

学位論文要旨

食品機能成分の脳における新規抗炎症機序の解明

広島大学大学院人間社会科学研究科
教育科学専攻 教師教育デザイン学プログラム
人間生活教育学領域

D210568 海野 美月

序章 研究の背景と目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) やうつ病など、生活に支障をきたし、健康寿命短縮の原因になる神経変性疾患や精神疾患の増加は喫緊の世界共通課題である。これらの疾病は、脳内マクロファージであるミクログリアの活性化による脳の炎症が発症の要因の1つと考えられている。ミクログリアは、活性化もしくは不活性化状態でその働きや形態が異なる。これまで筆者は、食品機能成分の摂取が健康や生活の質 (quality of life: QOL) の維持・増進に寄与することを踏まえ、加齢やストレス負荷による脳機能低下に対し保護効果を示す食品機能成分について、ミクログリアの活性化に伴う形態変化を指標に検討を進めてきた。しかし形態観察だけではミクログリアが活性化状態になり障害的に働いているのか、もしくは不活性化状態として保護的に働いているのか、特定することが困難であり、課題であった。

さらに脳の炎症に関する研究を遂行する上で、近年注目されているのが「脳腸相関」である。腸は栄養吸収の働きだけでなく、免疫応答および内分泌系にも関連している。脳と腸の相互作用は、精神疾患および神経障害に関連していることが報告されている(1, 2)。しかし、疾患の詳細な発症メカニズムについては未だ明確になっておらず、その治療方法も確立されていないため、脳腸相関に焦点を当てた新たな治療法の開発、予防策が求められている。

以上のことから本研究では、これまでの研究成果を踏まえつつ、食品機能成分の脳での新規抗炎症機序について、ミクログリアの炎症性およびそれに関連する脳への影響の観点から検討を行った。また、脳腸相関の観点から食品機能成分が持つ脳における抗炎症作用機序についても検討を行った。

第1章 カルノシン酸の新規抗炎症機序の解明

本章では、初めに老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mice prone 8: SAMP8) の加齢に伴う経時的な脳の炎症状態の変化について、組織化学評価を用いて検討を行った。SAMP8 は AD の病態と同様な生化学的・病理学的変化を示すことが知られている(3, 4)。正常な老化を示す正常老化マウス (senescence-accelerated mice resistant 1: SAMR1) と比較して SAMP8 では活性化ミクログリアが増加し、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) の機能が障害される(4)。ミクログリアは炎症状態になると ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD: ASC) スペックを形成し、神経毒性を示すことから(5)、ASC 陽性ミクログリアを指標に加齢に伴う経時的な脳の炎症状態を検討したところ、SAMP8 は加齢に伴い ASC 陽性ミクログリアが多く観察される傾向にあった。活性化ミクログリアは神経新生能に障害をきたすことに着目し(6)、神経新生能についても検討を行ったところ、神経新生能に関連するダブルコルチン (doublecortin: DCX) およびニューロペプチド Y (neuro peptide Y: NPY) 陽性細胞数が12週齢には減少することが明らかになった。これらの研究結果を基に、各種食品機能成分を摂取することによる脳での抗炎症作用機序の検討を行った。

ハーブのローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) の主要成分であるカルノシン酸 (carnosic acid: CA) の経口摂取による抗炎症効果の作用機序を明らかにするため、CA を長期摂取した SAMP8 の脳について解析を行った。結果として、CA 摂取は ASC スペックを含むミクログリアいわゆる炎症性ミクログリアの増加および NPY 陽性細胞数の減少を抑制した。また、BBB 機能の破綻を抑制した。さらに CA がアミロイド形成タンパク質であるトランスサイレチン (transthyretin: TTR) に及ぼす影響について検討した。CA は TTR 安定化効果を有し、さらに CA 投与がアミロイド β (amyloid β : A β) の蓄積を抑制することから(7)、CA がアミロイド形成に影響を及ぼす可能性が示唆されている。本研究において脳の TTR 染色を行ったところ Control 群に比べ CA 群では脳内の TTR 沈着が少なかった。したがって、CA 摂取によってミクログリアの炎症性、NPY 陽性細胞数の減少、BBB 機能の破綻、TTR 沈着の抑制を介して認知機能障害が改善されることが明らかになった。

