

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 4 日現在

機関番号：34505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460277

研究課題名(和文)ファイトケミカルによる細胞寿命の制御機構

研究課題名(英文)How do phytochemicals regulate the cellular survival and death?

研究代表者

後藤 隆洋 (Gotow, Takahiro)

甲子園大学・栄養学部・教授

研究者番号：20135693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ファイトケミカルによるミトコンドリアとオートファジーの機能と細胞生存・細胞死との関係を明らかにした。レスベラトロール(RSV)はPC12細胞で、ミトコンドリアとオートファジーを腫瘍性細胞では不活性化して殺し、神経性細胞では活性化して生存させる。冬虫夏草とその特異的成分のゴルジセピンをDahl食塩感受性高血圧ラットとPC12細胞に作用させると、ラットの寿命を有意に延長させ、ミトコンドリアとオートファジーは脳の神経細胞では不活性化し、その他の器官の細胞では活性化した。PC12細胞ではこれらの物質の作用はRSVの場合と同じであった。ファイトケミカルのヒトの健康寿命の延長効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：We clarified how phytochemicals regulated the relationship between functions of mitochondria/autophagy and cell survival/death with morphological, immunohistochemical and biochemical analyses. Resveratrol(RSV) suppressed mitochondria/autophagy functions in naive (tumorigenic) PC12 cells, resulting in cell death, but activated these functions in differentiated (neuronal in nature) PC12 cells, enhancing cell survival. LC3 was found necessary for such RSV functions. Cordyceps militaris (CM) extended significantly lifespan of stroke-induced Dahl salt-sensitive hypertensive rats through reducing the mitochondria/autophagy-related functions in neurons of the central nervous system and activating these functions in respective cells in heart, kidney and liver. CM extract and cordycepin, a specific CM ingredient, influenced PC12 cells, in a manner similar to RSV. The effects of these phytochemicals will be expected to extend healthy lifespan in humans.

研究分野：細胞神経生物学

キーワード：レスベラトロール 冬虫夏草 コルジセピン 神経細胞 PC2細胞 ミトコンドリア オートファジー
細胞生存

1. 研究開始当初の背景

本研究はファイトケミカルを用いて細胞生存及び細胞死のメカニズムを特にミトコンドリアとオートファジーの働きに着目して解析する。私たちは赤ワインポリフェノールのレスベラトロールの老化促進マウスへの効果を解析し、肝細胞でミトコンドリアの増加と脂肪滴の減少、脂肪滴を囲むミトコンドリアの増加、脂肪酸合成の抑制及びミトコンドリアに局在する活性酸素消去酵素(SOD2)の増加を明らかにし、細胞機能の活性化が引き起こされることを指摘した(Shiozaki et al., 2011)。レスベラトロールは長寿遺伝子 SIRT ファミリー(ヒストンを脱アセチル化し DNA の働きを制御)を活性化し、さらにカロリー制限と同様の作用で、細胞のエネルギーセンサーである AMPK(AMP 活性化キナーゼ、ATP が減少すると働く)を活性化させ、ミトコンドリアの機能を亢進し、寿命延長に貢献すると考えられている。しかし、この化学物質の酵母、線虫、ハエなどの寿命延長効果は示されているが、マウスでの寿命延長効果はみられない。カロリー制限したアカゲサルも寿命延長効果は確認されていない。しかし、これら哺乳類でレスベラトロールあるいはカロリー制限が癌も含め老化関連疾患を有意に減少させたことは極めて興味深い。PC12 細胞での解析では、レスベラトロールはこの細胞が未分化(腫瘍性)の場合は細胞死を、NGF(神経成長因子)で分化(神経性)させると神経突起伸展と細胞生存を促進することがわかり、細胞の分化度の相違により逆の作用を示し、この現象がミトコンドリアとオートファジーの機能変化と強く関連していることが初め示唆された(Hayakawa et al., 2012)。

2. 研究の目的

ファイトケミカルは植物由来の低分子化学物質で強力な抗酸化能をもつため、老化関連疾患の予防・抑制効果が注目されている。ファイトケミカルは正常細胞では寿命の延長、腫瘍細胞では細胞死を誘導することが指摘されているが、このような細胞の分化・性質によって、細胞を生かしたり殺したりするメカニズムがどのように区別されるのか、そのカスケードに参与する分子群を特にミトコンドリアとオートファジー(細胞浄化作用)の機能変化に関連して解明することが目的である。すなわち、ファイトケミカルを利用して、ミトコンドリアとオートファジーの機能促進あるいは低下がどのように細胞寿命の延長あるいは短縮を引き起こすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は平成 25~28 年度の 4 年間で、甲子園大、順天堂大及び新潟大で実施した。使用する機器の一部は順天堂大にしかないため、また研究には高度の遺伝子、タンパク質、細

