

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670047

研究課題名(和文)自然な睡眠を促すクロシン糖付加物の合成と作用機構の解明

研究課題名(英文)Crocinn, a carotenoid pigment, promotes non-rapid eye movement sleep

研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE, Kosuke)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：70390804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロシンをヒスタミンH1受容体、ドーパミンD2受容体或いはアデノシンA1受容体遺伝子欠損マウスに投与して、その作用を比較したところ、H1受容体欠損マウスではクロシン睡眠誘発効果がほとんど消失した。クロシンのヒスタミンH1受容体結合能およびヒスタミン遊離に及ぼす効果を調べたところ、H1受容体結合能およびヒスタミン遊離抑制作用がないことが判明した。従って、クロシンは間接的にヒスタミンの覚醒調節機能を抑制することによって睡眠を誘発していることが強く示唆された。クロシン糖付加物は、クロシンに比べて高い化学的安定性と光安定性を有することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We compared the effects of crocinn in wild-type mice, mice lacking of histamine H1 receptor (H1R) gene, dopamine D2 receptor (D2R) gene or adenosine A1 receptor (A1R) gene by monitoring the locomotor activities and electro encephalogram. In wild-type mice, D2R KO and A1R KO, crocinn significantly decreased the locomotor activities and increased the time spent in non-REM sleep. In H1R KO mice, effects of crocinn on locomotor activities and non-REM sleep were suppressed. Crocinn did not show any specific binding affinities against H1R nor inhibited the histamine release. These results strongly suggested that crocinn indirectly suppressed histamine arousal system to induce sleep. We found enzymatically synthesized crocinn-glycoside shows better property in chemical stabilities and photo stabilities than crocinn.

研究分野：薬理学

キーワード：ノンレム睡眠 カロテノイド色素 ヒスタミンH1受容体 サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

サフランに含まれるカロテノイド色素のクロシン (クロセチン・ジゲンチオピオース) が経口投与で鎮静効果を有することを行動解析によって証明し、鎮静効果はノンレム睡眠の増強によるものであることを科学的に信頼性が最も高い脳波測定による解析の結果見出した (Mol. Nutr. Food Res. 2012, 56, 304-308)。クロシンによって誘発される睡眠脳波は、現在、医薬品として用いられているベンゾジアゼピン系薬剤のジアゼパムによって誘発される異常な脳波と異なり、自然な睡眠とほとんど区別できない睡眠脳波であった。クロシンのノンレム睡眠誘発効果は、糖鎖を除いたアグリコンであるクロセチン (図2) に比べて、モル濃度比で約10倍強力であることも証明した。この結果は、クロシンの生物学的利用能を高めるためには糖鎖が重要であり、糖鎖がクロシンの消化管内での安定性、吸収性、或いは生体内での安定化に働いていることを強く示唆する。

以上の結果は、クロシンがこれまでにない生理的な睡眠を誘発できる化合物として有用であり、新規な睡眠改善薬として開発できることを示すものである。

2. 研究の目的

本研究は、生理的な睡眠と区別できない自然な睡眠を誘発するサフランの主要な活性成分クロシンの 1)睡眠誘発メカニズムの解明と 2)睡眠調節薬或いは睡眠調節食材としての開発を目的としてクロシン糖付加物の合成方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) クロシンの作用機構の解明

申請者の所属する研究グループは、睡眠覚醒調節機構の解明を行い、(Curr Opin Pharmacol 7:33, 2007)。さらに、睡眠調節に関与する様々な分子(プロスタグランジン(PG)D₂合成酵素、PGD₂受容体、アデノシンA_{2a}、A₁受容体、ドーパミン受容体、ヒスタミンH₁受容体)の遺伝子改変マウスの睡眠を解析し、睡眠障害のモデル動物であることや、これらの分子に対する特異的阻害薬や拮抗薬の投与実験を行い、薬理的に睡眠・覚醒を制御できることを証明した (PNAS 103:4687, 2006; Nat Neurosci 8:858, 2005)。

