

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26450159
研究課題名(和文) 血管新生抑制作用とオートファジー活性化作用を持つ食品機能成分の老齡疾患予防効果

研究課題名(英文) Preventive effect of food-derived bioactive compounds with anti-angiogenic and autophagy activities on aging.

研究代表者
松原 主典 (Matsubara, Kiminori)

広島大学・教育学研究科・准教授

研究者番号：90254565
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)：血管新生抑制作用を有する食品機能成分について、オートファジー活性化作用を神経細胞株と軟骨細胞で検討した結果、ローズマリーに含まれるカルノシン酸とブロッコリースプラウトに多いスルフォラファンがオートファジー活性化作用を示すことを見出した。カルノシン酸を老化促進マウスに長期間経口投与し、加齢に伴う各種臓器の機能低下への影響を検討した。その結果、カルノシン酸摂取群は記憶学習機能が維持されていた。また、生存率も対照群より高い上、肝臓・腎臓などの機能も維持されていたことが明らかとなった。その分子レベルでの作用機構として、長寿と関連している転写因子FoxO3aの活性化が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We screened autophagy activating effect of food-derived anti-angiogenic compounds and found that carnosic acid (CA) in rosemary has the effect. To evaluate the anti-aging effect of CA, CA was orally administrated to senescence-accelerated mice prone 8 (SAMP8) for a year. CA group of SAMP8 showed a lower death rate compare to control group. In histological analyses, liver and kidney of CA group were better than those of control group. In behavior tests, CA group showed better results than control group suggesting CA prevented brain function. We found that the molecular mechanism by which CA exerts anti-aging effect is attribute to activation of FoxO3a, a transcription factor relating longevity.

研究分野：食品機能学

キーワード：抗老化 血管新生 オートファジー FoxO3a 運動器 脳機能 老齡疾患

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた現在、高齢者の介護・支援に要する莫大な社会保障費が大きな社会問題となっている。高齢者の要介護・支援につながる代表的な老齢疾患は、運動器症候群(ロコモティブシンドローム)と神経変性疾患(認知症)であり、これらの老齢疾患は発症してからの治療が困難であることから、その予防が重要である。生活習慣はこれらの疾患と関連性があり、食生活もそれらの発症に影響を与えていることから、食生活の改善や工夫により、これらの疾患の予防に貢献できると考えられている。また、食品機能成分による積極的な予防も高い関心を集めている。特に、高齢者の生活の質や社会保障に大きな影響を与えるロコモティブシンドロームと神経変性疾患のリスクを下げる食品機能成分には大きな期待が寄せられている。

2. 研究の目的

高齢者の要介護・支援につながる代表的な老齢疾患は、運動器症候群(ロコモティブシンドローム)と神経変性疾患(認知症)であり、これらの病態では異常な血管新生(病的血管新生)が生じることや血管新生促進因子が増大することで病態が悪化することが知られている。また、細胞内の異常タンパク質を除去し、変性タンパク質の蓄積を予防するなど細胞の機能維持に重要な役割を果たすオートファジーの機能低下も変形性関節症やアルツハイマー病に關与していることが示されている。従って、血管新生抑制作用とオートファジー活性化作用の両作用を持つ食品機能成分は、要介護・支援につながる老齢疾患予防に有効な可能性がある。そこで、本研究では血管新生抑制作用とオートファジー活性化作用を持つ食品機能成分を見出し、その機能成分の老齢疾患予防効果を実験動物モデルで検討した。さらに、その作用機構を分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) オートファジー活性化作用

血管新生抑制作用を有する食品機能成分について、オートファジー活性化作用を培養細胞で用いて検討した。オートファジー活性化の指標は、LC3-II タンパク質量の増加についてウエスタンブロット法で検討を行った。経口摂取による運動器でのオートファジー活性化については免疫組織染色法により検討した。

(2) 関節軟骨細胞保護効果

運動器への影響として、変形性関節症との関わりが深い軟骨細胞への影響について、培養軟骨細胞を用いて検討を行った。

(3) 実験動物への経口投与実験

食品機能成分摂取による膝関節でのオートファジー活性化については、C57BL/6J への一週間連続投与により検討した。投与終了後、膝を回収し、固定化後、切片を作成し LC3 抗体による免疫染色で評価した。

加齢に伴う各種臓器の機能低下に対する予防効果を検討するため、老化促進マウス P8 (SAMP8) に食品機能成分を経口摂取させた。投与期間中に定期的に行動科学試験を行い、脳機能評価を行った。また、握力測定もを行い、運動器機能評価も行った。

投与実験終了後、各種臓器を回収し、組織化学的解析や生化学・分子生物学的解析を行った。

(4) 抗老化作用機構の解明

食品機能成分の老齢疾患予防効果の分子レベルでの作用機構について、培養細胞を用いて検討を行った。また、長期カルノシン酸を投与した老化促進マウス SAMP8 の臓器を用いて、その効果を検証した。

