

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号： 36301
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23700941
 研究課題名（和文） 神経・行動科学的アプローチによる認知症防御を目指した柑橘類由来成分探索と機能解明
 研究課題名（英文） Neural and behavioral scientific approach for protecting dementing disorder: Exploration and functional elucidation of citrus compounds.
 研究代表者 奥山 聡 (OKUYAMA SATOSHI)
 松山大学・薬学部・助教
 研究者番号： 40550380

研究成果の概要（和文）：

柑橘類の果皮に特徴的に含まれ中枢神経系への作用がこれまで明らかにされていなかった、クマリンの一種である auraptene (AUR) と、ポリメトキシフラボンの一種である 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) の評価の為に、全脳虚血モデル、LPS 誘発炎症モデル、MK-801 誘発健忘症モデルの各種病態モデルマウスを用いて作用の検討を行ったところ、AUR と HMF には、脳内において抗炎症作用や脳由来神経栄養因子産生促進作用を含めた様々な生理活性を持つ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Functional effect of citrus compounds, auraptene (AUR) and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF), on the central nervous system were investigated using with the global ischemia, LPS-induced inflammation and MK-801-induced dementia models. AUR and HMF showed anti-inflammatory effect and enhancing effect of BDNF production in the brain hippocampus.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 生活科学・食生活学

キーワード： 柑橘類由来成分、オーラプテン、ヘプタメトキシフラボン、中枢神経系、脳虚血、抗炎症、脳由来神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

近年、健康増進を図る上で食品のもつ生体調節機能が重要であると認識されるようになってきた。柑橘類についても、発がん抑制作用や抗アレルギー作用などの末梢作用をもつ成分が次々と見出され報告されてきたが、脳機能に作用する成分についてはほとんど研究されていなかった。しかし最近になり、柑橘由来成分でフラボノイド配糖体のヘスペリジンが脳内へ移行する可能性も報告さ

れている。また、生薬の陳皮(熟したみかんの皮を干したもの)に含まれるノビレチンに抗認知症作用があることが明らかにされたことは、柑橘類にその他の脳機能活性化物質が存在する可能性を示唆している。そこで申請者らは柑橘成分には脂溶性低分子の化合物が多く、中枢神経組織に移行し直接神経細胞などに作用する可能性が高いと考え、愛媛県特産柑橘の果皮を材料として、培養神経細胞において基幹シグナル伝達分子であり、脳神経細胞の機能を高め、記憶・学習や認知機

能など幅広い高次脳機能に不可欠の分子と解明されつつある extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) 活性化を指標とする *in vitro* スクリーニングを実施した結果、複数の候補物質を見出すことができた (論文 5)。

2. 研究の目的

In vitro スクリーニングで効果があった化合物の中でも、愛媛県特産柑橘の河内晩柑に多く含まれていたフラボノイドの一種である 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) と auraptene (AUR) には、これまで中枢神経系における効果が報告されていなかったことから、これら両化合物に注目し *in vivo* 実験を進めた。

本研究の目的は、中枢神経系の病態モデルとして、マウスを用いた全脳虚血モデル、LPS 誘発炎症モデル、MK-801 誘発健忘症モデル、MK-801 誘発統合失調症様モデルを作製、これらの化合物が脳機能保護作用に及ぼす効果を行動薬理的、生化学的、組織化学的手法を用いて検討し、脳内における作用メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系病態モデルの作製

① 全脳虚血モデル

全脳虚血モデルは、イソフルラン麻酔下で C57BL/6 マウスの総頸動脈流を 12 分間一時的に止め、再灌流することで作製した。HMF や AUR の血中濃度を一定に保つために、サンプルを入れた Alzet 浸透圧ポンプを背中皮下に埋め込むことで、除放的な一週間の連続投与を行った。投与量は 10、25、50mg/kg/day となるように調製した。

