

第1章 緒論

1.1 背景と目的

菊花は、漢方薬を調合するうえで欠かすことのできない配剤であり、薬効の高い特定の薬用菊が利用され、中国では薬用の菊花は薬として扱われている。一方、中国、日本その他の国々においては、食用としても様々な種類の菊が古くより利用され、解熱や解毒に有効であることが古書に記されており効能が伝承されてきた。1980年代より食品を積極的に疾病予防や健康増進に役立てようとする動きが世界的に活発となり、食品の健康機能に関する研究が進展した(1)。食品中の非栄養素成分には、生理・薬理機能をもつ物質が多数存在し、特にフラボノイド、テルペノイド、ペプチドなどが疾病予防の機能を有することが明らかにされている。また、生活習慣病の予防が期待できる12の食品群が公表されていてキク科野菜が含まれている。1991年から食品に機能性表示が可能となり、2015年からは生鮮食品も対象となったが、現在に至るまで表示の可能となった生鮮食品は2品目に過ぎない(2)。機能性の食品表示においては食品の健康効果を明確な科学的根拠で示す必要がある。さらに、生鮮食品は一般に品種をはじめ生産される地域の土壌や気象などの環境要因等により有効成分の含有量や食品機能性が異なることが知られており(3)、機能性のデータはこれらの要因を解消したものであることが求められている。疫学研究からは野菜や果実の健康に対する有用性を示すデータが蓄積されつつあり、野菜や果実への関心が高まっていて伝統野菜も見直されている。しかし、多くの生鮮食品では健康機能を立証するシステマティックレビューのデータと成り得る知見は著しく不足しているのが現状である。菊は薬草に区分される種もあることから、食用菊においても健康機能を示すものも多く健康維持への利用を広げることが望まれるが、日本の各地で栽培されている食用菊の種類は60種以上あるといわれており、栽培品種の違いなどを区別した健康機能に関する研究が必要である。従って、本研究の一つの目的は、菊花の健康機能(中枢神経細胞保護作用)の栽培品種による相異を明らかにすることであり、生産量も多く日本を代表する阿房宮および延命薬について中枢神経細胞に対する生理作用の比較を行いそれぞれの健康機能特性を明らかにした。

菊花の薬効は、解熱、解毒、鎮痛、消炎などであり(4)、感冒や発熱、悪寒、頭痛などの症状に効果を示す。漢方においては、抑うつやイライラに対して菊花が有効とされ、また高血圧随伴の疼痛や抑うつへ処方される「釣藤散」の配剤としても菊花が使用されている。菊花の効能に関する科学研究からは、脳神経の虚血再灌流による酸化ストレス傷害の保護作用、学習記憶改善作用などの報告があり、菊花成分の中枢神経細胞の保護や機能改善に対する作用も注目されている。ストレス化社会や国民の高齢化を背景に、精神疾患患者は増え続け認知症の患者は現在520万人を超えており大きな社会問題となっている(5)。2011年からは医療計画に

において精神疾患は生活習慣病の一つに追加された。精神疾患の発症機序の多くは不明である。1998年 Eriksson 等は成人脳でも海馬ニューロンが新生していることを見出した。新生された神経細胞は、分裂、増殖、分化を経て既存の神経細胞と軸索による連結を形成して神経ネットワークを再構成し、新たな可塑性を生み出していることが明らかとなっている(6)。このような神経細胞の生存や分化の営みは、BDNF (brain derived neurotrophic factor) などの神経栄養因子の働きにより維持されている。しかし、パーキンソン病、アルツハイマー病、うつ病など、多くの神経疾患では、神経の新生が欠如し、神経細胞が傷害を受け、神経ネットワークの再構成が減少し神経伝達が障害されていることが明らかにされ(7)、神経栄養因子レベルの低下や、酸化ストレスや慢性炎症の常態化による神経細胞の傷害等が神経変性疾患の共通の発症要因ではないかと考えられ、酸化ストレスの防御、神経栄養因子の活性化、神経炎症反応の制御等は神経変性疾患の新たな治療標的になっており、現在活発なアプローチがなされている。菊花には、酸化傷害の保護作用や抗炎症作用、神経栄養因子様作用(生体の神経栄養因子と類似の作用)に顕著な活性を示す化合物が存在していることから(8)、菊花は中枢神経細胞の可塑性の改善や保護作用に効果を示すことが考えられる。本研究では、低分子化合物による神経変性疾患の新たな治療法開発における基礎的知見を得る観点から、菊花のフラボノイドやトリテルペノイド等のフィトケミカルの中枢神経細胞に対する、神経栄養因子様作用(第3章)、酸化ストレス保護作用(第4章)、神経炎症反応の制御(第5章)について、構成フェノール化合物が大きく異なる栽培品種の阿房宮と延命楽(Fig. 1.1)の比較を切り口として検討を行った。

1.2 菊花の種類

菊は、キク科キク属の多年草の植物(*Chrysanthemum morifolium*)であり観賞用の他、頭花は薬用や食用に用いられている。菊花は中国では2000年以上前から薬用として栽培されており、後漢時代の『神農本草経』や明時代の『本草綱目』に記載がある(4)。日本には奈良時代末期に中国から伝来し、平安時代の『本草和名』『医心方』に記載があり天皇や貴族などを中心に薬用として用いられてきた。現在、日本薬局方(医薬品の規格基準書)には収載されていないが、日本薬局方外生薬規格集や中国の薬局方である『中華人民共和国薬典』に記載されており、漢方で繁用される「釣藤散」に配剤されているなど、漢方薬を調合する生薬として重要性は高い。*Chrysanthemum morifolium* Ramatulle (キク)、*Chrysanthemum indicum* Linne (シマカンギク)である杭州産の黄菊花(杭菊)、安徽省原産の白菊花、野菊花が用いられている。杭菊花は、味が苦く、解熱効果が高く、風邪を引いた時の頭痛やのどの痛みなどに有効であり、白菊花は、味が甘く、沈静、解熱効果にすぐれ、めまいやふらつき、目の充血に有効である。野菊花は、味が甘く、解毒作用にすぐれているとされ、化膿性の皮膚炎などに

効果を示す。花卉を食する習慣は江戸時代から始まったとされている。日本で食用として栽培されている菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramatulle, 他) は約 60 種あると言われ、各地で栽培されている (9)。青森県南部地方特産で黄色の「阿房宮」と、山形県、新潟県で栽培が盛んな淡紅紫色の「モッテノホカ」は生産量が多く日本の食用菊の代表的な栽培品種である。「モッテノホカ」は生産地域あるいは系統により「延命楽」, 「おもいのほか」, 「かきのもと」等の呼び名もある。食用菊には、異名同種や同名異種がたいへん多く、名前が付けられていない種類もあり、正確な分類で整理されたデータは存在しない。ホームページで紹介している食用菊の種類をに示す。2010年の食用菊の収穫量は約 1,132 トンで、その6割弱は、つま菊として料理の彩どりに用いられている。実際食に供される菊の県別生産量は、山形県 212 トン、新潟県 82 トン、青森県 80 トンとなっている。

1.3 フィトケミカルの生体調節作用

人類は誕生以来、植物を薬として利用してきたと考えられ、縄文の住居跡からは薬草が見つかった。野菜などの植物性食品も健康に有用であることは中国の薬食同源思想が教えているところであるが、近年の科学研究は植物性食品に含まれる色素、香り、苦み成分などの非栄養素に生理活性があることを明らかにしている。これらの化学物質はフィトケミカル

(phytochemical) とよばれ、ポリフェノール類、含硫化合物、イソチオシアネート類、カロテノイド類、テルペン類などが対象となる (10)。フィトケミカルは植物が、紫外線や病原菌、ほ乳類や昆虫などの摂食から身を守るために生産する自己防衛成分と考えられており、エネルギー代謝やタンパク質・核酸合成等の一次代謝産物とは区別され、二次代謝産物ともよばれている。フィトケミカルは、免疫制御 (賦活および抑制)、代謝促進、細胞・臓器の保護作用、がん抑制効果など様々な生理・薬理効果を示すが、その作用機構 (メカニズム) においては、ポリフェノール類等の多くのフィトケミカル化合物が有する抗酸化活性が重要な原動力になっていると考えられてきた。しかし、これらの生理・薬理作用 (Table 1.1) の多くは、フィトケミカル化合物が抗酸化作用を示す有効血中濃度に達することはほとんど無く (11,12,13)、また、近年、特定のフィトケミカル化合物を認識する生体分子の発見や (14)、生体防御に関する遺伝子発現、それらを制御する上流のシグナル分子群に対する調節作用を介した作用機構等が発見され、フィトケミカル化合物による生体調節は、抗酸化能力のみならず標的分子 (受容体や情報伝達タンパク質) への作用と機能調節によってなされていると考えられるようになった。具体的には、フラボン類やフェニルプロパノイド類による薬物代謝系の第 2 相酵素誘導やイソフラボン等のエストロゲン受容体に対する作用などが明らかにされている。

現在、酸化的ストレスに対する巧みな生体抗酸化システムである NF-E2 related factor 2 - antioxidant response element (Nrf2-ARE) 経路が解明されつつある (15)。生体では、酸化

—抗酸化バランスが崩れると活性酸素種により生体内分子は攻撃を受け酸化され、その機能が損なわれる。このような酸化ストレスに対し、Nrf2-ARE 経路はすみやかに活性酸素種に反応し、抗酸化酵素（グルタチオン合成酵素やヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) 他）を発現誘導する。本来はストレス下で誘導されるこれらの防御機構を、予め起動し細胞を警戒状態に導く現象を“ホルミシス”と呼ぶが、Nrf2 は酸化ストレスに対するホルミシスを仲介すると考えられている。フィトケミカルの中には Nrf2-ARE 経路を活性化する化合物が見いだされており、これらのフィトケミカル（毒性の低い親電子性物質と考えることが出来る）の摂取により予め Nrf2 が活性化され、より重篤なストレスへの備えができることによって、疾患の予防・治療に効果を示すことが示唆されている（16）。菊花の細胞保護作用や抗炎症作用の主要な活性成分はルテオリンであるが、Nrf2-ARE 経路を活性化し HO-1 を誘導することが報告されている。従って、本論の第 5 章、菊花の神経細胞の酸化ストレス傷害保護作用においては、Nrf2-ARE 経路を活性化および HO-1 の誘導の検討を行った。

1.4 中枢神経の脆弱性・可塑性・炎症と神経疾患

神経疾患には極めて多くの疾患が含まれている。各種の神経疾患にはそれぞれに特異的な発症機序が想定されるが、分子生物学的な病理研究の進歩に伴い、細胞死を来すような「器質性精神疾患」であるアルツハイマー病等のような神経変性疾患のみならず、気分障害等の「機能性精神疾患」においても病態解析が進展し、何らかの器質的な傷害が見いだされ、神経細胞内で起きている共通的な分子レベルでの発症機構の解明が進められている。現在、神経変性本体を改善する有効な治療法（治療薬）は存在しない。しかし、分子生物学的な観点から明らかにされてきた、神経細胞の酸化脆弱性、神経ネットワーク再構築に係る可塑性の低下、グリア細胞活性化に伴う神経細胞の炎症性傷害に関する領域は、これらの精神疾患の共通した治療標的として活発な研究が行われている（17）。

本研究は菊花抽出物の中枢神経細胞の保護作用の検討を行うものであり、目的の項でも示したように、神経細胞の保護効果に関して、脆弱性、可塑性、炎症制御の観点から検討を行うことにした。神経細胞は最も虚血に弱い細胞であり、虚血再灌流では大きな損傷を受ける。神経変性疾患の発症や症状の進展に活性酸素（ROS）の関与が指摘されており、神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が問題となっている（18）。酸化ストレスに対する生体防御機構において中心的な役割を担っている Nrf2-ARE 経路はルテオリンなどの菊花抽出物に反応することより（19）、第 5 章では培養ニューロン細胞（SH-SY5Y）を用い、菊花抽出物の酸化ストレスに対する神経細胞保護作用について検討を行った。神経変性疾患の治療が望めない大きな理由は神経細胞が再生されないことにある。しかし、目的の項で示したように海馬・辺縁系における恒常的なニューロンの新生と神経細胞の軸索伸長・ネットワーク再構成は、神経ネットワー

ク・神経機能の維持、損傷の回復に不可欠な営みである。第3章においては、神経の可塑性を考察する観点より、神経分化モデルとして広く用いられているPC12細胞を用い、菊花抽出物の神経突起伸長活性を指標として神経栄養因子様作用の検討を行った。炎症は感染やアレルギー、酸化ストレスに対応する生体防御反応であり、マクロファージ等の免疫細胞からシグナルが実質細胞へ発せられ発熱等、種々のストレス応答反応が活性化される。しかし、炎症反応が遷延して慢性化すると臓器が機能不全に陥り、多くの疾患が誘発すると考えられている。生活習慣病や癌などの様々な疾患に共通するその発症要因として、慢性炎症が注目されているが、アルツハイマー病、痴呆症等の神経変性疾患発症の原因にもなっていると考えられている。脳の高次機能はニューロン細胞とその軸索により形成されるニューロンネットワークにおいてやり取りされる電気シグナルの営みによる。しかし、中枢神経細胞はニューロン細胞と、その50倍以上の数のグリア細胞（アストロサイト、ミクログリア等）から構成されている。ミクログリアは脳内の免疫反応の中心となる細胞であり、死細胞の除去や免疫担当細胞として脳組織の保護や修復等を行っている。しかしながら、感染あるいは加齢変化により活性化したミクログリアは過剰な炎症性サイトカインの分泌などによりニューロンの傷害を引き起こす(20, 21), そう反する作用を示し、ミクログリア細胞の免疫応答の制御は神経変性疾患の病理解明や治療にとって重要である。抗炎症作用は菊花の最も基本となる薬効であることから、第6章においては、脳内の免疫調節のかなめであるグリア細胞に着目し、菊花抽出物の神経傷害因子産生の抑制や神経栄養因子発現などの神経炎症の制御へ及ぼす作用について検討を行った。

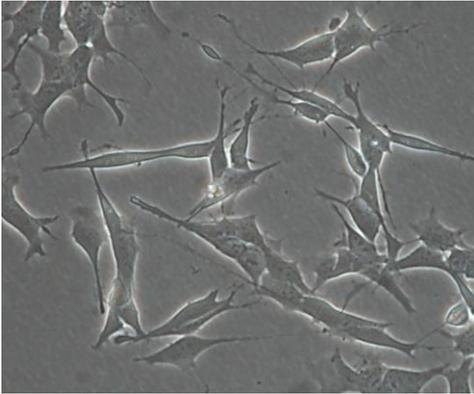


Fig. 1.1 Variant of edible *Chrysanthemum* flowers, Aboukyu (Left) and Enmeiraku (Right).

Table 1.1 Bioactive function of phytochemical and their effective concentrations

Effect	Compound	IC ₅₀ (μM)	Reference
Antioxidant	Luteolin	14.9	(22)
	Apigenin	131.9	(24)
	Eriodictyol	19.8	(22)
	Epigallocatechin gallate	16.3	(22)
Transformation of AhR	Luteolin	6.5	(23)
	Apigenin	3.2	(23)
	Quercetin	1.5	(23)
	Epigallocatechin gallate	35.0	(23)
Inhibition TNF-α production	Luteolin	<1.00	(25)
	Apigenin	8.9	(24)

A Neurons



B Microglial cells

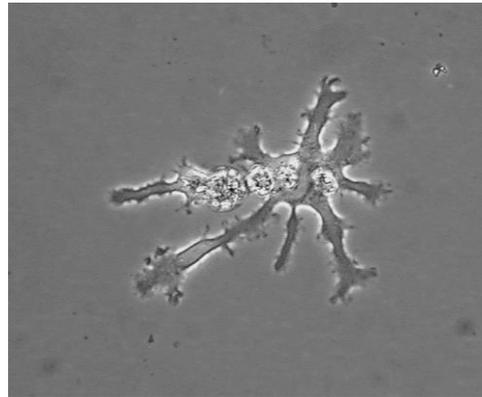


Fig. 1.2 Functions of brain cells (neuron and microglial cells)

Neurons (A); carry information/messages throughout the brain and body (SH-SY5Y).

Microglial cells (B); immune system in the brain. They keep the brain under surveillance for environment and defend against invading microorganisms, damage and disease (MG5).

1.5 引用文献

- 1 矢野俊正 (1987) 「食品機能の系統的解析と展開」について, 化学と生物, **25**, 111-113
- 2 消費者庁 HP 機能性表示食品に関する情報, <http://www.caa.go.jp/foods/index23.html>
- 3 Jaakola, L. and Hohtola, A. (2010). Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant Cell Environ.*, **33**, 1239-1247.
- 4 上海科学技術出版社, 小学館編, 中薬大辞典, 1 (小学館), 408-412 (2002).
- 5 厚生労働省 HP 患者調査, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/10-20.html>
- 6 Eriksson, P. S., Perfilievca, E., Eriksson, T. B., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, **4**, 1313-1317.
- 7 Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **18**, 223-253.
- 8 Nishina, A., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Kozawa, K., Koketsu, K., Ninomiya, M., and Furukawa, S. (2013). Neurite outgrowth in PC12 cells stimulated by components from *Dendranthema × grandiflorum* cv. “Mottenohoka” is enhanced by suppressing phosphorylation of p38MAPK. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 403503, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/403503>
- 9 山形大学農学部 HP 食用菊, <http://www.tr.yamagata-u.ac.jp/~shokuyougiku/index.htm>
- 10 Egger, A. L., Gay, K. A., and Mesecar, A. D. (2008). Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 84-94.
- 11 Jeanne, H.M., Peter, C.H., Hollman, S. M., Michel, N.C.P., Peter, L., Wija, A., and Martijn, B. K. (1995). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 60-65.
- 12 Conquer, J. A., Maiani, G., Azzini, E., Raguzzini, A., and Holub, B. J. (1998). Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J. Nutrition*, **128**, 593-597.
- 13 Nakagawa, K., Okuda, S., and Miyazawa, T. (1997). Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1981-1985.

- 14 Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., and Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380-381.
- 15 Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 313-322.
- 16 伊東健 (2009) Nrf2酸化ストレス応答系による病態制御, 生化学, 81, 447-455
- 17 錫村明生 (2014) 神経変性疾患, 神経炎症とミクログリア, 臨床神経学, 54, 1119-1121
- 18 Nunomura, A., Castellani, R. J., and Zhu, X. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **65**, 631-641.
- 19 Nabavi, S. F., Braidly, N., Gortzi, O., Sanchez, E. S., Daglia, M., Wozniak, K. S., and Nabavi, S. M. (2015). Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review. *Brain Research Bulletin*, **119**, 1-11.
- 20 Tai, Y. F., Paverse, N., Gerhard, A., Tabrizi, S. J., Barker, R. A., Brooks, D. J., and Piccini, P. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, **130**, 1759-1766.
- 21 Sanz, J. M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Virgilio, D. F. (2009). Activation of microglia by amyloid β requires P2X7 receptor expression. *J. Immunol.*, **182**, 4378-4385.
- 22 太田千穂, 忝岡樹子, 加藤善, 原口浩一, 遠藤哲也, 古賀信 (2011) フェニルプロパノイド類とフラボノイド類の抗酸化作用と α -グルコシダーゼ阻害作用:構造活性相関について, 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要, **43**, 243-248
- 23 Ashida, H., Fukuda, I., Yamashita, T., Kanazawa, K. (2009). Flavones and flavonoids at dietary levels inhibit a transformation of arylhydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Letters*, **182**, 4378-4385.
- 24 Bernardesa, N. R., Heggdorne-Araújo, M., Borgesb, I. F. J. C., Almeida, F. M., Amaral, E.P., Lasunskai, E. B., Muzitano, M. F., Oliveira, D. B.(2014). Nitric oxide production, inhibitory, antioxidant and antimycobacterial activities of the fruits extract and flavonoid content of *Schinus terebinthifolius*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **24**, 644-650.
- 25 Upadhyay, S. and Dixit, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 504253, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/504253>

第2章 実験方法

2.1 試薬

使用試薬と入手先

Apigenin, Luteolin	: Wako Pure Chemicals
Acacetin	: Santa Cruz Biotechnology Inc.
luteolin-7-O-glucoside	: Extrasynthese SA
Tertiary-butyl hydroperoxide	: Wako Pure Chemicals
Lipopolysaccharide (<i>E.col</i> O127)	: Wako Pure Chemicals
MEK inhibitor (U0126)	: Wako Pure Chemicals
p38 MAPK inhibitor(SB203580)	: Cayman Chemical
Nerve growth factor	: Sigma-Aldrich
Tumor Necrosis Factor	: Wako Pure Chemicals
Monoclonal antibodies against p44/42 ERK1/2, p-p44/42 ERK1/2, p38MAPK, p-p38MAPK,	: Cell Signaling Technology
alkaline phosphatase-linked anti-rabbit IgG antibodies	: Cell Signaling Technology
1-Step™ NBT/BCIP	: Thermo Scientific
SOD Assay Kit-WST, Cell Counting Kit-8(CCK-8)	: Dojindo Molecular Technologies Inc.
BCA Protein Assay Kit	: Thermo Scientific
Griess Reagent System	: Promega

他の試薬、溶媒等は全て特級以上の市販品を用いた。

2.2 実験材料と試料の調製

生鮮食用菊の阿房宮と延命楽は栽培農家から提供されたものを使用した。本研究は栽培品種の成分の相異に着目し、菊花の栄養・薬理作用の解明を試みるものであることから、土壌や気象条件などの環境による影響を極力避けるため、いずれの食用菊も同じ農場で栽培され、同時期（10月中旬～11月上旬）に収穫されたものを使用した。花卉を凍結乾燥後粉碎した。粉碎した花卉を5倍量のヘキサン、80%メタノール、熱水で段階的に抽出を行い、ヘキサン画分、メタノール画分、水画分に分け各実験に供した。

2.3 化学分析

2.3.1 フォーリン・デニス法

Folin-Denis 法 (1) により全フェノール化合物の含有量 (total polyphenol) の測定を行った。フェノール性化合物のフェノール性水酸基がアルカリ性でリンタングステン酸、モリブデン酸を還元して生ずる青色を 700~770nm で比色し定量した。標準物質として没食子酸を用い、全フェノール化合物の含有量を乾燥重量 1 g あたりの没食子酸相当量 (mg/g-dry weight) で表した。

2.3.2 BCA 法

Smith らの方法 (2) に従い、プロテインアッセイビシンコニン酸キットを用いた。アルカリ条件下でタンパク質によって還元された、1 価の銅イオンがビシンコニン酸と配位結合して生じる紫色を 540 nm で比色した。標準タンパク質として BSA を用い、検量線よりタンパク質濃度を算出した。

2.3.3 活性酸素消去能の評価 (SOD)

市販のキット SOD Assay Kit-WST を利用し、NBT 法のホルマザンを WST-1 ホルマザンに置き換えた改良法に従い行った。キサンチン - キサンチンオキシダーゼをスーパーオキシド生成系とし、WST-1 ホルマザンのスーパーオキシドによる還元反応で生じる発色を測定した。消去活性 (阻害活率) は、スーパーオキシド生成系に試料を加えた群 (sample), スーパーオキシド生成系のみからなる群 (blank1), キサンチンと試料からなる群 (blank2), キサンチンのみからなる群 (blank3) の各反応系の吸光度測定結果より、次に示す式に従い求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sampl}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

2.3.4 一酸化窒素

免疫細胞から放出された NO は即座に酸化されて NO₂ になり、さらに水と反応して亜硝酸や硝酸となる。通常このようにして生じた亜硝酸を、間接的な NO 産生量として評価している。亜硝酸はグリース試薬を用いて定量した。免疫細胞市販のキット (Griess Reagent System) を用い、スルファニルアミドと亜硝酸のジアゾ化反応において、N-1-ナフチルエチレンジアミンのカップリング反応により生成するアゾ色素を 540 nm で比色し間接的な NO 産生量进行评估した。

2.4 機器分析

2.4.1 LC-DAD 分析

フォトダイオードアレイ高速液体クロマトグラフィー (HPLC-DAD) 分析は、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD10-AVP) , データ処理システム (CLASS-LC10) 等で構成される島津製作所社製の HPLC LC-10 を使用した。カラムには ODS 樹脂の Mightysil RP-18 (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) カラム (Kanto Corp., Tokyo, Japan) を使用し、カラム温度は 40°C, 流速は 0.7 mL/min. とした。0.2% ギ酸を含む水 (A 液) およびメタノール : アセトニトリル : 水混合液 (9 : 9 : 2, B 液) の 2 液により、始めの 20 分間は B 液濃度を 20% に保持して溶出を行なった後、B 液濃度を 10 分間で 20% から 65% まで上昇させ濃度勾配溶出を行なった。検出は波長 230, 250, 270, 290, 310, 330, 350 および 370 nm の紫外吸収をフォトダイオードアレイ検出器 (島津製作所) により測定し、連続的に各ピークの UV スペクトルデータを記録した。

2.4.2 GC-MS 分析

ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) 測定は、島津 GC-MS-QP 2010 (EI) を使用した。カラムには、低極性カラム DB-1 (30m × 0.25mm × 0.25μm; Agilent) を使用した。GC 注入口温度は 250°C とし、320°C に達した後 10 分間保持した。キャリアガスは高純度のヘリウムを用いた。イオン化は電子衝撃 (EI) 法であり、イオン化電圧 650 eV で行った。イオン検出は質量範囲 m/z 40 ~ 600 で 0.5 秒のスキャン間隔で記録した。分析対象はトリテルペノイドであることを考慮し、試料はトリメチルシリル (TMS) 化誘導体とした。試料のヘキサン抽出物の 5mg を 0.5mL TMS-HT (東京化成) にて 70°C, 30min 加熱し TMS 化した。水とヘキサンを加え振とうして静置後、上層を分離濃縮し分析試料とした。

2.5 細胞培養

2.5.1 PC12

ラット副腎褐色細胞腫由来の PC12 細胞 (Cat. No. 88022401) は、ATCC (American Type Culture Collection) より導入したものを使用した。培養は、10% HS, 5% FBS, 100 U/mL penicillin G および 100 μg/mL streptomycin を含む DMEM 培地 (基本培地) を用い、5% CO₂ と 95% 空気の気相下、37°C で行った。3 日間培養し、70% 程度のコンフルエントになったところで 0.05% トリプシン溶液で剥離することにより継代を行った。継代時に一部の細胞を実験に供した。実験には継代回数が 10 回以内の細胞を用いた。

2.5.2 SH-SY5Y 細胞

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞(Cat. No. EC94030304)は、ATCC より導入したものを使用した。培養は、10% FBS, 100 U/mL penicillin G および 100 µg/mL streptomycin を含む DMEM/F12-HEPES 培地 (基本培地) を用い、5% CO₂ と 95% 空気の気相下、37°Cで行った。継代および各試験のための細胞播種は以下の通り行った。80–90%コンフルエントとなった細胞を PBS で洗浄し、0.25 %トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を剥離し、遠心(1000rpm, 3min, 室温) で回収後基本培地に懸濁した。継代培養用には 10cm ディッシュを用い、ウエスタンブロット用には 35mm ディッシュ、細胞生存試験用には 96well プレートへ適正数の細胞を用意した。

2.5.3 RAW264.7 細胞

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞は、ATCC より導入したものを使用した(Cat. No. EC91062702)。培養は、10% FBS, 2mM Glutamine, 100 U/mL penicillin G および 100 µg/mL streptomycin を含む DMEM 培地(基本培地)を用い、5% CO₂ と 95% 空気の気相下、37°Cで行った。継代および各試験のための細胞播種は以下の通り行った。80–90%コンフルエントとなった細胞をセルスクレイパーで剥離し、遠心 (1000rpm, 3min, 室温) で回収後基本培地に懸濁した。継代培養には 10cm のディッシュ、抗炎症作用の試験には 96well プレートへ適正数の細胞を播種した。

2.5.4 MG5 細胞・A1 細胞

p53 ノックアウトマウス由来ミクログリア細胞株 MG5 細胞(IFO50520)およびマウス由来アステロサイト細胞株 A1 細胞(IFO50519)は、医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲されたものを使用した。A1 細胞の培養には 10%FBS を含む DMEM 培地を用いた。細胞は週に 2 回、PBS で 1 回洗浄した後トリプシン処理により回収し、split ratio 1/20~1/30 で 75cm² フラスコを使用して継代した。MG5 細胞の培養に必要な A1 細胞の培養上清は次のようにして調製した。75cm² フラスコにコンフルエントにまで増殖した A1 細胞の継代時に、1/10 を 175 cm² フラスコに撒き込む。サブコンフルエントの状態にまで増殖したら、フラスコあたり 60mL の培地を加え一晩培養する。翌日、培地を回収し、血清培地用のフィルターでろ過し、A1 細胞の培養上清とした。MG5 細胞の培養には、DMEM /10%FBS と A1 細胞の培養上清を 3:7 の比率で混合して MG5 細胞用培地として用いた。MG5 細胞の培養には径 10cm ディッシュを用いた。継代および各試験のための細胞播種は以下の通り行った。4 °C PBS で 5 分附置した後、セルスクレイパーで剥離し、遠心 (1000rpm, 5min, 室温) で回収後

基本培地に懸濁した。継代培養には 10cm のディッシュ、抗炎症作用の試験には 96well プレートへ適正数の細胞を播種した。

2.5.5 L929 細胞

TNF- α 感受性マウス由来線維芽細胞株 L929 細胞 (JCRB9003) は、理化学研究所 RBC 細胞バンクより分譲されたものを使用した。培養は 10%HS, 0.1mM NEAA (非必須アミノ酸) を含む Eagle's MEM 培地 (基本培地) を用い行なった。継代および各試験のための細胞播種は以下の通り行なった。80-90%コンフルエントとなった細胞を PBS で洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA 溶液を用いて細胞を剥離し、遠心 (1000rpm, 3min, 室温) で回収後基本培地に懸濁した。継代培養には 10cm のディッシュ、TNF- α のアッセイには 96well プレートへ適正数の細胞を播種した。

2.6 各種評価法

2.6.1 細胞生存率の測定法

細胞生存率 (cell viability) の評価はセルカウティングキット (CCK-8) を用い Ishiyama 等の方法に準じて行なった(3)。可溶性のテトラゾリウム塩 (WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]) は生細胞の dehydrogenases により還元されオレンジのホルマザン色素となる。色素の吸光度は生細胞数に比例することから、この色素の 450nm の吸光度を測定し生存率を評価した。生存率の評価を行う各ウェルを生理食塩水で洗浄、培養液の 10 分の 1 容の WST-8 を加え 1~3 時間 CO₂ インキュベーターに附置した。反応後マイクロプレートリーダーを用いサンプル波長 450nm、リファレンス波長 500nm で測定し、生存率を評価する。

2.6.2 神経突起伸長活性の評価

PC12 細胞の神経突起形成の測定は Kamata 等の方法に準じて行なった(4)。コラーゲンコート 6 穴平底ウエルプレート (TYPE-1 collagen) に PC12 細胞を 4×10^4 cells/mL の密度で播種、24 時間培前培養後に低血清培地 (血清濃度を生育培地の 10 分の 1 とした) に交換し一晚培養した。所定濃度の試料を加えた培地と交換し 24 時間培養後神経突起伸長を位相差顕微鏡 (オリンパス) 下で観察した。神経突起をもつ細胞を陽性細胞と判定し、1 well あたり任意の 3 視野で 100 個の細胞について評価し、全細胞数に対する陽性細胞数の百分率を神経突起形成率として表した。阻害剤を用いた実験では、試料添加の 2 時間前に阻害剤を含む基本培養培地に交換し、その後試料を添加し培養を行なった。

2.6.3 酸化傷害保護作用の評価

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を 96 穴プレートに 5×10^4 個/well で播種した。翌日、被検試料を含む低血清培地（基礎培地の血清濃度を 1% FBS とした）に交換し所定時間培養後、適切な濃度（0.13~0.15 mM）の t-BHP を SH-SY5Y 細胞に所定時間曝露させた。PBS で洗浄した後、CCK-8 により細胞生存率を評価した。細胞生存率は、各試験の t-BHP 非暴露対照群の吸光度に対する各試験群の吸光度の比率（%）で表した。

