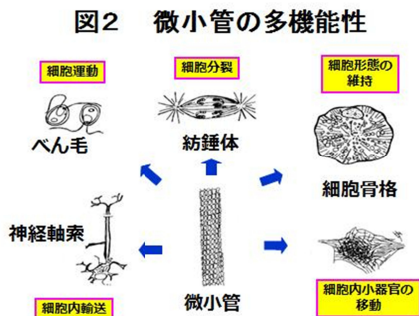
れる介護・支援を必要としている認知症高齢者の推移を示している。これから、今後、介護・支援を必要としている認知症患者(その多くはアルツハイマー型認知症である)が増加すると予測されていることが分かる。

高齢社会を迎え、アルツハイマー型認知症患者が増加している現在、特に食品科学に携わっている本申請者は、食生活から現状に対応しようと考え、高齢者が健康に過ごせるための食生活、すなわち、アルツハイマー型認知症患者用の食生活は如何にあるべきかを考えている。

そのためには、まず、アルツハイマー型認知症の発症原因を追究し、その原因を駆逐する、あるいは対抗する方法を考えるべきである。

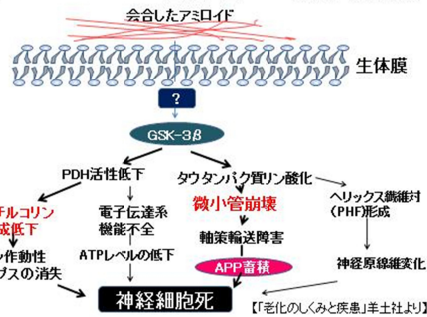
アルツハイマー型認知症はチューブリン・微小管系の伸展阻害によるものであるという仮説が Matsuyama and Jarvik によって報告されている (*Proc.Natl. Acad. Sci., USA, 86,8152(1989)*)。

図2に示すように、微小管は細胞内にあって、細胞骨格、紡錘体、べん毛、神経軸索を形成して多機能性を発現している。アルツハイマー型認知症患者の脳では、細胞数が減少



し、細胞の委縮が観察されている。その事実は、微小管の機能低下によることが推察させるもので、Matsuyama and Jarvik の仮説の正

図3 アルツハイマー型認知症による神経細胞死機構



しさを裏付けるものである。

その後の研究成果を反映して、現在知られているアルツハイマー型認知症による神経細胞死のメカニズムを示したものが図3である。そこでは、PDHの活性低下とタウタンパク質のリン酸化の大きく2つの要因を挙げている。

タウタンパク質は微小管付随タンパク質の一つで、チューブリンからの微小管形成に強く関与している。それが末端のチロシン残基のリン酸化により微小管形成促進作用を失い、細胞死に至るというものである。本申請者は、タウタンパク質のリン酸化ばかりでなく、どんな要因であれ微小管形成能の低下が細胞死、アルツハイマー型認知症を引き起こすものと考えている。

2. 研究の目的

アルツハイマー型認知症発症のメカニズムは、4つの系統にまとめられる。うち、2系統は微小管形成そのものに関するもので、本申請者はこれまで関連研究に携わってきた。また、1つはコリン仮説といわれるもので、アセチルコリンの減少、シナプス(微小管から形成されている)の消失から細胞死に至るものである。そこで本研究は、食品からアセチルコリンエステラーゼ阻害物質を検索し、そのシナプスへの影響および細胞への影響を明らかにし、薬剤としてではなく、日常の食生活からアルツハイマー型認知症発症予防につなげることを目的としている。また、本阻害物質の神経保護作用にも期待して、健康な長寿社会の育成を目指したものである。

3. 研究の方法

上述のように、アルツハイマー型認知症発症原因としての微小管形成の阻害とアセチルコリン合成低下に着目した。研究方法の1つは、微小管形成阻害要因としての脂質過酸化作用の減弱による予防効果発現食品

成分の検索であり、他の一つはアセチルコリンを減少させないため、食品素材からのアセチルコリンエステラーゼ阻害物質の検索である。

前者については、脳細胞での微小管形成阻害を前提としていることから、神経細胞モデルとして PC12 細胞を対象として、脂質過酸化による微小管形成阻害およびその生細胞数減少効果を確認した。また、脂質過酸化物の抗酸化系酵素活性への影響を検討した。次いで、脂質過酸化物を洗浄除去した培地で培養した細胞を活性化させる物質として抗酸化物質の抗酸化系酵素活性への効果を検討した。