胞レベルの解析技術が必要なため、順天堂大と新潟大の熟練研究者(リソソーム/オートファジー系が専門)が分担者として必須であった。最初の 2 年間は培養細胞を用いて解析を行い、細胞から得られたデータに基づき、残り 2 年間は解析目的に応じた動物(マウス)を用いて、ファイトケミカルの効果を以下の ~ の方法を用いて解析した。形態学的手法(位相差、光学及び電子顕微鏡で解析)、免疫組織細胞化学的手法(共焦点レーザー顕微鏡で解析)、生化学的手法(SDS-PAGE/イムノプロット法を使用)、RNAi 法(LC3 遺伝子の各 siRNA を細胞に導入後 ~ の手法で解析)した。発現変化を解析したものは、ミトコンドリア関連タンパク質(ミトコンドリア ATP 合成酵素 サブユニット、活性酸素消去酵素 2 (SOD2)、SIRT3) オートファジー関連タンパク質(LC3、カテプシン D、p62) 細胞生存・細胞死・代謝関連タンパク質(SIRT1、AMPK、Akt、mTOR)、神経細胞関連タンパク質(シナプトフィジン、MAP2、ニューロフィラメントタンパク質)である。ファイトケミカルとしてレスベラトロールに加えて、強力な抗酸化・抗腫瘍能をもつファイトケミカルで、最近細胞への作用機序が注目されている冬虫夏草(*Cordyceps militaris*)とその特異的成分であるコルジセピン(cordycepin:ヌクレオチドの誘導体、分子量 251)(Takahashi et al., 2012)を用いて、同様のアプローチで解析した。冬虫夏草の場合は本当に個体(哺乳類)の寿命が延長するか解析した。冬虫夏草は国内で人工飼育が可能になり、日本シルクバイオ研究所にて入手可能となった。

4. 研究成果

(1) 私たちは、以前から PC12 細胞を用いて、赤ワインに豊富なファイトケミカルで寿命延長効果が示唆されているレスベラトロール(RSV)の神経保護作用と抗腫瘍作用について解析してきた。PC12 細胞は交感神経系の腫瘍細胞で、NGF で神経突起伸展能が誘導され神経細胞に分化するので、RSV の作用を分化度の異なる同じ細胞で解析できる利点がある。RSV は未分化(腫瘍性)細胞には障害的に作用し細胞死を促進し、分化(神経性)細胞には保護的に作用し神経突起伸展能を促進した。私たちは、このメカニズムにミトコンドリアとオートファジーが関係しており、これらの機能が腫瘍細胞では低下、神経細胞では促進していることを見出した。

最初はまずオートファジーの機能変化に注目し、PC12 細胞においてオートファゴソームの形成に本質的なタンパク質の遺伝子である LC3 の mRNA を RNAi 法でノックダウンし、RSV のノックダウン細胞(未分化及び分化型)での作用を解析した。

コントロール(野生型とモック)細胞と比較して、ノックダウン細胞で以下の結果が得られた。未分化及び分化細胞共に細胞死が促

進される傾向にあったが、RSV で未分化細胞は変化がなく、分化細胞は有意に細胞死が増加した。神経突起進展能は RSV の有無にかかわらず両細胞で変化がなかった。ミトコンドリアの数とミトコンドリア ATP 合成酵素 サブユニットの発現は未分化細胞で RSV と関係なく減少し、分化細胞では RSV で減少した。オートファゴゾームは、LC3 特に LC3 の発現が極めて低下した状態でも出現し、未分化細胞では RSV で変化がなかったが、RSV 非投与で減少し、分化細胞では RSV 非投与で変化がなかったが RSV で減少した。

以上より、LC3 / の発現が低下してもオートファゴゾームは少数ながら常に検出されるが、その出現変化は RSV と無関係で、LC3 の一定レベルの発現が、RSV の本来の PC12 細胞での上記の正常な作用、すなわち腫瘍性細胞には細胞死を誘導し、正常あるいは分化した細胞は保護的に作用し細胞生存を促進すること、に必要なことが示された。

