

培養細胞下の体内時計に作用するフラボノイド系化合物の発見

【助成対象者】

早稲田大学 先進理工学部
田原 優

【共同研究者】

早稲田大学 先進理工学部
篠崎 綾子

早稲田大学 先進理工学部
柴田 重信

【研究の目的】

体内時計は生体の恒常性維持機構に重要な役割を担っている。食・栄養は体内時計を調節する外界からの刺激であり、いつ、どのような食事を取ることで体内時計を健康に保てるか、またいつ機能性食品成分を摂れば効果的かを考える学問として時間栄養学が話題である。本研究では、フラボノール・フラボノイド系化合物に着目し、概日時計に作用する栄養素の探索を、培養細胞を用いて実験した。実際には、時計遺伝子の発現を発光としてモニターできる PER2::LUC MEF 細胞を用いて、培地への試薬投与に対する時計遺伝子の変動を指標に研究を行った。体内時計の3要素として、周期、振幅、位相があるが、それぞれにおいて試薬投与の効果があるのか検討した。さらに試薬の刺激タイミングを考慮することで、いつ摂取するといいいのかについても考察した。

【研究の成果】

これまでの研究として、カフェインによる周期延長作用、振幅増大作用、位相シフト作用を昨年報告した (Narishige et al., Br J Pharmacol., 2014)。PER2::LUC 細胞を用いて、カフェインの培地投与による周期延長作用を、濃度依存的に確認した。さらに、その作用メカニズムとして、カフェインによる cAMP 上昇、Ca²⁺シグナル経路の活性化が周期延長・振幅増大に寄与していることを示した。位相シフトに関して作用メカニズムの追求には至らなかったが、マウス個体レベルでも位相シフト作用を確認することが出来た。本研究では上記のカフェインと同様の実験方法を用いて、以下の実験を行った。

実験1 試薬混合培地における時計遺伝子発現の変化

Flavone, Chrysin, Baicalein, Apigenin, Luteolin, Daidzein, Genistein, EC, EGC, EGCG, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Tangeretin, Nobiletin の混合培地をそれぞれ作成し、PER2::LUC knock-in MEF 細胞を培養、発光リズムの測定を行った。濃度と周期、振幅の相関図を作成した結果、以下の結果を得た。

①振幅の低下（細胞死、または体内時計減弱の可能性）なく周期延長を示したのは、Nobiletin のみであった。Tangeretin, Quercetin も振幅低下無しに、若干周期延長。

②振幅の低下と共に周期延長したのは、Flavone, Apigenin, Luteolin, Genistein, EGC, EC, Kaempferol。ただ、濃度によっては振幅低下無しに周期延長も見られた。

③周期短縮を示すものは見つからなかった。

④濃度依存的に振幅を上げたものは、Myricetin, Tangeretin, Nobiletin であった。

実験 2 短期間の試薬暴露による時計遺伝子発現の変化

次に、PER2::LUC MEF 細胞を培養・発光測定中に、試薬を培地に 30 分間滴下し、その後 wash out し発光リズムを測定した。ここでは、その後の振幅と次に出てくる波のピーク時刻を評価した。ここでは、Flavone, Baicalein, Luteolin, Apigenin, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Nobiletin について実験を行った。その結果、試薬滴下後に、コントロール（DMSO 0.25%）に比べ、Flavone, Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Nobiletin で振幅が大きくなる事が分かった。

実験 3 Myricetin, Nobiletin の時計シフトに対する投与時刻依存性（図 1）

実験 2 で特に、Myricetin, Nobiletin にて振幅増大作用が大きかったので、試薬滴下のタイミングを変えてさらに実験を行った。発光リズムがピーク（高）またはトラフ（低）になった時刻から±3-4 時間の付近でそれぞれ試薬の滴下を行った。その結果、発光ピークの 2 時間後の滴下で、次のピーク時刻が大きく後退した。また、発光値が最小になる 3 時間前の滴下において、次のピーク時刻が大きく前進した。つまり、刺激タイミングによって、体内時計の時刻が早まったり遅くなったりする事が分かった。また、Nobiletin は投与に大きく振幅・発光値が増加するが、Myricetin ではその効果が見られなかった。

実験 4 Nobiletin の時計への作用メカニズム

Nobiletin による PKA, ERK, CREB の活性化が報告されている。一方で、CREB を介した時計遺伝子 Per1/2 の転写活性化も報告されているので、Nobiletin による時計作用経路の可能性として PKA シグナル経路の寄与を検討した。まず、Nobiletin を培地添加し 15 分または 1 時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットにて ERK のリン酸化レベルを解析した。結果、コントロールである DMSO 群に比べ Nobiletin 投与群では有意に ERK のリン酸化が亢進していることを確認した。次に、Nobiletin 滴下 30 分後の細胞内 cAMP 濃度を測定した。その結果、コントロールに比べて Nobiletin 投与により cAMP の上昇が見られたが、有意な差では無かった。次に、PKA 阻害薬である H-89、または ERK 阻害薬である U0126 を Nobiletin と共に投与し、発光リズム測定による時計シフトを解析した。その結果、H-89 では Nobiletin による時計シフト効果を抑制する傾向が見られたが、U0126 ではその効果を確認出来なかった。