脂質過酸化物は、精製大豆フォスファチジルコリン製品である Lipoid S-100 をメチレンブルー存在下で光酸化させることで得た。チューブリンからの微小管形成は、PC12 細胞の GTPase 活性を GDP の増加で測定することによって検討した。生細胞数は WST-8 法で測定した。抗酸化系酵素としては、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、カタラーゼ(CAT)を取り上げ、いずれも市販酵素活性測定キットを用いて測定した。

後者については、紅タデ中にアセチルコリンエステラーゼ阻害物質が存在することを確認し、それをクロマトグラフィーで精製することを試みた。

紅タデから各種溶媒で阻害活性物質を抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で精製を試みた。

4. 研究成果

(1) 微小管形成阻害に対応する食品成分検索

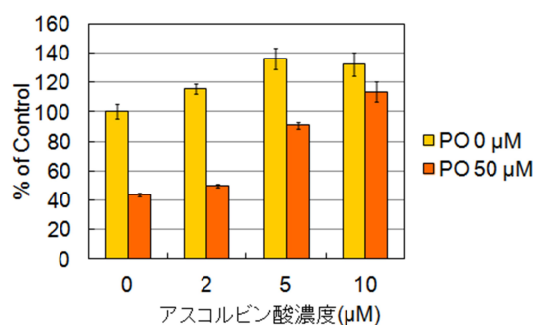
大豆由来リン脂質過酸化物 (PO) は、PC12 細胞の微小管形成を阻害して、その生育で生細胞数を小さくすることが確認された(雑誌論文)。この事実は、アルツハイマー型認知症患者の脳細胞モデルを PO と PC12 細胞とで作成することの可能性を示しており、以後の実験では、PO で劣化させた分化 PC12 細胞を使用することとした。ここで分化細胞を使用しているのは、分化細胞は神経突起を伸展させ、PO への感受性が未分化細胞よりは大きくなっているからである。

また、PO で劣化した分化 PC12 細胞では、その抗酸化系酵素活性が大きくなっていた

(雑誌論文)。

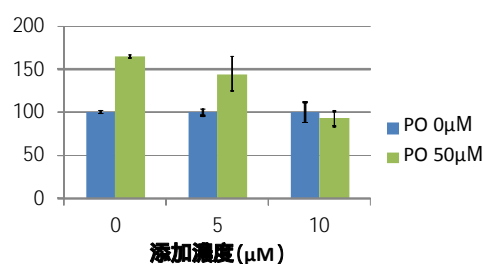
細胞が PO で劣化させられていることから、対応する食品成分として抗酸化物質が有効であると考えられる。抗酸化物質として、エピカテキン、ケルセチン、アスコルビン酸、
- トコフェロール、
- カロテンなどが検討対象とされ、生細胞数への影響および抗酸化系酵素活性への影響が検討された。一例として、劣化した分化細胞へのアスコルビン酸の影響を以下に示す(未発表)。

アスコルビン酸添加(48H)の相対生細胞数への影響



また、抗酸化系酵素活性への影響としてアスコルビン酸のカタラーゼ活性への効果を示すと以下のようなになる。

CAT (24 h)



生細胞数への影響では、PO に曝されたことにより生細胞数は減少していたが(アスコルビン酸濃度 0) 添加によって濃度依存的に生細胞数を回復させていることがわかる。

また、CAT への影響では、PO に曝されたことにより CAT 活性が大きくなっていたものが添加によって劣化していない細胞の CAT 活性と同レベルまで戻った。

以上のことから、PO により劣化した細胞へは抗酸化物質の添加は正常細胞への回帰という点で効果が認められたと考えられる。他

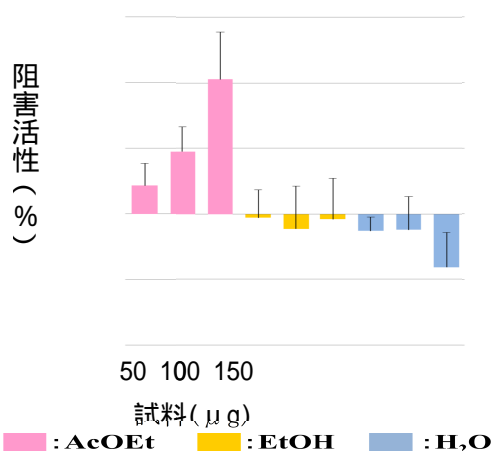
の抗酸化物質についても、効果の大小があるものの同じような効果が期待できるものと考えている。