2.6.4 抗炎症作用の評価

RAW264.7 または MG5 細胞を 96 well plate に 1.0×10^5 cells/mL で播種し培養した。翌日、被検試料を加えた培地と交換し細胞へ前処理を施した。1 時間後、免疫細胞（RAW264.7 または MG5 細胞）を活性化し炎症反応を惹起する目的で、培地に LPS（最終濃度：10 ng/mL）を加え 24 時間培養した。免疫細胞が産生する NO, TNF- α を測定し、LPS 刺激対照群のそれらの産生量と比較することにより炎症抑制効果を評価した。NO 量は 2.3.4 に基づき測定した。等量の培地と Griess 試薬（5%リン酸の 1%スルファニルアミド溶液と 0.1% n-1-ナフチルエチレンジアミンニ塩酸塩）を混合し、540 nm の吸光度を測定した。NO 産生能は LPS 刺激対照群の吸光度に対する各試験群の吸光度の比率（%）で表した。TNF- α 量の測定は下記のバイオアッセイ法により定量した。

2.6.5 TNF- α のバイオアッセイ

TNF- α 活性は、Kerekyarto の方法（5）に準じて行った。すなわち、L929 細胞を 96 well plate に 4×10^5 cells/mL で播種し、コンフルエントとなるまで培養した。アクチノマイシン D（4 μ g/mL）50 μ L と炎症試験を行った培養上清および各濃度の TNF- α 標準試料を 50 μ L 加え、37°C で 20 時間インキュベーションした。その後、CCK-8 キットを用い各 well の cell viability を測定した。添加 TNF- α 濃度に対する L929 細胞の生存率で作成した検量線を用い、培地中に産生された TNF- α 濃度を定量した。

2.6.6 クロマチンヌクレオチド DNA 断片化試験

細胞から DNA を抽出し、RNase 処理、次いで proteinase K 処理を行った後、DNA を分離し電気泳動に供した。DNA の精製・抽出はシリカモノリスを利用した Mono Fas 培養細胞ゲノム DNA 抽出キットを使用した。proteinase K 処理を行った液をシリカモノリスのスピニングラムに通し、吸着された DNA を回収することにより、DNA を分離精製した。ローディング液を加えアガロース電気泳動を行った後、非変異原性の蛍光試薬 Novel Green（Bio-Helix）で染色した。泳動ゲルを UV トランスイルミネーターで照射し観察、記録を行った。

2.7 ウェスタンブロット法

2.7.1 タンパク質の抽出

細胞質タンパク質抽出は次のように行った。氷上でマイクロプレートまたはディッシュを 2mM TBS で洗い, RIPA バッファー(Santa Cruz Biotechnology Inc.) を加え細胞を溶解した。溶解した細胞を 4°C 15,000g で 30 分間遠心分離し上清をウェスタンブロット分析に供した。核タンパク質はリソピュア核・細胞質タンパク質エキストラクターキットを用い説明書に従い可溶性核タンパク質画分を分離し分析に供した。また, タンパク含量は BCA タンパク質定量キットで測定した。

2.7.2 電気泳動およびイムノブロット

タンパク抽出液を sampling buffer に 1:1 で混合し, 80°C で 5 分間反応した。試料を SDS・ポリアクリルアミド電気泳動で分離し, PVDF メンブランにエレクトロブロットにより転写した。イムノブロット分析は, 転写メンブランをブロッキング液で 1~2 時間インキュベーションした後, 一次抗体反応 (4°C, 一晚), 二次抗体反応を行った。二次抗体としてアルカリホスファターゼ共役抗ウサギ IgG (Cell Signaling Technology) を用いた。発色は 1-Step™ NBT/BCIP 溶液 (Thermo Scientific) 中で行った。イムノブロットの結果はイメージアナライザー (Kodak EDAS 290) より画像を取得し各バンドの強度を解析ソフト (Kodak 1D Image Analysis Software) を用い数量化した。

2.7.3 各タンパクの WB に用いた一次抗体および希釈倍率

- ・ p44/42ERK1/2 および phospho-p44/42 ERK1/2 (p-p44/42 ERK1/2)の検出,
Rabbit anti-ERK1/2antibody (Stress Marq Bioscience ; 1:3000 in Can Get Signal solution 1)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology ; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)
- ・ p38MAPK および p-p38MAPK の検出,
p38 MAPK Antibody (Cell Signaling Technology ; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9)XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology ; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)

- Nrf2 の検出

NRF2 (D1Z9C) XP® Rabbit mAb (Cell Signaling Technology; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)

- HO-1 の検出

RabbitHO-1 (P249) Antibody (Cell Signaling Technology; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)

- β -Actin の検出

Rabbit Anti- β -Actin pAb (MBL; 1:1000 in Can Get Signal solution 1)

2.8 統計処理

定量的データは平均値 \pm 標準偏差で表した。平均値の有意差検定は Student-t 検定および一方向分散分析を用いて比較した。危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した。

2.9 引用文献

- 1 Folin, O. and Denis, W. (1915). A Colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *J. Biol. Chem.*, **22**, 305-308.
- 2 Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- 3 Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1518-1520.
- 4 Kamata, Y., Shiraga, H., Tai, A., Kawamoto, Y., Gohda, E., (2007). Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid. *Neuroscience*, **146**, 1073-1081.
- 5 Kerékgyártó, C., Virág, L., Tankó, L., Chihara, G., and Fachel, J. (1996). Stain differences in the cytotoxic activity and TNF production of marine macrophage stimulated by Lentinan. *Int. J. Immunopharmacol.*, **18**, 347-353.

第3章 菊花に含まれるフェノール化合物に関する栽培品種の比較

3.1 緒言

キクは観賞用の他、食用に供されており日本では約 60 種が各地で栽培されている。青森県南部地方を中心に栽培されている黄色の「阿房宮」と、山形県、新潟県で栽培が盛んな淡紅紫色の「モッテノホカ」は生産量が多く日本の食用菊の代表的な栽培品種である。「モッテノホカ」は生産地域あるいは系統により「延命楽」、「おもいのほか」、「かきのもと」等の呼び名もある。菊花には薬効があり、中国では薬として扱われていて、「釣藤散」など種々の漢方薬の重要な配剤となっている。日本でも日本薬局方外生薬規格集に記載され薬に準じた扱いがなされている。菊花の薬効は、解熱、解毒、鎮痛、消炎などであり、感冒や発熱、悪寒、頭痛などの症状に効果を示す。さらに多くの研究が行われており、脳神経の虚血再灌流による酸化ストレス傷害の保護作用など、脳神経に対する作用も注目されている。これらの薬効は、フラボノイド、テルペノイド、クロロゲン酸等のフェノール酸系化合物によるものであり、菊の消炎、解毒、抗アレルギー作用を示す成分としては、フラボノイドのルテオリン (luteolin)、アピゲニン (apigenin)、アカセチン (acacetin) および配糖体である 3',4',5-trihydroxy-flavanone 7-O-glucuronide, apigenin 7-O-β-d-glucuronide などの化合物が知られており(1, 2), 解熱、解毒、抗炎症作用、肝機能保護作用、抗菌作用、抗プロモーション抑制活性などを示す成分としては、テルペノイドの brein, heliantriol B₂, heliantriol C などの化合物があり、また、抗酸化作用、がん細胞増殖抑制作用などを示す成分としては、フェノール酸系化合物のクロロゲン酸 (chlorogenic acid), 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 7-O-β-d-(4β-caffeoyl)glucuronide などの化合物が知られている(3)。栽培品種により菊花の成分組成を比較したいくつかの研究が報告されている(4, 5, 6)。栽培品種による上記の活性成分の組成や比率の相違は、それぞれの栽培品種が示す薬理作用を決定する化学的特徴となっているが、現在これらに関する知見は乏しい。中国においては、菊花は漢方薬の配剤として重要な位置にあり、菊花のルテオリンおよびクロロゲン酸の含有量を薬効の指標にしようとする提案がなされている(6)。日本においても食品を健康増進に役立てる観点から特定保健食品制度が施行されているが、最近制定された機能性表示食品制度では生鮮食品の健康への活用を促進する目的から対象を生鮮食品にも広げている。しかし、生鮮食品は一般に品種をはじめ栽培する地域や気象環境などによりその食品機能が異なることが知られており、制度を利用する生鮮食品は食品機能とそれを担保する活性成分の科学的根拠を明らかにすることが求められている。前述のように現在伝統野菜が見直されて来ており、薬効の顕著な食用菊についても活用の拡大が望まれる。本研究では菊花の中樞神経細胞保護作用を検討する切り口として、日本の代表的な食用菊の阿房宮と延命楽の二つの栽培品種の特徴の比較を行っており、本章においては生理機能研究に先立ち、活性成分

の主体となるフラボノイド、テルペノイド、クロロゲン酸類等の成分組成を、それらが回収されるヘキサン抽出物およびメタノール抽出物について両栽培品種の比較を行った。

3.2 結果と考察

3.2.1 栽培品種による菊花フェノール化合物の組成および含有量の比較

植物等の天然物には多様なフェノール化合物が存在し、化合物の特徴により分類がなされている。はじめに、菊花花卉のフェノール化合物の概要を把握するため、各溶媒で溶出された画分の重量比を求め、栽培品種により比較した (Table 3.1)。テルペノイドは概ねヘキサンやメタノール等の溶媒に抽出され、フラボノイドは 80%メタノール等に抽出される。溶媒抽出物の約 80%は、メタノールに可溶性成分で占められることから、フラボノイド化合物の組成比の高いことが示唆され、また、栽培品種による差はほとんど認められなかったが、ヘキサン抽出画分の重量比は延命楽に比べ阿房宮で高い値を示し (5.53 % vs. 1.78 %) (t-test, $P < 0.05$)、テルペノイドの組成比は阿房宮で高いことが示唆された。次いで大部分の抽出物が回収されるメタノール抽出画分について、全フェノール化合物の含有量 (total polyphenol) をフォーリン・デニス法により分析し標準物質とした没食子酸の換算量で示した (Table 3.2)。阿房宮および延命楽の花弁の全フェノール化合物含有量は乾燥重量当りそれぞれ 21.8 ± 1.07 mg/g および 11.4 ± 1.01 mg/g であり、いずれも高い含有量を示した (t-test, $P < 0.01$)。また、栽培品種による比較では含有量に約 2 倍の差があり、阿房宮の方が高い値を示した。さらに、種々の生理活性が知られ、菊花の特徴的なフラボノイドを構成する化合物の中から、アピゲニン (apigenin)、ルテオリン (luteolin)、アカセチン (acacetin) について、その含有量を HPLC により定量し栽培品種で比較した (Table 3.2) (t-test)。これらの化合物の構造を Fig. 3.1 に示した。栽培品種により、アピゲニンとルテオリンの含有量は対症的な値を示し、延命楽では阿房宮に比べルテオリン含有量が高く (3.24 ± 0.17 $\mu\text{mol/g}$ vs. 1.30 ± 0.34 $\mu\text{mol/g}$; 各 dry weight) (t-test, $P < 0.01$)、アピゲニン含有量は低く、逆に阿房宮で高い値を示した (0.88 ± 0.16 $\mu\text{mol/g}$ vs. 2.48 ± 0.95 $\mu\text{mol/g}$; 各 dry weight) (t-test, $P < 0.01$)。アピゲニンとルテオリンのレベルは阿房宮と延命楽のフラボノイド組成の違いを顕著に表す化合物であることが示されたが、Sugawara 等の報告では、延命楽 (紫紅色) でアピゲニンのレベルが高く、ルテオリンのレベルが低いとする、本論文とは逆の結果を報告している(4)。結果が異なった理由については、同栽培品種であっても系統が異なっている可能性や、栽培環境の違いなどの要因が考えられるが、原因は不明であり解決すべき課題と考えられる。Sugawara 等は山形で栽培されている菊の系統の異なる、コトブキ、イワカゼ、モッテノホカ (紫紅色、黄色) の花卉のフラボノイド組成を分析し比較した結果、栽培品種により組成比が大きく異なることを示し、同時にラジカル消去活性も異なっていることから、組成の相異が生理活性の強さなどへ大きく影響することを明らかにした(4)。

アカセチンの含有量は両栽培品種で差は認められなかった ($0.71 \pm 0.13 \mu\text{mol/g}$ vs. $0.78 \pm 0.16 \mu\text{mol/g}$; 各 dry weight)。

3.2.2 HPLC-DAD による菊花構成フェノール化合物の同定と栽培品種による比較

次に、阿房宮および延命楽のフラボノイド組成の特徴を比較するため、メタノール抽出物をフォトダイオードアレイ検出器付高速液体クロマトグラフィー (HPLC-DAD) により分析し (Fig. 3.2), 各フェノール化合物の分離とその UV スペクトルデータより各化合物の同定もしくは推定を試みた。フォトダイオードアレイ検出器は、通常の検出器が特定波長の紫外強度を経時的に 2 次元で表すのに対し、分離成分の溶出時間、吸収スペクトルとその強度を同時に連続的に測定する三次元クロマトグラムデータとして得ることができる。菊花メタノール抽出物で観察された主要な 12 のピークの各化合物について、UV スペクトルよりそれぞれの極大吸収波長を求め、各ピークを極大吸収波長の特徴より、フラボノイド、クロロゲン酸等のフェノール酸系化合物 (caffeoylquinic acid derivatives) およびその他へと分類し、各ピークの同定の参考とした (Table 3.3)。フラボノイドは 252 nm, 265~268 nm および 332~348 nm に極大吸収を持つ特徴があり、フェノール酸系化合物は 239 nm, 300 nm および 326 nm などに極大吸収を持つ特徴がある。同定は、標準物質を用意した化合物については、標準物質の保持時間と UV スペクトルを抽出物のそれらのデータと比較し検討した。その結果、次の 6 ピークについて、ピーク 1 はクロロゲン酸 (chlorogenic acid), ピーク 2 は luteolin-7-O-glucoside, ピーク 4 は 3,5-di-caffeoylquinic acid, ピーク 8 はルテオリン (luteolin), ピーク 11 はアピゲニン (apigenin), ピーク 12 はアカセチン (acacetin) と同定した。ピーク 6 の UV スペクトルはルテオリンのそれと極めて類似していて、また保持時間が短いことからルテオリンの配糖体であることが推測された。同様の理由から、ピーク 5 およびピーク 7 はアピゲニンの配糖体と推測した。阿房宮および延命楽の抽出物で認められる主要なこれらの 12 のピークは、HPLC-DAD 分析による各ピークの保持時間ならびに UV スペクトルデータが互いに一致していることより、これらのピークの化合物は両栽培品種に共通に存在していることが示された。しかし、これらのピークの面積比は大きく異なっており、延命楽では阿房宮と比べ、ルテオリン (ピーク 8) や luteolin-7-O-glucoside (ピーク 2), ピーク 6 の面積は大きく、アピゲニン (ピーク 11), アピゲニンの配糖体と推測されるピーク 5, ピーク 7 の面積は小さく、アピゲニンおよびルテオリン含有量の結果を裏付けるものであった。

3.2.3 GC-MS による菊花トリテルペノイドの検討と栽培品種による比較

抗炎症作用は菊花の薬効の重要な柱をなすものであり、トリテルペノイドはフラボノイドと比べ存在比は少ないと考えられるが、菊花の抗炎症作用を示す活性成分の中心をなすものであ

ることから、菊花のヘキサン抽出物について、トリテルペノイド化合物の分析を試みた。既に菊花のトリテルペノイド分析に関する詳細な報告がなされており、Ukiya 等は 24 の triterpene diol と triol, および 32 のそれらの 3-O-fatty acid ester を分離同定している(8)。本研究においては、栽培品種によるトリテルペノイド組成を比較する観点より、菊花ヘキサン抽出物をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) により検討した。試料をトリメチルシリル化誘導体とし、EI 法 (Electron impact (電子衝撃) 法) による GC-MS 分析を行った。カラム温度を 200°C から 320°C まで昇温し分離を行いそのトータルイオンクロマトグラムを Fig. 3.3 に示す。主要な 12 のピークを選び番号を付し、その保持時間とピーク 3 を基準とした各ピークの相対強度 (%) を Table 3.4 へ示す。両栽培品種の 12 のピークの保持時間およびマススペクトルのフラグメントパターンは互いに一致しており、ヘキサン抽出物の成分組成は栽培品種間で類似していることが判明した。しかし、相対強度を比較すると延命薬に比較して阿房宮においては、ピーク 7, 11, 12 が低くなっており、これらの化合物が栽培品種間の抽出物成分の主な相違となっていることが示唆された。各ピークの化合物について、マススペクトルのライブラリーデータ (NIST21; 21,250 件の化合物データを収載, および NIST107; 107,886 件の化合物データを収載) との比較, およびテルペノイド分析に関する関連文献のフラグメンテーションパターンや保持時間等を参考にして検討を行った。ライブラリーデータのスペクトルと比較的高い類似度を示したピークについて、その類似度 (%) と化合物名; ピーク 5 : campesterol trimethylsilyl ether, ピーク 6 : stigmasterol trimethylsilyl ether, ピーク 7 : β -sitosterol trimethylsilyl ether, ピーク 9 : β -amyrin trimethylsilyl ether を Table 3.4 へ示し、各ピークのクエリースペクトルとヒットしたライブラリーのスペクトルを対比した図を Fig. 3.4 へ示した。試料の気化温度が高いためカラム温度は高温となり、分析したスペクトルにはカラムから剥がれてくる液相由来の m/z 207, 281, 341 等多数のフラグメントが夾雑スペクトルとなり全てのデータのスペクトルに重なっていることから、夾雑フラグメントの減算処理をした上でクエリースペクトルとした。しかし、これらの化合物の同定には NMR など他の傍証が不可欠であり、同定ではなく化合物の候補として示した。ピーク 8, 10, 11 には Oleanane/Ursane-type のトリテルペノイドの特徴である、相対強度の高い m/z 203, 218 のスペクトルが認められる。 m/z 73 はトリメチルシリル基由来のフラグメントである。また、菊花において生理活性を示す化合物として報告されている化合物のうち、ライブラリーに収載されているものは、上記化合物の他は、lupeol のみであり、菊花の抗炎症活性の強い化合物である heliantriol C 等は収載されておらず、他のピークについてライブラリー検索は行えなかった。第 6 章で示すように、抗炎症活性は両栽培品種で大きく異なり、延命薬に比べ阿房宮で低いことが示されていて、その要因として両栽培品種間で組成比の異なっている、ピーク 7, 11, 12 の化合物の組成比の低いことが考えられる。ピーク 11, 12 は有効なライブラリー検索を行うことはできないが、文献

の保持時間や含有量に関する知見などより、それぞれ、faradiol および heliantriol C である確率が高いと考えられた(7)。Fig. 3.5 へピーク 11 および 12 のマススペクトルを示した。Faradiol, heliantriol C は taraxastane-type のトリテルペノイドであり、ピーク 11 および 12 には、taraxastane-type に現れる m/z 408, 365, 203, 189, 175 等のフラグメントイオンが認められる。両者の構造は 22 α の位置の水酸基の有無だけであり、両ピークのスペクトルはほぼ一致していることが示された。また、保持時間の短い位置に現れるピーク 1~4 はライブラリー検索より炭化水素鎖であることが推定され(Fig. 3.6)、トリテルペノイドの脂肪酸エステルを構成する脂肪酸のメチレン基部分と考えられるが、夾雑ピークの存在よりメチレン鎖の分子量を判定することはできなかった。

3.3 結言

中国においては、菊花は漢方薬の配剤として重要な位置にあり、薬効の高い特定種が薬草用菊として利用されている。一方、中国、日本その他の国々においては、食用としても様々な種類の菊が古くより利用されてきた。機能性の食品表示においては、食品の健康効果を明確な科学的根拠で示す必要がある。菊は薬草としても利用されているもので食用菊にも顕著な健康機能を示すものも多い。しかし、食用に供される菊は種類が多く、生理作用の特性も多様である。従って、食用菊など生鮮食品の機能性表示にあたっては品種、生産地を区別して機能性の立証に関する科学的評価が必要とされるが、そのデータは著しく不足している。近年、Sugawara 等は食用菊の栽培品種による抗酸化能の比較をフラボノイド組成と DPPH ラジカル消去活性から報告している(4)。また、Xie 等は薬用と食用の菊花の品種についてフラボノイド組成と、In vivo および in vitro の抗アレルギー作用から検討を行った(6)。本研究では菊花の中樞神経細胞保護作用を、日本の代表的な食用菊の阿房宮と延命薬の二つの栽培品種の比較から解明することを目的とし、本章においては生理活性の主体となるフラボノイド、テルペノイド、クロロゲン酸類等の成分組成を両栽培品種で比較した。

各溶媒（ヘキサン、メタノール、水）へ回収された菊花成分の乾燥重量を栽培品種で比較した結果、ヘキサン抽出画分の重量比は延命薬に比べ阿房宮で高く(t-test, $p < 0.05$)、テルペノイドの組成は阿房宮で高い可能性が示唆された。それ以外は同様の重量比であった。フォーリン・デニス法により分析した全フェノール化合物含有量は阿房宮の方が延命薬に比べ約 2 倍高い値を示し、栽培品種により大きく異なった(t-test, $p < 0.01$)。菊花の生理活性に大きく関わる、アピゲニン (apigenin) 、およびルテオリン (luteolin) の含有量は、延命薬と阿房宮で対照的な値を示し、延命薬では阿房宮に比べルテオリン含有量が高くアピゲニン含有量は低く(t-test, $p < 0.01$)、阿房宮ではその関係は逆となっており、両化合物の存在比の相異は、阿房宮と延命薬のフラボノイド組成の特徴を顕著に表すものと考えられた。しかし、Sugawara 等の

延命薬の結果とは異なっており検討が必要である。HPLC-DAD で菊花を構成するフェノール化合物を検討した結果、主要な 12 の化合物の約半数はアピゲニン、ルテオリン、およびそれらの配糖体から成ると考えられた。アピゲニンとルテオリンレベルの栽培品種による相異は、HPLC-DAD 分析結果からも示され、配糖体についても同様の関係が示された。また、これらの 12 の化合物は両栽培品種で共通であった。一方、ヘキサン抽出物の構成化合物を検討する目的で EI-GC-MS により検討を行った。選択した 12 のピークの保持時間とマススペクトルのフラグメントパターンは栽培品種間で互いに一致しており抽出物の成分組成は類似していることが示された。しかし、延命薬に比較して阿房宮においてはピーク 7, 11, 12 の相対強度が低く、栽培品種間の化合物の組成比の主な相違となっていることが示唆された。ピーク 7, 11, 12 は、いずれも同定には至っていないが、ライブラリー検索よりピーク 7 は β -シトステロールの TMS 誘導体、ピーク 11, 12 は文献の菊トリテルペノイドに関する既存の知見より、フラジオール、ヘリアントリオール C の TMS 誘導体と推測された。

薬草などの生理作用が、それらのフェノール化合物に起因していることも少なくないが、それらの有効性や作用機構には不明の点が多い。本来フェノール化合物は生体成分ではないため、抗酸化能力など生体に対する非特異的な働きかけを介して作用を及ぼすと考えられてきた。しかし近年、特定のフェノール化合物を認識する部位の発見や、生体防御に関する遺伝子発現やそれらを制御する上流のシグナル分子群に対する調節作用を介した作用機構等が多数見出され、各フェノール化合物が固有の特異的な仕組みで作用を発現している場合のあることが分かってきた。従って多成分からなる食物の摂取を疾病予防や健康増進に役立てようとするには食品機能発現機構を正しく理解することが大切であり、食品成分の構造や化学的特徴と標的部位における個々の化合物の挙動や化合物に対する生体側の応答等を照らし合わせ、食品の有効性の科学的根拠を追及する積み重ねが大切であると考えられる。本章においては、次章以降で検討される菊花抽出成分の神経細胞保護作用の機構に関する研究に先立ち、今回研究対象とした阿房宮および延命薬の主要な有効成分を構成するフラボノイドとテルペノイドの同定やプロフィールについて明らかにし、保護機構の検討を進めるデータとした。

Table 3.1 Content ratio of each solvent extract from *Chrysanthemum* petals of Aboukyu and Enmeiraku

	Aboukyu	Enmeiraku
Fraction (solvent)	weight % of extract	
Hexane	5.53	1.78
Methanol	47.26	44.32
Water	5.99	6.19
Residue	41.21	47.71

Dried *Chrysanthemum* petals were extracted with hexane, 80% methanol and hot water successively and collected in three fractions. Values are weight % of extract against dry petal.

Table 3.2 Total phenolic compounds and flavonoids content of extracts from *chrysanthemum* petals of Aboukyu and Enmeiraku

	Aboukyu	Enmeiraku
(mg/g dry wt.)		
Total polyphenol	21.8 ± 1.07 ^a	11.4 ± 1.01 ^b
(µmol/g dry wt.)		
Apigenin	2.48 ± 0.95 ^a	0.88 ± 0.16 ^b
Luteolin	1.30 ± 0.34 ^a	3.24 ± 0.17 ^b
Acacetin	0.71 ± 0.13	0.78 ± 0.16

Total phenolic component content was measured by Folin-Denis, using standard as gallic acid. Contents of flavonoid were determined by quantitative HPLC analysis. Values are mean ± SD of three determinations. Statistics were calculated by t-test. Difference at $p < 0.05$ are indicated by different letter (a and b). (From D. J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

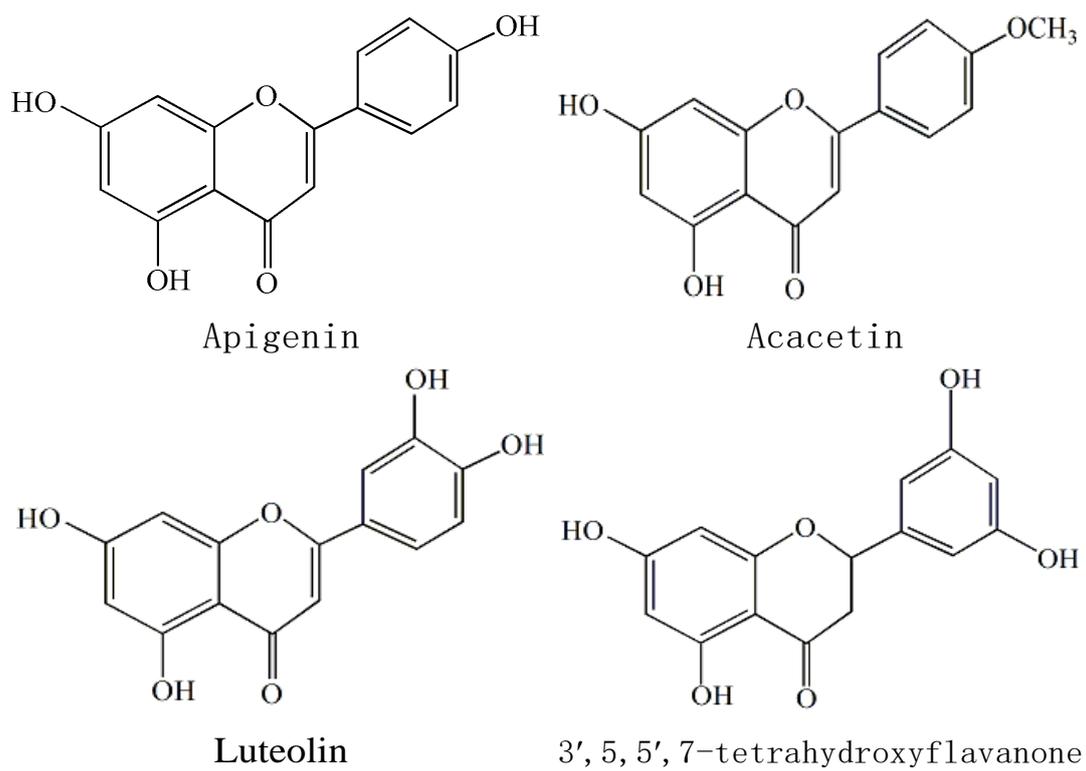


Fig. 3.1 Chemical structure of some major flavonoids found in *Chrysanthemum* petal

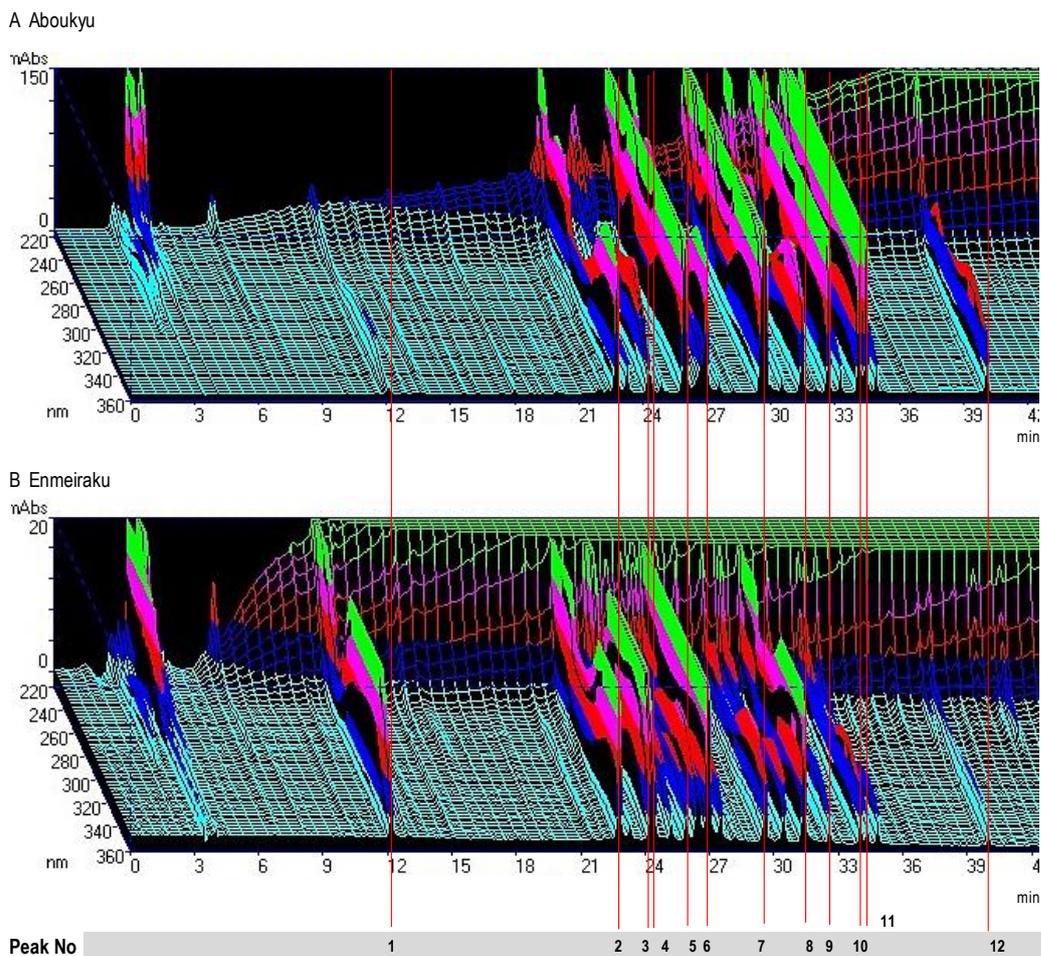


Fig. 3.2 Three dimensional chromatogram of the chrysanthemum flower extracts from Aboukyu (A) and Enmeiraku (B).

LC-DAD was carryout using the shimadzuSPD10-AVP photodiode array detector. Spectra from 220 – 360 nm were collected at 1.2nm resolution. Compounds corresponding to six peaks were identified as chlorogenic acid (peak 1), luteolin-7-O-glucoside(peak 2), 3,5-di-caffeoylquinic acid (peak 4), luteolin (peak 8),apigenin (peak 11), and acacetin (peak 12). AUC (%) for twelve peaks of Aboukyu and Enmeiraku were listed in Table 3.3.