クロシンの作用部位を同定する為に、これら遺伝子改変動物に対する投与実験を行い、自発運動量或いは脳波に及ぼす効果を比較する。

自発運動量および脳波測定

自発運動量は、マウス赤外線センサーを用いて検出する。

脳波は、脳波測定と睡眠解析システムを開発して、オンライン型睡眠バイオアクセスシステム(図1)を用いる。

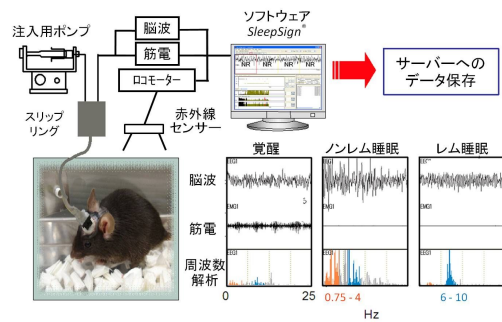


図1 マウスの睡眠判定システム

マウスの脳波および筋電図から睡眠・覚醒の判定をほぼ自動で解析できる

以下の遺伝子改変マウスを用いて、自発運動量あるいは脳波に及ぼす効果を野生型マウス (C57BL/6) と比較した。

- ・ドーパミン D2R 受容体欠損マウス
- ・ヒスタミン H1 受容体欠損マウス
- ・アデノシン A1 受容体欠損マウス

ヒスタミン受容体拮抗試験

マウス脳内ヒスタミン H₁ 受容体に対して拮抗薬 (Pyrilamine の ³H 標識および非標識体) とクロセチン (クロシン投与で血中に検出される) との競合を調べた。マウスの全脳の前ホモジネートに Mepyramine およびクロシンを加えて反応させた後に、GF/B フィルター (Wattman) を用いて、ろ過した後に、フィルターの放射活性を測定した。

ヒスタミン遊離抑制試験

RBL-2H3 細胞をカルシウムイオノフォア (A23187) で刺激して、ヒスタミンの遊離を惹起した。刺激 10 分前に細胞にクロシンを作用させてヒスタミン遊離に及ぼす効果を調べた。遊離ヒスタミンは、培養液を HPLC で分離後、*o*-フタルアルデヒドで蛍光ラベル化して 検出定量するポストカラム法 (Yamatodani, et al., J. Chromatogr. 344, 115-123, 1985) によって分析した。

(2) クロシン糖付加物の合成

クロシン糖付加物の調製

クロシンにシクロデキストリン・グルカノ・トランスフェラーゼ (Cyclodextrin-glucano-transferase: CGTase, EC 2.4.1.9) を用いて糖の付加を行った。クロシン (10-100 mg/mL)、可溶性デンプン (1-10%) を CGTase (5-20U/mL) 存在下に 42 度で 1-24 時間反応させて、クロシン糖付加物を調製した。反応生成物は、逆相 HPLC (カラム; COSMOSIL Cholesterol, HPLC システム; SHIMADZU Prominence LC、検出; UV-Vis 検出 440 nm) にて分析した。

糖付加物は、NMR 分析 (JEOL 製 ECA800、¹H スペクトルは 800 MHz、¹³C スペクトルは 200 MHz) によってその構造を分析した。

クロシン糖付加物の安定性測定

a) 水溶液中での安定性評価

クロシン糖付加物あるいはクロシンを、それぞれ 5% (w/v) の maltosyl- β -cyclodextrin 水溶液に溶解し、各成分をそれぞれ 2.5 mg/ml 含有する溶液を調製した。これを、室温、遮光条件下に 6 時間静置した。静置から 0 時間、1 時間、3 時間及び 6 時間後に、各溶液を採取して、前述の HPLC 分析システムを用いて、クロシン糖付加物またはクロシンの各分解物の生成状況を確認した。

b) 光に対する安定性評価

クロシン糖付加物あるいはクロシンを、それぞれ 5% (w/v) の maltosyl- β -cyclodextrin 水溶液に溶解し、各成分をそれぞれ 2.5 mg/ml 含有する溶液を調製した。これを、室温、光照射条件下 (蛍光灯約 1000 lux 照射) に、6 時間静置した。静置から 0 時間、1 時間、3 時間及び 6 時間後に、各溶液を採取して、前述の HPLC 分析システムを用いて、クロシン糖付加物またはクロシンの各分解物の生成状況を確認した。

経口投与後の血中濃度の比較

クロシン或いはクロシン糖付加物をマウスに経口投与すると腸管で加水分解、吸収されて血中では糖が外れたクロセチンとして検出される。クロセチン、クロシン或いはクロシン糖付加物を経口投与し、経時的に採血して、血液中のクロセチンの量を分析した。マウスの血清に 5 倍量のアセトニトリルを添加して、血清中のクロセチンを抽出し、これを HPLC で分析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスに対するクロシンの効果の比較