さらに LC3mRNA をノックダウンした両細胞、すなわち、未分化と分化細胞での細胞生存・細胞死及びミトコンドリア関連タンパク質の発現変化は以下の通りであった。SIRT1、SOD2、リン酸化 Akt 及びリン酸化 mTOR は増加したが、SIRT3、カテプシン D 及びミトコンドリア ATP 合成酵素は減少した。しかし、リン酸化 AMPK は未分化細胞では減少、分化細胞では増加した。これらのタンパク質の発現変化は基本的に RSV 非依存的であった。SIRT1 ノックダウン細胞では LC3 の発現に変化がなかったため、RSV のより直接の標的は SIRT1 より LC3 の可能性があり、LC3 が RSV の正常未分化及び分化 PC12 細胞の適正な作用（癌細胞などは殺し、正常細胞は保護し寿命を延ばす）に本質的であることが示された（図 1）。

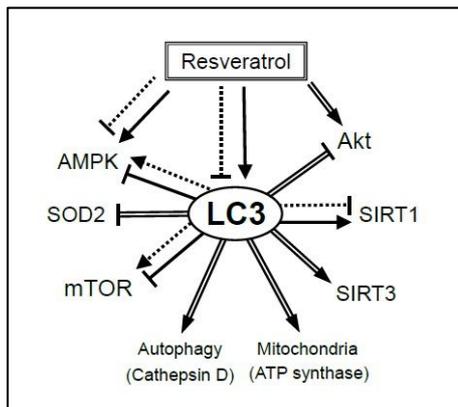


図 1 . レスベラトロール (RSV) の LC3 を介しての正常 PC12 細胞へ影響、破線が未分化細胞、実線が分化細胞、二重線が両細胞への作用を示す。

(2) 次に RSV とは異なるファイトケミカルであり、古くから薬効能が示唆されている冬虫夏草に注目し、ラットでの寿命延長効果を細胞レベルで解析した。冬虫夏草の抗腫瘍、

抗肥満、免疫力向上作用などの効果が示唆されているが、寿命延長効果についてはシヨウジョウバエでしか報告がない。

私たちは従来の冬虫夏草 (Cordyceps sinensis) より冬虫夏草に特異的な成分であるコルジセピン (cordycepin) をより多く含む国内で人工栽培が可能になった Cordyceps militaris (CM) (日本シルクバイオ研究所提供) を用いて、食塩 (8%) 投与で寿命を短くできる食塩感受性 Dahl ラット (平均寿命約 2.9 ヶ月) を用いて、CM 投与により寿命に変化があるか解析した。コントロールラットと比較して CM (3%濃度で食餌に添加) 投与ラットで有意に寿命が延長することがわかった ($p < 0.001$)。このラットの死因は、私たちの今回の観察から高血圧による脳出血による後遺症であると考えている。CM は脳出血を抑制することなしに、脳出血後の寿命を延長させることが推測された。

CM の寿命延長効果がどのようなメカニズムで遂行されているか、脳の神経細胞に加えて高血圧の影響を受けやすい心臓、腎臓、肝臓の細胞を形態学的、免疫細胞化学的及び生化学的に解析した。その結果、コントロールの Dahl ラットにおいて、中枢神経系の神経細胞、心臓の心筋細胞、腎臓系球体のたこ足細胞、尿管上皮細胞及び肝細胞は変性的変化を示したが、CM 投与によりその形態学的所見は改善した。しかし、CM 投与により各組織におけるミトコンドリア/オートファジー、細胞生存/細胞死及び代謝関連タンパク質 (ミトコンドリア ATP 合成酵素 サブユニットタンパク質、LC3、カテプシン D、p62、SIRT1、SIRT3、リン酸化 Akt、リン酸化 AMPK 及びリン酸化 mTOR、) の発現変化は、基本的に中枢神経系とその他の器官で逆の結果になった。すなわち、CM により中枢神経系の主として神経細胞ではミトコンドリア/オートファジーの機能低下及び代謝活性の低下が示されたが、神経特異的及び細胞骨格タンパク質のシナプトフィジン、MAP2 及びニューロフィラメントタンパク質はコントロールより発現が増加した。他の器官では、CM は心筋細胞の変性的変化を抑制し、ミトコンドリアの変性も抑制し、上記のオートファジー、細胞生存及び代謝関連タンパク質の発現を促進した。CM は腎臓や肝臓に対しても同様の変性抑制効果が示された。しかし、興味深いことに CM は脳の神経細胞の変性を抑制するが、神経細胞に発現する上記細胞生存関連タンパク質の発現を低下させることが示された。