Table 3.3 Peaks data list from chromatograms (350nm) of chrysanthemum flower

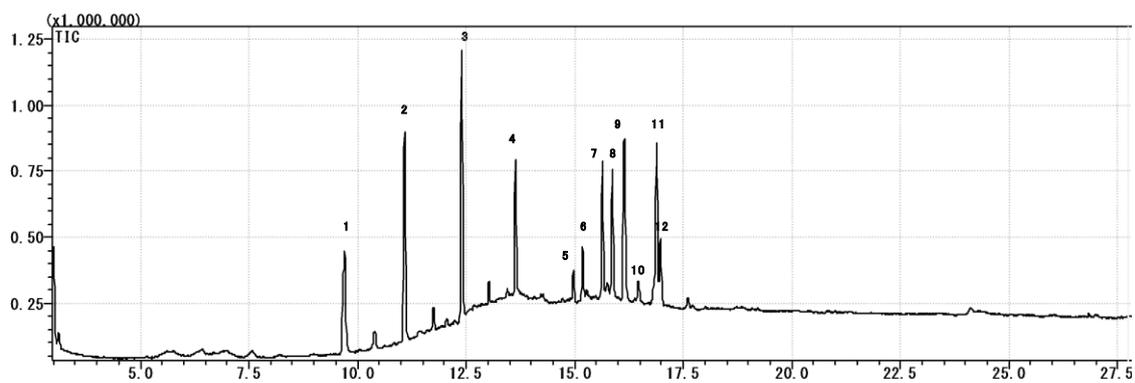
Peak. No	T _R (min)	UV λmax (nm)			Aboukyu	Enmeiraku	identification
					Area %	Area %	
Flavonoids							
2	22.821 ± 0.125	252	265	347	4.48 ± 0.52 ^a	12.48 ± 2.35 ^b	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside [*]
5	26.244 ± 0.360		283	328	12.04 ± 5.23	3.24 ± 0.39	
6	27.018 ± 0.114	253	265	347	6.86 ± 2.68 ^a	21.97 ± 2.11 ^b	
7	29.732 ± 0.087		266	336	26.21 ± 5.54 ^a	4.30 ± 0.73 ^b	
8	31.476 ± 0.079	253	265	348	3.59 ± 0.82 ^a	9.91 ± 1.81 ^b	Luteolin [*]
9	32.701 ± 0.718		266	331	4.96 ± 2.28 ^a	1.43 ± 0.40 ^b	
10	34.313 ± 0.194		266	337	7.50 ± 0.42 ^a	3.12 ± 1.01 ^b	
11	34.724 ± 0.297		268	332	7.88 ± 2.35 ^a	1.94 ± 0.25 ^b	Apigenin [*]
12	40.713 ± 1.156		268	332	1.72 ± 0.46	2.32 ± 1.01	Acacetin [*]
Cafeoylquinic acids							
1	12.173 ± 0.199	239	300	326	2.47 ± 2.06	4.27 ± 1.34	Chlorogenic acid [*]
3	24.338 ± 0.128	239	300	326	2.40 ± 1.30	5.81 ± 3.83	
4	24.469 ± 0.128	239	300	326	3.77 ± 2.65	4.62 ± 3.77	3,5-Di-cafeoylquinic acid ^{**}

* Peak estimation was confirmed by comparison of their retention times with those standards.

** Previously identified from NMR and mass spectral data.

Values are mean ± SD of three determinations. Statistics were calculated by t-test. Difference at p<0.05 are indicated by different letter (a and b). (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

a Enmeiraku



b Aboukyu

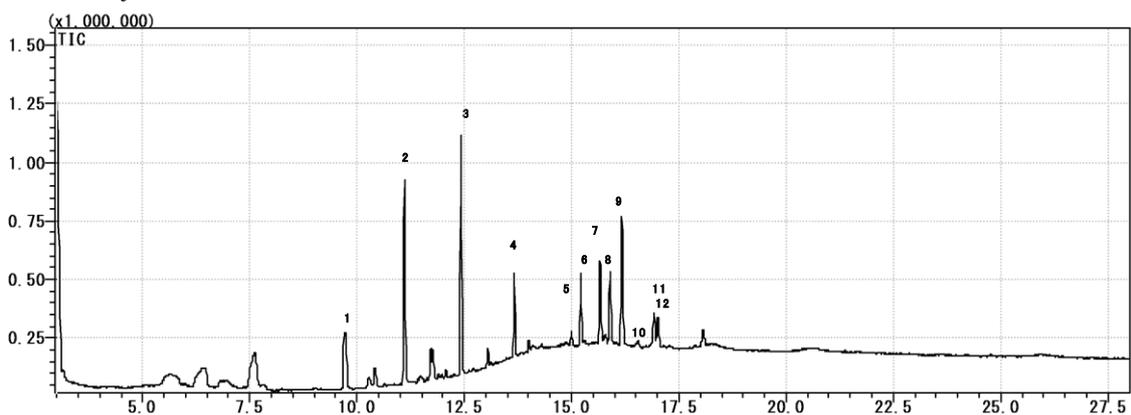
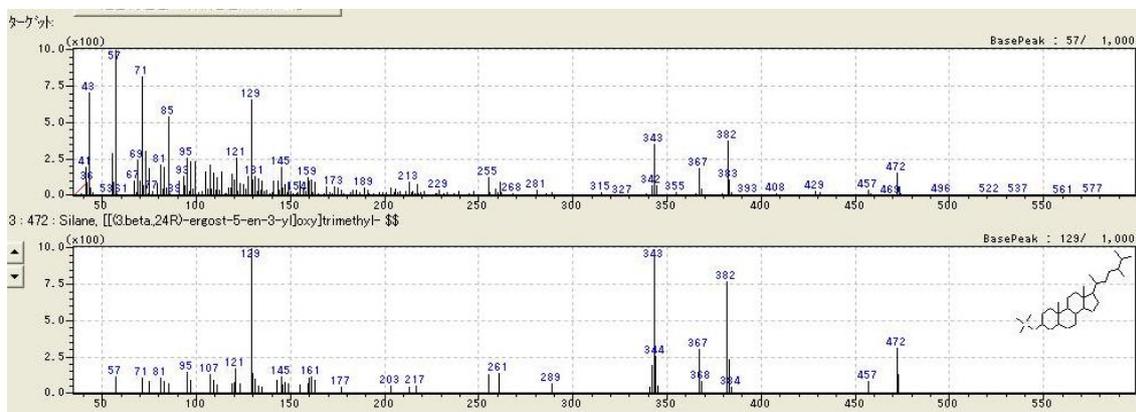


Fig. 3.3 Total ion chromatograms of the trimethylsilyl constituents of *Chrysanthemum* flower extracts from Enmeiraku (a) and Aboukyu(b).

Peaks assignment listed in Table 3.4. Constituents of *Chrysanthemum* flower were isolated from the dried petal with hexane, and converted into trimethylsilyl derivatives by treatment with TMS.

peak 5



peak 6

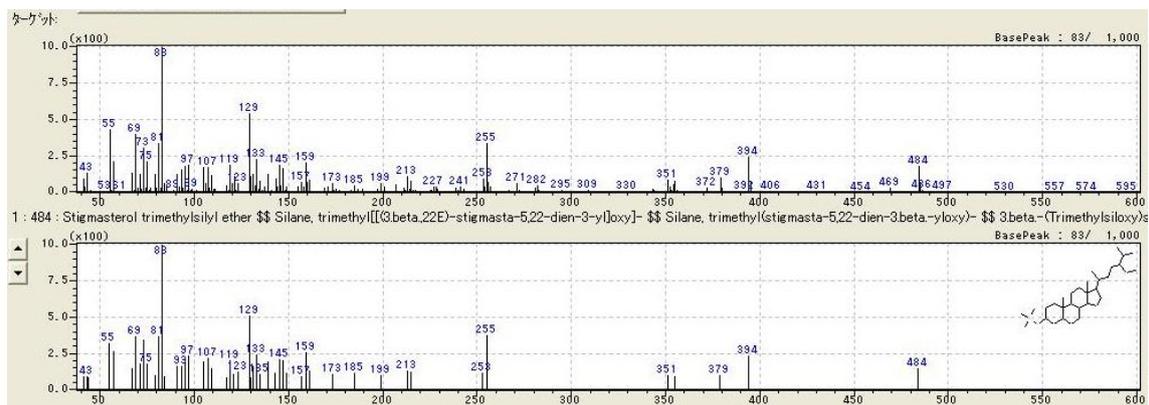
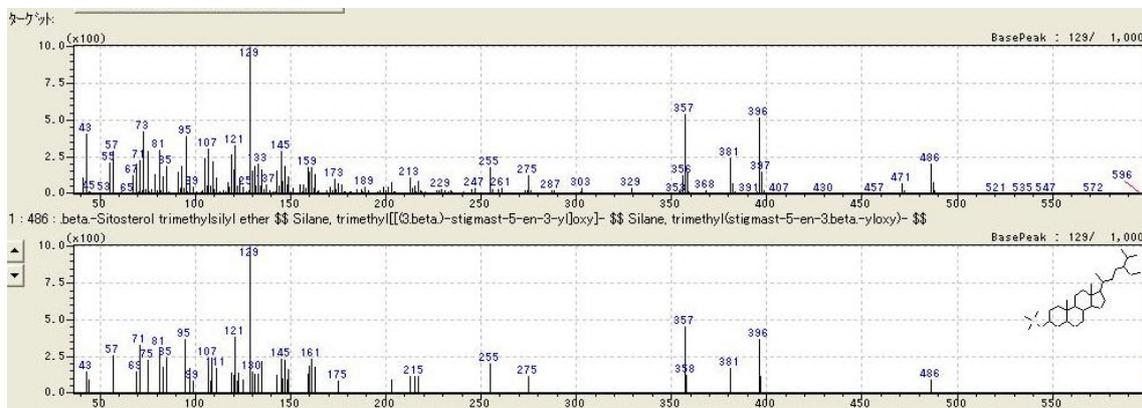


Fig. 3.4 Comparing a query mass spectrum (upper side) with reference mass spectra (lower side) in a library via spectral matching

peak 7



peak 9

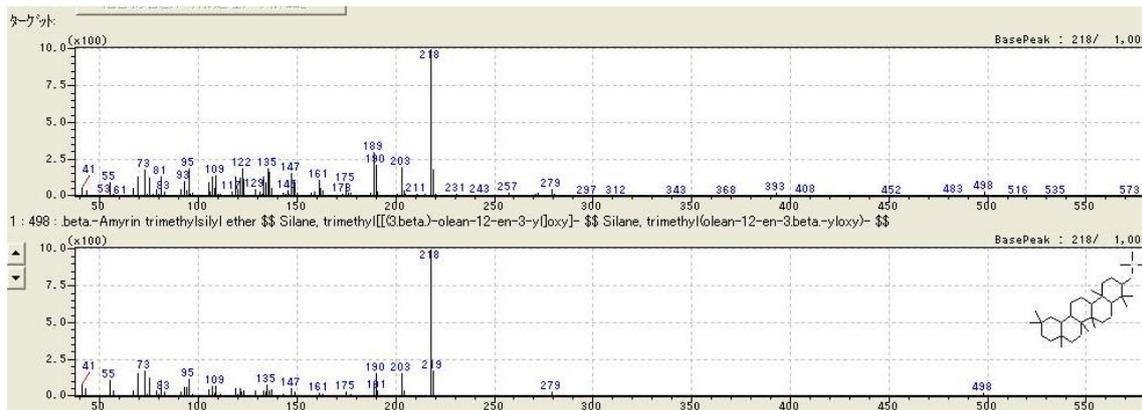
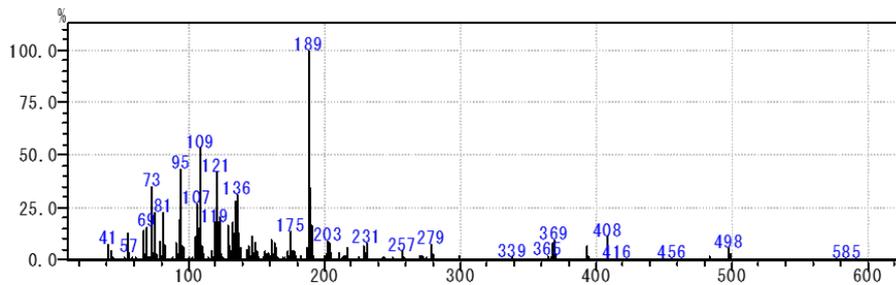


Fig. 3.4 (continue) Comparing a query mass spectrum (upper side) with reference mass spectra (lower side) in a library via spectral matching

peak 11



peak 12

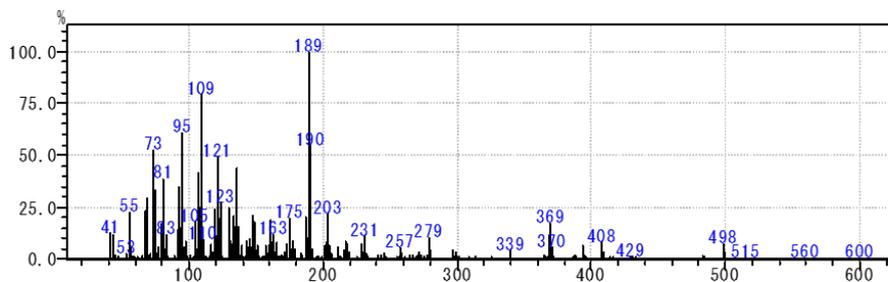


Fig. 3.5 Electron impact mass spectra of peak 11 and peak 12

peak 3

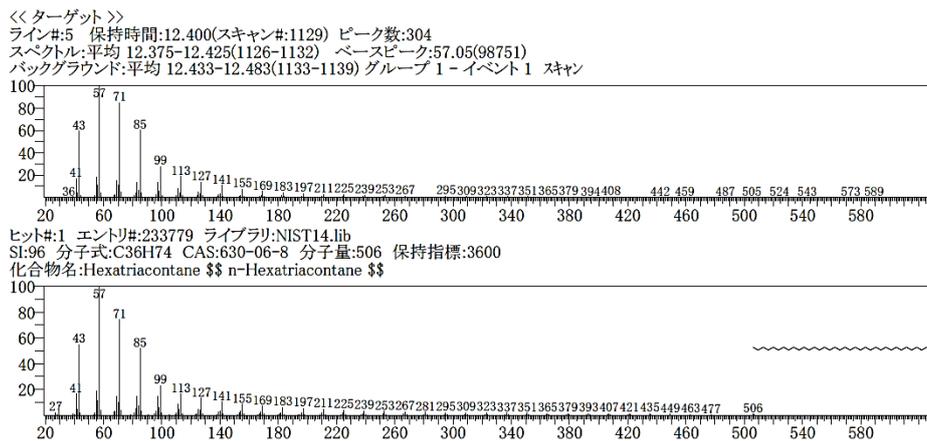


Fig. 3.6 Comparing a query mass spectrum (upper side) with reference mass spectra (lower side) in a library via spectral matching

Table 3.4 Peaks data list from total ion chromatograms of the trimethylsilyl constituents of *Chrysanthemum* flower

Peak	T _R (min)	Relative height (%)		Similarity (%)	Compound (high similarity)	type	Formula	M.w.
		Enmei	Abou.					
1	9.710	37.2	24.5					
2	11.830	74.4	83.2					
3	12.399	100.0	100.0					
4	13.520	65.1	47.5					
5	14.968	31.1	25.2	63	campesterol trimethylsilyl ether		C ₃₁ H ₅₆ OSi	472
6	15.184	38.2	47.1	92	stigmasterol trimethylsilyl ether		C ₃₂ H ₅₆ OSi	484
7	15.641	65.2	33.7	82	β-sitosterol trimethylsilyl ether		C ₃₂ H ₅₈ OSi	486
8	15.866	62.4	47.7			Oleanane/Ursane		
9	16.143	72.6	68.9	85	β-amyrin trimethylsilyl ether	Oleanane/Ursane	C ₃₃ H ₅₈ OSi	498
10	16.465	27.6	21.6			Oleanane/Ursane		
11	16.889	71.2	32.1			taraxastane		
12	16.976	40.6	30.3			taraxastane		

The compound, which has high similarity, in analysis of GC-MS data by matching the experimental mass spectra to reference mass spectra in a library.

3.4 引用文献

- 1 Chen, K.Y., Wen, S.F., Zhi, Z.J., and Shao, J.S.(1983). Preliminary observation of ¹³¹Cs distribution in experimental acute myocardial infarction and coronary insufficiency treated with root of *Salvia miltiorrhiza*, flower of *Chrysanthemum morifolium* and *Chrysanthemum indicum*. *J. Traditional Chinese Medicine*, **3**, 265–270.
- 2 Li, L. and Jiang, H. (2006). Determination and assay validation of luteolin and apigenin in human urine after oral administration of tablet of *Chrysanthemum morifolium* extract by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 261–265.
- 3 Kim, H.J. and Lee, Y.S. (2005). Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Medica.*, **71**, 871–876.
- 4 菅原哲也, 五十嵐喜治 (2009) 食用キク栽培品種のフラボノイドとポリフェノール画分のラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, **56**, 600-604
- 5 Lin, L.Z. and Harnly, J.M. (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*, **120**, 319-326.
- 6 Xie, Y., Qu, J., Wang, Q., Wang, Y., Yoshikawa, M., and Yuan, D. (2012). Comparative evaluation of cultivars of *chrysanthemum morifolium* flowers by HPLC-DAD-ESI/MS analysis and antiallergic assay. *J. Food Chem.*, **60**, 12574-12583.
- 7 Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., and Takido, M. (2001). Constituents of compositae plants. 2. triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3187–3197.

第4章 菊花抽出物の神経栄養因子様作用に関する栽培品種比較による検討

4.1 緒言

神経細胞は軸索を伸長させ、他の神経細胞の細胞体、樹状突起とシナプス結合をつくることにより神経回路（ネットワーク）を形成し、学習や記憶等中枢神経の高度な脳機能を発揮している。従来、神経ネットワークの成長は生後間もなく停止し、以後は衰退してゆくだけと信じられていたが、1998年 Eriksson 等は成人脳でも海馬ニューロンが新生していることを見出した(1, 2)。新生された神経細胞は、分裂、増殖、分化を経て既存の神経細胞と軸索による連結を形成してニューロンネットワークを再構成し、新たな可塑性を生み出す。このようなニューロン細胞の生存および分化の営みは、神経栄養因子（nerve growth factor : NGF, Brain-derived neurotrophic factor: BDNF, 他）による、神経細胞表面の神経栄養因子受容体を介した、細胞の新生や分化によって維持されている(1)。しかし、パーキンソン病、アルツハイマー病、うつ病など、多くの神経疾患では、BDNFの減少や神経細胞の傷害による軸索の突起伸長の減少の結果、神経伝達が障害されていて、神経疾患の要因になっていると考えられている(3)。従って、低分子量で、血液脳関門を透過できる神経栄養因子作用を有する化合物は、アルツハイマー病（AD）などの神経変性疾患に対する治療薬開発のシーズとして有益な情報を提供することから、多くの天然物に対する神経栄養因子様作用の活性を調査する研究が行われている(1, 4)。Asano 等は大豆成分のスクリーニングより、フラボノイドのケルセチン等に神経栄養因子様作用を発見して、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体が関与していることを示し(5)、さらに柑橘類果皮からはポリメトキシフラボンの一種であるノビレチンが顕著な活性を示すことを発見している(6)。また、神経細胞の新生や神経突起伸長等の分化、あるいは認知や記憶の形成などには細胞内のシグナル伝達の活性化や、CREB（cAMP response element（CRE）-binding protein）標的遺伝子群の発現が必要であることが知られている。AD原因物質であるA β ペプチドは、細胞内シグナル因子 ERK1/2（extracellular signal-regulated kinase1/2）および CREB のリン酸化を減少させることが報告されている(7)。

菊花には解熱、解毒、鎮痛、消炎などの薬効があり、感冒や発熱、悪寒、頭痛などの症状に用いられているが、近年、菊花成分について学習記憶改善作用や神経保護作用などの薬効についても報告がなされている(8, 9)。漢方においては、抑うつやイライラに対しては菊花が有効とされ、また高血圧随伴の疼痛や抑うつへ処方される釣藤散の配剤としても菊花が使用されていることから、菊花の脳の健康に対する関与が予想されるが不明の点が多い。

本章においては、菊花の薬効の主要成分であるフラボノイドに着目し、神経の生存や分化に対するその神経栄養因子様作用について、神経分化モデルとして頻用されるラット副腎髄質褐色細胞腫由来細胞株 PC12 細胞（rat pheochromocytoma cell line）を用い神経突起伸長活性を

指標とし検討した。さらに、神経細胞の新生や神経突起伸長等の分化の機序や記憶の形成へ関与する細胞内のシグナル伝達経路について、ERK1/2 や p38 のリン酸化活性を Western blotting 法により検討を行った。

4.2 実験結果と考察

4.2.1 PC12 細胞を用いた菊花抽出物の神経栄養因子様作用に関する栽培品種比較による検討

神経栄養因子は神経細胞の神経突起を伸ばし、成熟した神経細胞へと分化誘導作用を示す物質として発見された NGF や BDNF, GDNF 等の総称である。学習や記憶などの高度な脳機能は、神経細胞の神経突起伸長およびシナプス形成による神経回路形成により維持されており、このような生存維持作用にも神経栄養因子が深く関わっている。多くの神経疾患では神経栄養因子が低下していることから、この働きを回復することができれば新たな治療への道が開けると考えられている。従って緒言で記したように神経栄養因子作用を有する化合物に対する活発な研究が進められており、神経栄養因子と同様な活性を有する場合、その活性を神経栄養因子様作用と呼んでいる。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来の PC12 細胞は、神経成長因子で処理すると増殖を停止し神経突起を伸長し、交感神経節ニューロン様性質を持つようになるため、神経分化・突起伸長のモデルとして広く用いられており、本研究においても使用した。

菊花メタノール抽出物で PC12 細胞を処理し、突起伸長の形態観察より神経栄養因子様作用の検討を行った。PC12 細胞を前培養後、16 時間低血清培地で培養した。その後菊花メタノール抽出物を加えた低血清培地と交換し 24 時間培養を行い、細胞を刺激した。位相差顕微鏡により 200 倍で細胞の形態を観察し、結果を Fig. 4.1a へ示す。実験方法で示したとおり、突起伸長スコアは任意の 3 視野において、約 100 の細胞について突起伸長の有無を調べ全体の細胞数に対する突起伸長が認められる細胞数を百分率で表し Table 4.1 へ示した。例えば 50 ng/mL の NGF で刺激した場合は $91.7 \pm 2.8\%$ であった。また、突起伸長活性は菊花抽出物の処理濃度により異なり、最大を示す濃度は栽培品種により異なるため、各栽培品種が概ね最大値を示す濃度で刺激することを基本とした。阿房宮および延命楽の両方の栽培品種の抽出物の刺激によって、短い突起の伸長が観察され、突起伸長スコアはそれぞれ、阿房宮では $25.3 \pm 2.5\%$ 、延命楽では $26.3 \pm 4.0\%$ であり、菊花抽出物単独の刺激による突起伸長は不活発なものだった。また、両栽培品種で有意な差は認められなかった (t-test, $p > 0.05$)。ただし、最大の突起伸長スコアを示す抽出物の濃度は、阿房宮では約 $200 \mu\text{g/mL}$ であったのに対し、延命楽では約 $300 \mu\text{g/mL}$ であった。これは、抽出物重量に対するフェノール化合物の含有量は延命楽に比べ阿房宮では約 2 倍多く、このことが最大スコアを示す処理濃度の差として現れたものと考えられた。また、両栽培品種はその成分や組成比が大きく異なっており、特にアピゲニンおよび

ルテオリンの組成比が対照的である。そのため、これらのフラボノイドの突起伸長能力についても検討し、顕微鏡観察像を Fig. 4.1b へ示す。ルテオリンには顕著な突起伸長が観察され細胞を結び付けている様子が観察されるのに対し、アピゲニンでは僅かに弱い突起伸長が散見されたのみである。Sagawara 等は神経栄養因子様活性とその試料におけるケルセチンやルテオリンなどの突起誘導能の高いフラボノイド濃度との間には強い相関のあることを示している。しかし、阿房宮および延命楽の抽出物ではルテオリンの濃度が大きく異なっているにも拘わらず、これらの組成比の違いを反映するような形態変化を観察することはできなかった。両者の組成の比較においては、ルテオリン以外の誘導能への関与の大きいフラボノイドの組成比も考慮し検討することが必要である(10)。Li 等は神経突起誘導において天然物の役割は NGF の突起伸長作用を相乗的に高めることにあると報告している (11)。そこで、菊花抽出物の相乗効果を検討した (Fig. 4.2)。1 ng/mL の NGF 刺激で誘導される突起伸長は弱いものであったが、阿房宮 (100 μ g/mL) および延命楽 (150 μ g/mL) の抽出物が共存することで活発な突起伸長が誘導され、突起の長さは数倍長くなり、それぞれの突起伸長スコアは阿房宮では $69.0 \pm 6.2\%$ 、延命楽では $63.7 \pm 6.7\%$ と突起を伸長した細胞が飛躍的に増大した。以上のことより菊花のメタノール抽出物は神経栄養因子様作用を示す可能性があり、作用は直接的な効果は弱いですが、内在性の神経栄養因子の働きを抽出物が共存することによって顕著に高める相乗作用によって効果を発揮する可能性が示唆された。菊花の神経栄養因子様作用に対する栽培品種による差異は、突起伸長誘導能の評価からは観察されなかった。

4.2.2 菊花抽出物の神経栄養因子様作用に係るシグナル伝達経路の活性化について

生体が刺激に応じて反応する場合、刺激の情報は体内や細胞内で何らかの信号として伝えられる必要がある。MAPK (mitogen-activated protein kinase) は細胞運命 (増殖, 分化, 生存, 死) の決定に最も重要なシグナル伝達に係るシステムであるが、神経突起伸長の誘導においてもシグナル伝達経路として係わっていることが明らかにされており、神経細胞の MAPK の活性変動は神経細胞の機能分化の指標として捉えることができる。MAPK には複数の経路が存在するが、ここでは、ERK1/2 経路および p38 経路に着目し検討した。Lin 等はルテオリンの刺激により PC12 細胞で突起伸長が誘導される際、ERK1/2 および PKA のシグナル経路が活性化することを報告している(12)。また Nishina 等はルテオリン刺激による突起伸長は p38 経路を阻害することにより、より活発となることを観察している(13)。本研究では菊花抽出物刺激による突起伸長が誘導に係るシグナル経路を明らかにする目的から ERK1/2 および p38 MAPK 経路を阻害することにより、それらの経路の関与について評価を試みた。経路の阻害はそれぞれの特異的な阻害剤, U0126 (ERK1/2 経路), SB203580 (p38 経路) を用いた。10 μ M の U0126 を処理した PC12 細胞では菊花抽出物の刺激による突起誘導は完全に抑制され、

ERK1/2 経路がシグナル伝達に関与していることが確認された (Fig. 4.3, E・F)。この抑制は阿房宮, 延命薬いずれにおいても同様であった。次に 20 μ M の SB203580 で処理し, 菊花抽出物で刺激した細胞では突起伸長の誘導は認められたが阻害剤非処理の細胞と比較しやや弱く (Fig. 4.3, H・I), Nishina 等の突起伸長が活発となるという観察は再現されず, p38 経路の係わりを判断することはできなかった(13)。

MAPK におけるシグナル伝達は経路を構成する酵素が連鎖的に次々とリン酸化を繰り返すことによりシグナル伝達が行われていることから MAP キナーゼカスケードとも呼ばれる。本研究においては, MAPK 経路の菊花抽出物刺激シグナル伝達に果たす役割を, MAPK 酵素のリン酸化レベルの変動の観察からも検討した。PC12 細胞を 100, 200 μ g/mL の菊花メタノール抽出物で 30 分間刺激した後, 直ちに細胞のタンパク質を抽出しウエスタンブロッティングにより ERK1/2 およびリン酸化された pERK1/2 をそれぞれの特異抗体で染色し, その結果を Fig. 4.4A に示した。また, 定量性は低いものの, ERK1/2 のバンドのデンシティーに対する pERK1/2 のバンドのデンシティー比より酵素のリン酸化の程度を評価した。細胞に刺激を与えない対照と比較し, 菊花抽出物刺激により, pERK1/2 の比率は上昇し, 処理濃度に応じてさらに上昇した。処理濃度 (抽出物の重量) に対する pERK1/2 の比率は延命薬と比べ阿房宮で高かったが, 同条件でのデータはなく正確な比較はできないが, 突起伸長誘導スコアでは両栽培品種で有意差は示されておらず(t-test, $p > 0.05$), pERK1/2 の比率と突起伸長誘導スコア間に相関は認められなかった。Watanabe 等は, ERK1/2 は突起伸長誘導の上流のシグナルとして不可欠の存在であるが, 誘導される突起の長さとは無関係であることを報告している(14)。p38 MAPK のリン酸化レベルについて, 200, 400 μ g/mL の菊花メタノール抽出物刺激により検討し, 結果を Fig. 4.4B へ示した。抽出物刺激によりリン酸化レベルの変動は認められず, 400 μ g/mL の阿房宮でやや高い傾向が観察されるものの, いずれの栽培品種にも有意な変化は認められなかった(t-test, $P > 0.05$)。p38 MAPK は紫外線や活性酸素などのストレスに対する細胞応答を制御するシグナル伝達に関与しており, フラボノイドが過酸化水素暴露によるアポトーシス死から細胞を保護する過程では活性化された p38 MAPK のリン酸化レベルが抑制されている (14)。神経細胞の分化に p38 MAPK のリン酸化は不可欠であるとする知見がある一方, p38 MAPK のリン酸化の抑制が神経突起誘導を高めるとする相反する報告もなされている (14, 15, 16)。本研究において, 多数のフラボノイド等が含まれる菊花抽出物の刺激による突起伸長の誘導は p38 MAPK の特異阻害剤である SB203580 によってほとんど抑制されなかったことから, p38 MAPK のリン酸化は不可欠のものではないことも考えられたが, 突起誘導に対する p38 MAPK の関わりについてはさらなる検討が必要である。

4.3 結言

BDNFなどの神経栄養因子は、特に海馬領域において神経細胞の分裂、増殖、分化、生存維持や修復作用などに重要な役割を果たしている。さらに、神経突起伸長およびシナプス形成による神経回路の形成または再構成を行ない高度の脳機能を維持している。神経突起の喪失など回路の損傷は様々な神経疾患の要因となっていることから、その治療手段として神経栄養因子の働き高めることが考えられる。しかし、神経栄養因子を投与した場合、生体高分子であるため、血液内の半減期は短く、血液脳関門も透過しないため神経栄養因子自体を治療薬として用いることはできない。天然物より神経突起誘導作用など神経栄養因子と似た働き（神経栄養因子様作用）を有する低分子化合物が発見されており、神経疾患の治療や健全な神経機能の維持に対し有益な知見をもたらすものと期待されている(4)。一方、菊花は、漢方では抑うつやイライラに対して有効とされており本章では伝承的に知られている菊花の神経機能への作用について神経栄養因子様作用の観点から検討した。さらに、神経栄養因子様作用の発現にはシグナル伝達路のMAPK経路が関わっていることより、MAPKシグナル因子についても検討を行った。

PC12細胞の観察より、菊花抽出物は弱い突起伸長誘導能を示すことを明らかにした(Fig. 4.1)。延命楽と阿房宮ではルテオリンとアピゲニンの組成比は大きく異なり、ルテオリンは活発な突起伸長誘導作用を示しアピゲニンにはほとんど作用がないが両栽培品種間に突起伸長能に有意な差は無かった。Nishina等は菊花に含まれるフラボノイドのルテオリン、アカセチンが高い突起伸長誘導能を示すことを報告している(13)。また、顕著な誘導能が報告されているのはポリメトキシフラボノイドであるシークワサーに多量に含まれているノビレチンである。活性の根拠となる構造上の要件について、突起伸長誘導能に関する知見はなく、細胞増殖抑制活性に関する構造活性相関の知見であるが、ノビレチンの場合B環の3', 4'の-OCH₃基が活性強度に重要であることが示されている。MAPKシグナル因子のERK1/2のリン酸化レベルを栽培品種で比較した結果、阿房宮の方が高まっていたが、両栽培品種間で突起伸長誘導には有意な差は認められず、ルテオリンとアピゲニンの組成比のみでは作用を説明できないことが示された。菊花抽出物はNGFの突起伸長誘導能を相乗的に高める働きが示され、その効果も延命楽と阿房宮による違いは認められなかった。食物に一般的に含まれる多くのフラボノイドでは、それらの突起伸長誘導能はノビレチンなど特異な化合物を除き単独での作用は低くいが、菊花などに含まれるフラボノイドが脳内に到達しシナージストとして神経栄養因子様作用を示す可能性は十分考えられ、このことを支持する疫学データや漢方の知識も示されている。

神経疾患の要因として酸化ストレスによる神経突起の喪失やそれに伴う神経回路の損傷があり、これらのストレスのシグナルはp38 MAPKによって伝達され神経突起の喪失に関わっ

ているとされている。しかし、フラボノイドによる突起伸長に p38 MAPK のリン酸化が必要であるとする報告もある。本章では菊花抽出物の突起伸長誘導能に対する p38 MAPK の係わりを検討するため、菊花抽出物刺激による p38 MAPK リン酸化レベルの変化ならびに p38 MAPK の特異阻害剤 SB203580 による突起伸長誘導への影響を検討したが、有意な変化は観察されず p38 MAPK の役割についての知見は得られなかった。

Table 4.1 Neurite outgrowth score of PC12 cells treated with the extracts of chrysan petals, flavonoid specimens, NGF in combination with the extracts, and inhibitors.

