

# 菊花成分の中樞神経細胞保護作用に関する 食用菊栽培品種の比較による研究

馬 東 建

## 要 旨

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、その効能が変化すること等により、効能を表示した生鮮食品は現在 2 例のみである。そのため、生鮮食品においては品種ごとに、有効成分の構成と薬理効果の明確な因果関係を明らかにしたシステムティックレビューが重要となっている。一方、精神疾患は急増し大きな社会問題となっているが、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。そこで、菊花の主要な薬理作用が抗炎症作用であることに着目し、本研究では、菊花成分の中樞神経細胞に対する作用に関し、成分の分析（第 3 章）、神経栄養因子様作用（第 4 章）、酸化ストレス保護作用（第 5 章）、神経炎症反応の制御（第 6 章）について、フェノール化合物の組成が大きく異なる栽培品種の阿房宮と延命楽の比較を切り口として検討を行った。

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楽について、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な成分で占められ、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楽に比べ阿房宮で高い値を示した（5.53 % vs. 1.78 %）。全フェノール化合物の含有量は阿房宮の方が延命楽に比べ約 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、延命楽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い、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、阿房宮と延命楽のフラボノイド組成の特徴を顕著に表しているものと考えられた。HPLC-DAD 分析結果より、メタノールに可溶な主要な 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。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った。GC-MS 分析よりトリテルペノイド組成も両栽培品種で共通であるが、一部組成比が異なった。菊花の生理作用はフェノール化合物に起因するが、食用菊の代表的な

---

学位記番号と学位 : 博第 54 号, 博士 (工学)

授与年月日 : 平成 30 年 3 月 20 日

栽培品種において、その分子種や組成比が大きく異なっていることが示された。

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、その誘導スコアは低かった（阿房宮； $25.3 \pm 2.5\%$ 、延命薬； $26.3 \pm 4.0\%$ ）。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高めることが示された（阿房宮； $69.0 \pm 6.2\%$ ）。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、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、**ERK** 経路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（**SH-SY5Y**）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。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、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、アピゲニン含有量が高いため高濃度では保護作用が失われたと考えられた。栽培品種による成分組成の相異が、生理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** 系は活性酸素種に応答し、抗酸化酵素を誘導して防御機能を果たす。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** 系の活性化を介し生体防御機構の能力を高め、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、菊花抽出物の神経炎症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（**RAW264.7**）の **NO** 産生抑制作用を検討した結果、ヘキサン抽出画分が最も強い抑制効果を示した。ヘキサン抽出画分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が強い抑制活性を示していることが示唆された。脳内の免疫調節で中心的な役割を担うグリア細胞（**MG5**）に対する延命薬のヘキサン抽出物の作用を検討した結果、**NO** 産生および炎症性サイトカインである **TNF- $\alpha$**  産生を顕著に抑制した。これらの化合物は

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，グリア細胞の活性化を抑制し抗炎症作用を果たす可能性が示唆された。

菊花には優れた消炎，解毒等の薬理作用が明らかにされてきたが，本研究においては，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して酸化傷害保護作用，抗炎症作用を示すことを明らかにした。また，その作用特性は栽培品種によって大きく異なり，栽培品種によりフィトケミカルを構成する分子種や組成比の違いに起因することが示された。

主指導教員 若生 豊

---

# Neuroprotective effects of cultivar extracts derived from *Chrysanthemum Morifolium* flowers on the cerebral nerve cells

Dongjian Ma

## Abstract

*Chrysanthemum* flowers have been used for the treatment of inflammation, fever alleviation and detoxification. It is used for food which displayed a healthy function for disease prevention and health promotion actively. Phytochemicals in vegetables and fruits have been reported to exhibit various significant pharmacological effect. Systematic reviews to show clear causal relationships between the active ingredient constitution and the pharmacological effect for variety of fresh food are critical. Meanwhile, psychiatric disorders have rapidly increased and become a major social problem, but many of pathogenic mechanisms are unknown. The degeneration and injury of neurons due to oxidative stress and chronic inflammation, and they are thought to be an essential common cause of neurological disorders from dementia to depression. The protection from oxidative stress, restoration of neural plasticity, control of neuroinflammatory response of microglial cells are being studied as new therapeutic targets. In this study, chemical profile analysis (chapter 3), neurotrophic-like effects (chapter 4), neuroprotective effects (chapter 5) and anti-inflammatory effects (chapter 6) of two typical *Chrysanthemum* cultivar flowers were compared to examine the correlation between chemical profile and bioactivity.

We investigated the phenolic compounds contents of the extracts from Aboukyu and Enmeiraku flower, which are well known *Chrysanthemum spp.* cultivars in Japan (chapter 3). About 80% of soluble extracts ingredient was in methanol fraction. The level of hexane extract of Aboukyu was higher than those of Enmeiraku (5.53 % vs. 1.78 %). Aboukyu contained more phenolic compounds compared to Enmeiraku. Contents of luteolin and apigenin were assayed by quantitative HPLC. Enmeiraku contained more luteolin and less apigenin compared to Aboukyu. Two cultivar petal extracts were subjected to HPLC-DAD to characterize the phenolic components. The compounds corresponding to twelve specific peaks are common components of Aboukyu and Enmeiraku flowers, and six peaks were estimated as luteolin, apigenin, and their glycosides. The phenolic compounds differed greatly between two cultivars in terms of the content and composition of luteolin, apigenin and their glycosides. GC-MS analysis also showed that the composition of triterpenoids also differed between two cultivars.