② LPS 誘発炎症モデル

脳内における炎症の誘発は、グラム陰性菌のエンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS) を、C57BL/6 マウスの側脳室や海馬に微量注入することで作製した。HMF 50mg/kg/day を一週間連続で投与した後に LPS を注入し、その後解析を行った。

③ MK-801 誘発健忘症モデル

C57BL/6 マウスに対し、Alzet 浸透圧ポンプで HMF 50mg/kg/day を一週間連続で投与した後に、MK-801 (0.05mg/kg) を投与し健忘症を誘発した。

④ MK-801 誘発統合失調症様モデル

C57BL/6 マウスに対し HMF 50mg/kg/day を一週間連続で投与した後に、MK-801 (0.2mg/kg) を投与し統合失調症様陽性症状を誘発した。

(2) 行動科学的解析

行動試験による病態解析では、様々な試験を組み合わせ実施し、解析ソフトである ANY-maze を用いて、移動距離、軌跡、不動時間など様々なパラメーターについて調べた。主にオープンフィールドテスト、Y-maze テスト、モリス水迷路試験を行った。

(3) 脳組織を用いた生化学的解析

解剖により脳組織を取り出し、海馬や線条体を中心に解析を進めた。生化学解析では細胞内シグナル伝達に及ぼす作用として、ERK1/2、その下流シグナルである cAMP response element-binding protein (CREB) のリン酸化レベルをウエスタンブロット法で調べた。また TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、COX-2 など様々な炎症マーカーや、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) など脳内栄養因子の遺伝子発現の変動については、RT-PCR 法を用いて測定を行った。

(4) 脳組織を用いた組織学的解析

特異的抗体を用いアストロサイトやミクログリア、神経細胞の形態変化について免疫組織化学染色法で解析を行った。同時にそれらの細胞と BDNF、COX-2 などのマーカーとの関連についても同様の方法で解析を行った。さらに新規産生神経細胞の発現についても調べた。

4. 研究成果

(1) AUR の全脳虚血モデルに対する効果 (post-administration: 治療効果)

虚血手術直後に浸透圧ポンプによる AUR の投与を開始したところ、虚血 (2V0) 群では 7 日目における生存率が 50% だったのに対し、2V0+AUR25 (25mg/kg/day 投与) 群では 89% であった。虚血脳では炎症がおこることが知られている。全脳虚血に対し脳の実質は非常に脆弱であることから、海馬でのミクログリア (脳における免疫担当細胞) の様子を調べたところ、2V0 群ではミクログリアの数が有意に増えていたが、2V0+AUR25 ではその増加を有意に抑制していた (図 2)。また海馬では、炎症や酸化ストレス、細胞毒性などの影響で神経細胞死がおこるが、虚血手術 7 日後の海馬各領域 (CA1, CA2, CA3) の生存神経細胞数を調べたところ、2V0+AUR25 群では 2V0 よりも各領域で有意に高い生存率であった (図 1)。このことから、AUR が虚血障害に対し抗炎症、神経細胞死抑制に働くことが示唆された (論文 1)。