(Score %)			
treatment	A. Control	B. Aboukyu	C. Enmeiraku
Extract	1.33 ± 0.58 ^a	25.30 ± 2.50 ^b	26.33 ± 4.04 ^b
flavonoid or	D. NGF	E. Apigenin	F Luteolin
NGF(50ng/mL)	91.70 ± 2.80 ^b	2.00 ± 1.00 ^a	25.00 ± 2.65 ^b
NGF(1ng/mL)	G. Control	H. Aboukyu	I. Enmeiraku
	45.67 ± 6.03 ^b	69.00 ± 6.24 ^b	63.70 ± 6.70 ^b
Inhibitor (U0126)	J. Control	K. Aboukyu	L. Enmeiraku
	1.67 ± 0.58 ^a	5.33 ± 2.08 ^a	2.67 ± 1.15 ^a
Inhibitor (SB203580)	M. Control	N. Aboukyu	O. Enmeiraku
	1.67 ± 0.58 ^a	25.33 ± 4.16 ^b	14.00 ± 2.65 ^b

Cells were seeded on collagen coated plate and serum starved by low serum medium for 16 h and treated with no addition (A), with 200µg/mL of Aboukyu extract(B), with 300 µg/mL Enmeiraku extract (C), with 50 ng/mL of NGF (D), with 20 µM of apigenin (E), and with 20 µM of luteolin (F). PC12 cells were treated by combination of NGF and extracts, treated with 1 ng/mL of NGF alone (G), in combination with 100 µg/mL of Aboukyu extract (H), and with 150 µg/mL Enmeiraku extract (I). Effects of inhibitor U0126 or SB203580 on neurite outgrowth induced by chrysanthemum extracts in PC12 cells. Cells were preincubated with U0126 (10 µM) or SB203580 (5 µM) for 1 h before addition of extracts, and treated with no addition in the presence of U0126 (J) or SB203580 (K), with 200 µg/mL of Aboukyu extract (L) or 300 µg/mL of Enmeiraku extract (M) in the presence of U0126, and treated with 200 µg/mL of Aboukyu extract (N) or 300 µg/mL of Enmeiraku extract (O) in the presence of SB203580. Photographs were taken 24 h later under phase-contrast observation at a magnification of 200×. Statistics were calculated from three values by t-test compare to control A. Difference at p<0.05 are indicated by different letter (a or b)

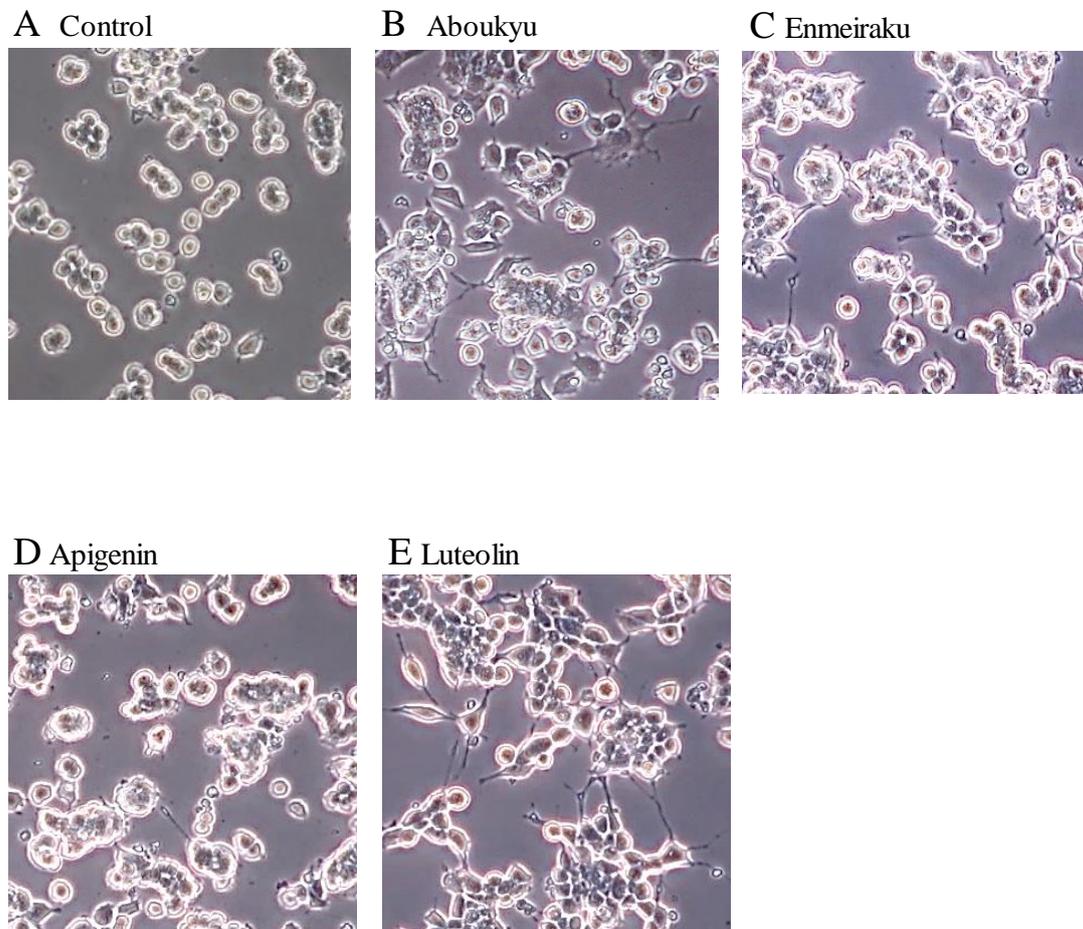


Fig. 4.1 Morphology of PC12 cells treated with extract of chrysanthemum petals and flavonoid specimens

Cells were seeded on collagen coated plates and serum starved by low serum medium for 16 h and treated with no addition (A), with 200 μ g/mL of Aboukyu extract(B), with 300 μ g/mL Enmeiraku extract (C), with 20 μ M of apigenin (D), with 20 μ M of luteolin(E). Photographs were taken 24 h later under phase-contrast observation at a magnification of 200x. (From D. J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

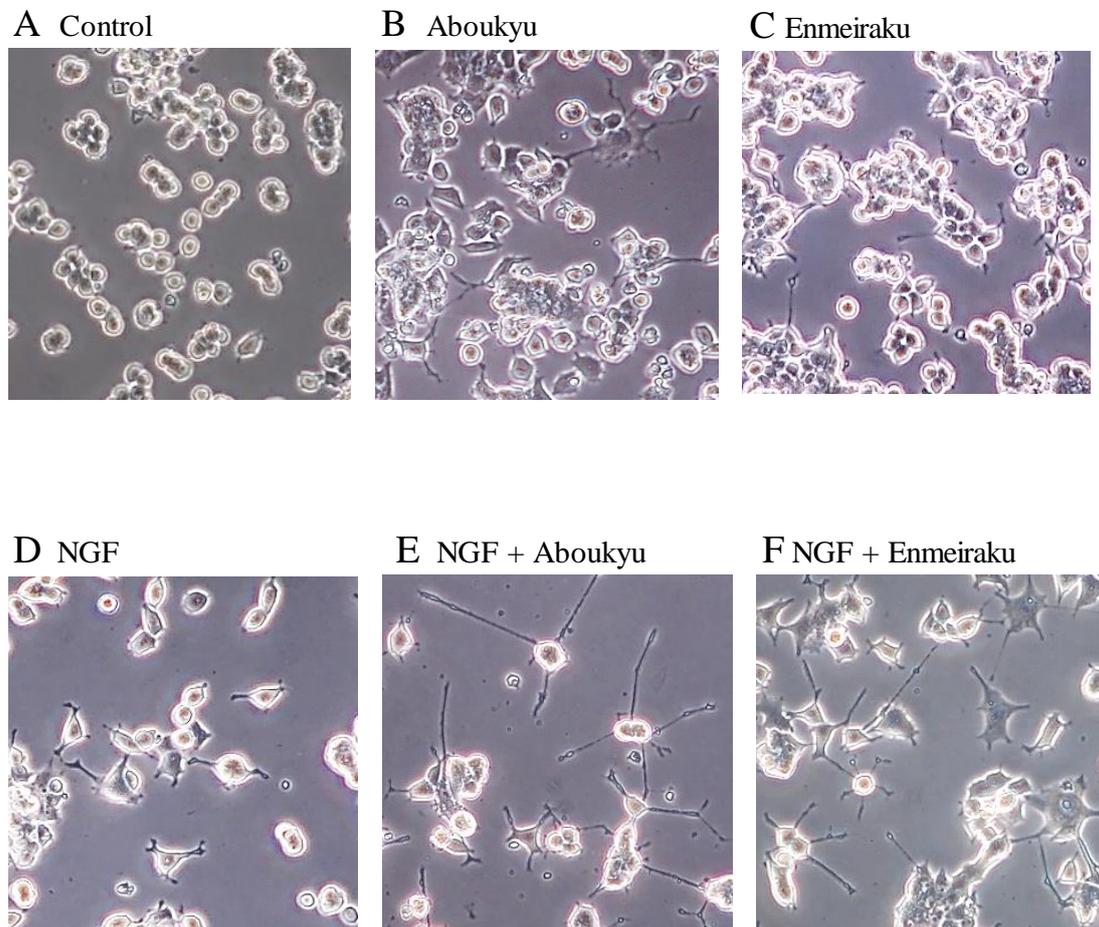


Fig. 4.2 Morphology of PC12 cells treated with extract of chrysanthemum petals and NGF in combination with extract

Cells were seeded on collagen coated plates and serum starved by low serum medium for 16 h and treated with no addition (A), with 200 μ g/mL of Aboukyu extract(B), with 300 μ g/mL Enmeiraku extract (C). PC12 cells were treated by combination of NGF and extracts, treated with 1ng/mL of NGF alone (D), in combination with 100 μ g/mL of Aboukyu extract (E), with 150 μ g/mL Enmeiraku extract (F). Photographs were taken 24 h later under a phase-contrast observation at a magnification of 200x. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

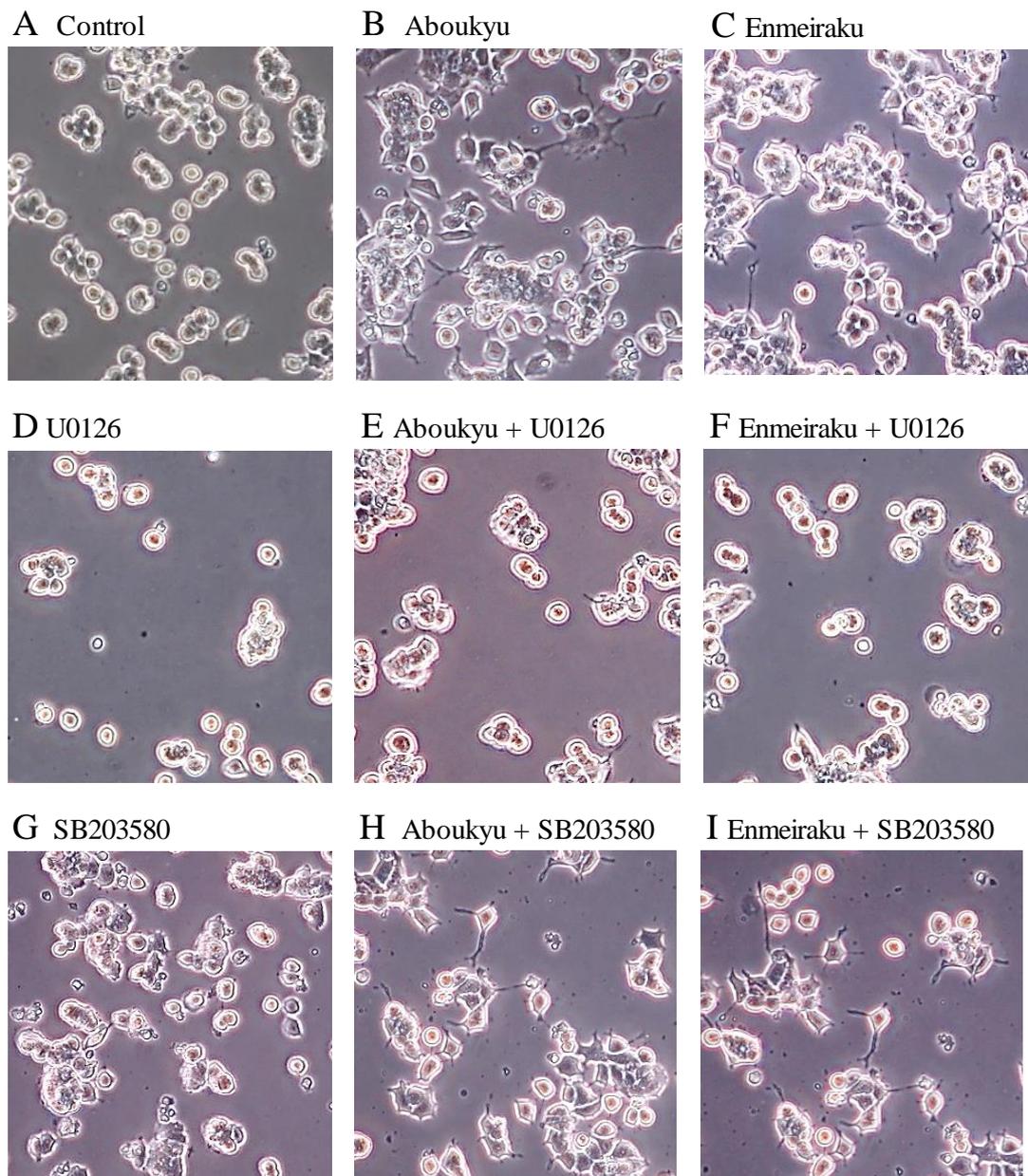


Fig. 4.3 Morphology of PC12 cells treated with extract of chrysanthemum petals in combination with inhibitors

Cells were treated with no addition (A), with 200 μ g/mL of Aboukyu extract (B), with 300 μ g/mL Enmeiraku extract (C). Effects of inhibitor U0126 or SB203580 on neurite outgrowth induced by chrysanthemum extracts in PC12 cells. Cells were preincubated with U0126 (10 μ M) or SB203580 (5 μ M) for 1 h before addition of extracts, and treated with no addition in the presence of U0126 (D) or SB203580 (G), with 200 μ g/mL of Aboukyu extract (E) or 300 μ g/mL of Enmeiraku extract (F) in the presence of U0126, and treated with 200 μ g/mL of Aboukyu extract (H) or 300 μ g/mL of Enmeiraku extract (I) in the presence of SB203580. Photographs were taken 24 h later under phase-contrast observation at a magnification of 200x. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.).

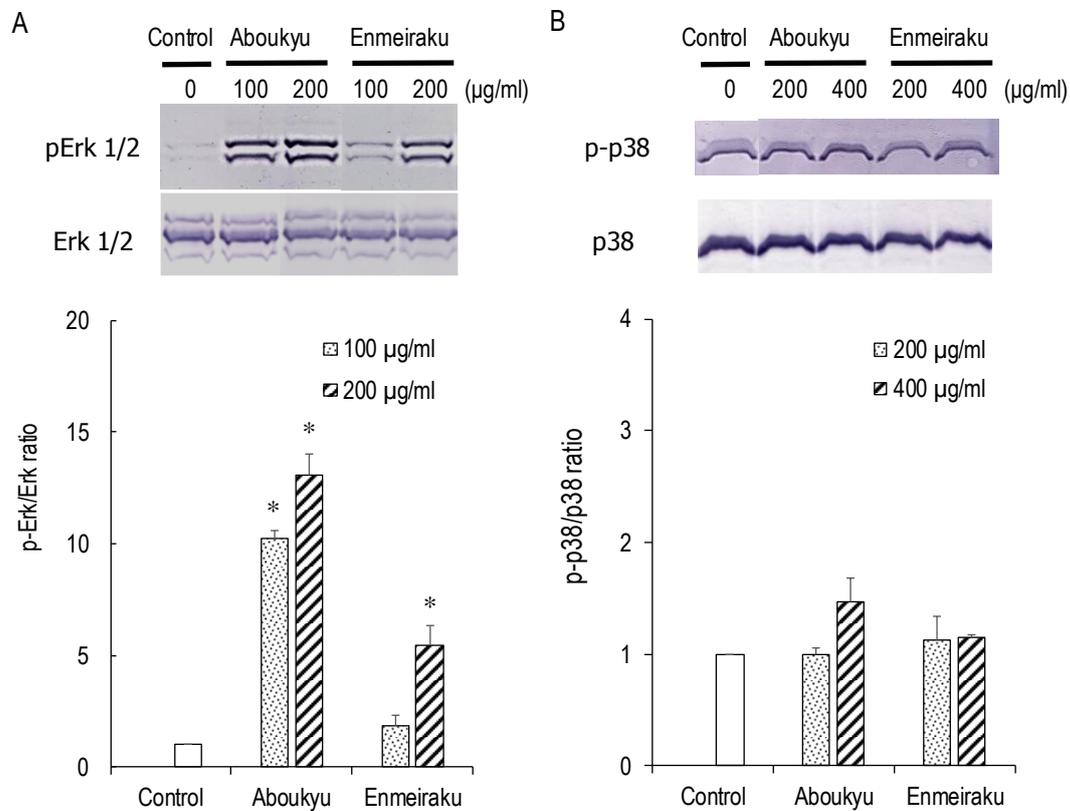


Fig. 4.4 Chrysanthemum petal extracts of Aboukyu and Enmeiraku induced MAPK phosphorylation in PC12 cells

Cells were cultured with extracts of Aboukyu and Enmeiraku(100 - 400 μg/mL) for 30 min. Cell lysates were prepared from these cells and subjected to western immunoblotting using anti-phospho-Erk1/2 and anti-total Erk1/2 antibody(A), or anti-phospho-p38 and anti-total p38 antibody(B). Data are represented as mean ratios of phospho-Erk1/2 to total Erk1/2(A), or anti-phospho-p38 and anti-total p38 (B) from densitometric analyses. Each bar presents the mean ±SD from two independent experiments. *, p< 0.01 versus untreated control cells. (From D. J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

4.4 引用文献

- 1 Bothwell, M. (1995). Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, **18**, 223-253.
- 2 Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Eriksson, T. B., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.*, **4**, 1313-1317.
- 3 Enciu, A.M., Nicolescu, M.I., Manole, C.G., Muresanu, D.F., Popescu, L.M., and Popescu, B.O. (2011). Neuroregeneration in neurodegenerative disorders. *BMC Neurol.*, **11**, 75-82.
- 4 More, S.V., Koppula, S., Kim, I.S., Kumar, H., Kim, B.W., and Choi, D.K. (2012). The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. *Molecules*, **17**, 6728-6753.
- 5 Asano, J., Niisato, N., Nakajima, K., Miyazaki, H., Yasuda, M., Iwasaki, Y., Hama, T., Dejima, K., Hisa, Y., and Marunaka, Y. (2009). Quercetin stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport via PTK-dependent mechanisms in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **41**, 688-695.
- 6 Nagase, H., Yamakuni, T., Matsuzaki, K., Maruyama, Y., Kasahara, J., Hinohara, Y., Kondo, S., Mimaki, Y., Sashida, Y., Tank, A.W., Fukunaga, K., and Ohizumi, Y. (2005). Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry*, **44**, 13683-13691.
- 7 Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, **297**, 353-356.
- 8 Zhang, P. H., Tang, H. Q., Zheng, M. Z., Chen, Y. Y., and Shen, Y. L. (2011). Effect of total flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* on learning and memory in mice. *Chinese journal of applied physiology*, **27**, 368-371.
- 9 Kim, I. S., Koppula, S., Park, P. J., Kim, E. H., Kim, C. G., Choi, W. S., Lee, K. H., and Choi, D. K. (2009). *Chrysanthemum morifolium* Ramat (CM) extract protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity. *J. Ethnopharmacol.*, **126**, 447-454.
- 10 Sugawara, T. and Igarashi, K. (2009). Cultivar variation in flavonoid components and radical scavenging activity of polyphenol fractions among edible *Chrysanthemum* flowers. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, **56**, 600-604 (in Japanese).

- 11 Li, P., Matsunaga, K., Yamakuni, T., and Ohizumi, Y. (2002). Picrosides I and II, selective enhancers of the mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway in the action of neuritogenic substances on PC12D cells. *Life Sci.*, **71**, 1821-1835.
- 12 Lin, L. F., Chiu, S. P., Wu, M. J., Chen, P. Y., and Yen, J. H. (2012). Luteolin induces micro RNA-132 expression and modulates neurite outgrowth in PC12 cells. *PLoS One*, *7*, e43304, 18 pages <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles>.
- 13 Nishina, A., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Kozawa, K., Koketsu, K., Ninomiya, M., and Furukawa, S. (2013). Neurite outgrowth in PC12 cells stimulated by components from *Dendranthema × grandiflorum* cv. “Mottenohoka” is Enhanced by suppressing phosphorylation of p38MAPK. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 403503, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/403503>.
- 14 Watanabe, K., Akimoto, Y., Yugi, K., Uda, S., Chung, J., Nakamuta, S., Kaibuchi, K., and Kuroda, S. (2012). Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length. *J. Cell Sci.*, **125**, 2198-2211.
- 15 Morooka, T. and Nishida, E. (1998). Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 Cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24285- 24288.
- 16 Yung, L. Y., Tso, P. H., Wu, E. H. , Yu, J. C., Ip, N. Y., and Wong, Y. H. (2008). Nerve growth factor-induced stimulation of p38 mitogen activated protein kinase in PC12 cells is partially mediated via G (i/o) proteins. *Cell Signal.*, **20**, 1538-1544.

第5章 菊花抽出物の神経細胞に対する酸化傷害保護作用とその栽培品種による比較

5.1 緒言

生命は地球上に酸素がほとんど存在しない環境下で誕生し、本来嫌気的環境で生命を育むのに適したシステムを有する嫌気生物として出発した。やがてエネルギー獲得の手段に光を利用する光合成生物が誕生し、大気中の酸素濃度が上昇するのに従い、多くの生物は酸素による酸化ダメージにより死に絶えたものと考えられる。その中で酸素の毒性を防ぐ抗酸化防御系を生み出すことにより生き延びた様々な生物種が出現し人類もその一員である。さて、1954年 Gerschman らは酸素による毒性は酸素ラジカルによるものであることを提唱し (1) , その後このことを裏づけるスーパーオキシドジスムターゼ酵素 (SOD) の存在が明らかにされ、現在一般に受け入れられている活性酸素による酸素傷害理論となった (2) 。活性酸素は、宇宙線や電磁波照射により体内の水が分解して生じるヒドロキシラジカル ($\text{OH}\cdot$) や、生体の酸化的エネルギー獲得過程で生じる活性化された酸素のスーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2\cdot^-$) などである。また、生体防御を目的とした一酸化窒素 (NO) の産生も生理的条件下で起きており、これらの活性酸素から逃れることはできない。哺乳類では呼吸に利用される酸素の3~10%が活性酸素に変化すると考えられている。活性酸素やフリーラジカルから身を守る防御系は、活性酸素などの消去を行う酵素によるものと低分子抗酸化物質に大別される。消去酵素の中心となるものは、SOD やカタラーゼであり、前者は $\text{O}_2\cdot^-$ を H_2O_2 へ変換することにより $\text{O}_2\cdot^-$ を除去し、後者は H_2O_2 を無害な H_2O と O_2 へ分解する。近年ヘムオキシキナーゼ—1 (heme oxygenase; HO-1) による酸化制御が注目されている (3)。HO-1 はヘム代謝に関わる酵素であると同時に、酸化ストレスに応答し誘導されてくる、酸化傷害から細胞を守る保護タンパク質であり、活性酸素種生成に対する生体防御システムである解毒代謝酵素群を構成する酵素の一つである。一方、低分子の防御系は、生体成分のグルタチオン、リポ酸、ビタミンE、尿酸、ビリルビンなどであるが、食事に由来する抗酸化ビタミン類も防御因子として機能する。近年、野菜・果実等に多量に存在するポリフェノールの一部には生体の酸化傷害の防御に有効であると考えられる化合物が示されており、生体の酸化傷害防御に期待が持たれている。しかし、その反面ポリフェノールの有効性や作用機構には不明の点が多い。ポリフェノールは一般に高い抗酸化活性を有することが化合物の特徴となっているが、作用機構においてその抗酸化活性が生体防御に果たす役割は少ないと考えられるようになっており、生体防御に関する遺伝子発現やそれらを制御する上流のシグナル分子群に対する調節作用を介した他の作用機構が多数見出され報告されている。菊花の主要な構成成分はフラボノイドとテルペノイドであり、菊花の薬理作用もこれらに由来しており、本章では菊花の抽出成分の神経細胞保護作用の機構について考察を行った。

1985年 Sies は、生体は酸化促進物質(prooxidants)と抗酸化物質(antioxidants)との均衡が保たれた状態にあり、この均衡が prooxidants 側に傾くと生体傷害が起こるとする、生体の酸化ストレス説を提唱した(4)。この概念は、動脈硬化、心不全、ガンなどの様々な疾病が、加齢による酸化抑制酵素の活性低下など何らかの理由で、過剰に生成される活性酸素に晒され続けることが原因になっているとの考え方に合致するものであった。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) やパーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) などの神経変性疾患は、なおその原因については明らかとなっていないが、その根底の重要な要因には酸化ストレスの均衡の破綻や乱れがあるものと考えられている。神経細胞は神経伝達物質の放出など神経細胞の機能を保持するために大量のエネルギーが消費されている。神経細胞の全体重に占める重量比率は約2%に過ぎないが、酸素消費は生体全体の消費量の20%を占めると推定されていて、そのほとんどはミトコンドリアでの酸素呼吸により供給されているため、酸素呼吸に伴う反応性の高い活性酸素が常時発生している。従って、神経細胞はその活動を維持する上で活性酸素による酸化傷害の危機に常に曝されており、神経細胞変性の大きな危険因子となっている。このような背景から神経変性疾患の新たな治療アプローチとして酸化ストレスに対する防御機構を活性化させる方法が模索されているが未だ有効な治療薬の開発には至っていない。

治療薬の開発においては有効化合物の設計の糸口を得るリード化合物を選択し構造と活性の相関や作用機構に関する検討を行うことがあり、神経細胞の保護作用を目指した治療薬の開発では、長い食経験があり脳血管閉塞を透過可能なフラボノイドが取り上げられており、天然物の中でフラボノイドは神経細胞の保護に効力を持つ物質の一つとして着目されている。2011年 Lin 等はヒト神経芽腫細胞においてルテオリンが酸化傷害に対する顕著な保護効果を示すことを報告している(5)。本章においては、菊花に含まれる多様なフラボノイドに着目し、それらの構成の違いが酸化ストレスに対する神経細胞保護作用の活性や作用機構をどのように変化させるかを検討し、神経保護作用に貢献度の高い分子種などを推定し、菊花のフラボノイドの神経細胞保護作用の特徴を明らかにすることを目的とした。

また、神経変性への対策として、前述のような治療薬の開発を目指すものとは別に、防御システムの機能低下を食事により改善する試みも検討され期待されている。2000年 Butterwreck 等はフラボノイド (quercetin) 摂取がうつ病動物モデル実験において抗鬱作用を示すこと報告し(6)、フラボノイド等のフェノール化合物の定期的な摂取が神経変性疾患の予防あるいは改善に有効である可能性が疫学調査や介入試験により示唆されている。第3章において日本を代表する食用菊である阿房宮と延命楽のフラボノイドの構成成分の存在比は大きく異なることを示した。

本章においては多数のフラボノイドの分子種が含まれその構成比率の異なる2つの栽培品種の抽出物について、その神経細胞保護作用を比較することにより、各フラボノイドの神経細

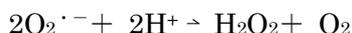
胞保護作用の特徴の考察を試みるとともに、食品栄養学的な観点から食用菊の神経保護作用に対する栽培品種の違いによる、その特徴を対比することを目的とした。

5.2 実験結果と考察

5.2.1 菊花抽出物の活性酸素消去能における栽培品種の比較

植物等に含まれるフェノール化合物（ポリフェノール）は複数個のフェノール性水酸基（ベンゼン環に直接水酸基が結合している構造）を持っており抗酸化活性を示す理由となっている。食事由来の抗酸化活性成分の摂取は、生体に本来備わっている酸化ストレス防御のメカニズムを補完する働きを持つのではないかと期待から、健康維持に有意義と考えられてきた。しかし多くの場合、フェノール化合物がその薬理作用を示す濃度はフェノール化合物が抗酸化作用を示す濃度よりはるかに低いレベルで起きていることから、フェノール化合物の薬理作用は固有の標的分子を介した特異的な反応によっているのではないかと考えがある。本章においては、菊花のフラボノイドによる神経細胞保護作用の特徴を明らかにすることを目的としていることから、菊花抽出物の抗酸化活性を把握しておく必要があり、はじめに2つの栽培品種の阿房宮および延命楽の菊花抽出物についてその抗酸化活性を測定した。

生体にはスーパーオキシドディスムターゼなど、活性酸素 ($O_2^{\cdot-}$) を除去する働きを持つ酵素による酸化防御メカニズムが存在する(7)。同様の作用を持つ抗酸化物質の活性を



SOD 様活性とし評価する方法があり、本研究ではこの評価法に従い阿房宮および延命楽のメタノール抽出物の抗酸化活性の比較を行った。SOD 様活性の強度は反応系内における $O_2^{\cdot-}$ 産生の阻害率で表し、50%の阻害効果をもたらす菊花抽出物の濃度を IC_{50} としこの値の比較より評価した。値が低い程は活性が高いことを意味する。阿房宮および延命楽の花弁抽出物の重量および抽出物のフェノール化合物に換算した値に対する阻害率を Fig. 5.1 に示した。重量当たりの IC_{50} は阿房宮で約 370 $\mu\text{g/mL}$ 、延命楽で約 1060 $\mu\text{g/mL}$ となり、菊花抽出物が抗酸化力を発揮するためにはこの結果より数百 $\mu\text{g/mL}$ から千 $\mu\text{g/mL}$ 程度の濃度の抽出物が存在する必要があると思われた。本研究は神経細胞に対する菊花抽出物の酸化傷害保護作用ならびに抗炎症作用等を検討したものであるが、それらの作用は数 $\mu\text{g/mL}$ から百 $\mu\text{g/mL}$ の処理濃度の範囲で観察されており、抗酸化活性を示す数分の一から 1/100 程低い濃度で作用が起きており、抽出物の抗酸化力がこれらの作用の主要な原因にはなっていないことが示唆された。

抗酸化活性は栽培品種間で異なっており、阿房宮花弁抽出物の方が延命楽のそれよりも活性が高いことが示された (Fig. 5.1A)。しかし、これに対し活性をフェノール化合物に換算した値当たりで計算した場合は阿房宮花弁抽出物の SOD 様活性はラジカル産生阻害の IC_{50} で約 15 $\mu\text{g/mL}$ であるのに対し、延命楽花弁抽出物の IC_{50} は約 27 $\mu\text{g/mL}$ であり両者の阻害レベルはか

なり接近しその差は著しく縮まった (Fig. 5.1B)。第3章で示したとおり菊花抽出物のフェノール化合物の重量当たりの含有量は延命楽に比べ阿房宮の方が約2倍多く、抗酸化活性が重量当たりでは阿房宮花卉抽出物の方が高い値を示したのは、延命楽花卉抽出物に比べて阿房宮花卉の方がフェノール化合物をより多く含んでいるためと考えられた。しかし、フェノール化合物含有量を基準として計算された抗酸化活性の比較においても両者の間に活性の差が認められたことより、フェノール化合物の種類により活性が異なることが示され、わずかであるが阿房宮のフェノール化合物を構成しているものの方が延命楽に比べ高いことが示唆された。