このことは酸化ストレスにより老化したアルツハイマー型認知症へは抗酸化物質がその予防に効果的であるという考えを導きだすものである。

(2) アセチルコリンエステラーゼ阻害物質の検索

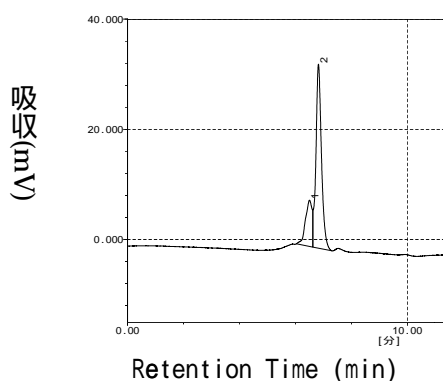
次いで、紅タデからのアセチルコリンエステラーゼ阻害物質の精製実験結果について述べる。

まず最初に、タデ葉は生葉より乾燥状態の方が阻害活性が高かった。次いで、抽出溶媒の検討がなされたので、その結果を以下に示す。



上の図に示すように、抽出溶媒としては酢酸エチルが適当であると判断された(学会発表,)。

乾燥葉からの酢酸エチル抽出物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製したときの阻害活性画分(Fr.#9)をHPLCで純度検定した結果を示す(学会発表)。



これらの結果、乾燥紅タデ葉から酢酸エチル抽出によりアセチルコリンエステラーゼ阻害物質が得られ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより部分精製に成功したことがわかる。これらの結果は2013年8月の第60回日本食品科学工学会大会で報告された。

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 1件)

Microtubule Formation and Activities of Antioxidative Enzymes in PC12 cells Exposed to Phosphatidylcholine Hydroperoxides. *International Journal of Molecular Science*, **13**, 15510-15522, 2012, Yukako Yamanaka, Shumi Yoshida-Yamamoto, and Hiroshi Doi

[学会発表](計 6件)

紅タデからのアセチルコリンエステラーゼ阻害物質の精製、酒井芙弥子、宮崎由子、山中裕佳子、土井裕司、第60回日本食品科学工学会大会、2013年8月30日、実践女子大学

フォスファチジルコリン過酸化物により劣化した分化PC12細胞への各種抗酸化剤の効果、山中裕佳子、橋本沙織、向瀬きなみ、酒井芙弥子、川口真規子、土井裕司、第67回日本栄養・食糧学会大会、2013年5月25日、名古屋大学

リン脂質過酸化物により劣化した分化PC12細胞への各種抗酸化剤の効果、山中裕佳子、橋本沙織、向瀬きなみ、酒井芙弥子、川口真規子、土井裕司、日本栄養・食糧学会第51回近畿支部大会、2012年10月20日、甲子園大学

紅タデからのアセチルコリンエステラーゼ阻害物質の検索、酒井芙弥子、阪口亜貴、山中裕佳子、宮崎由子、土井裕司、日本栄養・食糧学会第51回近畿支部大会、2012年10月20日、甲子園大学

リン脂質過酸化物により劣化した分化PC12細胞への各種抗酸化剤の効果、山中裕佳子、羽柴澄子、山田 瞳、酒井芙弥子、土井裕司、日本農芸化学会、2012年度大会、2012年3月23日、京都女子大学

ヤナギタデの免疫賦活作用の効果、宮崎

由子、中西まなみ、千葉文香、土井裕司、日本栄養・食糧学会、2011年度大会、2011年5月14日、お茶の水女子大学

〔図書〕(計 1件)

Role of Microtubules in Maintenance of Nerve Cell Networks. Kentaro Yomogida, Shumi Yoshida-Yamamoto, and Hiroshi Doi, In Neurodegenerative Diseases -Processes, Prevention, Protection and Monitoring-. Edited by Raymond Chuen-Chung Chang, pp35-50, 2011, InTech, Rijeka, Croatia

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土井 裕司 (DOI, Hiroshi)
武庫川女子大学・生活環境学部・教授
研究者番号：50106267

(3)連携研究者

川口 真規子 (KAWAGUCHI, Makiko)
甲子園大学・栄養学部・講師
研究者番号：1033320

酒井 芙弥子 (SAKAI, Fumiko)
武庫川女子大学・生活環境学部・助手
研究者番号：90612565