図 1

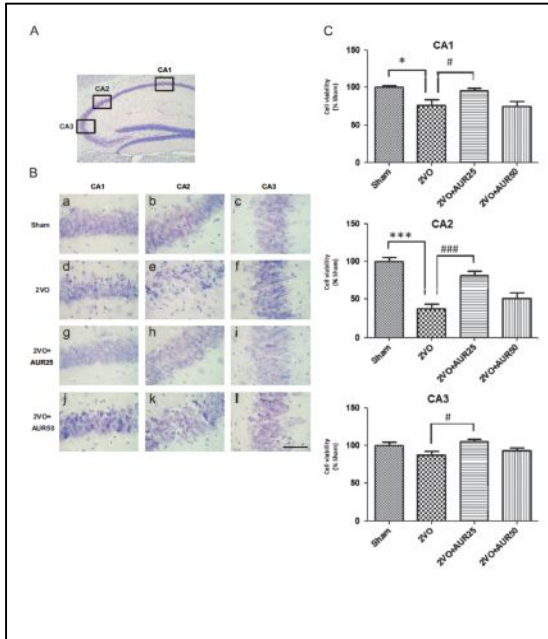
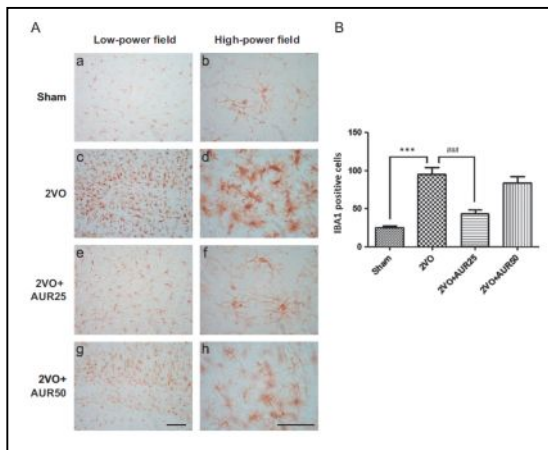


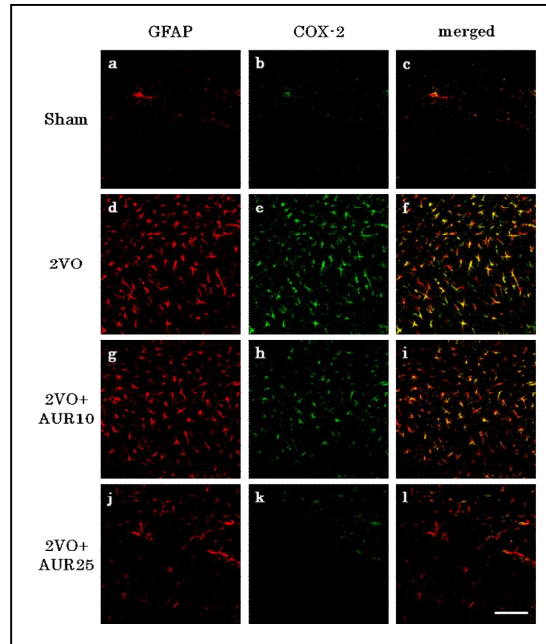
図 2



(2) AUR の全脳虚血モデルに対する効果
(pre-administration : 予防効果)

AUR (25mg/kg/day) をいれた浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、投与開始 5 日目に全脳虚血手術を行った。その 3 日後 Y-maze テストを用いて、短期作業記憶について調べたところ、2VO 群でみられた記憶障害が 2VO+AUR25 群では改善される傾向が見られた。(1) の実験同様、2VO+AUR25 では海馬におけるミクログリアの活性化を有意に抑制し、炎症マーカーの一つである COX-2 の発現も有意に抑制していた (図 3)。炎症に関連のあるシグナル因子 NFκB p65 の発現量も、2VO 群で有意に高かったが、2VO+AUR25 群では上昇を有意に抑制していた。また、記憶に重要な海馬 CA1 領域の神経細胞死も (1) の実験同様に、2VO+AUR25 では有意に抑制していた。このことから、本実験スケジュールにおいても、AUR による抗炎症、神経細胞死抑制効果が観察できた。

図 3



(3) HMF の全脳虚血モデルに対する効果
(pre-administration : 予防効果)

HMF (50mg/kg/day) をいれた浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、投与開始 5 日目に全脳虚血手術を行った。その 3 日後に海馬の変化について調べた。これまで培養神経細胞でみられた HMF による ERK1/2 と CREB の活性化が、2VO+HMF50 群の海馬においても見られた。これらの細胞内シグナル因子が活性化 (=リン酸化) すると、BDNF の合成を促進させるメカニズムが活性化される可能性があるが、2VO+HMF50 群では 2VO に対し、有意な BDNF 産生増加が観察された (図 4)。また、BDNF の産生は、新規産生神経細胞の発現を促進することが知られているが、2VO+HMF50 群では海馬歯状回 (SGZ) と側脳室下帯 (SVZ) でその様子が観察された (図 5)。これらのことから、虚血後の脳内で HMF は、神経栄養因子産生による脳保護作用を持つ可能性が示唆された (論文 2)。

