

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26500022

研究課題名(和文) ストレス関連疾患における予防薬及び治療薬としてのポリフェノールの有効性の基礎解析

研究課題名(英文) Basic analysis on the effectiveness of polyphenols as preventive and therapeutic agents in stress related diseases

研究代表者

豊平 由美子 (Toyohira, Yumiko)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90269051

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)：交感神経系モデルとしての培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、ストレス軽減効果の有る予防薬や気分障害の治療薬として適用できる可能性があるポリフェノールを選定した。アピゲニン、オーラプテン、イカリソサイドAはニコチン性アセチルコリン(ACh)受容体刺激によるカテコールアミン(CA)分泌と細胞内へのCa、Naイオン流入を濃度依存性に抑制した。アピゲニンとルテオリンはチロシン水酸化酵素(TH)活性を濃度依存的に抑制した。イカリソサイドAはACh刺激によるCA合成やTH活性を濃度依存的に抑制した。アピゲニンとイカリソサイドAはイオンチャネルの機能を阻害してCA神経系の機能を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The polyphenols that may be applicable as a prophylactic agent with a stress reduction effect or a remedy for mood disorders were selected in adrenal medullary cells. Apigenin, auraptin and icarisoside A inhibited concentration-dependently inhibited the secretion of catecholamines induced by acetylcholine(ACh). These polyphenols inhibited Na influx and Ca influx induced by ACh in a concentration-dependent manner similar to that of catecholamine secretion. Apigenin and luteolin suppressed tyrosine hydroxylase (TH) activity. Icarisoside A also suppressed catecholamine synthesis and TH activity induced by ACh. The present findings suggest that apigenin and icarisoside A inhibit acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis through suppressing ion influx in the adrenal medulla. These polyphenols also may protect the hyperactive catecholamine system induced by strong stress or emotional excitation which evokes the secretion of ACh from the splanchnic nerves.

研究分野：神経薬理学・内分泌学

キーワード：ポリフェノール カテコールアミン チロシン水酸化酵素 ストレス アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

心理的・社会的ストレスから生じる病気や、ストレスによって経過が悪くなると考えられる病気を「ストレス関連疾患」と呼び、胃かいようのようにはっきりと臓器の障害が認められる体の疾患から、頭痛、腰痛などのように原因となる臓器の異常が認められない不定愁訴、さらには神経症、抑うつ状態などの精神的な疾患、食欲不振症といった食行動異常も含まれている。昨今、ストレスが起因となる精神疾患は生活習慣病と並んで大きな問題となっている。

食物の5大栄養素は、炭水化物、たんぱく質、脂質、ビタミン、ミネラルであるが、第6の栄養素として注目を集めた食物繊維同様、今まで栄養素と考えられていなかった植物性食品の「色」「香り」「苦味」等の成分であるフィトケミカル (phytochemical) が第7の栄養素として、病気の予防や健康維持に重要な役割を演じているとして取り上げられるようになった。フィトケミカルにはポリフェノール、イオウ化合物、カロテノイド等がある。中でもポリフェノールは極めて種類が多く、抗酸化作用の他に、生体内酸化ストレス抑制、抗炎症作用、血小板凝集の抑制、癌・心疾患・糖尿病などの疾病に対する抑制・予防作用などが疫学調査や動物実験により報告されている。

機能成分として多くのポリフェノールが含まれているハーブはうつ病や不安障害等に古くから民間療法として用いられている。セント・ジョーンズ・ワート (西洋弟切草) の抽出物に存在するハイパフォリンとヒペリシンが抗うつ作用の主要な有効成分であると考えられている。ハイパフォリンには、セロトニン、ドーパミン、ノルアドレナリン、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、グルタミン酸の取込み阻害作用があることが報告されている。ジャーマンカモミールのメタノール抽出物成分であるアピゲニンは抗炎症作用とともに鎮痙作用、鎮静作用があるとして広く使われているが、GABAの活性化によるCl⁻の細胞内への流入を濃度依存的に抑制する。他にもパッションフラワーは不安や緊張を和らげ、それに因る不眠を改善するとされており、ハルマンやハルモールなどのインドールアルカロイド、アピゲニンなどのフラボノイドが効能の要因成分であると考えられている。ローズマリーエキスはモノアミン系の神経伝達に関与して、抗うつ作用を発現していることが、レモングラス精油は抗不眠、抗不安、抗痙攣作用を示すことがマウスの行動実験において示唆されている。