TTR の発現促進は脳の炎症抑制との関連性が示されている(8, 9)。そこで SAMP8 に CA を短期投与し、TTR 遺伝子発現の変化について検討を行ったところ、老齢期に CA を摂取すると TTR 遺伝子発現が増加する傾向がみられた。CA による TTR の誘導をより詳細に検討するために脳神経細胞モデル SH-SY5Y 細胞を用いて実験を行った結果、TTR 遺伝子とタンパク質発現はパターンが異なるものの CA は SH-SY5Y 細胞の TTR 遺伝子およびタンパク質の発現レベルを高めることが明らかになり、CA は脳神経細胞の TTR 遺伝子およびタンパク質発現を誘導する可能性が示唆された。

最後に CA の脳神経保護効果の新たな作用機序を明らかにするために、CA 処理がグルタミン酸による神経細胞死に与える影響について検討した。実験の結果から、比較的短期時間の CA 処理によってグルタミン酸による興奮毒性が抑制されることが明らかになった。高濃度のグルタミン酸は神経細胞に大きなダメージを与え(10)、シナプスや損傷した細胞から放出されるグルタミン酸は、ミクログリアを活性化させることが明らかになっている(11, 12)。したがって、本研究によって CA がグルタミン酸による脳の神経細胞死を抑制している可能性が示された。

第 2 章 グリセロホスホコリンの脳における抗炎症効果の検討

第 2 章では第 1 章の結果を基に酒粕の機能成分グリセロホスホコリン (glycerophosphocholine: GPC) を長期摂取した SAMP8 の脳を解析し、脳での抗炎症効果の検討を行った。GPC 長期摂取により、海馬歯状回 (dentate gyrus: DG) において炎症性ミクログリアの増加を抑制し、神経新生能に参与する DCX および c-fos 陽性細胞数の減少が抑制された。さらに神経炎症抑制に参与する NPY 陽性細胞数を維持する傾向もみられた。神経新生が行われる DG において、ストレスによる炎症が引き起こされると神経新生能が低下し、うつ病といった精神疾患を引き起こす可能性が示されている(13-15)。したがって GPC 摂取によって DG におけるミクログリアの炎症性が抑制されたことで、神経新生能が維持されたと考えられる。以上のように GPC 摂取の効果として、

第 1 章で明らかにしたミクログリアの炎症性抑制に加え、神経新生能が維持されることを示した。

第 3 章 脳腸相関における新規抗炎症機序の解明

第 3 章では第 2 章の結果を基に、GPC を短期摂取した SAMP8 の行動科学試験から脳機能への影響を明らかにすると共に、脳腸相関の観点からの作用機序を検討するため、脳での抗炎症効果および腸への機能保護効果の検討を行った。GPC 短期摂取により、強制水泳試験において不動時間が短縮し、抗不安様作用を有することを明らかにした。脳の組織化学評価から、GPC 短期摂取によってミクログリアの炎症性が抑制され、NPY 陽性細胞数が維持された。一方、第 2 章と比べ GPC 投与が短期であったことから、神経新生への影響は不明確であった。また、腸の組織化学評価、IgA 濃度測定の結果からは、GPC 摂取による腸への効果が明確ではなかったことから、脳腸相関による GPC の脳への抗炎症効果を示すことはできなかった。

GPC の脳での抗炎症効果について、脳腸相関の観点から明らかにできなかったことから、新しく開発された抗酸化ナノ粒子を SAMP8 に投与を行った。この物質は腸に留まり、体内に吸収されない成分であるにも関わらず、うつ様行動を軽減し神経栄養因子 (brain-derived neuro-trophic factor: BDNF) 産生を維持することから脳腸相関との関連が示されているが、脳の炎症に関しては未検討であった。本研究の結果、新規抗酸化ナノ粒子の摂取によってミクログリアの炎症性が抑制され、NPY 陽性細胞数の減少が抑制されていることが明らかになった。先行研究において新規抗酸化ナノ粒子は海馬における BDNF と神経成長因子の減少を抑制することが報告されている(16)。ミクログリアは BDNF シグナル伝達を通じて学習と記憶において重要な機能を果たすことが明らかになっていることから(17)、新規抗酸化ナノ粒子摂取による抗うつ様効果は、ミクログリアの炎症性を抑制することによって BDNF 等の関連分子の発現を誘導している可能性がある。以上のことから、腸に留まる新規抗酸化ナノ粒子は、腸での抗酸化作用を介して脳でのミクログリアの炎症性および NPY 陽性細胞数の減少を抑制することが示され、脳腸相関を通して抗炎症作用を示すことが明らかになった。