Neurotrophic factors such as BDNF play an important role in regulating differentiation, survival and functional maintenance of neurons, and the microtubule-dependent extension. Reorganization of lost neuronal networks in the injured brain is necessary for restoration

of normal physiological functions. Because of these properties, neurogenesis substances are anticipated as promising therapeutic tools for neuronal injuries. In chapter 4, we evaluated the neurogenesis capacity of the petal extracts of two cultivars. Individually, Aboukyu and Enmeiraku extracts only slightly induced neurite outgrowth (Aboukyu;  $25.3 \pm 2.5\%$ , Enmeiraku;  $26.3 \pm 4.0\%$ ). However, in combination with NGF, the extracts acted synergistically to induce full neurite outgrowth in PC12 cells (Aboukyu;  $69.0 \pm 6.2\%$ ). These result suggests the role of chrysanthemum extract in enhancing the neurite outgrowth activity of NGF. The MAPK family include ERK and p38MAPK, is known to be involved in various cellular events such as survival/death, differentiation and migration. To evaluate the signal transmission pathway for neurite outgrowth during chrysanthemum extract stimulation, we compared the effects of two cultivar extracts on phosphorylated ERK and p38MAPK levels in PC12 cells by immunoblot analysis. The ratio of pERK was higher in the cells treated with Aboukyu extract compared to Enmeiraku. However, there were no significant differences in neurite outgrowth activity between cells treated with two extracts. Phosphorylation of ERK, as an upstream signal, is necessary for neurite outgrowth, however, there was no correlation between strength of ERK activity and the length of neurite outgrowth.

Nerve cells are extremely sensitive to oxidative stress. The injury of glial cells and neurons due to toxicity of free radicals, leading to disorders. The polyphenolics have positive effects on the treatment and prevention of a wide range of oxidative stress injuries. In chapter 5, we compared the bioactive characteristics of two cultivar extracts by analyzing the composition of phenolic components and assessing the neuroprotective. Extracts of Enmeiraku protected neuroblastoma SH-SY5Y cell viability against oxidative stress-induced injury in a concentration-dependent manner. By contrast, the neuroprotective effect of Aboukyu extracts was biphasic and was weakened at concentrations  $> 25 \mu\text{g/mL}$ . The differences in the neuroprotective effects of Aboukyu and Enmeiraku extracts might be attributable to the anti-apoptotic capacity of their phenolic compounds as well as compositional differences. The levels of flavonoids such as apigenin that easily induce apoptosis were higher in Aboukyu extract than Enmeiraku extract. Thus, the characteristics of the neuroprotective capacity of chrysanthemum cultivars differed markedly according to the flavonoid composition. The Nrf2-ARE system, a body's antioxidant system, induces expression of antioxidant enzymes in response to reactive oxygen species. Certain phenolic compounds activate the Nrf2-ARE pathway, and activate these defense mechanisms in advance and put the cells in an alert state. Treatment of neuronal cells with chrysanthemum flower extract prior to oxidative stress alleviate the oxidative damage to neuronal cells. In addition, the expression levels of Nrf2 and the antioxidant enzyme HO-1 were increased in neuronal cells treated with chrysanthemum flower extract. These effects were higher with extract of Enmeiraku characterized by a high content of luteolin. These data suggest that chrysanthemum flower extract may enhance the ability of body's defense mechanisms through activation of Nrf2-ARE system, and may help reduce oxidative stress to neurons.

Although pathogenic mechanisms remain unknown for the majority of neurodegenerative diseases, activation of microglia and persistence of chronic inflammation are generally thought to be common triggers of the pathogenesis of neurodegenerative diseases. In chapter 6, the suppressing effect of chrysanthemum flower extract on neuroinflammation was examined. Extracts of solvent fraction from chrysanthemum flowers were assayed for inhibition of NO production by LPS-stimulated macrophages, and the hexane extract fraction showed the most potent inhibitory effect. Triterpenoids and fatty acid esters thereof in the hexane extract fraction were suggested to have a strong inhibitory activity. The effects of the Enmeiraku hexane extract demonstrated on glial cells, which play a central role in immune regulation in the brain, were markedly decreased production levels of NO and TNF- $\alpha$ . These compounds are known to cross the blood-brain barrier and reach the inside of brain, and suggested to suppress glial cell activation and exert the anti-inflammatory effect.

Although chrysanthemum flowers have been shown to have excellent pharmacological effects such as anti-inflammation and detoxification, the present study showed that chrysanthemum flower extract exerted the protective effect against oxidative damage and the anti-inflammatory effect in neurons and glial cells. This study also showed that its action characteristics varied greatly depending on cultivar, and it was shown that it depends on the species and composition ratio of phytochemical depending on the cultivar.

Main  
Supervisor    Yutaka wakou

---