4. 研究成果

(1) オートファジー活性化作用

血管新生抑制作用を有する食品機能成分のオートファジー活性化作用について SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。その結果、ローズマリーに含まれるカルノシン酸とブロッコリースプラウトに多いスルフォラファンがオートファジーを活性化することを見出した(図1)。

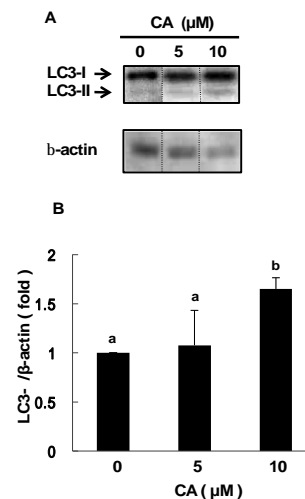


図1 カルノシン酸のオートファジー活性化作用 (Shibata, S., et al. Int. J. Food Sci. Nutr., 2016)

カルノシン酸と構造の類似し、血管新生抑制作用を有するピシフェリン酸についても同様に検討したが、明確な効果は認められなかったことから、水酸基の有無という僅かな化学構造の差が生物活性に影響するということが分かった。一方で、カルノシン酸と僅かに構造の異なる食品成分の中には、カルノ

シン酸よりも高い生物活性が期待できるものもある可能性が示唆された。

スルフォラフアンの経口摂取によって、膝軟骨細胞でのオートファジー活性化が確認されたが、カルノシン酸については明確な効果は認められなかった。

(2) 関節軟骨細胞保護効果

オートファジー活性化作用を示したカルノシン酸とスルフォラフアンの軟骨細胞での効果について検討を行った。両成分共に軟骨細胞でもオートファジーを誘導したことから、軟骨細胞保護効果が期待された。また、変形性関節症発症に關与する各種タンパク質の遺伝子発現への影響について定量 RT-PCR 法で検討した結果、軟骨分解酵素である ADAMTS5 の発現を抑制することも明らかとなった。

(3) 実験動物への経口投与

老化促進マウスである SAMP8 に 12 ヶ月齢になるまで投与実験を続けた。行動科学試験（新奇物体認識試験）で脳機能を評価したところ、対照群は新奇物体と既知物体に対する興味・関心を示す行動に差が無かったのに対し、カルノシン酸（50 μM ）投与群は有意に興味・関心を示した（図 2）。

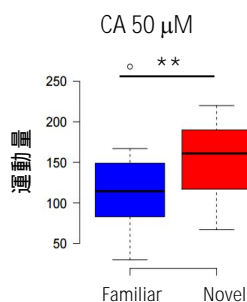


図 2 カルノシン酸摂取群（CA）の新奇物体（Novel）へのアプローチ

12 ヶ月齢までの生存率では、カルノシン酸摂取群の方が生存率は高く、カルノシン酸摂取により各種臓器が保護され高い生存率につながったと考えられた。

各種臓器の状態については組織化学的解析を行った。老化促進マウスは 10 ヶ月齢頃から脳の血液-脳関門の機能が低下することが知られている。そこで、血漿成分である IgG に対する抗体で免疫染色を行ったところ、対照群では IgG の脳内への漏出が認められたが、カルノシン酸摂取群ではほとんど確認できなかったことから、カルノシン酸摂取により脳の血管機能が保護され、それが脳機能保護につながったことが示された。また、血液生化学解析により肝臓と腎臓の機能評価を行った結果、肝機能については明確な差は認められなかったが、腎機能（血清クレアチニン値）はカルノシン酸摂取群が有意に低く、カ

ルノシン酸摂取により保護されていることが明らかとなった。また、各種サイトカインなど 10 種類についても検討を行ったが、炎症性サイトカインをはじめ全てのサイトカイン濃度に差は認められなかった。炎症性サイトカイン濃度に差がないにも関わらず、肝臓や腎臓の状態が良かったことは、カルノシン酸摂取により炎症に対する抵抗性が増したことが影響していると考えられた。

運動器への影響について握力と筋肉量で検討したが、対照群とカルノシン酸群では有意な差は認められなかった。また、予備実験ではカルノシン酸の濃度 60 μM では変形性膝関節症の進行が抑制されていたが（図 3）、カルノシン酸 50 μM では明確な抑制効果は認められなかった。

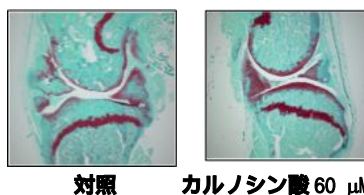


図 3 カルノシン酸による変形性膝関節症予防

(3) 抗老化作用機構の解明

カルノシン酸の抗老化作用機構について、SH-SY5Y 細胞を用いて検討した結果、長寿との関連が知られている転写因子 Forkhead box 03a (Fox03a) の脱リン酸化を促進し、転写因子として活性化することを明らかにした（図 4）。