図 4

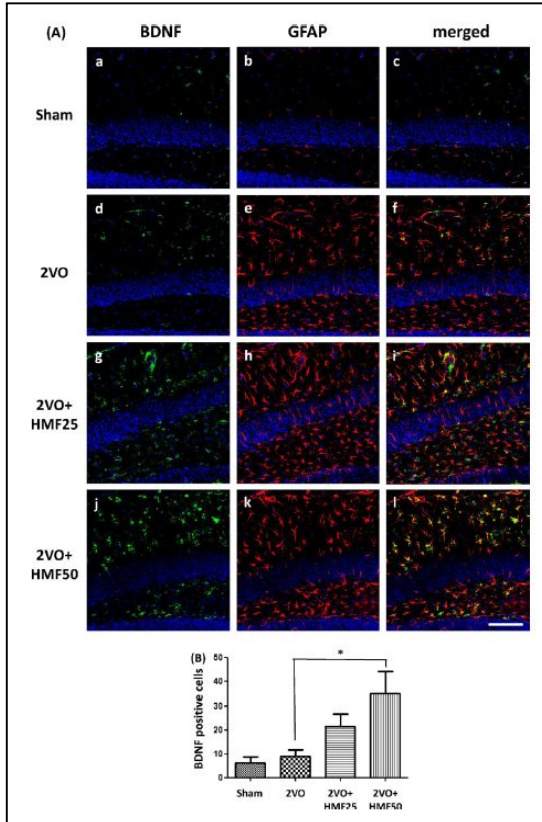
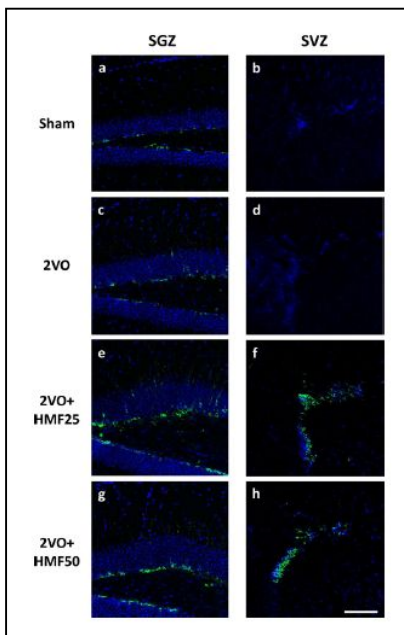


図 5

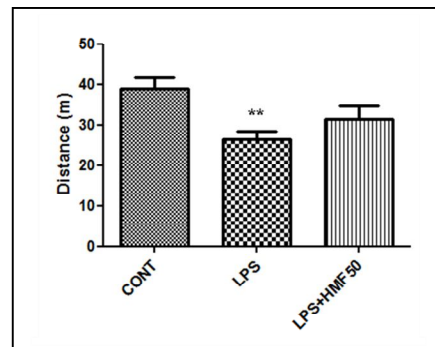


(4) HMF の LPS 側脳室投与に対する効果

LPS を側脳室に投与すると脳の広範囲に炎症が広がることから、側脳室の近傍に位置する線条体と海馬を中心に解析を行った。HMF (50mg/kg/day) の一週間皮下投与後、LPS (5 μ g) を脳室に投与し、次の日にオープンフィールドテストを行ったところ、LPS 投与群で有意に低下した行動量が、LPS+HMF50 群では改善する傾向が見られた (図 6)。LPS に