5.2.2 菊花抽出物のニューロン細胞に対する酸化傷害保護作用とその栽培品種による比較

緒言で述べたように、多くの神経変性疾患や、虚血再灌流傷害において神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性が問題となっている。酸化ストレスに対する防御を高める方法が見つけられれば神経変性を原因とする神経疾患の治療法の開発に対し大きく貢献することとなり多くの検討がなされている。フェノール化合物については抗酸化ストレス作用に関する多くの知見が蓄積されており、フェノール化合物を豊富に含む食物の摂取が神経疾患に好影響をもたらすとする調査報告もなされている(8)。本章では中枢神経のニューロン細胞として株化神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用い、菊花抽出物の酸化ストレス保護作用について *in vitro* の検討を行った。神経細胞の酸化傷害は本来、活性化したグリア細胞が過剰に分泌する活性酸素である一酸化窒素 (NO) や神経伝達物質であるグルタミン酸等によって引き起こされるが、本研究においては安定した酸化ストレス負荷を行うことが出来、ストレス負荷に広く用いられている tertiary-butyl hydroperoxide (t-BHP) により細胞へ酸化傷害を加えることにし、あらかじめストレス負荷を行うための適切な t-BHP の濃度の確認を行った。また、菊花抽出物の細胞毒性を確認するため、抽出物で細胞を処理した際の cell viability を測定し細胞へ影響をおよぼす濃度の確認を行った。Fig. 5.2 に、SH-SY5Y 細胞を 5×10^5 cells/mL の密度で播種し一晩前培養の後、菊花栽培品種の延命楽および阿房宮のメタノール花卉抽出物を 800 μ g/mL 以下の濃度範囲で段階的に希釈した培地により細胞を 16~18 時間処理し、細胞生存率 (cell viability) を測定した結果を示す。対照の cell viability と比較し、阿房宮の抽出物は 800 μ g/mL まで差は認められなかったが、延命楽の抽出物では約 300 μ g/mL を超える濃度範囲で cell viability に低下が認められ細胞の活動に影響することが認められた。従って、200~300 μ g/mL 以下の濃度では両栽培品種とも大きな影響はないと判断し、以後この濃度範囲で実験を行うことにした。次に t-BHP の濃度の検討を行ったが、播種した細胞の密度、試料の処理時間などの条件によりストレスの生じ方は変化することが分かり、実験の条件に応じ適切な濃度を選択する必要があることが分かった。Fig. 5.3 に、SH-SY5Y 細胞を 5×10^5 cells/mL の密度で播種し、菊花メタノ

ール抽出物（延命薬）により細胞を 0~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 18 時間前処理を行った際の t-BHP 暴露による酸化傷害の観察結果を示す。0.13mM の t-BHP を 24 時間暴露し、細胞生存率（cell viability）を測定した結果、cell viability が約 60%までに減少しており、また菊花抽出物の添加により細胞のダメージが濃度依存的に軽減されることが観察され、この実験条件では、酸化傷害負荷条件として t-BHP の濃度は 0.13mM が適当であることを確認した。

はじめに、菊花のヘキササン抽出物とメタノール抽出物について神経細胞の酸化傷害に対する保護作用の検討を行った。前述のようにヘキササンにはトリテルペノイドが主に回収され、メタノールへはフラボノイドやクロロゲン酸類などが回収される。Fig. 5.4 に t-BHP で誘導した酸化傷害に対するヘキササン抽出物の作用の検討結果を示す。段階的に希釈した抽出物で細胞を処理した後、t-BHP に暴露して 24 時間培養後の cell viability を示した。いずれの栽培品種においても t-BHP に暴露した群（黒の棒グラフ）では、試料の添加量が増えるに従って cell viability は減少しており、ヘキササン抽出画分に酸化傷害保護効果は認められず、むしろ酸化傷害を助長していた。ヘキササン抽出物の cell viability に対する影響（白抜きの棒グラフ）は、阿房宮では濃度に従い cell viability は僅かに上昇しており、延命薬では 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上昇した後、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では生存率が著しく減少し細胞毒性が示された。次にメタノール抽出物について、ほぼ同様の条件で酸化傷害保護作用の検討を行った結果、いずれの栽培品種においても抽出物の処理により cell viability の回復が認められメタノール抽出画分に保護効果のあることが示された（Fig. 5.5）。この画分の主成分はフラボノイドであることから、保護効果はフラボノイドに起因することが考えられる。しかし、栽培品種により保護効果の特徴が異なった。延命薬では 12.5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度依存的な細胞傷害保護効果の上昇が認められた（Fig. 5.5B）。これに対し、阿房宮の抽出物では 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度までは保護効果は濃度に従い上昇したが、それ以上の濃度では逆に保護作用は低下し、濃度による作用の二相性が示された（Fig. 5.5A）。第 3 章で示したとおり、阿房宮および延命薬のメタノール抽出物の成分の組成比は大きく異なっており菊花の特徴的な有効成分であるアピゲニンおよびルテオリンの含有量が、延命薬ではルテオリンが高いのに対し、阿房宮ではアピゲニンが高く、対照的に組成比が異なった。このことより、次に両栽培品種の酸化傷害保護作用の特徴の違いを探る目的で、アピゲニンおよびルテオリンの酸化傷害保護作用を比較した（Fig. 5.6）。アピゲニンおよびルテオリンによる酸化傷害保護効果の特徴はそれぞれ阿房宮および延命薬の保護効果の特徴と相似する傾向を示した。すなわち、ルテオリンでは処理濃度を上げるにつれ保護効果が高まり 5 μM 以上の濃度では t-BHP 非処理の対照とほぼ同レベルにまで cell viability が回復した。これに対してはアピゲニンでは低濃度では保護効果が認められるが、2.5 μM 以上の濃度では保護効果は低下し、さらに約 10 μM 以上では t-BHP の酸化傷害作用を強めていることが示された。この観察より、栽培品種間で観察された酸化傷害保護作用の挙動の相異は、阿房宮および延命薬のアピゲニン

およびルテオリンの組成比の相異が主な原因になっていることが示唆された。従って、フラボノイドの神経細胞に対する酸化ストレス保護効果はその分子種により大きく異なることが示され、ルテオリンは保護作用に貢献する分子種の代表であることが考えられ、次節においてその酸化傷害保護機構について検討を行った。

5.2.3 菊花抽出物による酸化傷害保護および細胞死誘導に関する検討

神経細胞は神経伝達物質の放出など神経細胞の機能を保持するために大量のエネルギーが必要とされ、脳内では活発な酸素呼吸が起きており、これに伴い反応性の高い活性酸素が常時発生している。活性酸素種は生体を構成するタンパク質や核酸、脂質などに傷害を与え、細胞や臓器の機能不全を引き起こすため、生体は活性酸素種を適切に解毒するさまざまな防御機構を備えている。しかし、過剰な活性酸素の発生や防御機能の低下などにより重篤な酸化ストレスが生じた場合は細胞死が誘導され細胞が排除される。このような細胞死はアポトーシスによるもので代謝性疾患やがんなどヒトの様々な疾患の病態に関与することが知られ、神経変性疾患の要因にもなっていると考えられている(9)。なお、アポトーシス (apoptosis) とは、個体をより良い状態に保つために不要になった細胞や有害な細胞を排除するために、積極的に引き起こされる管理・調節 (プログラム) された細胞死のことである。本章では保護作用の評価の実験において細胞を t-BHP へ暴露し酸化傷害を加えて行っているが、このような酸化ストレスはアポトーシスを誘導することが知られている。本節では菊花のメタノール抽出物による神経細胞の保護作用のメカニズムを考察する観点より、酸化傷害を受けた細胞の形態観察、核 DNA の断裂や NAC (n-acetylcysteine) による酸化傷害の回復試験を行い、保護効果がアポトーシスの抑制作用に起因していることを推定した。

アポトーシス誘導においては、細胞の核内構造の変化とそれに伴う細胞の縮小が第一の特徴であり、クロマチンが正常の網膜構造を失い核膜周辺に凝集し、核の断片化が起こる。そこで本節では、ニューロン細胞 (SH-SY5Y cell) における t-BHP による酸化傷害と菊花抽出物の保護作用について、顕微鏡による細胞形態の観察ならびに核 DNA のアガロース電気泳動による DNA サイズの観察より、アポトーシス誘導の状況を検討した。SH-SY5Y 細胞を 100 μ g/mL の菊花抽出物を加えた培地、および無添加の培地で培養し、2 時間前処理を行った後、t-BHP に暴露し 16~18 時間培養した。顕微鏡観察および DNA の電気泳動検討用の培養はディッシュを用い cell viability 測定は培養上清一定量を 96 ウェルプレートへ移し CCK-8 により測定した。他の培養条件は前節と同様に行った。Fig. 5.7b へ培養後の cell viability の結果を示す。0.13mM の t-BHP の暴露により cell viability は対照の約 70%にまで低下したが(t-test, $p < 0.05$), 延命薬の抽出物で処理した細胞はほぼ対照と同レベルを示した。しかし、阿房宮の抽出物では t-BHP で暴露した対照と同レベルの cell viability を示し、保護効果は認められなかつ

た。他の濃度の t-BHP 暴露においても同様の傾向が観察された。0.13mM の t-BHP を暴露した細胞の位相差顕微鏡観察結果を Fig. 5.7a へ示した。t-BHP を暴露により多くの細胞が死滅し、ディッシュより剥離し円形となった細胞が認められ、細胞の輪郭も不明瞭となり突起も失われ、形態の退行的な変化が観察された (B)。延命薬の抽出物で処理した細胞は B と比べ生存細胞が多く、保存されている神経突起も多数認められた (C)。阿房宮の抽出物で処理した細胞ではディッシュより剥離し円形および形態の崩れた細胞が多数みられアポトーシスの起きていることが推定された。また B と同様に楔型をしている細胞も輪郭が不明瞭となりほとんどの神経突起が失われていて形態の退行的な変化が観察された (D)。核 DNA のアガロース電気泳動結果を Fig. 5.8 へ示した。対照の泳動結果はレーン (a) , t-BHP を暴露した対照の試験結果はレーン (b) , 延命薬および阿房宮抽出物で処理した細胞の結果はレーン (c) , (e) に示されており、抽出物で処理した細胞を t-BHP で暴露した結果はレーン (d) , (f) に示されている。レーン (a) , (c) , (e) では高分子量の位置にバンドがあり、低分子化に伴った下方へのテーリングは弱くこれらの群の細胞は正常な状態にあることが確認された。これに対し t-BHP により酸化ストレスを与えた active の対照 (b) では高分子のバンドの下方に強いデンシティーのテーリングが伸びていることが観察され DNA の低分子化が起きていることからアポトーシス誘導の起きていることが示唆された。SH-SY5Y 細胞では t-BHP の処理により活性酸素 (ROS) が生じ ROS-p53 系によってアポトーシスが誘導され細胞死が起きることが知られている。これに対し延命薬抽出物の処理した群 (d) においては明らかにテーリングのデンシティーは弱まり短くなっていることより、アポトーシス誘導の抑制が起きていることが示唆された。しかし阿房宮抽出物処理群 (f) ではテーリングはむしろ強まっている傾向が観察されアポトーシスが抑制されていないことが示された。以上の観察より、菊花抽出物による酸化傷害保護作用はアポトーシス誘導の抑制作用の結果と考えられ、抽出物に含まれるルテオリンなどをはじめとする抗アポトーシス活性をもつ多くのフラボノイド分子種が、細胞の保護に貢献しているものと考えられる(10)。これに対し、阿房宮抽出物ではルテオリン等の抗アポトーシス効果を有するフラボノイドの含有量が低く、逆にプロオキシダント効果を示すアピゲニンなどのフラボノイド含有量が高いと考えられ(11)、阿房宮抽出物が一定濃度以上では保護効果を示さない理由になっているものと考えられた。

フェノール化合物は抗酸化活性を示す反面、フェノール化合物の種類によっては遷移金属存在下で過酸化水素等と共存することにより、活性酸素生成反応を触媒する作用を示す場合があり、この作用はプロオキシダント効果と呼ばれフェノール化合物の負の側面として広く知られている。アピゲニンは過酸化水素存在下でアポトーシス誘導を促進させる働きが強く、その作用は過酸化水素から活性酸素の発生を高めるプロオキシダント効果によるものと考えられている(11)。前節において、阿房宮の抽出物およびアピゲニンでは濃度が上昇するにつれ細胞傷

害を促進する働きをすることが示された。そこで、本節においては阿房宮抽出液およびアピゲニンが、t-BHP 共存の下で上述のアポトーシスを誘導しているものと考え、細胞保護作用の試験を行った (Fig. 5.9)。SH-SY5Y 細胞を、200 μ g/ mL の阿房宮抽出物または 10 μ M のアピゲニンで処理した後、t-BHP へ NAC の存在下または非存在下で暴露した。NAC は抗酸化剤であり、活性酸素(ROS)-p53 系によるアポトーシス誘導を遮断する試薬である。その結果 NAC は、阿房宮抽出物およびアピゲニンで処理した細胞において、10 μ M~100 μ M の範囲で濃度依存的に酸化ストレスの損傷を回復させた。この結果より阿房宮の抽出物およびアピゲニンの高濃度における細胞死促進作用は ROS 産生に伴うアポトーシス誘導によることが示唆され、試料の処理濃度や t-BHP の濃度条件によってこれらはアポトーシス誘導の促進剤として働くことが示唆された。

5.2.4 菊花抽出物の酸化傷害保護作用における NRF2 依存抗酸化酵素誘導に関する検討

本章第 1 節でも触れたように、フェノール化合物が薬理作用を示す濃度はフェノール化合物が抗酸化作用を示す濃度よりはるかに低いレベルで起きていることから、フェノール化合物の保護作用には固有の標的分子を介した特異的な反応の存在が予測されていた。化学発がんの研究などより、親電子性の人工化学物質に対する誘導性の生体防御機構の存在が見いだされた (12)。親電子物質が転写因子 Nrf2 を活性化し、抗酸化剤応答配列 (ARE) を介して遺伝子発現を制御し、グルタチオンペルオキシダーゼ、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) などの抗酸化酵素や NADPH キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1) などの第二相薬物代謝酵素が誘導する、化学物質による発がん抑制機構が明らかにされた。その後、Eggler 等や Itoh 等は植物の二次代謝物などの天然の親電子性物質においても Nrf2 を活性化し、発がんの抑制や酸化傷害に対する細胞保護作用を発揮する効力を有していることを明らかにした(12, 13)。

本章において、菊花抽出物の t-BHP 暴露に対する神経細胞の酸化傷害保護作用の一つのメカニズムとして、前節ではアポトーシスの誘導を抑制し細胞を保護していることを推察した。本節では菊花抽出物の保護効果における Nrf2-ARE 経路の関与を検討する観点から、核内の Nrf2 レベルおよび細胞質の抗酸化酵素 HO-1 の発現量の検討を行った。はじめに、菊花抽出物が神経細胞を t-BHP 暴露より保護する際、抽出成分が細胞に働きかけ細胞の上記のような生体防御機構の働きを亢進させることで保護効果をもたらされているのかを検証する目的から、抽出物の処理と t-BHP 暴露のタイミングを変えた次の実験を行った。培養スケジュールを Fig. 5.10 へ示す。Pretreatment 群は SH-SY5Y 細胞を前培養後、菊花抽出物を加えた 100 μ g/mL とした培地で 18 時間培養し処理した。その後、培地を除き各濃度の t-BHP を加えた培地と交換し 4 時間培養することで細胞に対し t-BHP の暴露を行、培養後 cell viability を測定した。Simultaneous 群は前培養後、試料を含まない同培地で Pretreatment 群と同時間培養し、その

後、菊花抽出物と t-BHP の両方を含む培地と交換し、同様に 4 時間培養した後、cell viability を測定した。その結果を Fig. 5.11A へ示す。各群の区別は、白抜きの棒は対照の t-BHP 暴露のみ行った群、大柄の斜め格子の棒は Simultaneous 群、小柄の斜め格子の棒は Pretreatment 群を表した。t-BHP の暴露により cell viability は著しく低下した(t-test, $p < 0.05$)。いずれの処理方法の群でも保護効果が示されたが、Simultaneous 群では t-BHP 濃度の上昇に伴い効果は減少したが(ANOVA, $p < 0.05$)、Pretreatment 群では高い保護効果が保持され(t-test, $p < 0.05$)、延命薬群でより高い効果が認められた(t-test, $p < 0.05$)。すなわち、細胞が t-BHP に暴露される際、抽出物が存在していなくとも保護効果が生じていることから、前処理を行うことにより神経細胞の防御機構が亢進していることが示唆された。10 μ M のアピゲニン、ルテオリンについても同様の検討を行った (Fig. 5.12)。ルテオリンにおいては、各濃度の t-BHP の暴露において、いずれの群でも保護効果が示され、Simultaneous 群の方が高い効果を示す傾向が認められた。このことより、ルテオリンは神経細胞の防御機構を亢進させる能力の高いことが示唆された。これに対し、アピゲニンにおいては、各濃度の t-BHP の暴露において、Simultaneous 群では保護効果を示す傾向がみられたが、Pretreatment 群ではアピゲニン処理により著しい細胞傷害が生じ、アピゲニンには防御機構を亢進させる効力はなく、むしろプロオキシダントとして機能していることが考えられた。以上の検討より、ルテオリン等を含む菊花抽出物では、神経細胞の防御機構を亢進させている可能性が示されたため、次に神経細胞の核内の Nrf2 レベルおよび細胞質の抗酸化酵素 HO-1 の発現量の検討を行った。SH-SY5Y 細胞を 200 μ g/mL の菊花抽出物を加えた培地、および無添加の培地で処理し、1 時間前培養の後、培養液に t-BHP を加え濃度を 0.1mM とし細胞を t-BHP へ 6 時間暴露した。培養後、細胞より細胞質と核タンパク質をそれぞれ分取し、細胞質および各タンパク質中の転写因子 Nrf2 ならびに細胞質中の抗酸化酵素 HO-1 を SDS 電気泳動で分離後のそれぞれのタンパク量をウェスタンブロッティングにより測定し、その検出強度を画像計測シグラフに示した (Fig. 5.13)。Fig. 5.13A へ核および細胞質の Nrf2 (n-Nrf2, c-Nrf2) の抗体染色結果の写真と各バンドの染色強度のグラフを示す。菊花抽出物の処理により t-BHP の非暴露 (-) の核 Nrf2 の発現量は高まり、対照と比較し延命薬では約 5 倍程度、阿房宮では 4 倍程度高まった。フラボノイド等は Nrf2 を Keap1 より解離させ、核内レベルを上昇されることが知られており、これは菊花抽出物に含まれるフラボノイドに応答した結果と考えられる(13)。t-BHP 暴露による Nrf2 レベルの変化は、対照では非暴露と比べやや高まる傾向が見られ、菊花抽出物処理群では対照と比べ約 2 倍高まっており、延命薬では非暴露と比べ約 3/5 ほど低く、阿房宮では同レベルであった。また、細胞質の Nrf2 (c-Nrf2) レベルはいずれの群も同じレベルであった。以上のことより菊花抽出物はいずれの栽培品種においても、核の Nrf2 レベルを高めることが示された。次に、Fig. 5.13B に HO-1 およびローディングコントロールとして β -actin の抗体染色結果の写

真と各バンドの (HO-1/β-actin) の染色強度比のグラフを示す。菊花抽出物の処理により、延命薬では発現量が高まり、対照と比べ t-BHP の非暴露 (-) の細胞では約 6~7 倍程度、t-BHP 暴露した細胞では約 9 倍程度であった。それに対し阿房宮抽出物の処理群においては t-BHP 暴露・非暴露のいずれの細胞においても発現量の上昇は認められず、抗酸化酵素群が誘導されていないことが示唆された。

5.3 結言

神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であり、神経変性疾患の発症や進行の大きな要因となっている。植物の二次代謝物として天然物に含まれているフェノール化合物には、このような認知機能障害や神経細胞の変性脱離などの過程に関与する酸化ストレスを制御する機能を有するものがあり、その構造や作用機構の研究は治療薬開発におけるリード化合物としての役割や神経変性疾患の予防や進行の遅延に有効な栄養素の解明にとって極めて重要である (14)。本章では、菊花抽出物が酸化ストレスを負荷したニューロン細胞の酸化傷害を緩和する作用について、栽培品種の比較より検討を行い、フラボノイド分子種による作用の相異や酸化傷害保護の作用機構について考察した。

延命薬のメタノール抽出物で処理をした SH-SY5Y 細胞では t-BHP 暴露により誘導される細胞死が軽減された (Fig. 5.5)。保護作用は処理濃度が 100 μg/mL 未満の範囲で濃度依存的に上昇し、対照と同レベルまで回復した。保護作用は菊花のフラボノイドによるものと考えられる。フラボノイドの酸化傷害保護機構については、近年 Nrf2-ARE 経路の活性化を介した細胞の防御機構の誘導によることが明らかにされ、フラボノイドに備わった抗酸化力の関与は本質的なものではないと考えられている。本章においても菊花メタノール抽出物の抗酸化活性

(SOD) を測定した結果、延命薬の活性 IC₅₀ は約 1,060 μg/mL であり、細胞の保護作用を示す濃度よりはるかに高濃度であり、抗酸化力より保護作用を説明することはできない。Kang 等は、神経細胞保護作用を示す複数のフラボノイドについて、その活性酸素消去能と神経細胞の保護作用の指標となるカスパーゼ抑制活性の比較を行い両者には相関性がないことを示し、神経細胞保護作用への活性酸素消去能の関与は不明であることを示している (15)。米国農務省栄養データ研究所 (NDL) は、これまで食品の健康機能の指標として、ポリフェノールを含有する食品の抗酸化能を示す値 (ORAC 値) を公表してきた。しかし、この指標は人間の健康と相関性がないという多くの証拠が示されたことを受け、農務省は 2012 年にデータベースから食品の ORAC 値を削除した (16)。

菊花抽出物の神経細胞保護作用は栽培品種により大きく異なり、阿房宮の抽出物においては 25 μg/mL の処理濃度までは保護効果が認められるが、それ以上の濃度では保護作用は低下し、濃度による作用の二相性が示された (Fig. 5.5B)。この保護効果の特徴は、栽培品種のフラボ

ノイドの組成比が大きく異なることによるもので、阿房宮で組成比の高いアピゲニンの特性を反映したものである。フェノール化合物の種類によっては活性酸素生成反応を触媒し活性酸素を発生させるプロオキシダント効果を示すものがあり、アピゲニンは活性酸素の発生を高めアポトーシス誘導を促進させる働きが強い。坪内等はレスベラトロールが細胞内でプロオキシダントとしてアポトーシスを誘導することを報告している(17)。プロオキシダント効果はフェノール化合物の負の側面として働くこともあるが、アポトーシスは回復できない傷害を受けた細胞や将来がんになりうる変異細胞の除去に不可欠なプロセスであり、アポトーシス誘導活性も生体の恒常性維持に意義がある。従って、阿房宮抽出物の保護作用の特性はアピゲニン組成比が高いことを反映した結果と言え、栽培品種により菊花の薬理学特性が大きく異なることを具体的な例として示した。

菊花抽出物の酸化傷害保護機構については、Nrf2-ARE 経路の活性化を介した細胞の防御機構の誘導によることを二つの検討より推定した。菊花抽出物による保護作用が、オキシダントに対する直接的な作用ではなく、細胞の生体防御機構を亢進させた間接的な結果であることを裏付ける目的で次の実験を行った。神経細胞を前培養後、菊花抽出物を加えた培地で 18 時間培養し処理した後、その培地を除き t-BHP を加えた培地と交換し t-BHP の暴露を行い、cell viability を測定した。その結果、細胞へ抽出物の処理とオキシダント暴露を、時間を隔てて行っても、保護効果が認められ神経細胞の防御機構が亢進していることが示唆された。次いで、保護効果に対する Nrf2-ARE 経路の関与を確認する目的で、核内の Nrf2 レベルおよび細胞質の抗酸化酵素 HO-1 の発現量の検討を行った。延命楽の菊花抽出物の処理により核タンパク質画分の Nrf2 の発現量は対照と比較し約 5 倍高まり Nrf2 が Keap1 より解離し核内へ移行したことが示唆された。また、延命楽の菊花抽出物の処理により抗酸化酵素の HO-1 の発現量が高まり、対照と比べ t-BHP の非暴露 (-) の細胞では約 6~7 倍程度、t-BHP 暴露した細胞では約 9 倍上昇しており、神経細胞の防御能力が高まったことが示唆された。しかし、阿房宮の抽出物においては、転写因子の Nrf2 の発現量が上昇したにも拘わらず、抗酸化酵素 HO-1 は発現されておらず、処理濃度が約 100 μ g/mL 以上では保護作用を示さないことを裏付ける結果である。アピゲニンは HO-1 の発現を阻害することが報告されており、阿房宮抽出物に含まれるアピゲニンが HO-1 の発現を阻害したことが考えられる。

菊花は漢方薬の調合薬として解熱や解毒の薬効を果たす配剤として用いられてきた。本章においては、菊花、特に延命楽のメタノール抽出物がニューロン細胞 (SH-SY5Y) において Nrf2-ARE 経路の活性化を介し生体防御機構の能力を高めていることが示された。また、Faria 等はフラボノイドやそれらの配糖体が血液脳関門を通過し得ることを示している(18)。従って菊花の摂取により体内に取り込まれたこれらの成分が中枢神経へ到達し作用する可能性も十分に考えられ、菊花が脳内においても酸化ストレスの緩和に役立つ可能性が考えられた。

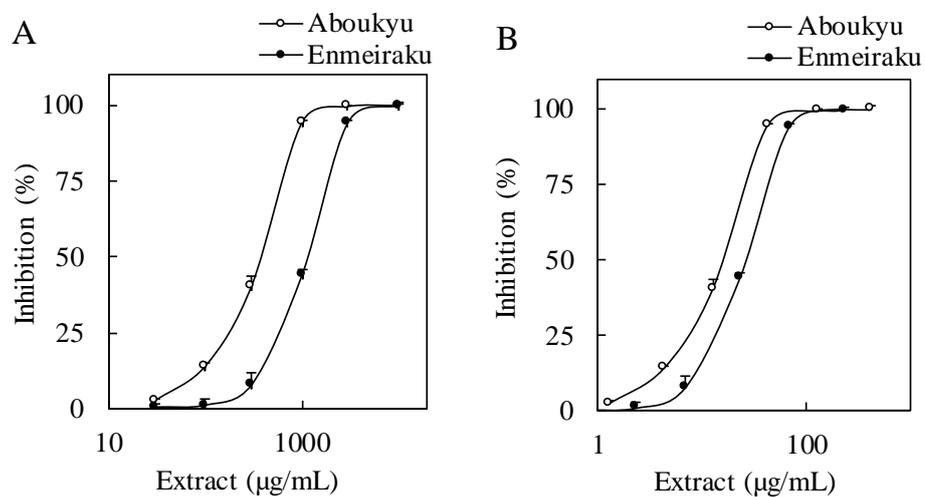


Fig. 5.1 Reduction of the superoxide radical anion in the presence of Chrysanthemum petal extracts of Aboukyu and Enmeiraku

Inhibition (%) is showed in (A) as a function of chrysanthemum extracts concentration. Inhibition (%) is also expressed as a function of the polyphenol ingredient concentration in (B). Values are expressed as mean \pm SD of three determination. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

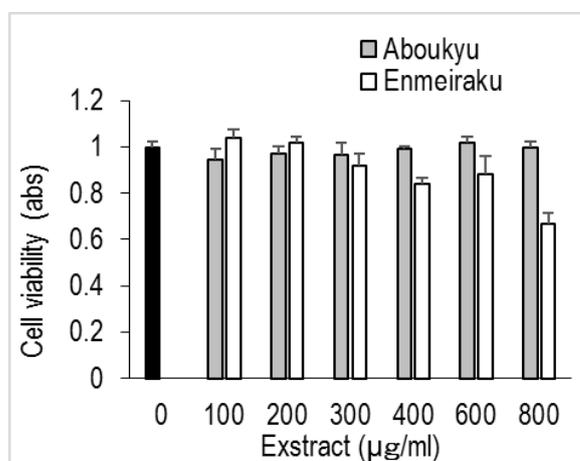


Fig. 5.2 Cytotoxic effects of *Chrysanthemum* petal extracts in SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells (5×10^5 cells/mL) were treated with *Chrysanthemum* petal extracts (0 to 800 µg/mL) from Aboukyu and Enmeiraku for 24 h. Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay. Each bar presents the mean \pm SD.

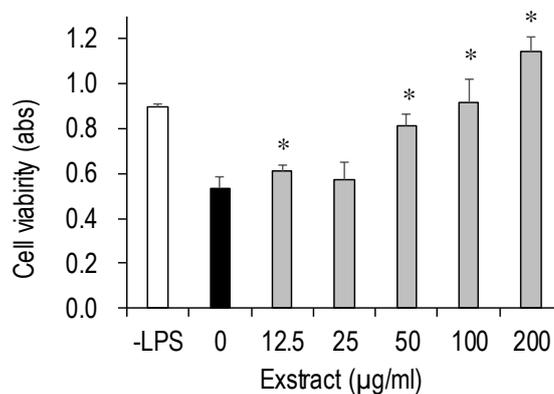


Fig. 5.3 Oxidative stress injury induced with 0.13mM t-BHP in SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells cultures were treated with various concentrations of extracts from Enmeiraku with or without t-BHP for 18h. The cell viability was estimated colorimetric methods by CCK-8 assay. Each bar presents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 µg/mL).

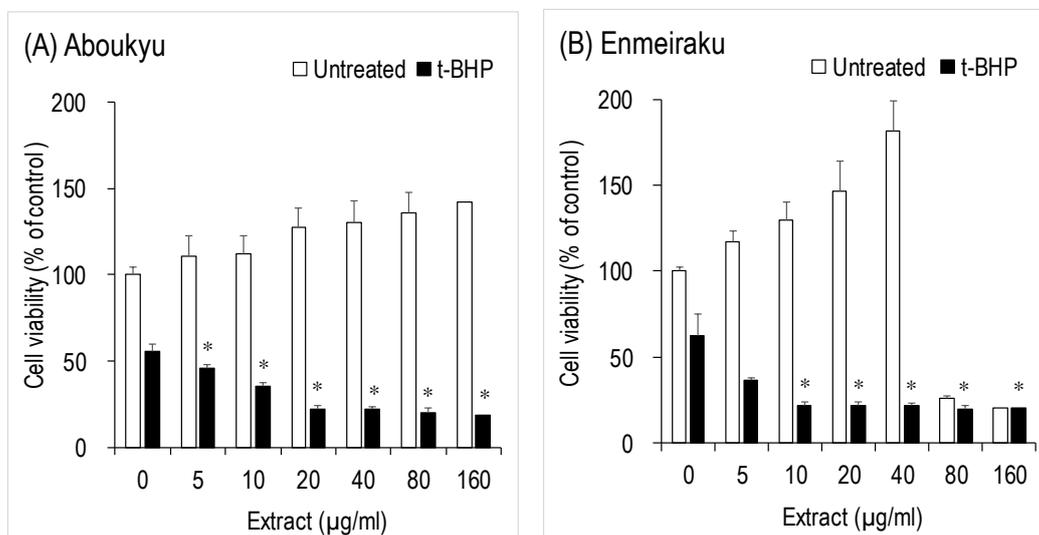


Fig. 5.4 Protective effects of *Chrysanthemum* petal hexane extracts on t-BHP induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells cultures were treated with various concentrations of hexane extracts from Aboukyu (A) and Enmeiraku (B) with or without t-BHP for 18h. The cell viability was measured by the CKK-8 assay and presented as percentage of cell viability relative to untreated control. Each bar presents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ versus t-BHP treated control (0 μ g/mL).