終章 研究の総括と今後の展望

本研究で使用した CA、GPC、新規抗酸化ナノ粒子すべての成分・物質は一貫して炎症性ミクログリアの増加抑制を示した。本研究を遂行する上で課題であったミクログリアの炎症性の評価について、ASC スペックを含むミクログリアを指標とすることで、食品機能成分の抗炎症効果の評価に応用することが可能であることが明らかになった。また炎症性ミクログリアの変化に伴って、NPY 陽性細胞数、BBB 機能、TTR 沈着数、神経新生能などが関連していることが明らかになった。さらに、新規抗酸化ナノ粒子のような腸に留まる成分を模して外面にポリエチレングリコールを用いた高い安定性を示す食品機能成分のコロイド粒子を開発することができれば、脳腸相関に関連した抗炎症作用の研究に応用することができると考えられる。

本研究では食品機能成分の脳における新規抗炎症機序について、ミクログリアの活性化や TTR を端緒として多面的に検討した。老化に伴う疾患をはじめ、ストレスや生活習慣の乱れ等によって引き起こされる疾患の根源は炎症である。生命活動の統制を司る脳の炎症を防ぐことは心身ともに健康に過ごす上で重要である。本研究の知見は、老化に限らずストレスや生活習慣の乱れによって引き起こされる脳の炎症とそれ伴う疾病に対する代替療法へと展開し、より良い生活を営む一助になることが期待される。

さらに現在は持続可能な社会の実現に向けて、持続可能な経済的発展が求められている。本研究で取り扱った CA を含むローズマリーや GPC を含む酒粕の他、その他膨大に存在する様々な食資源にも同様の抗炎症作用を持つ可能性がある。さらに、本研究の知見を基に新規抗炎症作用を有する未利用の農林水産物を探索し、これまでにない健康的付加価値を見出し、社会的需要を高めさせることができれば、農業発展の糸口になりうる。そして新たな地域産業の創出に寄与し、地産地消のエシカル消費を促す。その結果、経済成長を促し、持続可能な開発目標 (sustainable development goals: SDGs) 達成に貢献できる。加えて病院や薬局で処方される医薬品とは異なり、食品機能成分を摂取することは普段の食生活に容易に取り入れることができ、比較的安価で処方箋も不要なため入手も容易である。そのため、開発途上国など医療アクセスの難しい人々にも、セルフメディケーションの 1 つとして普及することで、世界中すべての人の健康に貢献し、SDGs 達成の一助となる。

参考文献

1. S. M. Collins, M. Surette, P. Bercik, The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* **10**, 735-742 (2012).
2. C. R. Martin, V. Osadchiy, A. Kalani, E. A. Mayer, The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **6**, 133-148 (2018).
3. K. Ito, Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Exp Anim* **62**, 275-280 (2013).
4. T. Kawamata *et al.*, Age-related changes in the brains of senescence-accelerated mice (SAM): association with glial and endothelial reactions. *Microsc Res Tech* **43**, 59-67 (1998).
5. C. Venegas *et al.*, Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* **552**, 355-361 (2017).
6. C. T. Ekdahl, J. H. Claassen, S. Bonde, Z. Kokaia, O. Lindvall, Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13632-13637 (2003).
7. S. A. Lipton *et al.*, Therapeutic advantage of pro-electrophilic drugs to activate the Nrf2/ARE pathway in Alzheimer's disease models. *Cell Death Dis* **7**, e2499 (2016).
8. Y. Ano *et al.*, Iso- α -acids, Bitter Components of Beer, Prevent Inflammation and Cognitive

- Decline Induced in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* **292**, 3720-3728 (2017).
9. T. Fukuda, K. Uchida, H. Nakayama, Y. Ano, Short-term administration of iso-alpha-acids increases transthyretin transcription in the hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* **507**, 471-475 (2018).
 10. S. M. Rothman, J. W. Olney, Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* **19**, 105-111 (1986).
 11. R. N. Christensen, B. K. Ha, F. Sun, J. C. Bresnahan, M. S. Beattie, Kainate induces rapid redistribution of the actin cytoskeleton in amoeboid microglia. *J Neurosci Res* **84**, 170-181 (2006).
 12. G. J. Liu, R. Nagarajah, R. B. Banati, M. R. Bennett, Glutamate induces directed chemotaxis of microglia. *Eur J Neurosci* **29**, 1108-1118 (2009).
 13. B. Czéh *et al.*, Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12796-12801 (2001).
 14. M. Boldrini *et al.*, Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2376-2389 (2009).
 15. P. J. Lucassen *et al.*, Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**, 1-17 (2010).
 16. Y. Ikeda, N. Saigo, Y. Nagasaki, Direct evidence for the involvement of intestinal reactive oxygen species in the progress of depression via the gut-brain axis. *Biomaterials* **295**, 122053 (2023).
 17. C. N. Parkhurst *et al.*, Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155**, 1596-1609 (2013).