より両領域で炎症が誘発されたが、LPS+HMF50 群ではミクログリアの活性化、COX-2 産生の両面で抑制効果、すなわち抗炎症作用が認められた。

図 6



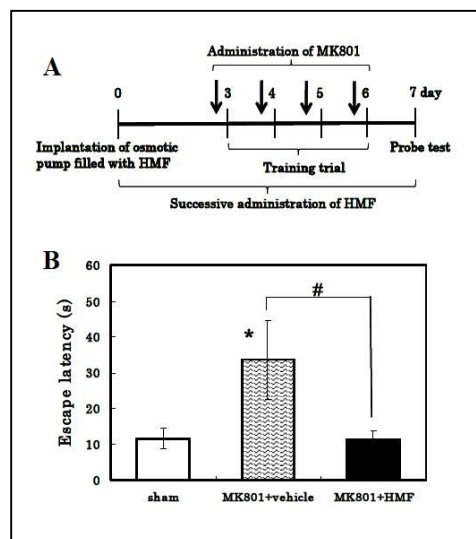
(5) HMF の LPS 海馬投与に対する効果

HMF (50mg/kg/day) の一週間皮下投与後、LPS (30 μ g) を海馬に投与し二日後に脳の解析を行った。LPS 群では LPS 投与前に比べて体重が有意に減少したが、LPS+HMF50 群では LPS 群と比較し、体重減少を有意に抑制していた。(5) の実験同様に、海馬におけるミクログリアの活性化、COX-2 の産生は HMF 投与によって有意に抑制されていた。

(6) HMF の MK-801 健忘症モデルに対する効果

HMF (50mg/kg/day) を入れた浸透圧ポンプを皮下に埋め込み、投与開始 3 日目からモリス水迷路試験を行った。プールの中にある避難場所を覚えさせるトレーニングを、1 日 5 回 4 日間行った。健忘症を誘発させるための MK-801 (0.05mg/kg) 投与は、毎トレーニング開始 30 分前に行った。トレーニング開始 4 日目、MK-801 群では避難場所に到達するまでの時間が有意に長かったが、MK-801+HMF50 投与群では MK-801 群に比べ有意に短かった (図 7、論文 5)。

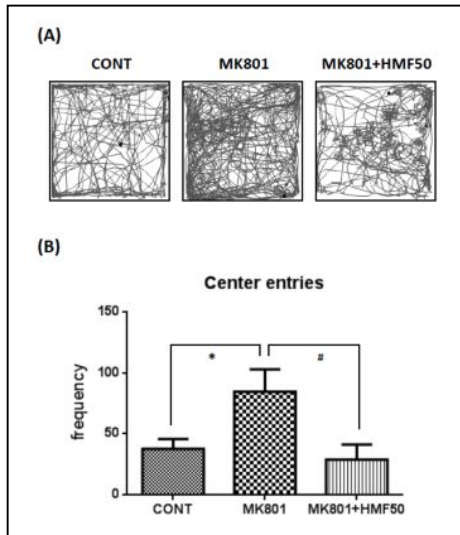
図 7



(7) HMF の MK-801 統合失調症様モデルに対する効果

HMF (50mg/kg/day) の一週間皮下投与後、MK-801 (0.2mg/kg) を投与し、統合失調症様陽性症状を誘発した。MK-801 群では行動量が有意に増加したのに対し、MK-801+HMF50 投与群ではそれを有意に抑制した (図 8)。

図 8



(8) 結論

以上のように、様々な中枢神経系病態モデルに対する、柑橘由来成分 AUR と HMF の効果を評価してきたところ、抗炎症作用と脳由来神経栄養因子産生促進作用を中心とする、脳保護効果が期待できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件) <査読有>

1. Okuyama S., Minami S., Shimada N., Makihata N., Nakajima M., Furukawa Y. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice. *Eur J Pharmacol*, 699, 118-23 (2013)
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.043.
2. Okuyama S., Shimada N., Kaji M., Morita M., Miyoshi K., Minami S., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Watanabe S., Nakajima M., Furukawa Y. Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci Lett*, 528, 190-5 (2012)
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.08.079.