以上より、CM は心臓その他の器官の機能改善及び活性化に関与し、それが脳の神経細胞のエネルギー消費を低下させる環境を保障し、脳出血後の神経細胞の活動を低下させることが個体の寿命延長につながることを示唆された (図 2)。

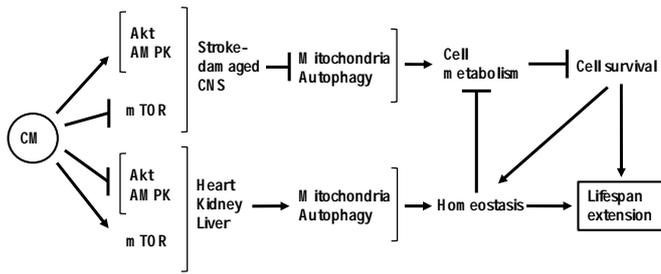


図2 冬虫夏草 (CM) の脳卒中を起こした Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける寿命延長メカニズム

(3) 冬虫夏草の細胞への直接効果を検討するため、冬虫夏草エキス及びコルジセピンの PC12 細胞への影響を解析した。RSV 投与と同様、これらのファイトケミカルは未分化 PC12 細胞は殺し、分化 PC12 細胞は細胞生存に作用した。Dahl ラットの場合、冬虫夏草投与により脳出血を起こした脳とそれ以外の器官でタンパク質の発現が逆になり、ミトコンドリア及びオートファジー関連タンパク質の発現は脳では低下、それ以外の器官では増加し、他の器官による代謝の活性化が脳の神経細胞の代謝低下を保護することにより寿命が延びることが示唆された。コルジセピン及び冬虫夏草の細胞への直接効果はこれらのタンパク質の発現低下で細胞死が、発現増加で細胞生存が促進され、in vivo と作用機序が異なることがわかった。

またファイトケミカルとは異なるが、最近寿命延長作用が注目されているニコチンアミドモノヌクレオチド (ビタミン B₃ の 1 種) の PC12 細胞への投与で、ミトコンドリアを活性化し、強力な神経突起進展作用により細胞分化を促進させることがわかり、ファイトケミカルと共にビタミンなど他の細胞及び個体の寿命延長作用を持つ物質の生体内でのメカニズムの解析を目指したい。

<引用文献>

Hayakawa, N., Shiozaki, M., Shibata, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Matsuura, N., Gotow, T.: Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 2013, 30-43

Shiozaki, M., Hayakawa, N., Shibata, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Gotow, T.: Closer association of mitochondria with lipid droplets in hepatocytes and activation of Kupffer cells in resveratrol-treated

senescence-accelerated mice. *Histochem. Cell Biol.* 136, 2011, 475-489.

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 0 件)
投稿中

[学会発表](計 4 件)

Morimoto M., Hayakawa N., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Influence of resveratrol on LC3-knockdown undifferentiated and differentiated PC12 cells. 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2013 年 11 月 12 日、San Diego

田畑幸司、伊藤彰悟、園田純矢、高倉健太郎、長井薫、塩崎元子、柴田昌宏、小池正人、内山安男、後藤隆洋: 冬虫夏草は食塩感受性高血圧ラット (Dahl ラット) の寿命を延長させる。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016 年 3 月 30 日、福島県郡山市

Tabata K., Ito S., Sonoda J., Takakura K., Nagai K., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Neuroprotective and lifespan extension effects of *Cordyceps militaris*/cordycepin. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日、横浜市

Tabata K., Ito S., Sonoda J., Takakura K., Nagai K., Shiozaki M., Shibata M., Koike M., Uchiyama Y., Gotow T.: Cyto-protective and -toxic effects of *Cordyceps militaris* and cordycepin on rat CNS neurons and PC12 cells. 2016 年 11 月 14 日、San Diego

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 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 0 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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 隆洋 (GOTOW, Takahiro)
関西女子短期大学・医療秘書学科・教授
研究者番号：20135693

(2) 研究分担者

柴田 昌宏 (SHIBATA, Masahiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：10343253

(3) 連携研究者

小池 正人 (KOIKE, Masato)
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：80347210

(4) 研究協力者

早川 直哉 (HAYAKAWA, Naoya)
厨子 芳子 (ZHUSHI, Yoshiko)
木田 しおみ (KIDA, Shiomi)
坂本 悠樹 (SAKAMOTO, Yuki)
森本 美幸 (MORIMOTO, Miyuki)