マウスに暗期 (19:00-7:00) 直前にクロシンを 25 mg/kg の用量で経口投与して、自発運動量に及ぼす効果を調べた。

野生型マウスにクロシンを経口投与すると投与後 2 時間、有意な行動量の抑制が認められた (図 2)。

ドーパミン D2R 受容体欠損マウスは、野生型マウスに比べて暗期、明期ともに行動量が少ない動物であるが、ここにクロシンを投与すると投与後 2 時間、有意に行動量の抑制が認められた。

ヒスタミン H1 受容体欠損マウスにクロシンを投与すると、クロシンの行動量抑制効果が一部消失することが判明した。

アデノシン A1 受容体マウスにクロシンを投与すると、クロシンの行動量抑制効果の持続して、クロシンの野生型マウス、ドーパミン D2R、ヒスタミン H1 受容体欠損マウスの脳波に及ぼす効果を比較した。

暗期直前にクロシンを投与すると、野生型マウスおよびドーパミン D2R 受容体欠損マウスの投与後 4 時間のノンレム睡眠量が有意

($p < 0.01$ vs. 溶媒投与) に増加した。一方、ヒスタミン H1 受容体欠損マウスへの投与では、ノンレム睡眠増強効果が減弱した (図 3)。

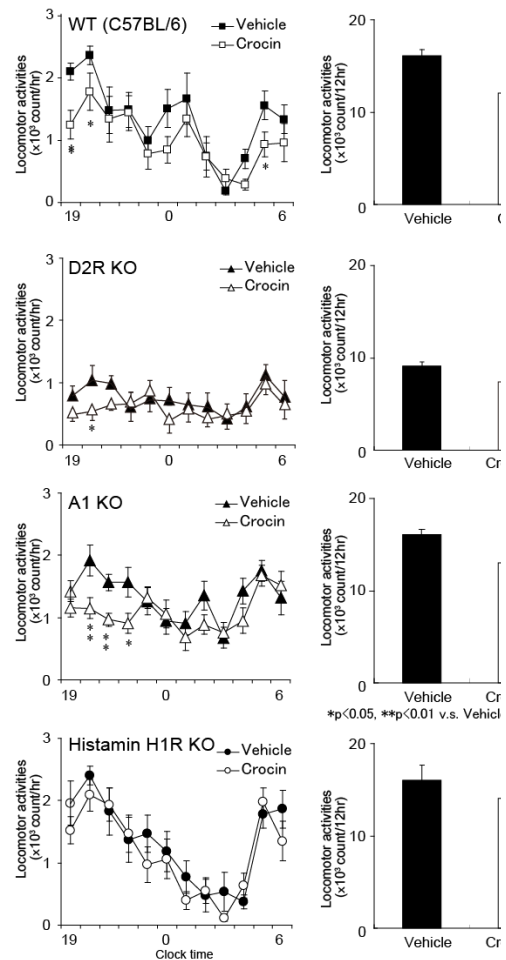


図 2 クロシンの自発運動量抑制効果の比較

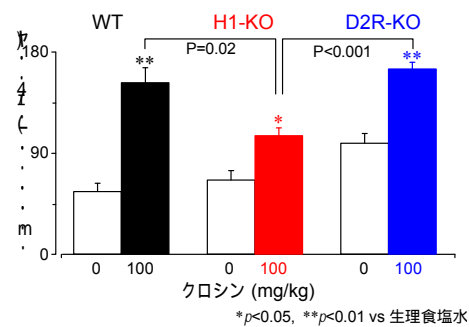


図 3 クロシンのノンレム睡眠誘発効果の比較

以上の結果から、クロシンの自発運動量抑制とノンレム睡眠増強効果は、ヒスタミンによる覚醒系の調節を介した作用であることが示唆された。そこで、クロセチンの H1 受容体拮抗作用およびヒスタミン遊離抑制を調べたところ、クロセチンはヒスタミン H1 受容体に対して特異的な結合能を持たず、また Ca イオノフォア刺激によるヒスタミン遊離に対して作用を示さなかった。

従って、クロシンの自発運動量抑制およびノンレム睡眠誘発効果はヒスタミン覚醒系に対して直接的な抑制作用ではないと考えられた。

(2) クロシンおよびクロシン糖付加物の安定性の比較

クロシン糖付加物の合成
 クロシンに CGTase を用いてグルコースを付加することによりクロシン糖付加物を合成した。
 反応生成物を HPLC 或いは液体クロマトグラフィー・マススペクトル (LC-MS) にて分離・分析した (図 4)。デンプンを基質として、CGTase によってクロシンにグルコース分子が少なくとも 1-8 分子付加された糖付加物が得られることが判明した。