3. Furukawa Y., Watanabe S., Okuyama S., Amakura Y., Yoshimura M., Yoshida T., Nakajima M. Effect of Citrus polymethoxyflavones on neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Biointerface Res Appl Chem*, 2, 432-7 (2012)
http://www.journaldatabase.org/articles/effect_citrus_polymethoxyflavones_on.html
4. Furukawa Y., Watanabe S., Okuyama S., Nakajima M. Neurotrophic effect of citrus auraptene: neuritogenic activity in PC12 cells. *Int J Mol Sci*, 13, 5338-47 (2012)
DOI: 10.3390/ijms13055338.
5. Furukawa Y., Okuyama S., Amakura Y., Watanabe S., Fukata T., Nakajima M., Yoshimura M., Yoshida T. Isolation and Characterization of Activators of ERK/MAPK from Citrus Plants. *Int J Mol Sci*, 13, 1832-45 (2012)
DOI: 10.3390/ijms13021832.
6. 天倉吉章、好村守生、奥山聡、古川美子。愛媛県特産柑橘類の果皮成分解析と脳活性化作用. *FFI Journal*, 218, 28-35 (2013)

[学会発表] (計 9 件)

1. 奥山聡、守田麻由、加地未来、中島光業、古川美子 「柑橘由来成分 auraptene の神経系に及ぼす作用 (2) 脳虚血疾患モデルに対する脳保護効果」 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜
2. 古川美子、奥山聡、渡辺苑、中島光業 「柑橘由来成分 auraptene の神経系に及ぼす作用 (1) 培養神経細胞および PC12 細胞に対する作用」 日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜
3. 奥山聡、島田直子、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子 「柑橘果皮由来成分ヘプタメトキシフラボンの全脳虚血モデルマウスにおける BDNF 産生ならびに神経新生促進作用」 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡国際会議場
4. 奥山聡、島田直子、渡辺苑、天倉吉章、好村守生、中島光業、古川美子 「河内晩柑果皮含有成分の脳虚血障害に対する脳保護作用」 第 3 回宇和島薬剤師会学術大会、2012 年 12 月 16 日、市立宇和島病院
5. 守田麻由、奥山聡、加地未来、中島光業、古川美子 「柑橘由来成分 auraptene の脳虚血疾患に対する脳保護効果」 第 51

回日本薬学会中国四国支部学術大会、
2012年11月10日、島根県民会館・サン
ラボ一むらくも

6. 三好和浩、奥山聡、西川祐貴、天倉吉章、
好村守生、吉田隆志、中島光業、古川美
子 「柑橘由来成分 heptamethoxyflavone
の中樞神経系における抗炎症作用検討」
第 51 回日本薬学会中国四国支部学術大
会、2012年11月10日、島根県民会館・
サンラボ一むらくも
7. 奥山聡、南仙雅、島田直子、巻幡奈保美、
天倉吉章、好村守生、吉田隆志、中島光
業、古川美子 「柑橘由来脳活性化物質
の探索 (2) 脳虚血障害におけるオーラ
プテンの脳保護作用」 日本薬学会第
132 年会、2012年3月29日、北海道大
学
8. 古川美子、奥山聡、渡辺苑、深田貴大、
中島光業、天倉吉章、好村守生、吉田隆
志 「柑橘由来脳活性化物質の探索
(1)」 日本薬学会第 132 年会、2012
年3月29日、北海道大学
9. 津村優一、奥山聡、天倉吉章、好村守生、
吉田隆志、中島光業、古川美子 「愛媛
特産柑橘果皮由来成分の脳における抗
炎症作用」 第 50 回日本薬学会中国四
国支部学術大会、2011年11月12日、サ
ンポートホール高松

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：脳神経疾患治療、脳神経疾患予防また
は脳機能改善のための組成物

発明者：古川美子、吉田隆志、天倉吉章、奥
山聡、中島光業

権利者：古川美子

種類：特許

番号：特願 2011-213795 号

出願年月日：2011年9月28日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥山 聡 (OKUYAMA SATOSHI)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：40550380