2. 研究の目的

病気の予防や健康維持に重要な役割を担っている植物性食品の「色」「香り」「苦味」等の成分であるフィトケミカルが第7の栄養素として注目を集めている。うつ病や不安障害等に古くから民間療法として用いられ

ているメディカルハーブがある。本研究ではハーブ機能成分のポリフェノール類がストレス関連疾患の予防薬として、メンタルヘルス不調の治療効果促進薬として適用できる可能性を評価する。細胞レベルでカテコールアミン神経系へ作用を特定したメディカルハーブ機能成分のポリフェノールについて、動物実験系で生体におけるストレス軽減効果、神経機能回復への有効性と作用機序の解析、併せて経口摂取した場合の「有効摂取量」と健康上の悪影響を及ぼさないと考えられる「許容上限摂取量」等を多面的に検討する。これらの検討を踏まえて、現代社会において課題となっているストレス関連疾患の予防薬や治療薬として機能しうる食品機能成分の特定を目的とした基礎研究である。

3. 研究の方法

初代培養副腎髄質細胞、ヒト神経芽 (SK-N-SH) 細胞等に対するフィトケミカルの直接作用を検討する。

(1) 培養ウシ副腎髄質細胞はアセチルコリン (ニコチン性アセチルコリン受容体刺激)、56mM HighK (電位依存性Caチャネル活性化)、Veratridine (電位依存性Naチャネル活性化) による刺激によって引き起こされるカテコールアミン分泌反応に対する各種フィトケミカルの影響を検討する。カテコールアミンは水酸化アルミニウム法にて分離濃縮し、エチレンジアミン法を用いて蛍光光度計にて測定する。各刺激時に、細胞内へ流入する⁴⁵Ca²⁺、²²Na⁺を液体シンチレーションカウンターにて測定し、イオンチャネルへの影響を検討する。

(2) カテコールアミン生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性はL-¹⁴C-tyrosineを用いた酵素反応により、カテコールアミン生合成はL-[U-¹⁴C]tyrosineを基質として、生成される¹⁴C-カテコールアミンを測定する。

(3) チロシン水酸化酵素 (TH) のリン酸化はWestern blotting法を行い、リン酸化抗体を用いて測定した。

(4) ノルアドレナリントランスポーター (NAT) 機能への影響は [³H]Noradrenaline (NA) の細胞内への取り込みを測定して検討する。

(5) アフリカツメガエル卵母細胞にニコチン性アセチルコリン (nACh) 受容体 (3/4) を発現させて、リガンド誘発電流を測定した。

4. 研究成果

(1) カテコールアミン神経系に影響を与えるポリフェノールの選定

神経系への影響を検討する目的で、交感神経系の機能解析においてモデル系である培養ウシ副腎髄質細胞を用いて、カテコールアミン (CA) 分泌への作用を指標としてポリフェノール類の選定を行った。以前の研究において、副腎髄質細胞からのアセチルコリン刺激によるカテコールアミン分泌をノミリン、ケンフェロール、ノビレチン、ケルセチン、

シルマリンは抑制する事を報告した。今回の検討でアピゲニン、リモニン、オーラプテンがアセチルコリン受容体刺激による CA 分泌を抑制する事が明らかになった。テアニン、カルノシン酸、ルチンやアントシアニン類は CA 分泌に影響を与えなかった。カテコールアミン神経系を修飾する可能性のあるポリフェノールが多数あることも明らかにした。

併せてイカリソウのフラボノイド配糖体であるイカリソサイド A が CA 分泌等に及ぼす影響についても検討した。

(2)アピゲニンとルテオリンの影響

フラボノイドの中でフラボン構造を基本骨格とし、さらに3位にヒドロキシ基を持たないものがフラボンに分類され、黄色~白色の植物色素で、アピゲニンやルテオリンが知られている。抗酸化作用、抗炎症作用、抗がん作用、抗腫瘍形成作用などが知られているアピゲニンは、パセリ、セロリ、カモミール茶等に含まれるフラボンとして知られている。

アピゲニンは副腎髄質細胞におけるニコチン受容体や電位依存性ナトリウムチャンネル、電位依存性カルシウムチャンネルを介した CA 分泌を濃度依存性(3 -100 μM)に抑制した。ルテオリンは CA 分泌には影響しなかった。