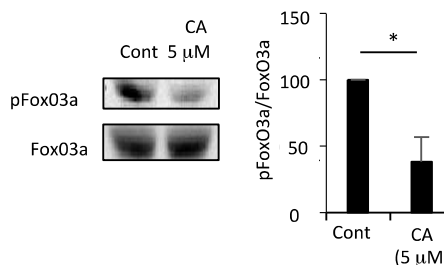


図 4 カルノシン酸の Fox03a 活性化作用 (Shibata, S., et al. Int. J. Food Sci. Nutr., 2016)

一方、細胞内情報伝達系の主要なタンパク質である Erk1/2 と Akt についてはリン酸化を促進することが明らかとなった。両細胞内情報伝達経路はオートファジーとも関連することから、これらの分子への作用によりオートファジーが活性化する可能性が示唆された。

カルノシン酸を経口摂取した老化促進マウス SAMP8 の肝臓と腎臓を用いて Fox03a の活性化について免疫組織化学的に検討した

結果、両臓器でも FoxO3a の活性化とその制御を受けている抗酸化酵素等の発現上昇が認められた。

以上の結果から、カルノシン酸の摂取による抗老化作用は、血管新生抑制作用やオートファジー活性化作用に加え、転写因子 FoxO3a を活性化し、生体内での炎症反応が抑制されることが関与していることを明らかにすることができた。

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)

Shibata, S., Ishitobi, H., Miyaki, S., Kawaoka, T., Kayashima, T., Matsubara, K. Carnosic acid protects starvation-induced SH-SY5Y cell death through Erk1/2 and Akt pathways, autophagy, and FoxO3a. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 67, 977-982, 2016. (査読有り)

<http://dx.doi.org/10.1080/09637486.2016.1208734>

Shibata, S., Yatagai, M., Tateishi, Y., Matsubara, K. Inhibitory effects of piciferic acid on angiogenesis and lymphangiogenesis. *Planta Med. Int. Open*, 3, e31-e34, 2016. (査読有り)

DOI: 10.1055/s-0042-107801

[学会発表](計 7件)

Shibata, S., Kayashima, T., Ishitobi, H., Miyaki, S., Kawaoka, T., Matsubara, K. Comparison of biological activities between carnosic acid and piciferic acid. *FFC 's 21st International Conference and Expo on Functional Foods*, 2017年3月26日, San Diego, CA, USA.

柴田紗知, 石飛博之, 奥田真友美, 味八木茂, 萱島知子, 川岡知博, 松原主典. 老化促進マウスにおけるカルノシン酸の肝臓及び腎臓保護効果. 日本農芸化学会 2017年度(平成29年度)大会, 2017年3月19日, 京都(京都).

松原主典, 柴田紗知, 石飛博之, 味八木茂, 萱島知子, 川岡知博. 老化促進マウスにおけるカルノシン酸の長期間経口摂取による脳及び運動機能への影響. 第16回日本抗加齢医学会総会, 2016年6月10日, 横浜(神奈川).

柴田紗知, 谷田貝光克, 立石能子, 松原主典. ピシフェリン酸の新規生理作用の検討. 日本農芸化学会中国四国支部大会, 2015年9月18日, 松山(愛媛).

石飛博之, 柴田紗知, 味八木茂, 松原主典. カルノシン酸による変形性関節症の予防効果の検討. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月21日, 長崎(長崎).

川岡知博, 柴田紗知, 松原主典. 老化促進

マウスにおけるカルノシン酸の肝臓保護効果に関する研究. 第61回日本栄養改善学会学術総会, 2014年8月21日, 横浜(神奈川).

石飛博之, 柴田紗知, 山崎聡士, 味八木茂, 松原主典. カルノシン酸による変形性関節症の予防効果の検討. 第14回日本抗加齢医学会総会, 2014年6月8日, 大阪(大阪).

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: FoxO3aリン酸化阻害剤、医薬、FoxO3aリン酸化阻害用添加剤および機能性食品

発明者: 松原主典, 味八木茂, 柴田紗知, 川岡知博, 谷田貝光克

権利者: 国立大学法人広島大学

種類: 公開特許公報(A)

番号: 特開2016-128398(P2016-128398A)

出願年月日: 平成27年4月28日

国内外の別: 国内

[その他]

松原主典. 抗老化因子 FoxO3a を活性化する食品機能成分. *BioJapan 2016*, 2016年10月13日, 横浜(神奈川).

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原 主典 (MATSUBARA KIMINORI)

広島大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号: 90254565

(2)研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号: 10392490