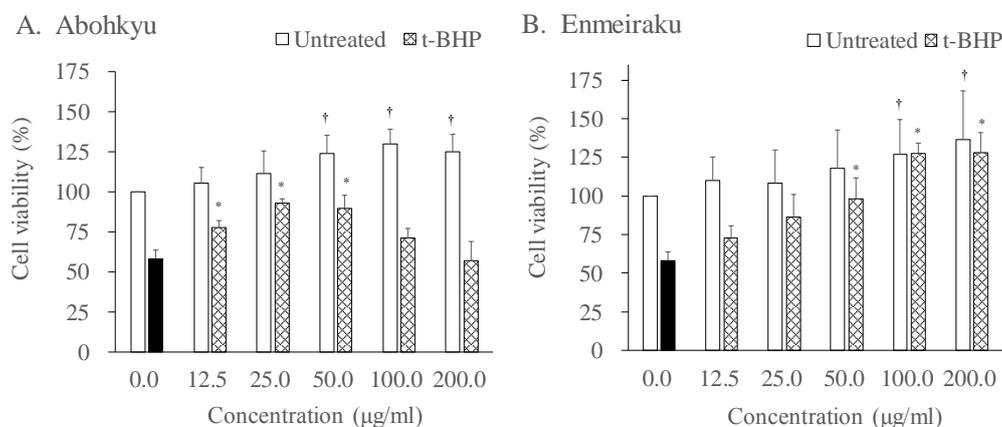


Fig. 5.5 Protective effects of *Chrysanthemum* petal extracts on t-BHP induced oxidative stress injury in SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells cultures were treated with various concentrations of chrysanthemum petals extracts from Abohkyu (A) and Enmeiraku (B) for 2 h before the addition of the oxidant. Then cells treated with t-BHP for 18h. The cell viability was measured by the MTT assay and presented as percentage of cell viability relative to untreated control. Each bar presents the mean \pm SD from two independent experiments. *, $p < 0.05$ versus t-BHP treated control cells. †, $p < 0.05$ versus untreated control cells. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

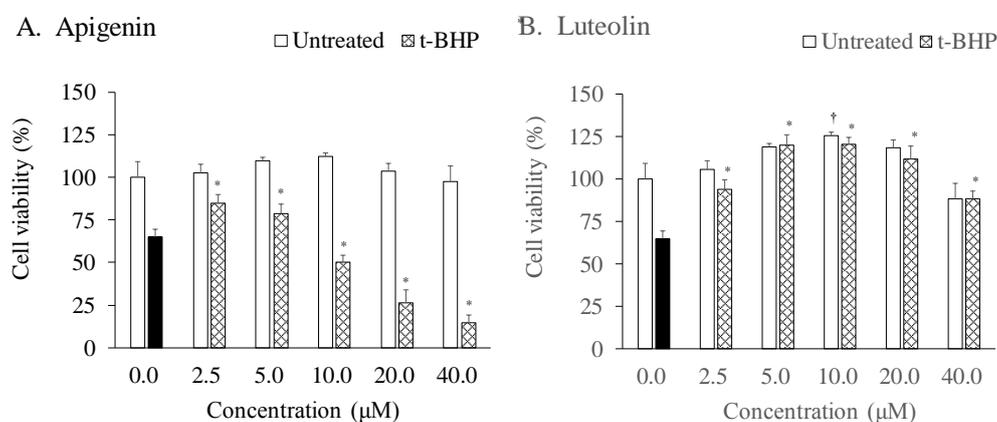
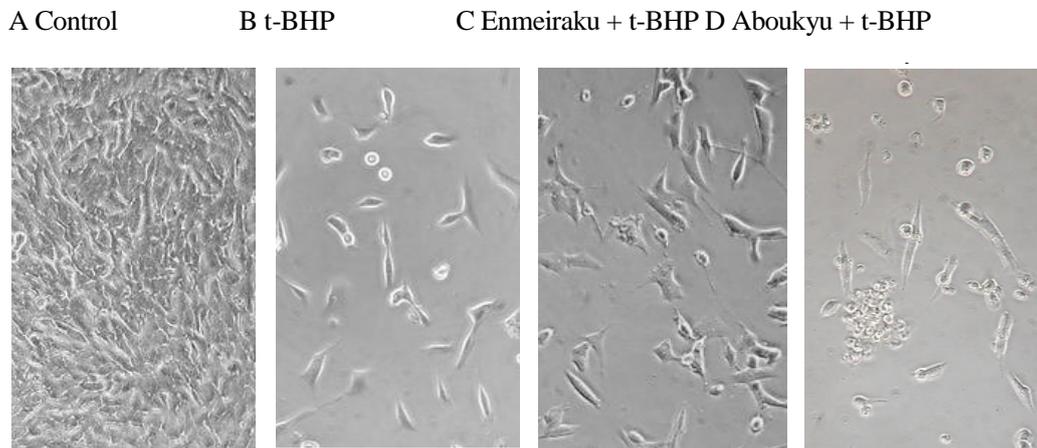


Fig. 5.6 Cytoprotective activity for the oxidative stress of apigenin and luteolin as a function of concentration

SH-SY5Y cell cultures were pretreated with various concentrations of apigenin (A) and luteolin (B) for 2 h before the addition of the oxidant. Then cells treated with t-BHP for 18h. The cell viability was measured by the MTT assay and presented as percentage of cell viability relative to untreated control. Each bar presents the mean \pm SD from 3 determinations. *, $p < 0.05$ versus t-BHP treated cells. †, $p < 0.05$ versus untreated control cells. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

a. Cell morphology



b. Cell viability

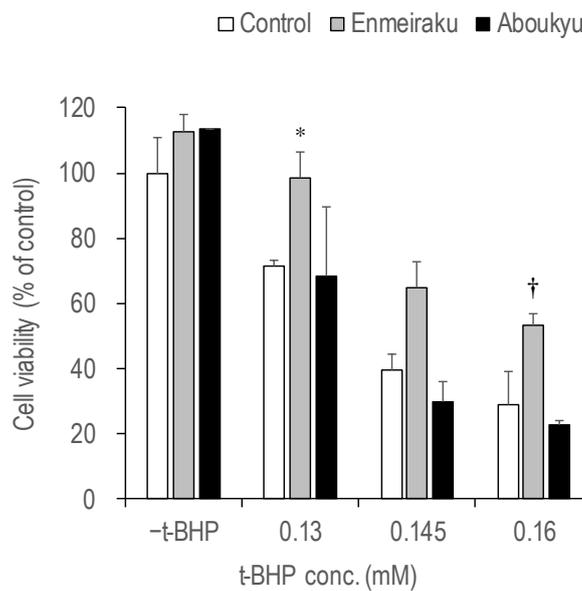


Fig. 5.7 Cytoprotective and cytotoxic effects of Chrysanthemum petal extracts on neural oxidative damage in SH-SY5Y cells

Morphology of SH-SY5Y cells co-treated with chrysanthemum extracts and t-BHP (a). No addition control (A). Treated with t-BHP alone (B), in combination with Enmeiraku extract (C), with Aboukyu extract (D). 200x. Cell viability of each group was evaluated using the CCK-8 assay (b). Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. Significant differences from the t-BHP treated control; *, $p < 0.05$ (0.13mM t-BHP), †, $p < 0.05$ (0.16mM t-BHP).

Extract	Control		Enmeiraku		Aboukyul	
	-	+	-	+	-	+
t-BHP (0.13mM)	a	b	c	d	e	f

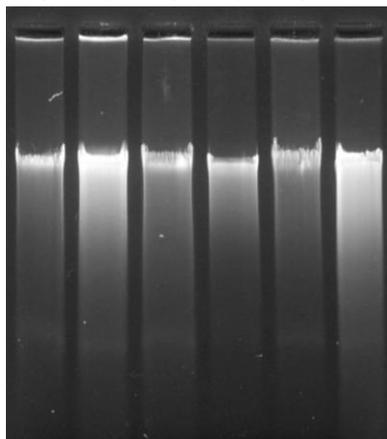


Fig. 5.8 DNA fragmentation induced by t-BHP in SH-SY5Y cells

Cells were treated with no addition (a), with 100 μ g/mL of Enmeiraku extract(c), with 100 μ g/mL Aboukyu extract (e). Cells were treated with 0.13mM of t-BHP alone (b), in combination with 100 μ g/mL of Enmeiraku extract (d), with 100 μ g/mL of Aboukyu extract (f). (From 木村, 五戸. 平成 28 年度八戸工業大学工学部バイオ環境工学科卒業研究論文集. 12: 57-60.)

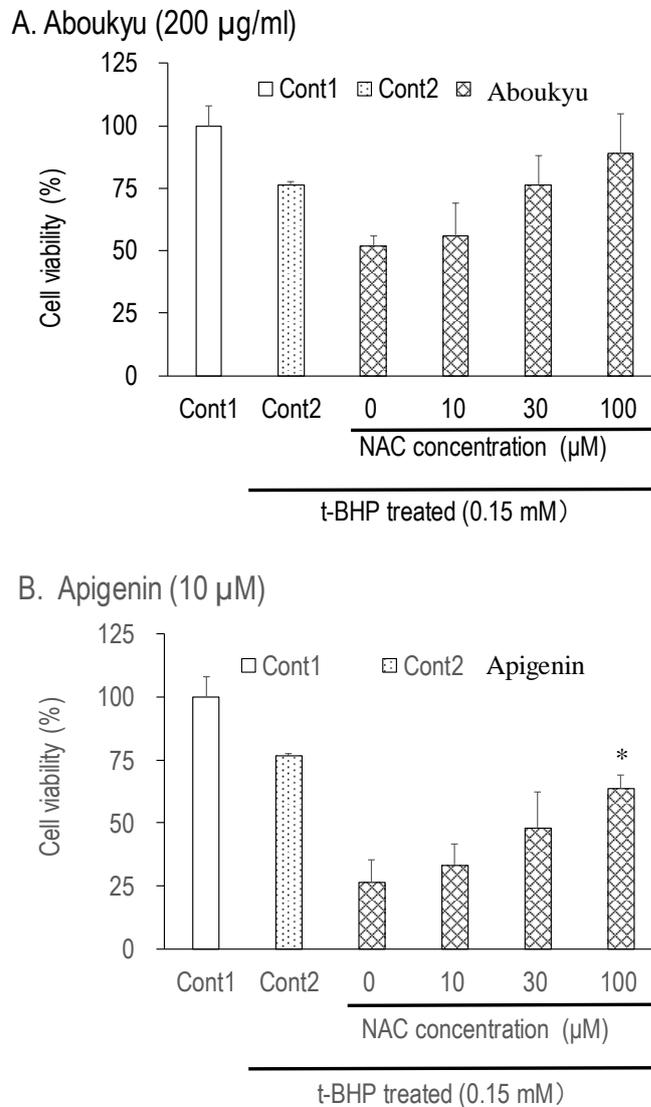


Fig. 5.9 Effect of N-acetylcysteine for the oxidative stress injury in SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells were treated by t-BHP in combination with 200 µg/mL of Aboukyu extracts (A) or 10 µM of apigenin (B) in the presence or absence of NAC for 18h. The cell viability was measured by the CCK-8 assay and presented as percentage of cell viability relative to untreated control (Cont 1). Each bar presents the mean \pm SD from two independent experiments. *, $p < 0.05$ versus NAC absent cell treated with t-BHP in combination with apigenin. (From D.J. Ma, Y. Wako. 2017. *Food sci. technol. Res.*, 23: 457–467.)

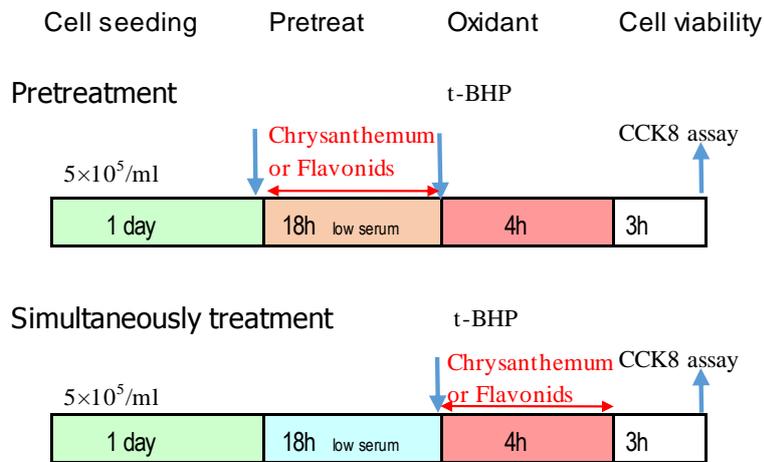


Fig. 5.10 Culture schedule

Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 5×10^5 cells/mL with growth medium. After 24 h, the cells were pretreated or untreated with sample to be test for 18 h before the addition of the oxidant. Then t-BHP were added to each well and cultured for 4 h. The cell viability was assayed using kit.

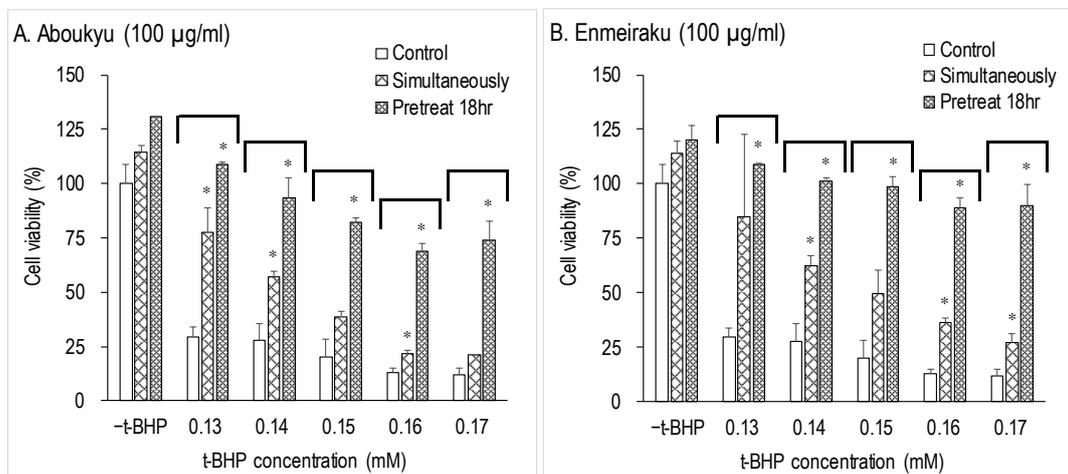


Fig. 5.11 Pretreatment of chrysanthemum extract enhance the protective effect against oxidative stress

SH-SY5Y cells were pretreated or untreated with chrysanthemum extracts from Aboukyu and Enmeiraku for 18 h before the addition of the oxidant. Then cells were treated with various concentration of t-BHP in the presence of chrysanthemum extracts for 4h. Significant differences from the t-BHP treated control in each t-BHP concentration group; *, $p < 0.05$.

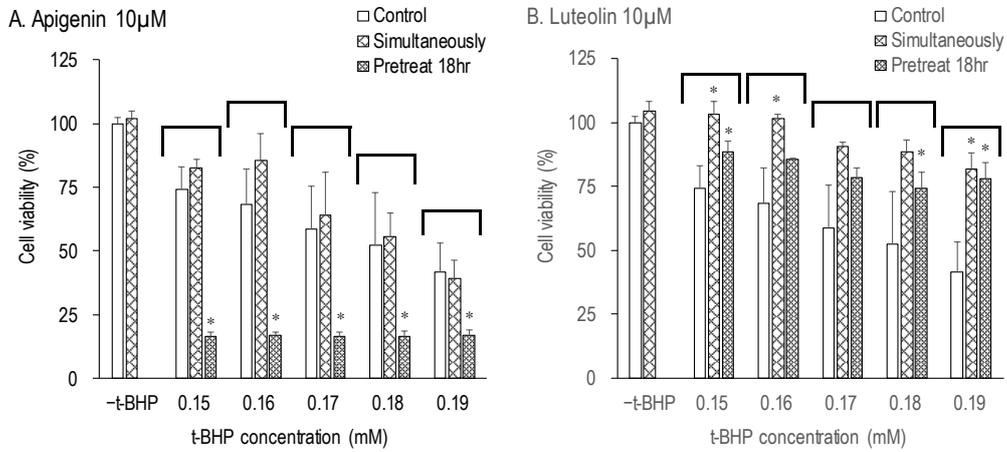


Fig. 5.12 Modulation of pretreatment with flavonoids on the viability in the cell induced oxidative stress

SH-SY5Y cells were pretreated or untreated with apigenin and luteolin for 18 h before the addition of the oxidant. Then cells were treated with various concentration of t-BHP in the presence of flavonoid specimen for 4h. Significant differences from the t-BHP treated control in each t-BHP concentration group; *, $p < 0.05$.

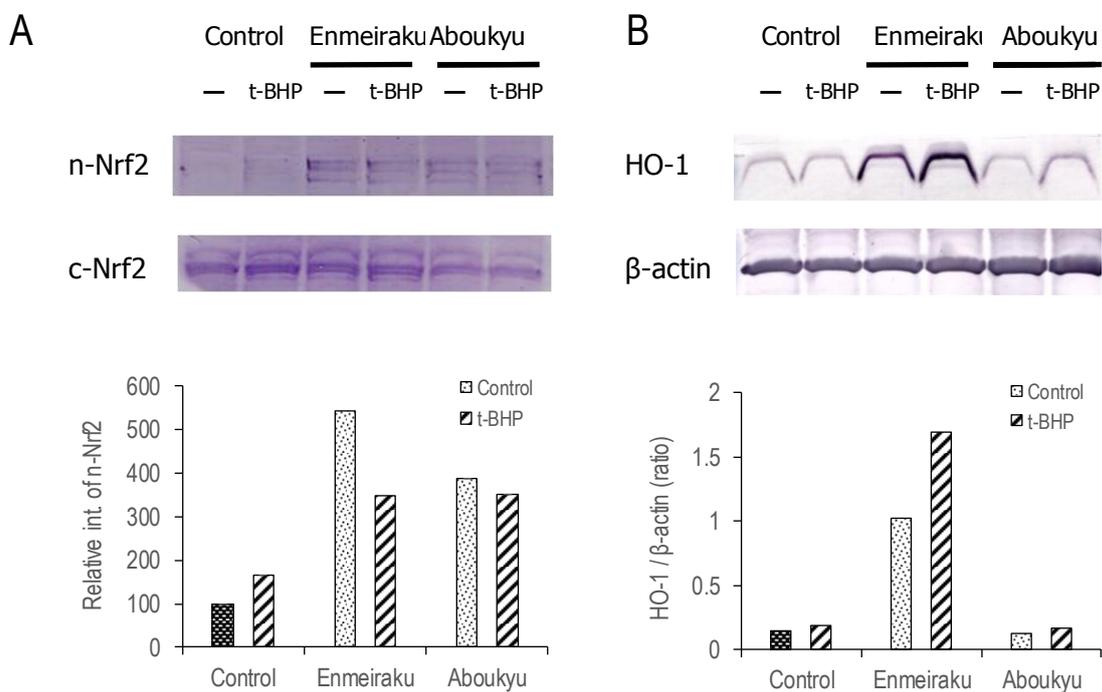


Fig. 5.13 Induction of n-Nrf2 and HO-1 in chrysanthemum extract treated SH-SY5Y cells

Cells were treated with extracts of Aboukyu and Enmeiraku (200 μ g/mL) for 60 min prior to 0.1 mM t-BHP treated for 6 h. Western blotting analysis was conducted to measure induction of nuclear and cytoplasmic-Nrf2 (A) and HO-1 (B) protein.

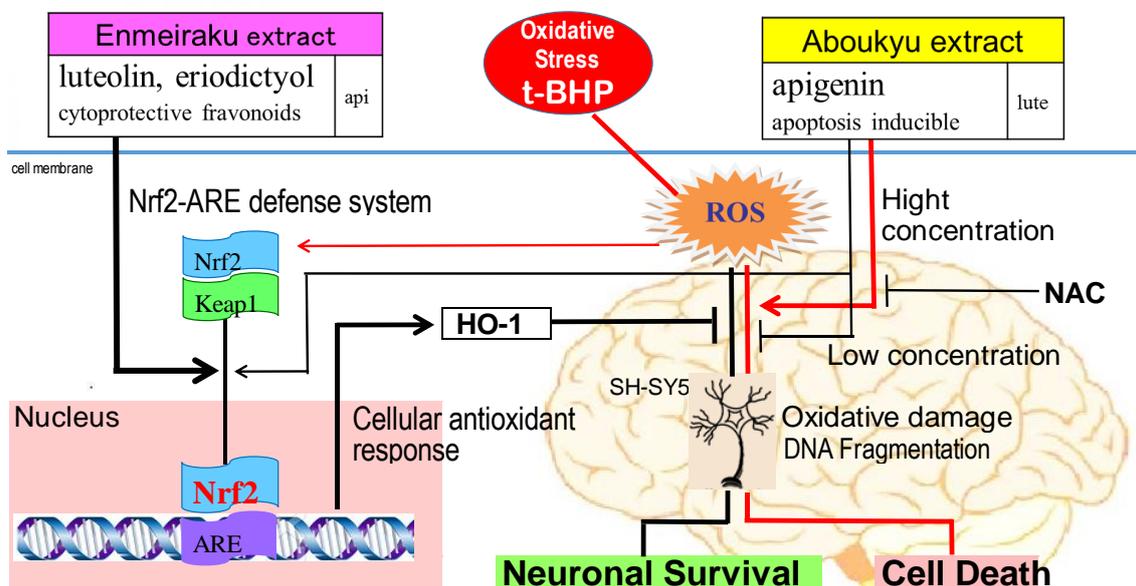


Fig. 5.14 Proposed mechanisms of *Chrysanthemum* petal extracts of Aboukyu and Enmeiraku in preventing t-BHP-induced cell death in SH-SY5Y cells

5.4 参考文献

- 1 Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., and Fenn, W. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, **119**, 623 -626.
- 2 McCord, J. M. and Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.*, **5**, 363-369.
- 3 Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Babiker, A., and Suliman, H. B. (2008). Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res.*, **103**, 1232-1240.
- 4 Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks, In: Oxidative stress. 1st Edition. Academic Press, London, 1-8.
- 5 Lin, T.Y., Lu, C.W., Wang, C.C., Wang, Y.C., and Wang, S.J. (2011). Curcumin inhibits glutamate release in nerve terminals from rat prefrontal cortex: possible relevance to its antidepressant mechanism. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **35**, 1785-1793.
- 6 Butterweck, V., Jürgenliemk, G., Nahrstedt, A., and Winterhoff, H. (2000). Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.*, **66**, 3-6.
- 7 Kim, S.N., Kim, M.R., Cho, S.M., Kim, S.Y., Kim, J.B., and Cho, Y.S. (2012). Antioxidant activities and determination of phenolic compounds isolated from oriental plums (Soldam, Oishiwase and Formosa). *Nutr. Res. Pract.*, **6**, 277-285.
- 8 Guyonnet, G. S., Secher, M., and Vellas, B. (2012). Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. *British Journal of Pharmacology*, **75**, 738-755.
- 9 Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 120-129.
- 10 Law, B.N., Ling, A.P., Koh, R.Y., Chye, S.M., and Wong, Y.P. (2014). Neuroprotective effects of orientin on hydrogen peroxide induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Mol. Med. Rep.*, **9**, 47-54.
- 11 Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., and Haqqi, T. M. (2008). Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition*, **24**, 733-743.

- 12 Egger, A.L., Gay, K.A., and Mesecar, A.D. (2008). Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: Induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 84-94.
- 13 Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, **13**, 76-86.
- 14 Vauzour, D., Vafeiadou, K., Mateos, A. R., Rendeiro, C., Spencer, J. P. E. (2008). The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.*, **3**, 115-126.
- 15 Kang, S. S., Ji, Y. L., Choi, Y. K., Kim, G. S., and Han, B. H. (2004). Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 2261-2264.
- 16 米国農務省 HP, <https://www.ars.usda.gov/northeast area/Beltsville md/Beltsville human nutrition research center/nutrient data laboratory/docs/oxygen radical absorbance capacity or ac of selected foods release 2 2010>
- 17 坪内涼子, 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉野昌孝 (2007) レスベラトロールのプロオキシダント作用発現とアポトーシス誘導, *Trace Nutrients Research*, **24**,185-190
- 18 Faria, A., Mateus, N., and Calhau, C. (2012). Flavonoid transport across blood-brain barrier: Implication for their direct neuroprotective actions. *Nutrition & Aging*, **1**, 89-97.

第6章 菊花抽出物の活性化ミクログリア細胞に対する抗炎症作用とその栽培品種による比較

6.1 緒言

すでに述べたとおり，薬用の菊花には鎮痛、解熱効果があり抗炎症作用を発揮する薬草として古くより漢方薬の重要な配剤として用いられてきた。食用菊においても同様に抗炎症効果があり風邪症状等の緩和に利用されてきた。近年，生活習慣病や癌などの様々な疾患に共通する発症要因として慢性炎症が注目されている。アルツハイマー等の神経変性疾患発症の原因にも慢性炎症が深く関与していることが知られ，病理の究明や治療法の開発において重要な位置を占めている(1)。炎症は感染，アレルギー，酸化ストレスに対応する生体防御反応であり，マクロファージ等の免疫細胞からシグナルが実質細胞へ発せられ発熱等種々のストレス応答反応が活性化される。しかし，炎症反応が遷延して慢性化すると臓器が機能不全に陥り，多くの疾患が誘発すると考えられている。長い間，脳組織は「免疫租界」の領域と考えられていたが，近年実はさまざまな免疫細胞が関与するダイナミックな免疫応答の場であることが広く認識されるようになった。特にミクログリアは，脳に定住するマクロファージ様細胞として，脳内免疫の中心的役割を果たしている(2)。グリア細胞は神経細胞（ニューロン）の50倍以上存在し，アストロサイト，オリゴデンドロサイト，ミクログリアなどから構成されており，ミクログリアは脳内細胞の約10%を占めている。グリアの機能は，以前は単なる神経細胞の支持組織としてしか認識されていなかったが，多様な機能を有することが明らかとなっている。ミクログリアは感染や加齢によって平常の状態とは異なる動きを示すことから諸刃の剣と呼ばれ，平常の状態では，様々な神経栄養因子，神経保護因子を産生し神経細胞の機能維持や細胞の保護・増殖を行う一方，感染や加齢による活性化にともない炎症性サイトカイン，一酸化窒素，活性酸素，興奮性アミノ酸，アデノシン三リン酸（ATP）などの神経傷害因子を産生し炎症反応を引き起こす。現在までの研究より中枢神経系内の細胞によって炎症促進性免疫応答が開始されることや，炎症性サイトカインとその他の重要なメディエーター（プロスタグランジン，NO等）が神経障害，神経変性疾患及び認知障害の進展において働くことを裏付ける研究成果が増えていることから，将来，グリア細胞の神経傷害因子の抑制や神経栄養因子の増大など神経炎症の制御が，神経変性疾患の治療標的になるとの考えより，炎症経路を標的とする新たな治療アプローチが試みられつつあるが，現在のところ神経変性本体を改善する有効な治療薬は存在しない。

ステロイド剤は優れた抗炎症薬の代表であるが，中枢神経系のストレス応答においては，副腎皮質のステロイドホルモンであるグルココルチコイドのレベル変動を介した HPA (hypo-

thalamus)系が存在し、この反応が一過性・短期的に収束すれば生体の適応反応となるが、慢性・長期的に持続すると中枢神経に対して有害な作用をもたらすことが知られていて、抗炎症剤としてステロイド剤を使用することは難しい。トリテルペンはスクワレンを前駆体として合成される30の炭素からなるイソプレノイドであり、スクアレンの環化の仕方によりステロイドとトリテルペンに別れる(3)。種々の植物にみられるオレアノール酸、ウルソール酸、ベツリン酸は、抗ガン作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗高脂血症効果などの強い生理活性を示す。トリテルペンの抗炎症作用に着目し、神経変性疾患の治療薬開発のリード化合物探索や食品における機能成分の所在を明らかにする目的から、天然物由来あるいは化学合成のトリテルペン化合物を対象とした神経炎症の制御作用を検討する取り組みが始められている(4)。

本章においては、菊花の主要な薬理作用が抗炎症作用であり、その薬効成分がトリテルペンやフラボノイドであることから、脳内免疫を担うグリア細胞に対する菊花抽出物の神経傷害因子の抑制や神経栄養因子の増大などの神経炎症の制御へ及ぼす作用を検討した。第3章で示した通り日本を代表する食用菊である阿房宮と延命楽はその構成成分や存在比が大きく異なることより、両栽培品種の抽出物による活性比較を行ない、活性成分の考察や各栽培品種の食品機能特性の評価を試みた。また、中枢神経系と末梢の免疫反応は密接に関連していることより、食品成分の脳内免疫へ及ぼす作用は実際には、直接的なものと中枢-末梢相関を介した作用の両方によることより、末梢の免疫を担うマクロファージ (RAW 264.7) に対する炎症制御反応への作用の検討も行った。

6.2 実験結果と考察

6.2.1 免疫細胞における炎症反応誘発条件および菊抽出物の処理濃度条件

菊抽出物のマクロファージに対する炎症抑制作用の検討を始めるに当たり、炎症の惹起条件について検討した。感染等においてマクロファージは細菌の構成成分を認識し、炎症性サイトカン等の産生誘導を介してリンパ球に感染防御のシグナルを伝達する。異物の認識はToll様受容体 (Toll-like receptor (TLR)) によってなされる。近年、TLRは微生物由来の成分のみならず内在性の分子も認識することが明らかとなり、自己免疫疾患や炎症性疾患との関わりが注目されている。本研究では炎症性疾患に対する作用の検討を目的としているが、TLR刺激による免疫惹起反応によっても評価を行うことができると考えられ、現在、広く行われているLipopolysaccharide (LPS) 刺激により免疫反応を誘導することにした。LPSの処理濃度は報告により様々であることから、0から2,000 ng/mLの濃度のLPSでRAW264.7細胞を刺激し免疫応答およびCell viabilityへ及ぼす影響を観察した (Fig. 6.1)。LPS添加後18時間後の培養上清中に産生されたNO濃度とCell viabilityを測定した結果、NO産生は添加のLPSが100 µg/mLになるまで濃度依存的に上昇し、その後一定となった。Cell viabilityはLPSの濃

度が 2,000 ng/mL となるまで大きな影響を受けていないことが示された。次に、菊花ヘキササン抽出物と LPS を処理した際の免疫応答および Cell viability への影響を検討した。阿房宮の菊花ヘキササン抽出物を 0 から 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で 1 時間前処理し、次いで 10 ng/mL の LPS を添加し炎症反応を誘導し、NO 濃度と Cell viability を測定した結果を Fig. 6.2 に示す。白抜きが LPS を処理していない対照群、塗りつぶしが試験群であり、活性は対照群の値に対する百分率で表した。200 $\mu\text{g/mL}$ までの濃度範囲内では Cell viability に大きな変化が無く、この濃度範囲で作用を評価できることを確認した。菊花抽出物は、50 $\mu\text{g/mL}$ 濃度において NO 産生量を対照の 50% 以下まで抑制し、有意な抗炎症作用を示し、トリテルペノイドなどがその主要な原因となっていることが示唆された。

6.2.2 菊花各抽出画分の LPS 刺激マクロファージに対する抗炎症作用の比較

抗炎症作用を示す菊花構成成分の抽出画分における所在と活性強度を検討するため、菊花のヘキササン抽出物、80%メタノール抽出物および熱水抽出物について RAW 264.7 細胞の炎症反応誘導に対する抑制作用を検討した。RAW 264.7 細胞はマウス由来のマクロファージ様細胞であり、末梢の免疫細胞である。中枢神経と末梢組織の間の免疫反応は神経および液性による相関が知られていることから、始めに菊花抽出物の炎症反応におよぼす作用について RAW 264.7 細胞を対象とし検討した。5 \times 10⁵ cells/mL 密度で播種した RAW 264.7 細胞を前培養した後、各試料を 0 から 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で 1 時間前処理した。次いで 10 ng/mL の LPS を添加し炎症反応を誘導し 12 時間培養後培養上清中に産生された NO 濃度を測定し、LPS を加えた対照の NO 産生量に対する各試験群の NO 産生量を百分率で表し、NO 産生の抑制効果を評価した (Fig. 6.3a)。菊花試料は延命薬を用いた。ヘキササン抽出物が最も高い抑制効果を示し、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 濃度において NO 産生量を対照の 50% 以下まで抑制した (t-test, P < 0.05)。ヘキササン抽出画分にはトリテルペンおよびその脂肪酸エステル類が局在することから、高い抑制活性を示したものと考えられた。メタノール抽出物は約 100 $\mu\text{g/mL}$ を超える濃度で NO 産生の抑制効果が現れるが、それより低濃度では LPS 刺激による NO 産生を助長する二相性を示した。しかし、メタノール抽出物自体には NO 産生刺激作用は無かった。メタノール抽出物の主成分はフラボノイドと考えられ、その他フェニルプロパノイド類やトリテルペン類などが含まれると考えられる。マクロファージ細胞における、これらの化合物の NO 産生に対する作用に関する研究では、そのほとんどが産生を阻害することを報告しているが、渡辺等は RAW 264.7 細胞を用いた実験よりクロロゲン酸を主成分とする画分は LPS 刺激による NO の生産を抑制するが、イソクロロゲン酸を主成分とする画分は NO の生成を上昇させたと報告している (5)。菊花にはイソクロロゲン酸が含まれており、本研究におけるメタノール抽出物の促進効果もイソクロロゲン酸による可能性が考えられるが、産生促進の原因を特定するためにはさ