アピゲニンとルテオリンは TH 活性を濃度依存的に抑制した(Fig. 1)。アピゲニンはチロシン水酸化酵素のセリン 31 と 40 のリン酸化を促進した。アピゲニンはアセチルコリン刺激によるチロシン水酸化酵素のセリン 31 のリン酸化を抑制した(Fig.2)。

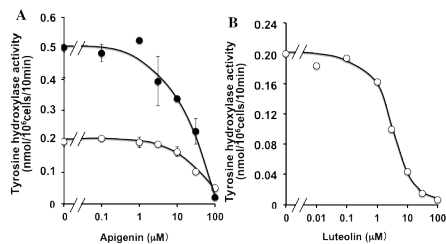


Fig. 1 Effects of apigenin (A) and luteolin (B) on tyrosine hydroxylase activity in the cells

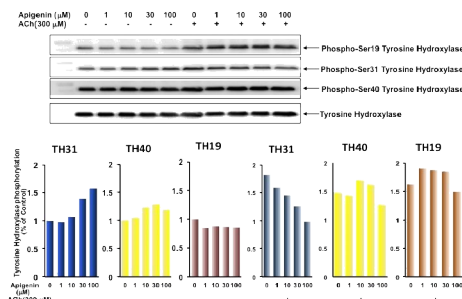


Fig. 2 Effect of Apigenin on tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31, and Ser40

アピゲニンは NAT 活性を抑制した。アピゲニンは副腎髄質細胞において、イオンチャンネルの機能を阻害して CA 分泌を抑制することが示唆された。アピゲニンとルテオリンは TH 活性とリン酸化に影響を及ぼすことは

明らかになったが、その作用機序については検討中である。

(3)オーラプテンの影響

オーラプテンは柑橘類の果皮に含まれるクマリン類の一種で、抗炎症、脂質代謝改善、肝臓内中性脂肪抑制などの効果が報告されている。

オーラプテンは nACh 受容体を介する CA の分泌を抑制した。オーラプテンは TH のセリン 40 のリン酸化を増加した。長期処理において nACh 受容体と電位依存性 Ca チャンネルを介する CA 分泌を抑制した。オーラプテン 48 時間処理において Total CA 量の減少が認められ、CA 生合成の律速酵素である TH 蛋白質量が増加した。TH のセリン 31、40 のリン酸化は抑制された。

オーラプテンはニコチン性アセチルコリン受容体等のイオンチャンネルを阻害することによりカテコールアミン分泌を抑制することが示唆された。CA 生合成系の機能調節に関与しているが、その機序については今後検討する。

(4)イカリソサイド A の影響

イカリソウは淫羊藿という生薬で補益薬、媚薬および抗リウマチ薬として用いられている。イカリソウの有効成分としてはイカリリン、イカリソサイド A、エピメジン C、エピメドサイド A というフラボノイド配糖体が知られている。イカリソサイド A については抗炎症作用と抗破骨細胞分化作用の報告があるが、神経系への作用についてはほとんど知られていない。

イカリソサイド A は nACh 受容体刺激による CA 分泌、 $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を濃度依存的(0.3 -100 μM)に抑制した。イカリソサイド A アグリコンおよび他の三種類のフラボノイドは CA 分泌に影響しなかった。nACh 受容体刺激による CA 分泌に対するイカリソサイド A の抑制作用は非拮抗阻害であった。

nACh 受容体(3-4)を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞において、イカリソサイド A は ACh 誘発電流を濃度依存的(0.1 -10 μM)に抑制した(Fig.3)。

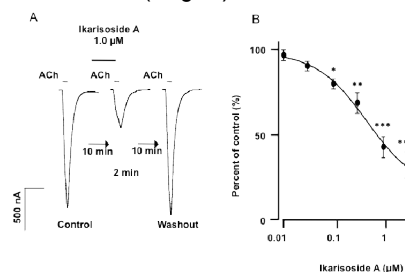


Fig. 3 Effects of ikaarisoside A on peak ACh-induced inward current in *Xenopus* oocytes expressed with $\alpha_1\beta_1$ nAChRs