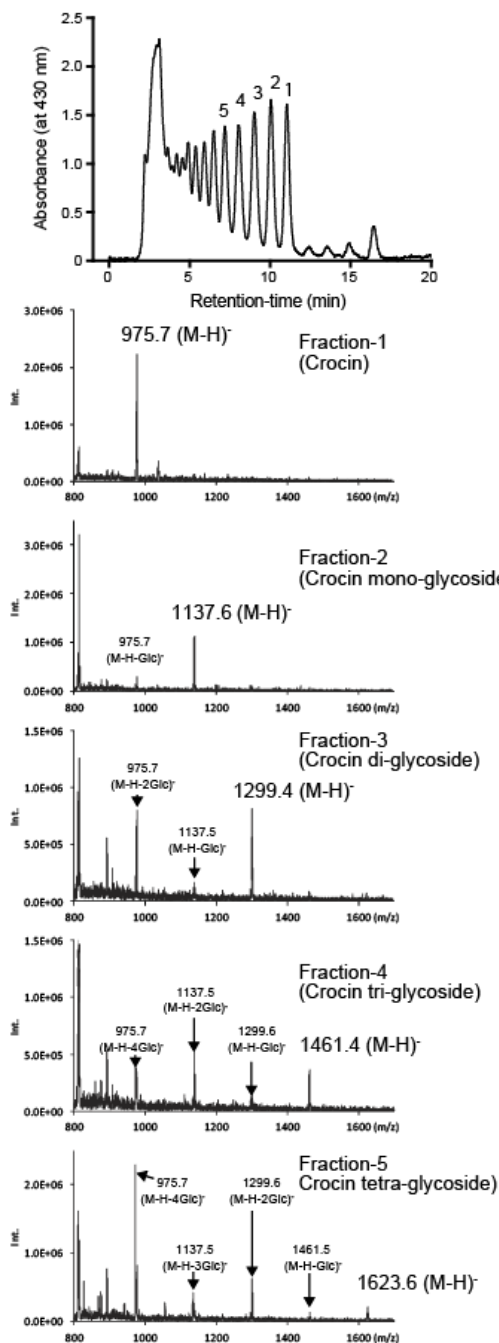


図 4 クロシンの酵素的糖付加物の分析

更に、フラクション 2 および 3 を分離精製して NMR 分析したところ、図 5 に示すような構造であることが明らかとなった。更に、合成物に 1,4-β-D-Glucan glucohydrolase (グルコアミラーゼ) を作用させると、糖 (グルコース、グルコースのオリゴマー) が乖離し、クロシンが検出されたことから、CGTase の触媒作用で付加された糖は、クロシン分子中のゲンチオピオースの 4 位にグルコースが脱水縮合されたものであることが確認できた。

クロシン糖付加物の安定性

クロシンとクロシン糖付加物の水溶液中での安定性および光に対する安定性を比較したところ、付加されたグルコース分子数に依存して水溶液中での安定性が向上することが判明した (図 6)。

水溶液中での安定性に関して、クロシンそのものは、水溶液に調製してから 6 時間後には 3.2% が分解したのに対して、クロシン糖付加物はわずか 3% しか分解は認められなかった。また、光照射に対する安定性に関しては、クロシンは、光照射から 3 時間後に 2.4% が分解、6 時間後に 4.6% が分解したのに対して、クロシン糖付加物の分解率は、光照射から 3 時間後は 1.7%、6 時間後は 3.1% であり、クロシンよりも分解が抑えられていることが確認された。