らに検討を行う必要がある。熱水抽出物は約 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超える濃度で NO 産生の抑制効果が現れた(t-test, $P < 0.05$)。山田らは熊本県の不知火姫菊についてその水抽出物が RAW 264.7 細胞の TNF- α 産生を促進したことを報告している (6)。NO 産生は測定していないが、おそらく促進していることが推測される。促進する成分は特定されていないが、活性はエタノール不溶性部分に存在し、熱に安定な分子量 66,000 以上の物質であることから高分子の糖類である可能性が強いとしている。本研究では LPS 刺激および無処理のいずれの群でも有意な NO 産生の促進効果は観察されなかった。不知火姫菊は既存の食用菊とは形態的に異なり、薬草の菊などの種類である *Chrysanthemum indicum* の種類に属するとされ、食用菊とは成分が異なることが推測される。本研究における熱水抽出物の NO 産生抑制成分については、検討は行っていないが水溶性画分に残った成分であることから、糖質である可能性が高い。

6.2.3 栽培品種による菊花抽出画分のマクロファージに対する抗炎症作用の比較

菊花抽出物の抗炎症作用について構成成分との関連から観察する試みとして栽培品種による作用の比較を行うため、阿房宮についてもヘキサン、80%メタノールおよび熱水の各抽出画分について、RAW 264.7 細胞の LPS 刺激 NO 産生に対する抑制作用を検討し、その結果を Fig. 6.3b へ示した。また、これらのデータの NO 産生抑制活性を栽培品種により比較しまとめた結果を Fig. 6.4 へ示した。阿房宮の NO 産生抑制作用は延命薬と同様の傾向を示したが、ヘキサン抽出物において延命薬では NO 産生量を対照の 50%以下まで抑制する抽出物の濃度は約 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったのに対し、阿房宮では約 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となり、両栽培品種間で抑制活性が大きく異なっていることが示された。また、熱水抽出物は抽出画分の中で抑制作用は最も低いが、抽出物の処理濃度約 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 付近より抑制作用が観察された。さらに、阿房宮で処理した細胞においては LPS 処理を行わない対照群の NO 産生が抽出物の処理濃度の上昇に伴わずかな増加傾向を示すことが観察され、変化の見られない延命薬の結果と異なった。菊花成分による NO 産生促進作用の報告は見当たらないが、TNF- α 産生促進についての報告があり、山田らは不知火姫菊の水抽出物が RAW 264.7 細胞において TNF- α の産生を促進することを報告している (6)。活性成分はエタノール不溶性を示し多糖類である可能性を示唆していて、阿房宮による NO 産生促進作用も同様の多糖類である可能性が考えられた。なお、不知火姫菊は薬草として用いられる菊の分類である *Chrysanthemum indicum* に属するが、阿房宮など食用菊の分類の *Chrysanthemum morifolium* とは異なり、成分組成も異なっているものと考えられる。阿房宮においては約 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超える濃度では LPS 刺激による NO 産生を抑制するとともに、同濃度において非刺激細胞では NO 産生を促進する、両面の作用を示していた。

両栽培品種間の LPS 刺激 NO 産生に対する抑制活性の比較 (Fig. 6.4) では、両方で顕著な相異を示す抽出画分はヘキサン抽出画分であることが示された。このことより、再度ヘキサン

抽出画分について抽出物の処理濃度の間隔をより狭くし詳しく抗炎症作用の比較を行うことにした。炎症反応の応答としてケミカルメディエーターである NO に加え炎症性サイトカインの一つである TNF- α の産生量を両栽培品種のヘキササン抽出物で測定し比較した (Fig. 6.5, Fig. 6.6)。延命薬のヘキササン抽出物は LPS 刺激によって産生された NO, TNF- α のいずれも顕著に抑制し、培養上清中の濃度を低下させたのに対し、阿房宮の抽出物の抑制効果は延命薬と比べ弱いことが示された。NO および TNF- α の産生抑制の結果を栽培品種による比較のグラフに書き改めたものを Fig. 6.7 に示す。NO 産生阻害は、延命薬では約 IC₅₀: 20 μ g/mL であるのに対し阿房宮では約 IC₅₀: 120 μ g/mL であった。また、TNF- α の阻害活性は延命薬では約 IC₅₀: 30 μ g/mL であるのに対し阿房宮では約 IC₅₀: 100 μ g/mL であった。延命薬および阿房宮はともに同じ *Chrysanthemum morifolium* に属するキク科植物であるにもかかわらず、このように活性が大きく異なることは興味深い。前述のようにヘキササン抽出物の主成分はトリテルペノイドおよびその脂肪酸エステルと考えられる、抗炎症作用を示す菊花のトリテルペノイドとしては helianol, heliantriol C, faradiol, dammaradienol, cycloartenol, taraxasterol, sitosterol, lupeol 等が報告されており(7), Ukiya 等は食用菊より 24 の triterpene diol と triol, および 32 のそれらの 3-O-fatty acid ester を分離同定し、それらの抗炎症活性を評価している(8)。その結果、マウスを用いた耳介の TPA(12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate)刺激に対する抗炎症活性の評価では、その中で heliantriol C (ID₅₀; 0.03), brein (0.05), heliantriol B₂ (0.05) が強い活性を有していることを明らかにし、その活性強度はフラボノイドより強く、抗炎症剤である hydrocortisone と同レベルであることを示している。第3章において菊花ヘキササン抽出物の GC-MS 分析より、トリテルペノイドの存在を確認し、同定には至っていないが Table 3.4 で示したとおり、ライブラリー検索の結果より 4 ピークの化合物を推定し、ピーク 7 は抗炎症作用を示す β -sitosterol と推測した。また、ライブラリーにデータが収載されていないためシミラリティー検索は行えなかったが、文献の菊花トリテルペノイドに関する既存の知見より、ピーク 11 は抗炎症作用を示す faradiol, およびピーク 12 は強い抗炎症作用を示す heliantriol C であると推測した。Table 3.4 に基づき、両栽培品種の成分組成比を比較すると、延命薬に比べ阿房宮では抗炎症作用を有する β -sitosterol と推測されるピーク 7 の相対強度は約二分の一であり (延命薬: 65.2% vs. 阿房宮: 33.7%), faradiol と推測されるピーク 11 の相対強度は二分の一以下であり (延命薬: 71.2% vs. 阿房宮: 32.1%), 強い抗炎症作用を示す heliantriol C と推測されるピーク 12 の相対強度は四分の三程度に低下している (延命薬: 40.6% vs. 阿房宮: 30.3%)。従って、抗炎症活性が延命薬の抽出物に比べ阿房宮の抽出物で弱い要因としては、抗炎症活性を有すると推測されるピーク 7 およびピーク 11, 12 の化合物の組成比が低いことが主な原因と考えられた。

6.2.4 栽培品種による菊花抽出画分のミクログリア細胞に対する抗炎症作用の比較

ミクログリア細胞は脳の支持に過ぎないものと考えられていた時代があつたが、近年神経科学の進歩によりグリア細胞は脳機能の維持・調節に従来考えられてきた以上に重要な役割を果たしていることが明かにされつつある。ミクログリアは脳の免疫機構において中心的な働きをしている細胞であり、ミクログリアの本来の主な役割は、死細胞の除去や免疫担当細胞として脳組織の修復などを行うこととされている。しかしながら、活性化したミクログリアから産生される過剰量の NO は、神経変性過程でみられる神経傷害の重要なメディエーターと考えられていて、神経細胞の傷害にも関わるそう反する作用を有している。本研究は菊花成分が神経細胞の機能調節にどのような作用を有するかについて考察することを目的としており、本節では脳免疫の中心となるミクログリア細胞に対する抗炎症作用について検討した。

LPSで刺激し活性化させたミクログリア細胞に対する菊花抽出物による NO 産生抑制活性を両栽培品種間で比較した。ミクログリア細胞は株化細胞の MG5 を用い、抗炎症作用の評価はマクロファージ様細胞の RAW 264.7 の検討の場合とほぼ同条件で行ったが、使用する培地は高グルコースタイプの DMEM をアストロサイト細胞で 12 時間処理した培地を用いた。Fig. 6.8 へ各濃度の菊花抽出物で MG5 細胞を処理した際の LPS 刺激 NO 産生量 (A) および cell viability (B) の変化を、対照となる LPS を刺激していない細胞のそれらと対比させ示した。また、栽培品種による NO 産生および TNF- α 産生の抑制活性を比較し Fig. 6.10 へ示した。抽出物の処理が cell viability へ及ぼす影響は、延命薬では 2.5~40 $\mu\text{g/mL}$ の範囲では cell viability は上昇しており、約 80 $\mu\text{g/mL}$ の濃度付近からやや低下し始め、160 $\mu\text{g/mL}$ では著しく減少していた(t-test, $P < 0.01$)。阿房宮においても cell viability は 2.5~80 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で上昇しており、抽出物が 160 $\mu\text{g/mL}$ でも無処理のものと同様に cell viability の低下は見られなかった。このことより試料処理濃度が約 80 $\mu\text{g/mL}$ 以内の範囲では細胞の cell viability に対し大きな影響は与えていないことが推察された。延命薬へのヘキササン抽出物は LPS 刺激により上昇する培養上清中の NO 濃度を抽出物に処理濃度に応じ濃度依存的に低下させ、約 40 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では LPS 非刺激の細胞の NO 産生量とほぼ同レベル(t-test, $P < 0.05$)にまで低下させていることが示され (Fig. 6.8a) , in vitro の実験結果ではあるが、活性化されたミクログリアの NO 過剰産生を抑制する働きのある可能性が示唆された。近年、ミクログリアの NO 産生を抑制する天然物由来や合成されたトリテルペノイド化合物が明らかにされ、さらに Kozuka 等はトリテルペノイドおよびその脂肪酸エステル体は共に血液脳関門を通過し脳細胞に蓄積することを示している(9)。従って本研究における抽出物中の抑制活性はトリテルペノイドに起因していることが推察されることから、体内に取り込まれたこれらの成分が脳の神経細胞へ到達し作用する可能性が十分に考えられる。これに対し、Fig. 6.8b に示した阿房宮では NO 産生の抑制効果は延命薬と比較して弱く、約 20 $\mu\text{g/mL}$ を超える濃度付近から抑制効果が認められた。

さらに、延命薬の場合とは異なり LPS を刺激していない細胞においても抽出物の処理によって培養液中の NO 濃度が上昇しており、2.5~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で上昇し、約 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超える濃度付近から元の濃度へと戻る傾向が認められ、抽出物の処理濃度の変化に対し二相性を示した。阿房宮のヘキササン抽出物中には NO 産生を刺激する成分が含まれていることが示唆された。本章では NO の過剰生産に対する抑制作用の観点より検討を行っているが、NO は本来生体において多彩な役割を果たしている重要な生理活性分子である。中枢神経系において NO は神経伝達物質や細胞内セカンドメッセンジャーとしての働きや、神経修復に係る神経可塑性へ関与が明らかにされており、生理的レベルの範囲内での NO 産生昂進作用は神経細胞の新生や保護・修復に役立つ可能性が考えられる。

次に活性化ミクログリア細胞が分泌する炎症性サイトカインである TNF- α 産生に対する菊花抽出物の影響を観察した (Fig. 6.9, Fig. 6.10)。延命薬から調製した抽出物で処理したミクログリア細胞では、その培養上清中の上昇している TNF- α 濃度が、抽出物の処理濃度に従い濃度依存的に低下し、約 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で著しく低下 (t-test, $P < 0.05$) していることが示された (Fig. 6.9a)。従って、延命薬の抽出物はマクロファージ様細胞 RAW 264.7 のみならず、中枢に存在する活性化されたミクログリア細胞に対する TNF- α 産生を抑制する活性も有することが示された。活性物質は抽出物の主成分であるテルペノイドであると考えられる。しかし、阿房宮から調製した抽出物で処理したミクログリア細胞では、培養上清中の TNF- α 濃度は、抽出物の処理濃度を 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで上げて大きな変化は認められず、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で減少する傾向がみられ、延命薬に比べ抑制作用が低いことが示された (Fig. 6.9b)。このことは、前節のマクロファージ様細胞での抗炎症作用のところで論じたように、阿房宮の抽出物では抗炎症活性を有する、faradiol, heliantriol C および β -sitosterol と推測される成分の組成比率が延命薬に比べ低いためと考えられた。また、実験では対照として、LPS 非刺激の活性化していないグリア細胞へ抽出物を処理した結果についても対比して示している (白抜き棒グラフで示す)。延命薬および阿房宮のいずれの抽出物の処理によっても、LPS 非刺激のグリア細胞の培養上清中の TNF- α 濃度が上昇することが観察され、抽出物の処理濃度が高くなるとその作用は失われた。同様の現象は先に示した、NO 産生における阿房宮の抽出物で処理したミクログリア細胞で観察されたが、TNF- α では両栽培品種で認められた。延命薬では 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度で最も高くなり、阿房宮では 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理濃度で最も高かった。村上はトリテルペンの 1 種であるウルソール酸が LPS で刺激したマクロファージの炎症関連メディエーターの産生を顕著に抑制するとともに、LPS 非刺激のマクロファージに対してはウルソール酸の処理により、炎症性サイトカインの 1 種である M ϕ migration inhibitory factor (MIF) や interleukin-18 (IL-18) の産生を増加させることを報告している (10)。すなわちウルソール酸は炎症刺激を加えたマクロファージにおいては抗炎症的に働くが、無刺激状態の細胞には

免疫賦活的に働く二面性を示すことを明らかにしている。さらに、村上は免疫賦活機構の解明を試み、Ursolic acid は細胞膜表面の CD36 (異物貪食に関与するスカベンジャー受容体の 1 種) に結合することで活性酸素の生成や mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の活性化を促し、炎症性サイトカインの産生を促進することを明らかにしている。この賦活化はウルソール酸の構造類縁体では観察されず、また、細胞は ICR 系マウスの腹腔 M ϕ を用いた実験で賦活化が示されるが、他のストレインの動物や RAW264.7 細胞などの株化細胞では非常に弱いか全く観察されず、特異的な現象としている。前述のように本章では主に NO の過剰生産に対する菊花成分の抑制作用の観点より検討を行っているが、菊花成分が神経細胞の機能調節にどのような作用を有するかを考察することが目的であり、菊花成分がミクログリア細胞に対し免疫賦活作用を有するか否かは重要な知見であり、今後詳しく検討されるべき課題と考えられる。

6.2.5 菊花抽出物の神経栄養因子分泌に対する作用

ミクログリアの本来の主な役割は、死細胞の除去や免疫担当細胞として脳組織の修復などを行うこととされている。グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) は黒質ドーパミンニューロンの生存維持因子として発見されて以来、多くの研究が進められている。近年、脳の損傷や虚血などの低酸素傷害時に、GDNF がマクロファージやミクログリアなどの免疫系の細胞にて急速に誘導されることが報告されている。変性に陥った神経細胞の周囲に活性化されたミクログリアの存在が確認されおり、神経保護作用を担っていると考えられおり、その際 GDNF が誘導されているものと思われる。GDNF 産生に対する菊花抽出物の影響をミクログリア細胞により検討した。20, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の菊花抽出物および 10~1,000 ng/mL の LPS により MG5 細胞を処理し培養上清中の mGDNF をウエスタンブロッティングにより検討した結果を Fig. 6.11A に示す。条件を加えていない対照において、GDNF が観察された。このバンドと比べ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の菊花抽出物処理では大きい変化は観察されなかった。80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞傷害が現れ減少している。LPS 刺激では 10 ng/mL では変化は認められなかったが、250、1,000 ng/mL では分泌が抑制された。これは、ミクログリア細胞が活性化されたためと思われる。今回は定量的な GDNF 分析ではないため、これらの GDNF 産生へ及ぼす影響を判断することはできず、今後検討されるべき課題と考えられた。

6.3 結言

神経変性疾患の発症機序の多くは不明である。各種の神経変性疾患にはそれぞれに特異的な機序が想定されるが、共通の病理所見として病変部位には活性化されたミクログリアやアストロサイトの集積や、変性神経細胞の周囲には炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 の存在

が確認される。このようなことから神経変性疾患発症の引き金には、ミクログリアの活性化や慢性炎症の常態化が共通の要因になっているとの見方が一般化している。本章においては、抗炎症作用が菊花の最も基本となる薬効であることから(11)、脳内の免疫調節で中心的な役割を担うグリア細胞に着目し、菊花抽出物の神経傷害因子産生の抑制や神経栄養因子発現の増大などの神経炎症の制御へ及ぼす作用を検討した。

中枢神経の炎症には末梢の免疫反応も密接に関与することから、はじめに末梢のマクロファージ様株化細胞である RAW264.7 における炎症抑制効果について、3 画分にわけた各菊花成分の比較ならびに栽培品種間の比較を行い検討した。菊花が示す抗炎症作用は主にトリテルペノイドに起因することが知られており、本研究においても、トリテルペノイドが主に回収されるヘキササン抽出画分に最も強い NO 産生抑制活性が認められることを確認した。また、延命薬および阿房宮より調製した栽培品種の異なる試料の比較では活性が大きくことなることを認めた。いずれの菊も同一農地で栽培されほぼ同時期に収穫したものであることより活性の差は栽培品種の違いによるものと考えられた。第 3 章においてトリテルペノイド組成が栽培品種により異なることを示しており、活性の差は組成の相異によるものと考えられるが、各成分個々の活性比較は行っておらず化合物による具体的な説明は行えないが、化合物と活性の相関については今後の課題である。次に、脳内で中心的な免疫調節を担うグリア細胞に対する菊花抽出物の作用について、先の RAW264.7 と同様な検討を行った。神経変性疾患の治療は、その発症機序が未解明であることから完全なものでは無く、新たな治療法が模索されており、特にグリア細胞の炎症経路を標的とする新たな治療アプローチは現在最も注目を集めている研究領域であり(12)、グリア細胞の抗炎症に関する多くの情報や知見が必要とされている。延命薬のヘキササン抽出物により処理したミクログリア細胞 (MG5) では、LPS 刺激に応じて分泌される TNF- α および NO のレベルが減少し、菊花は有意な炎症抑制効果を示す成分を含んでいることが示された。活性を持つ成分はトリテルペノイドと考えられるが、トリテルペノイドおよびその脂肪酸エステル体は共に血液脳関門を通過し脳細胞に到達することが明らかとなっており(9)、介入試験などによる作用の検証を待つことになるが、菊花の摂取は中枢神経の免疫状態を穏やかに保つのに有効である可能性が考えられる。トリテルペノイドが中枢神経細胞を保護するメカニズムについては、Tran 等が LPS で活性化されたミクログリア細胞 (VB2) において nM レベルのトリテルペノイドが炎症関連遺伝子 (TNF- α , IL6 等の遺伝子) の発現を緩和することを報告し(4)、Pareek 等はトリテルペノイドが Keap 1-Nrf 2 制御系を介して HO-1 などの生体防御に関わる遺伝子群を活性化し、炎症反応を緩和していることを報告している(13)。本研究ではミクログリア細胞の Nrf 2 の変動については検討していないが、第 5 章において菊花抽出がニューロン細胞 (SH-SY5Y) の核内 Nrf 2 レベルを上昇させることを明ら

かにしており、本研究においても Nrf2-ARE 系が働いていることが予想される。また、栽培品種による比較では RAW264.7 の研究と同様に品種により活性が大きく異なることを認めた。

本研究では菊花抽出物の処理によりミクログリア細胞の炎症性サイトカイン (TNF- α) や活性酸素 (NO) の産生が刺激される可能性が示され、ミクログリア細胞の神経細胞保護における 2 面性を示す結果となった。LPS 非刺激の活性化させていないミクログリア細胞へ菊花ヘキササン抽出物を処理した結果、いずれの栽培品種においても培養上清中の TNF- α 濃度の上昇が観察された。前述のようにテルペノイドが炎症関連メディエーターの産生を促す例外的なケースとしては、テルペノイドのウルソール酸が ICR マウスの腹腔 M ϕ を用いた実験で免疫賦活化が生じることが報告されているのみで、中枢神経細胞であるミクログリア細胞における報告は見当たらない。菊花にミクログリア細胞に対する免疫賦活化活性を有する成分が本当に存在するのか、存在した場合どのような化合物であるかは今後解明されるべき課題である。ミクログリアは免疫調節機能や神経栄養因子分泌など様々な働きを介して、中枢内の死細胞の除去や脳組織の修復、機能の保持などを行っている。今後これらの点が明らかにできれば、菊花成分の摂取は平常時においてはミクログリア細胞の以上の機能を促すのに役立つ可能性が考えられる。

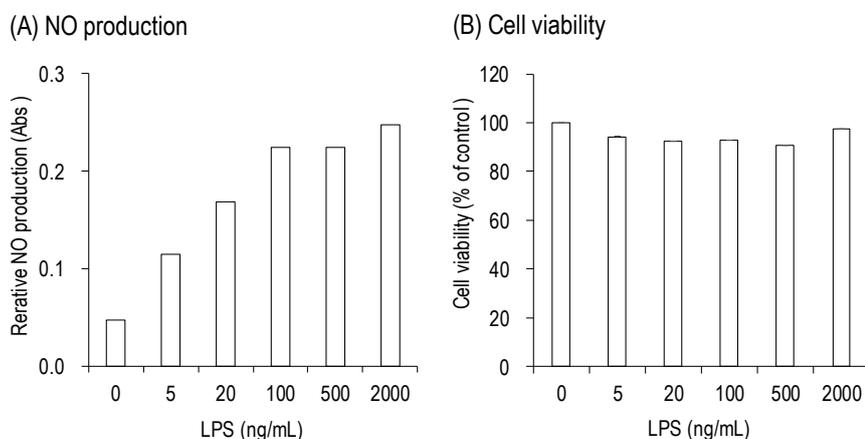


Fig. 6.1 NO production (A) and cell viability (B) in RAW264.7 cells stimulated with various concentrations of lipopolysaccharide (LPS)

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were treated with LPS (0 to 2000 ng/mL) for 18 h. NO concentration in the culture medium was determined using the Griess assay. Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay. Each bar presents the mean from two data.

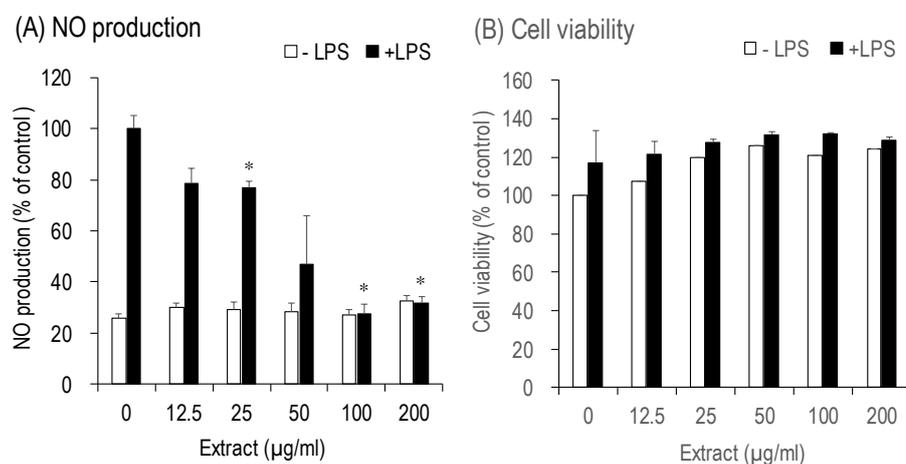
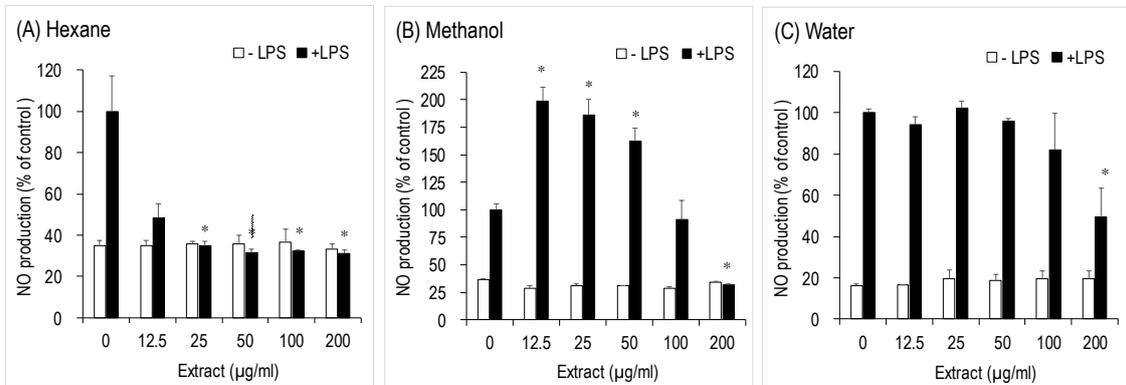


Fig. 6.2 Effects of *Chrysanthemum* petal hexane extracts on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were treated with various concentrations of hexane extracts (0 to 200 µg/mL) from Aboukyu with or without LPS (10 ng/mL) for 12 h. NO concentration in the culture medium was determined using the Griess assay. Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay. Each bar presents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 µg/mL).

a. Enmeiraku



b. Aboukyu

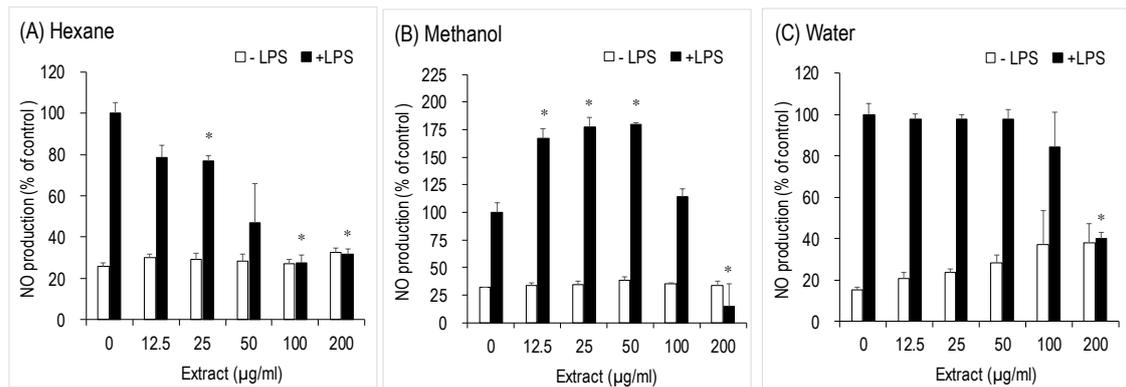


Fig. 6.3 Effects of *Chrysanthemum* petal extract (Enmeiraku, Aboukyu) on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Petals of Enmeiraku (a) and Aboukyu (b) were extracted with hexane, 80 % methanol and hot water successively. RAW264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were treated with various concentrations of hexane (A), methanol (B) and water (C) extracts (0 to 200 µg/mL) with or without LPS (10 ng/mL) for 12 h. NO concentration in the culture medium was determined using the Griess assay. Each bar presents the mean \pm SD. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 µg/mL).

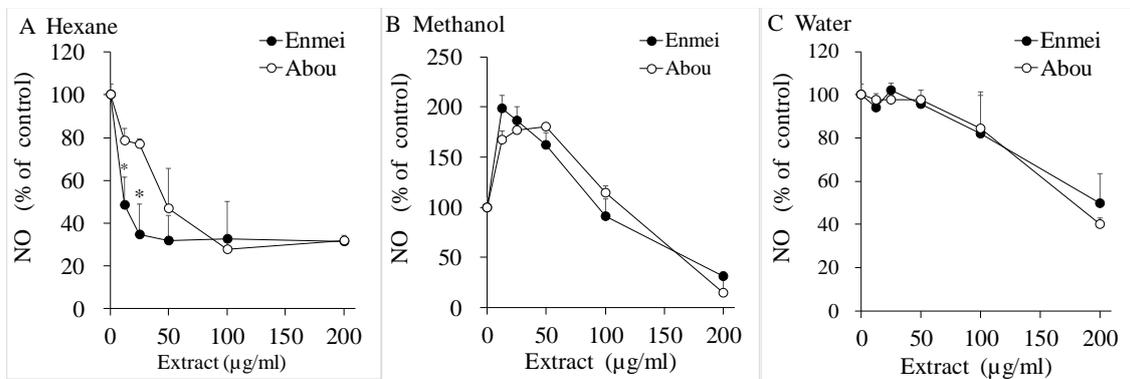
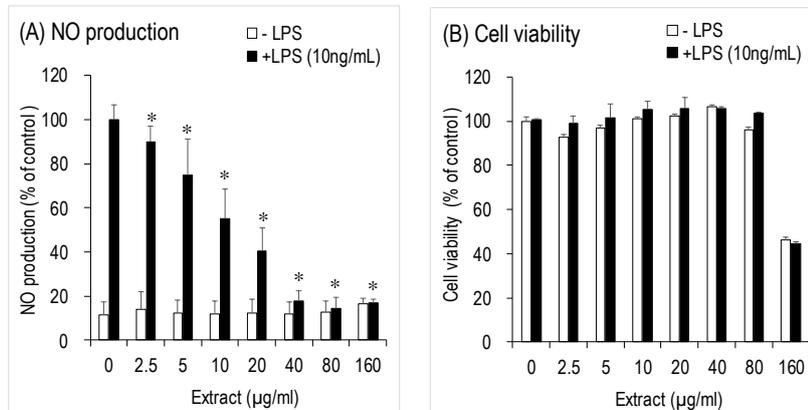


Fig. 6.4 Comparison of inhibitory effects of Chrysanthemum petal extracts (hexane, methanol and water) on the expression of LPS-stimulated NO production in RAW 264.7 by cultivars (Aboukyu and Enmeiraku)

RAW264.7 cells (5×10^5 cells/mL) were treated with various concentrations of hexane (A), methanol (B) and water (C) extracts (0 to 200 $\mu\text{g/mL}$) with or without LPS (10 ng/mL) for 12 h. NO concentration in the culture medium was determined using the Griess assay. Values are the mean \pm SD. Significant differences from the value of the corresponding another cultivar group, * , $p < 0.05$.

a. Enmeiraku



b. Aboukyu

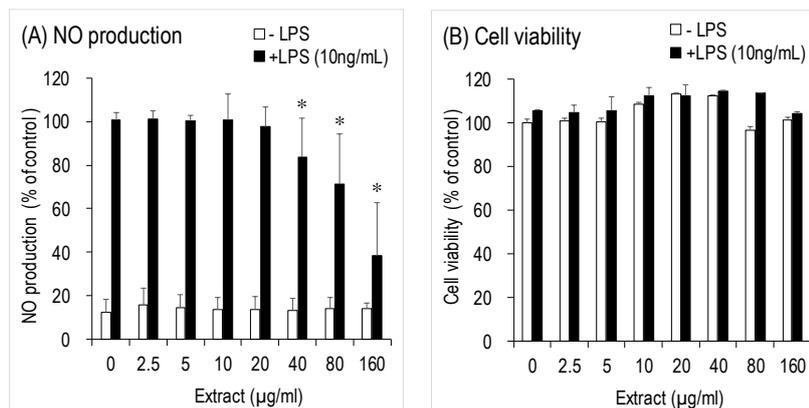
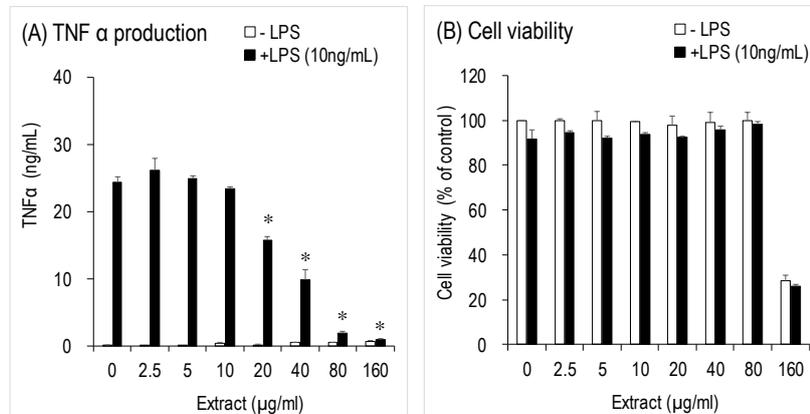


Fig. 6.5 Effects of Chrysanthemum petal extract (Enmeiraku, Aboukyu) on the production of NO in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW264.7 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts of Enmeiraku (a) and Aboukyu (b) for 2h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and NO levels in media determined by Griess assays (A). Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay (B). Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 μ g/mL).

a. Enmeiraku



b. Aboukyu

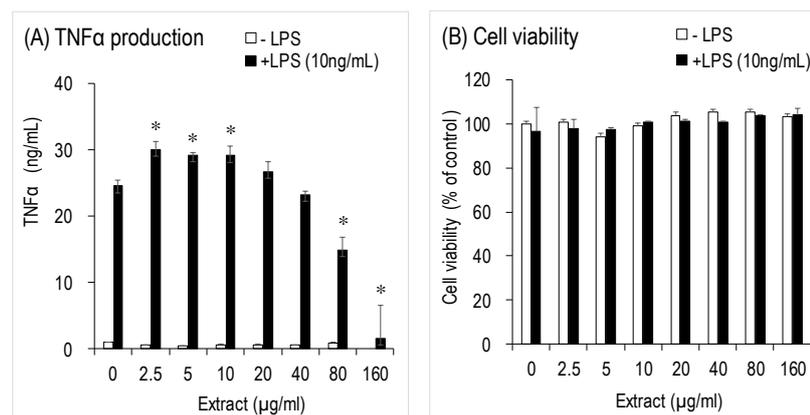


Fig. 6.6 Effects of Chrysanthemum petal extract (Enmeiraku, Aboukyu) on the production of TNF-α in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

RAW264.7 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts of Enmeiraku (a) and Aboukyu (b) for 2h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and TNF-α levels in culture media were determined by biological assay using actinomycin D-treated L929 cells (A). Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay (B). Values are the mean ± SD. *, p<0.05 versus LPS treated control (0 μg/mL).