イカリソサイド A は nACh 受容体刺激による CA 生合成や TH 活性を濃度依存的(1 -100 μM)に抑制した(Fig.4)。

イカリソサイド A は副腎髄質細胞において、イオンチャンネルの機能を阻害して CA 分泌および CA 生合成を抑制することが示唆された。

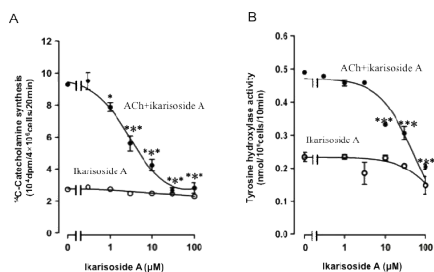


Fig. 4 Effect of ikarisoside A on ¹⁴C-catecholamine synthesis and tyrosine hydroxylase activity in adrenal medullary cells

(5) マウス行動実験での抗不安効果の評価

マウスを用いた行動実験（高架式十時迷路）では検討したポリフェノール全てにおいて、有意な抗不安効果を確認することが出来なかった。他の行動実験や投与方法、投与期間等の実験条件を再度検討する必要があると考える。また他の薬剤との併用による影響の検討も必要であると考えられる。今後の検討課題として、継続して研究を実施する予定である

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 6 件)

- Li X, Horishita T, Toyohira Y, Shao H, Bai J, Bo H, Song X, Ishikane S, Yoshinaga Y, Satoh N, Tsutsui M, Yanagihara N. Inhibitory effects of pine nodule extract and its component, SJ-2, on acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis in bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Sci.* 133:268-275, 2017 (査読有) doi: 10.1016/j.jphs.2017.03.006
- Akata K, Yatera K, Wang KY, Naito K, Ogoshi T, Noguchi S, Kido T, Toyohira Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Mukae H. Decreased Bronchial Eosinophilic Inflammation and Mucus Hypersecretion in Asthmatic Mice Lacking All Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Lung.* 194:121-124, 2016 (査読有) doi: 10.1007/s00408-015-9833-4
- Li X, Toyohira Y, Horishita T, Satoh N, Takahashi K, Zhang H, Iinuma M, Yoshinaga Y, Ueno S, Tsutsui M, Sata T, Yanagihara N. Ikarisoside A inhibits acetylcholine-induced catecholamine secretion and synthesis by suppressing nicotinic acetylcholine receptor-ion channels in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 388:1259-1269, 2015 (査読有) doi: 10.1007/s00210-015-1161-y
- Satoh N, Toyohira Y, Takahashi K,

- Yanagihara N. Effects of various pharmacological agents on the function of norepinephrine transporter. *J UOEH.* 37:33-42, 2015 (査読有) doi: 10.7888/juoeh.37.33
- Uchida T, Furuno Y, Tanimoto A, Toyohira Y, Arakaki K, Kina-Tanada M, Kubota H, Sakanashi M, Matsuzaki T, Noguchi K, Nakasone J, Igarashi T, Ueno S, Matsushita M, Ishiuchi S, Masuzaki H, Ohya Y, Yanagihara N, Shimokawa H, Otsuji Y, Tamura M, Tsutsui M. Development of an experimentally useful model of acute myocardial infarction: 2/3 nephrectomized triple nitric oxide synthases-deficient mouse. *J Mol Cell Cardiol.* 77:29-41, 2014 (査読有) doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.09.021
- Noguchi S, Yatera K, Wang KY, Oda K, Akata K, Yamasaki K, Kawanami T, Ishimoto H, Toyohira Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Mukae H. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res.* 15:92, 2014 (査読有) doi: 10.1186/s12931-014-0092-3

〔学会発表〕(計 26 件)

- 豊平由美子、坂巻路可、吉永有香里、李 曉佳、長友逸郎、石兼 真、柳原延章：柑橘類クマリン化合物オーラプテンのカテコールアミン分泌に及ぼす影響 第 90 回日本薬理学会年会，長崎ブリックホール（長崎県長崎市） 2017 年 3 月 15～17 日
- 坂巻路可、豊平由美子、吉永有香里、李 曉佳、田村和之、石兼 真、柳原延章：ポリフェノール化合物シリマリンのカテコールアミン分泌・生合成及びインシュリン分泌に及ぼす影響 第 90 回日本薬理学会年会，長崎ブリックホール（長崎県長崎市） 2017 年 3 月 15～17 日
- 李 曉佳、豊平由美子、堀下貴文、石兼 真、吉永有香里、佐藤教昭、筒井正人、柳原延章：カテコールアミン分泌と生合成に対する松節抽出物の効果：ウシ副腎髄質細胞での検討 第 90 回日本薬理学会年会，長崎ブリックホール（長崎県長崎市） 2017 年 3 月 15～17 日
- 李 曉佳、豊平由美子、堀下貴文、石兼 真、張 晗、吉永有香里、佐藤教昭、上野 晋、筒井正人、柳原延章：淫羊藿成分イカリソサイド A のカテコールアミン分泌及び生合成の抑制作用 第 46 回日本心脈管作動物質学会年会，琉球大学（沖縄県西原町） 2017 年 2 月 10～11 日
- 豊平由美子、坂巻路可、松田有希、馬場