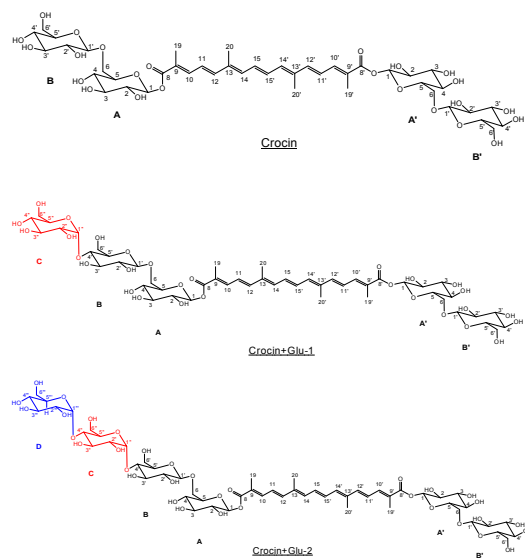


図 5 クロシン糖付加物の構造解析

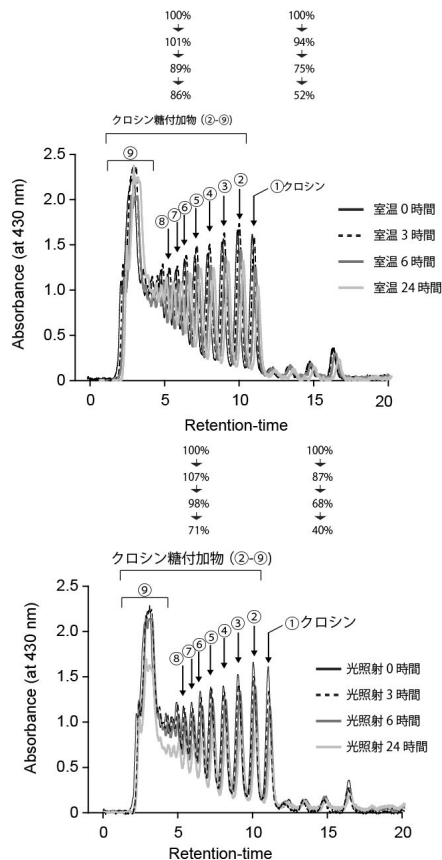


図 6 クロシン糖付加物の水溶液中での安定性 (上)と光安定性 (下)

クロシン糖付加物は、クロシンに比べて化学的に安定な化合物であることが示された。

クロシン糖付加物の血中濃度

クロセチン (10 mg/kg)、クロシン (30 mg/kg) およびクロシン糖付加物 (クロシンと等モル濃度) を経口投与して経時的な採血を行い、血中濃度推移を調べたところ、クロシン糖付加物は、速やかに吸収されること、またクロセチンに比べて高い血中濃度ピークを示すことが判明した (図 7)。

以上の結果からクロシン糖付加物は、クロシンに比べて、化学的安定性に優れ、睡眠改善

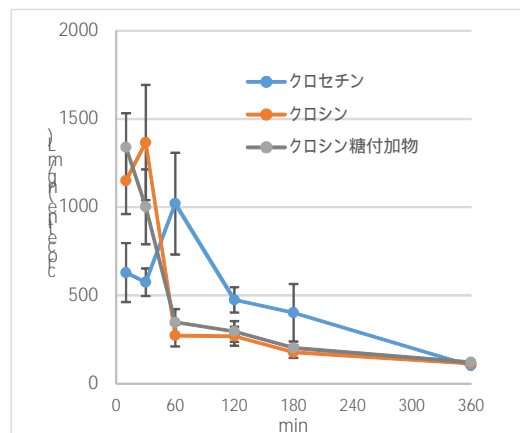


図 7 クロシン、クロシン糖付加物およびクロセチン経口投与後の血中濃度の比較

薬、或いは睡眠改善食品として商品開発に適していると考えられた。

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 2 件)

- 1) Kaushik MK, Aritake K, Kamauchi S, Hayaishi O, Huang ZL, Lazarus M, Urade Y. Prostaglandin D(2) is crucial for seizure suppression and postictal sleep. *Exp Neurol*. 2014 253:82-90. doi: 10.1016/j.expneurol. 2013.12.002. 査読有
- 2) Izumi Y, Aritake K, Urade Y, Fukusaki E. Practical evaluation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and enzyme immunoassay method for the accurate quantitative analysis of prostaglandins. *J Biosci Bioeng*. 2014 118(1):116-8. doi: 10.1016/j.jbiosc. 2013.12.022. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Kosuke ARITAKE, Nanako ITO, Yukihiro SHOYAMA, Yoshihiro URADE Crocin, a carotenoid pigment of saffron, promotes non-rapid eye movement sleep. 6th World Congress on Sleep Medicine, Mar 25 2015, Seoul, Korea
- 2) K Aritake, M Masaki, Y Shoyama, Y Urade Crocin, a carotenoid pigment, promotes non-rapid eye movement sleep, Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Congress 2013, 7. 10, St. Petersburg, Russia
- 3) 有竹浩介, 黄志力, 正山征洋, 裏出良博 サフラン成分のクロシンによる non-REM 睡眠の増強, 第 38 回日本睡眠学会, 2013 年 6 月 27 日, 秋田県民会館, 秋田県, 秋田市

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Nguyen Huu Tung, Shinji Soeda, Hiroshi Saito, Kosuke Aritake and Yukihiro Shoyama, Nova Science Pub Inc. Food and Brain Health, 2014, Chapter 14 137-150

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://urade.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/ja/>

6．研究組織

(1)研究代表者

有竹 浩介 （ARITAKE, Kosuke）

筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構

准教授

研究者番号：70390804