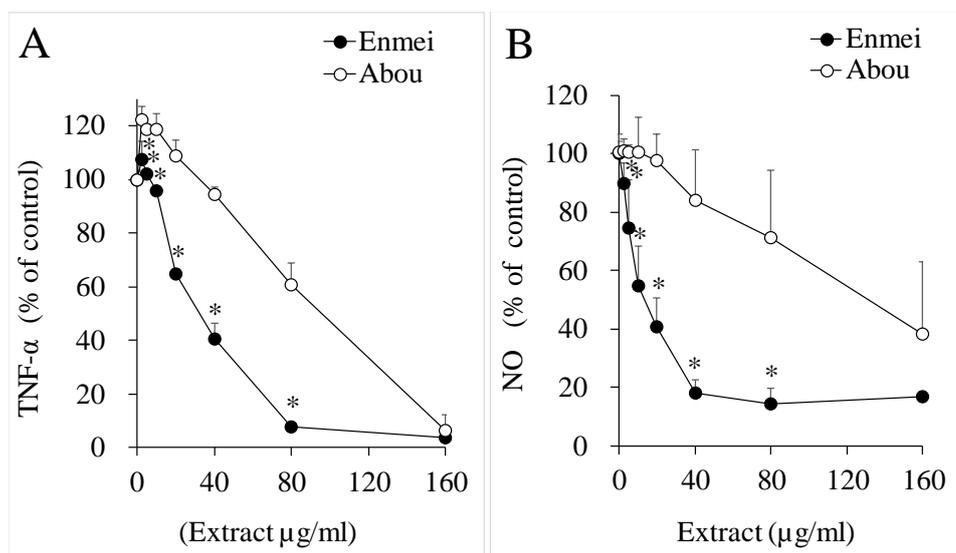
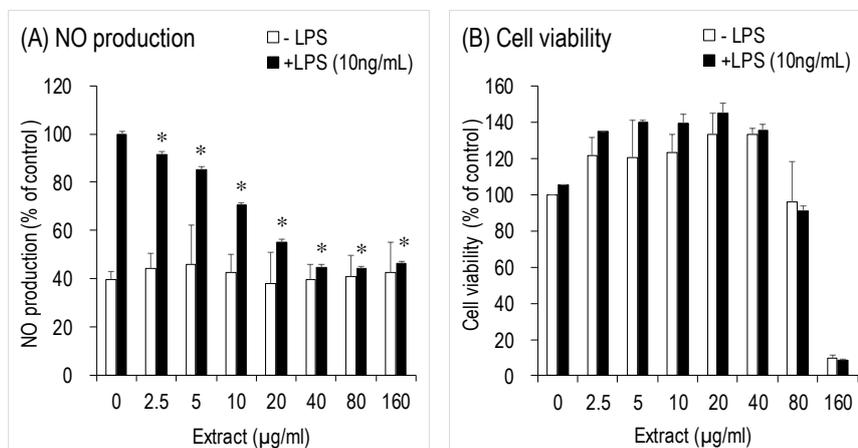


Fig. 6.7 Comparison of inhibitory effects of hexane extracts on LPS-stimulated TNF- α and NO production in RAW 264.7 by Chrysanthemum cultivars Aboukyu and Enmeiraku

RAW264.7 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts for 2 h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and TNF- α levels in culture media were determined by biological assay using actinomycin D-treated L929 cells (A). NO levels in media determined by Griess assays (B). Values are the mean \pm SD. Significant differences from the value of the corresponding another cultivar group, *, $p < 0.05$.

a. Enmeiraku



b. Aboukyu

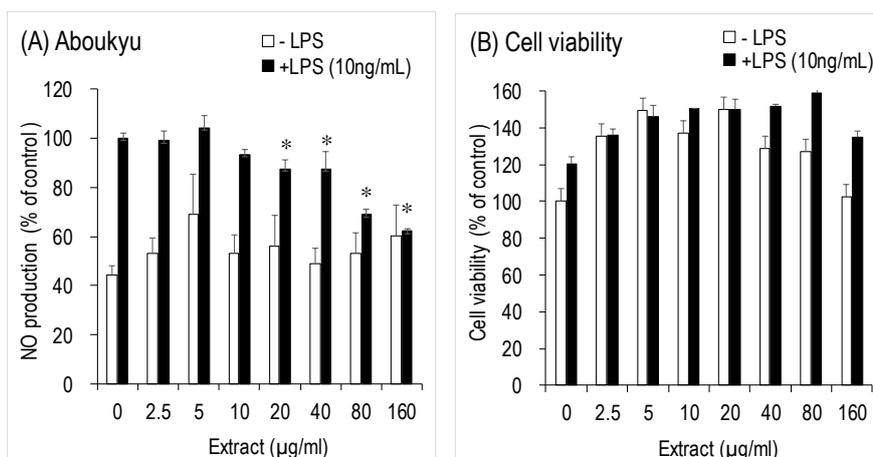
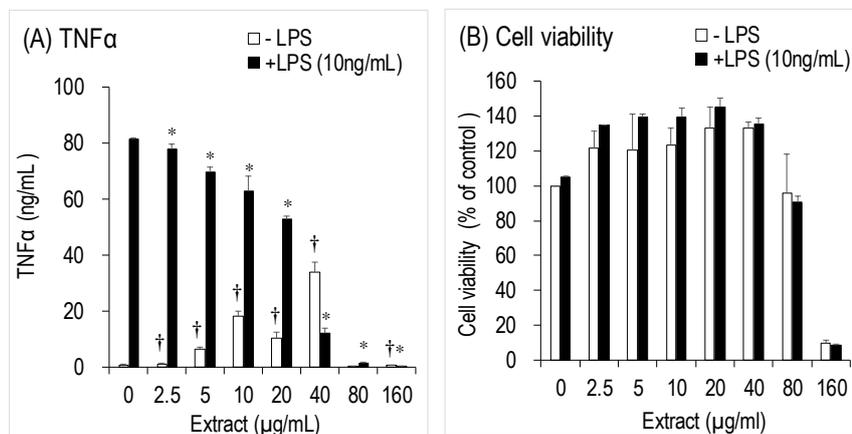


Fig. 6.8 Effects of Chrysanthemum petal extract (Enmeiraku, Aboukyu) on the production of NO in LPS-stimulated MG5 cells.

MG5 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts of Enmeiraku (a) and Aboukyu (b) for 2h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and NO levels in media determined by Griess assays (A). Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay (B). Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 $\mu\text{g/mL}$).

a. Enmeiraku



b. Aboukyu

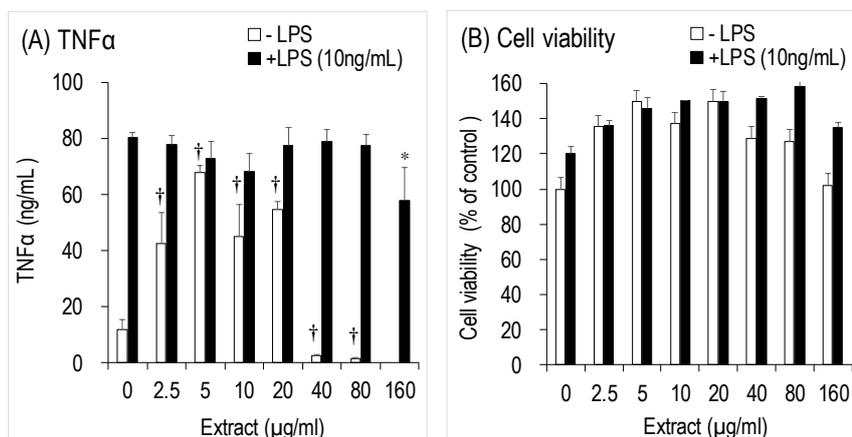


Fig. 6.9 Effects of Chrysanthemum petal extract (Enmeiraku, Aboukyu) on the production of TNF- α in LPS-stimulated MG5 cells.

MG5 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts of Enmeiraku (a) and Aboukyu (b) for 2h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and, TNF- α level in culture media were determined by biological assay using actinomycin D-treated L929 cells (A). Cell viability was evaluated using the CCK-8 assay (B). Values are the mean \pm SD of triplicate experiments. *, $p < 0.05$ versus LPS treated control (0 $\mu\text{g/mL}$). [†], $p < 0.05$ versus LPS untreated control (0 $\mu\text{g/mL}$).

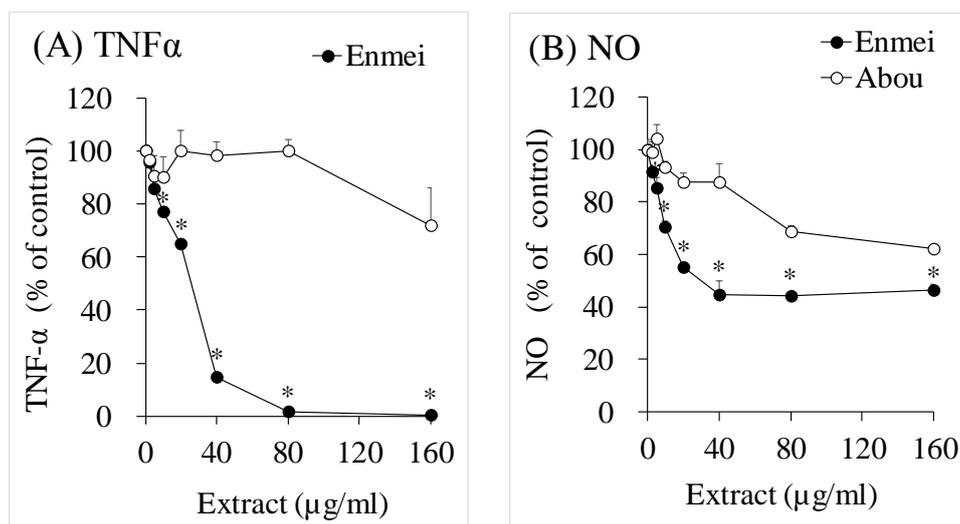


Fig. 6.10 Comparison of inhibitory effects of hexane extracts on LPS-stimulated TNF- α and NO production in MG5 by Chrysanthemum cultivars Aboukyu and Enmeiraku

MG5 cells seeded in 96-well plates and pre-treated with Chrysanthemum hexane extracts for 2 h before the addition of 10 ng/mL LPS for 24 h. Supernatants were collected, and TNF- α levels in culture media were determined by biological assay using actinomycin D-treated L929 cells (A). NO levels in media determined by Griess assays (B). Values are the mean \pm SD. Significant differences from the value of the corresponding another cultivar group, *, $p < 0.05$.

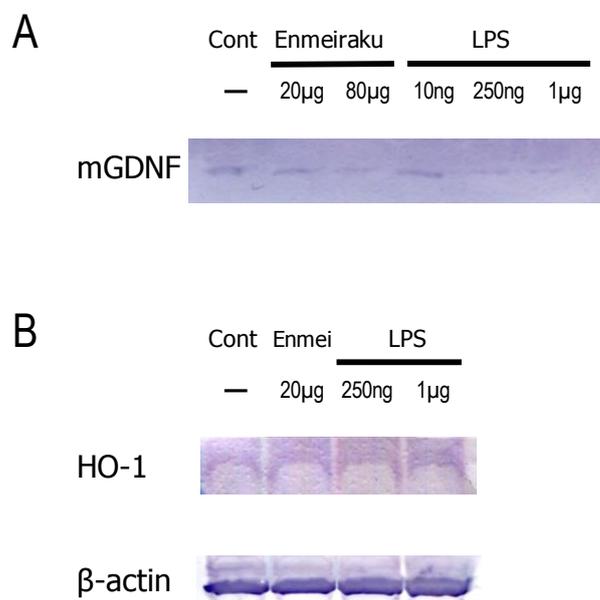


Fig. 6.11 Levels of mGDNF in culture medium (A) and induction of HO-1 (B) in Chrysanthemum extract treated MG5 cells

Cells were treated with extracts of Enmeiraku (20 - 200 μ g/mL) or LPS (10ng - 1 μ g/mL) treated for 24 h. Western blotting analysis was conducted to measure secretion of GDNF in culture medium (A) and induction of cytoplasmic HO-1 (B) protein.

6.4 引用文献

- 1 Lucas, S. M., Rothwell, N. J., and Gibson, R. M. (2006). The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, **147**, 232–240.
- 2 Perry, V. H. and Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.*, **35**, 601-612.
- 3 日本薬学会 HP トリテルペン, <http://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi?トリテルペン>
- 4 Tran, T. A., McCoy, M. K., Sporn, M. B., and Tansey, M. G.(2008). The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *Journal of Neuroinflammation*, **5**, 1-14.
- 5 渡辺 悟, 三沢 尚子, 坂上 宏 (2003) クロロゲン酸類の DPPH ラジカル消去活性とマウスマクロファージ様細胞に対する影響について, 聖徳栄養短期大学紀要, 34, 7-11
- 6 児林聡美, 小川直人, 藤村由紀, 立花宏文, 山田耕路 (2006) 不知火姫菊抽出液の TNF- α 産生促進効果, 日本食品科学工学会誌, 53, 430-436
- 7 Ranxin, S., Choon, N. O., and Han-Ming, S. (2004). Pharmacological and chemopreventive studies of *chrysanthemum*. In *Herbal and Traditional Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, pp. 351-378. CRC press.
- 8 Ukiya, M., Akihisa, T., Yasukawa, K., Kasahara, Y., Kimura, Y., Koike, K., Nikaido, T., and Takido, M. (2001). Constituents of compositae plants. 2. triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3187–3197.
- 9 Kozuka, C., Sunagawa, S., Ueda, R., Higa, M., Tanaka, H., Okabe, C. S., Ishiuchi, S., Takayama, C., Matsushita, M., Tsutsui, M., Miyazaki, J. I., Oyadomari, S., Shimabukuro, M., and Masuzaki, H. (2015). γ -Oryzanol protects pancreatic β -cells against endoplasmic reticulum stress in male mice. *Endocrinology*, **156**, 1242-1250.
- 10 Ikeda, Y., Murakami, A., and Ohigashi, H. (2008). Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 26-42.
- 11 Wu, T. Y., Khor, T. O., Saw, C. L. L., Loh, S. C., Chen, A. I., Lim, S. S., Park, J. H. Y., Cai, L., and Kong, A. N. T. (2011). Anti-inflammatory/anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *The AAPS Journal*, **13**, 1-13.

- 12 錫村明生 (2014) 神経変性疾患, 神経炎症とミクログリア, 臨床神経学, 54, 1119-1121
- 13 Pareek, T. K., Belkadi, A., Kesavapany, S., Zaremba, A., Loh, S. L., Bai, L., Cohen, M. L., Meyer, C., Liby, K. T., Miller, R. H., Sporn, M. B., and Letterio, J. J. (2011). Triterpenoid modulation of IL-17 and Nrf2 expression ameliorates neuroinflammation and promotes remyelination in autoimmune encephalomyelitis. *Sci. Rep.*, 1, 1-11.

第7章 結論

菊花は、解熱、解毒、鎮痛、消炎等に有効な薬あるいは食材として古くより利用されてきた。食品を積極的に疾病予防や健康増進に役立てようとする世界的な動きにより、既に健康機能を表示した多くの食品が存在する。野菜および果実のフェノール化合物（フィトケミカル）には様々な生理・薬理効果が知られ、健康に役立てられることが期待され、生鮮食品に対する効能表示制度が発足した。しかし、生鮮食品は品種をはじめ種々の条件により、その効能が異なること等により、効能を表示した生鮮食品は現在2種類の作物のみである。そのため、生鮮食品においては品種ごとに、有効成分と健康機能の明確な因果関係を明らかにするシステマティックレビューを行うために必要な、学術資料や知見の蓄積が重要となっている。本研究では、菊花が示す優れた消炎、解毒等の作用に着目し、中枢神経であるニューロン細胞、および中枢の免疫反応を制御するグリア細胞に対する菊花抽出物の酸化傷害保護作用、抗炎症作用について明らかにした。これまで、食品や天然成分の神経機能に対する作用について膨大な研究がなされてきたが、今日表示できる保健機能用途に神経の健康機能に関する枠組みは無い（特定保健用食品）。しかし、神経疾患患者は年々増大し、現在神経疾患は五大疾病の一つに加えられ、「生活習慣病としての精神疾患」という概念も生まれている。この概念からの取り組みの一環として、食品や天然成分の神経機能の健全性への活用は検討されるべき重要な課題となっており、これらの研究は、これまで取り組みが十分進められてこなかった神経疾患分野における予防医学的な検討にも資することが考えられる。

精神疾患の発症機序の多くは不明である。近年、酸化ストレスや慢性炎症による神経細胞の変性や傷害が、痴呆症からうつ病までの広範な神経疾患の本質的な共通する発症要因になっていると考えられるようになり、酸化ストレスの防御や神経可塑性の回復、ミクログリア細胞における神経炎症反応の制御等が新たな治療標的として研究が進められている。本来生体内でこれらの神経細胞の新生・分化や機能の維持・調節を担っているものは生体高分子化合物であり、体内寿命は短く、血液脳関門を通過できないため治療へ直ちに応用することはできない。このため、治療薬の開発や食事・食習慣改善による神経防御システムの機能低下の改善などの検討においては、上記の変性の改善に有効な低分子化合物の創出や発見を目指すことになるが、有効化合物を得る糸口となる化合物の抽出に当たっては、長い食経験がある食品や天然物に含まれるフィトケミカルの検討が重要となる。化合物の評価においては単離された化合物の構造解析と生理活性試験による構造-活性相関の研究が治療薬開発に有益な知見を与える。本研究においては、後者の栄養生理学的な食材を基準とした機能評価を目指す立場より、複成分系の菊花抽出物について神経保護効果を栽培品種の比較により検討した。食用菊のほとんどの栽培品種は同属 (*Chrysanthemum morifolium*) に分類されており、対象としたフィトケミカルのフラ

ボノイドおよびトリテルペノイドを構成する化合物は、阿房宮および延命薬間ではほぼ一致していることが明らかになった。一方、神経細胞の酸化傷害保護効果およびグリア細胞の抗炎症作用は活性強度および作用特性が大きく異なることを認め、構成する化合物の組成比率の比較より、酸化傷害保護作用については、アピゲニンおよびルテオリンの含有量と存在比率が活性発現の主要な要因であること、また、菊花の抗炎症作用については、同定には至っていないが、フラジオールおよびヘリアントリオールCと推測される化合物が主要な活性成分となっていることを明らかにした。以下に菊花成分による中枢神経の保護作用検討に関する各章のまとめと、概念図 (Fig. 7.1) を示した。第3章では日本の代表的な食用菊の栽培品種である阿房宮と延命薬について、そのフラボノイド、テルペノイド、クロロゲン酸類等の成分組成を比較した。菊花乾燥重量当たり、溶媒抽出物の約80%はメタノールに可溶性成分で占められ、フラボノイド化合物の組成比の高いことが示唆された。ヘキサン抽出物は延命薬に比べ阿房宮で高い値を示した。全フェノール化合物の含有量は阿房宮の方が延命薬に比べ約2倍高い値を示し、栽培品種により大きく異なった。菊花の生理作用に大きく関わる、アピゲニン (apigenin) およびルテオリン (luteolin) の含有量は、延命薬では阿房宮に比べルテオリン含有量が高くアピゲニン含有量が低く (Fig. 7.1 ③), 阿房宮ではその関係は逆となっており (Fig. 7.1 ④), 両化合物の存在比の相違は、阿房宮と延命薬のフラボノイド組成の相違を特徴づけるものであった。HPLC-DAD 分析結果より、メタノールに可溶性主要な12の化合物の約半数はアピゲニン、ルテオリン、およびそれらの配糖体で構成されていることが示された。これらの化合物は両栽培品種で共通であったが、その組成比は大きく異なり、品種によりアピゲニン (およびその配糖体) またはルテオリン (およびその配糖体) に偏っていた。次に、菊花のテルペノイドをEI-GC-MSにより検討し、抽出物のトリテルペノイド組成は栽培品種間で類似していることを確認した。しかし、延命薬に比較して阿房宮においてはピーク7, 11, 12 (Table 3.4) のトリテルペノイドの相対強度が低く (Fig. 7.1 ④), 栽培品種間の化合物の組成比の主な相違となっていることが示唆された。これらの化合物は同定には至らなかったが、いずれも抗炎症作用を有する、 β -シトステロール、フラジオールおよびヘリアントリオールCと推測された。

神経細胞は神経突起伸長および神経回路の再構成を行ない高度の脳機能を維持している。このような神経細胞の新生や生存、修復などはBDNFなどの神経栄養因子の働きにより維持されており、神経栄養因子の働きを高めることは神経疾患の治療手段として注目されている。菊花成分は神経栄養因子と似た働きを示すことが知られており、第4章ではPC12細胞の突起伸長を指標として、菊花抽出物の神経栄養因子様作用を栽培品種で比較した。菊花抽出物の刺激により突起伸長が誘導されたが、その誘導スコアは約25%程度と低かった。しかし、菊花抽出物は神経成長因子 (NGF) の突起伸長誘導能を相乗的に約70%にまで高めることが示された。このことから、菊花成分は突起伸長に対し直接作用する可能性は考えにくいですが、脳内で神経栄

養因子の作用を高め神経回路の再構成や修復に関与する可能性が示された。神経突起伸長の誘導に関わるシグナル伝達路、ERK1/2の活性化は延命薬と比べ阿房宮抽出物で高かったが、突起伸長スコアに差は無く、これらのシグナルは突起伸長に不可欠であるものの、活性化の度合いは突起伸長誘導のスコアとは相関しないことが示された。

神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であり、神経変性疾患の発症や進行の大きな要因となっている。植物の二次代謝物であるフェノール化合物には酸化ストレスを制御する機能が知られており、神経変性疾患の予防や進行の遅延の新薬開発においてはリード化合物として極めて重要と考えられている。第5章では、菊花抽出物の神経細胞に対する酸化傷害の緩和作用について、栽培品種の比較により検討した。菊花メタノール抽出物は保護作用を示し、延命薬では濃度依存的な保護効果が認められた (Fig. 7.1①)。しかし、阿房宮では低濃度では保護効果を示すが濃度の上昇に伴い保護作用は低下する二相性を示した。菊花抽出物にはルテオリンなどをはじめとする抗アポトーシス活性をもつ多くのフラボノイド分子種が存在することから

(Fig. 7.1③)、酸化傷害保護作用はアポトーシス誘導の抑制作用の結果と考えられた。また、阿房宮ではアポトーシス誘導を促すフラボノイドである、アピゲニン含有量高いため (Fig. 7.1④)、高濃度では保護作用は失われたと考えられた (Fig. 7.1②)。栽培品種による成分組成の相違が、保護作用の特性を大きく変化させることを具体的な例として示した。生体の抗酸化システムである Nrf2-ARE 系は活性酸素種に反応し抗酸化酵素を誘導し防御機能を果たす。酸化ストレスを負荷する前に神経細胞を菊花抽出物で処理することにより、神経細胞の酸化傷害は緩和された。また、菊花抽出物の処理により神経細胞の Nrf2 と抗酸化酵素 HO-1 の発現量が高まった。以上のことから、菊花抽出物は Nrf2-ARE 経路の活性化を介し生体防御機構の能力を高め (Fig. 7-1⑤)、神経細胞の酸化ストレスの緩和に役立つ可能性が考えられた。これらの効果はルテオリン含有量の高い延命薬抽出物で高かった。

神経変性疾患の発症機序の多くは不明であるが、神経変性疾患発症の引き金には、ミクログリアの活性化や慢性炎症の常態化が共通の要因になっているとの見方が一般化している。第6章においては、菊花の主たる薬理効果が消炎作用にあることに注目し、抽出物の神経炎症に対する抑制作用を検討した。菊花の各抽出画分について LPS 刺激マクロファージの NO 産生抑制作用を検討した結果、ヘキササン抽出画分に最も強い抑制効果を認め、活性は菊花に含まれるトリテルペノイドおよびその脂肪酸エステル類に起因していることを確認した。延命薬のヘキササン抽出物は、脳内の免疫調節で中心的な役割を担うグリア細胞に対し、LPS 刺激 NO 産生および炎症性サイトカインである TNF- α 産生を顕著に抑制した。トリテルペノイドおよびその脂肪酸エステルは血液脳関門を通過し脳内へ到達することが知られており、菊花成分が脳内で活性化したグリア細胞の炎症誘導反応を抑制する可能性が示唆された (Fig. 7.1⑥)。しかし、阿房宮の抽出物の抑制作用は延命薬に比べ著しく弱かった (Fig. 7.1⑦)。第3章より阿房宮の抽

出物に含まれるトリテルペノイドの組成比では、延命薬と比べ、 β -シトステロール、フラジオールおよびヘリアントリオールCと推測された、抗炎症作用を有する化合物の組成比が低いことが認められ (Fig. 7.1③, ④)。従って、抗炎症作用を引き起こす菊花の成分としてはヘリアントリオールCなどこれらの化合物が主体となっているものと考えられた。

本研究においては *in vitro* の系において、菊花成分の中樞神経保護作用を栽培品種の比較で明らかにしたが、今後、動物実験や介入試験による中樞神経に対する作用の検証が望まれる。また、神経細胞の酸化傷害保護効果においてアピゲニンが二相性を示すことや、菊花抽出物がグリア細胞に対し、活性型細胞に対しては抗炎症作用を示す一方、平常細胞へは免疫賦活作用を示す、相反する現象が観察されており、この点についても神経細胞保護の観点からどのような意義を持つか、検討が望まれる点である。さらに、*in vitro* の系の評価ではあるが、食用菊の代表的な栽培品種である阿房宮と延命薬の中樞神経保護作用は、同族の植物であるにも関わらず、作用特性や活性強度が異なることが示唆され、その特徴の違いを食品機能の活用に生かして行く方法の検討も重要な課題と考えられる。

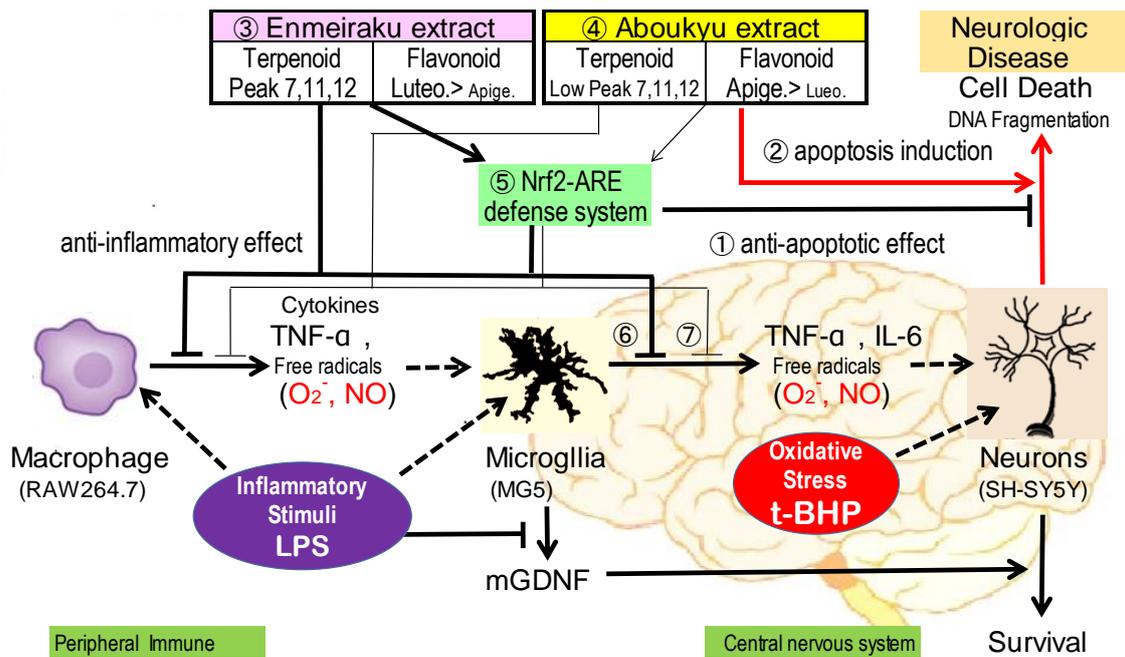


Fig. 7.1 Proposed mechanisms of neuroprotective and anti-inflammatory effects of cultivar extracts derived from *Chrysanthemum morifolium* flowers

謝辞

終わりに臨み、本研究に対しまして、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜りました八戸工業大学大学院工学研究科機械・生物化学工学専攻 若生豊教授に喪心より感謝の意を表します。

また、有益な御助言を賜りました八戸工業大学大学院工学研究科機械・生物化学工学専攻 鶴田猛彦教授、大黒正敏教授ならびに、藤田敏明教授に深く感謝の意を表します。

学位論文の研究対象である菊花の延命楽および阿房宮の貴重な試料を提供して頂いた小松国男氏に深く感謝の意を表します。また、菊花の栽培品種によるフラボノイド組成の相違に関し、ご教示賜りました、山形県工業技術センター庄内試験場 主任専門研究員 菅原哲也博士に深く感謝の意を表します。さらに、菊花成分の神経栄養因子様作用メカニズムに関する多くの知見をご教授頂き、研究を励まして下さいました、日本大学理工学部物質応用化学科 仁科淳良教授に厚く御礼を申し上げます。トリテルペノイドの GCMS 分析に際し、貴重なご助言と情報提供を賜りました、東京理科大学大学院理工学研究科 菅原二三男教授、ならびに島津製作所グローバルアプリケーション開発センター 福本真治氏に深く感謝の意を表します。

研究に関する論文読解、学位論文執筆等に対しまして日本語指導を賜りました八戸工業大学 渡辺武秀教授、山本忠准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究の遂行にあたり、ご協力を頂いた研究室の4年生、木村朱里さん、五戸澪さん、外和佑視君、中里仁哉君、前田朝葉さんへ厚く御礼申し上げます。