宏佳、李 曉佳、吉永有香里、石兼 真、柳原延章：フラボン化合物のアピゲニンとルテオリンによるカテコールアミン合成・分泌調節作用の検討に及ぼす影響 第 69 回日本薬理学会西南部会，松山大学（愛媛県松山市） 2016 年 11 月 26 日

豊平由美子、坂巻路可、松田有希、馬場宏佳、李 曉佳、吉永有香里、石兼 真、柳原延章：アピゲニンとルテオリンのカテコールアミン動態に及ぼす影響 第 9 回トランスポーター研究会九州部会宮崎市民プラザ（宮崎県宮崎市） 2016 年 10 月 1 日

豊平 由美子、李 曉佳、吉永有香里、馬場宏佳、松田有希、石兼 真、柳原 延章：フラボノイドであるアピゲニンとルテオリンのカテコールアミン動態に及ぼす影響 第 89 回日本薬理学会年会，パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市） 2016 年 3 月 9～11 日

李 曉佳、豊平 由美子、堀下貴文、高橋圭太、石兼 真、吉永有香里、上野 晋、筒井正人、柳原延章：フラボノール配糖体によるカテコールアミン分泌と合成への影響：ウシ副腎髄質細胞での検討 第 89 回日本薬理学会年会，パシフィコ横浜会議センター（神奈川県横浜市） 2016 年 3 月 9～11 日

李 曉佳、豊平由美子、堀下貴文、張 晗、吉永有香里、佐藤教昭、上野 晋、筒井正人、柳原延章：イカリソウ成分による副腎髄質機能への影響 第 68 回日本薬理学会西南部会，海峡メッセ下関（山口県下関市） 2016 年 11 月 26 日

豊平由美子、小原 剛、稲垣博英、柳原延章モノアミントランスポーター機能調節における赤ワインポリフェノールレスベラトロールの作用 第 8 回トランスポーター研究会九州部会，鹿児島大学医学部鶴陵会館（鹿児島県鹿児島市） 2015 年 7 月 18 日

李 曉佳、豊平 由美子、堀下貴文、高橋圭太、吉永有香里、上野 晋、筒井正人、柳原延章：アセチルコリン刺激によるカテコールアミン分泌に対するフラボノール配糖体の効果：ウシ副腎髄質細胞での検討 第 88 回日本薬理学会年会，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市） 2015 年 3 月 18～20 日

馬場宏佳、松田有希、豊平由美子、李 曉佳、吉永有香里、高橋圭太、柳原延章：ウシ副腎髄質細胞におけるチロシン水酸化酵素とカテコールアミン分泌に及ぼすアピゲニンの影響 第 67 回日本薬理学会西南部会 産業医科大学ラマツイーニホール（福岡県北九州市） 2014 年 11 月 23 日

李 曉佳、豊平 由美子、堀下貴文、高橋圭太、張 晗、吉永有香里、飯沼宗和、

佐藤教昭、上野 晋、筒井正人、佐多竹良、柳原延章：Ikarisoside A のカテコールアミン分泌及び合成に及ぼす影響 第 67 回日本薬理学会西南部会産業医科大学ラマツイーニホール（福岡県北九州市） 2014 年 11 月 23 日

坂巻路可、豊平由美子、李 曉佳、小原剛、稲垣博英、高橋圭太、柳原延章：培養ウシ副腎髄質細胞におけるカテコールアミン分泌に対する植物性フラボノイドの作用 第 7 回トランスポーター研究会九州部会 産業医科大学ラマツイーニホール（福岡県北九州市） 2014 年 11 月 22 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊平 由美子 (TOYOHIRA, Yumiko)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：9 0 2 6 9 0 5 1

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

坂巻 路可 (SAKAMAKI, Ruka)
西南女学院大学・保健福祉学部・准教授
研究者番号：8 0 3 8 9 4 8 6

(4) 研究協力者

李 曉佳 (LI, Xiaojia)

吉永 有香里 (YOSHINAGA, Yukari)