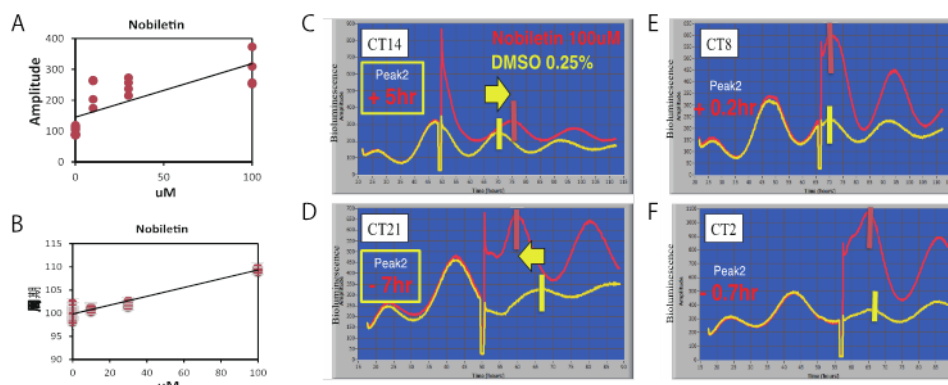


図1 Nobiletinによる概日時計調節作用

A, B, ノビレチン混合培地における PER2::LUC 発光リズムの振幅・周期と濃度の相関図

C-F, 異なるタイミングでのノビレチン刺激 (30 分間) に対する PER2::LUC 発光リズム変動

【今後の課題】

本研究により、Nobiletin, Myricetin による概日時計の周期延長作用、時刻調節作用を発見することができた。Nobiletin はポリメトキシフラボノイドのうちの一つであり、シークアーサーに多く含まれる。抗酸化、抗癌、抗肥満、抗炎症、抗認知症作用などが報告されている。Myricetin は、天然フラボノールの一つであり、クルミや赤ワインに含まれている。同じく、抗酸化、抗癌、抗炎症、抗肥満、抗認知症作用が報告されている。どちらの化合物も振幅の低下を伴わずに、周期延長作用、時刻調節作用が見られた。違いとして、Nobiletin は投与後に劇的な発光値上昇、振幅上昇が見られた。これは同じポリメトキシフラボノイドである Tangeretin でも見られた。振幅の上昇は体内時計の頑強さの向上を意味するが、発光値が異常に上昇していたため単にルシフェラーゼアッセイに直接作用した可能性もあり、今後詳細に調べる必要があると考えている。

時刻調節作用として、Nobiletin, Myricetin で最大 6 時間の時刻変化を起こせることが分かった。カフェインでは最大 1 時間の時刻変化しか見られなかったことから、Nobiletin, Myricetin の効果は非常に強いことが分かった。作用機序として CREB 経路の活性化が考えられたが、阻害剤で完全にブロック出来なかったことから、その他の経路も複合して作用している可能性がある。よって、今後さらなるメカニズムの解明を行っていく必要がある。また、これらの作用は組織レベル、個体レベルでも同様に起きるものなのかについても検討する必要がある。PER2::LUC 発光リズム測定系は、組織培養でも、個体レベルでも実験出来るので今後行っていく。

当初の目標では様々なフラボノイド化合物を解析することで、構造活性相関を見出すつもりであったが、研究結果はそこまで至らなかった。原因として、市販のフラボノイドでは構造が異なり過ぎており、どの側鎖や骨格が重要かまで議論できないことが挙げられた。しかし、Nobiletin, Myricetin に関しては振幅低下無く、周期延長・時刻シフト効果が見られたことから、結果的に欲しい化合物を得ることまでは到達できたと考えている。特に、周期の延長は、睡眠相前進症候群患者（時計の進みが早く、毎日夕方に寝てしまい、社会適応できない睡眠障害）の治療として用いることができる可能性がある。さらに時刻シフトは、時差ボケの早期回復に活用できると考えられる。次の課題としてはこれらの動物モデルにおける、同様の作用を見出すことが重要であると考えている。理由は、個体になると代謝、吸

収、分布の問題が出てきて、なかなか細胞と同等の結果が得られない場合が多いからである。

今回の実験で、カテキン類による周期延長作用は確かに見られたものの、他のフラボノイドに比べ強い概日時計調節作用は得られなかった。テアニンや紅茶抽出物でも同様の結果だった。また、濃度を高めると振幅も低下したため、さらなる追求は行わなかった。機能性食品成分として、カテキン類は脂肪吸収抑制、脂肪燃焼促進、食後血糖値の上昇抑制などの効果があるが、今後は摂取タイミングの違いがこれらの効果に及ぼす影響を調べる事で、時間栄養学的研究を行う必要もあるのではと考えている。

【本研究に関する主な発表論文、投稿等】

- ・ 現在、論文投稿中。
- ・ 学会発表

Shinozaki A, Yokota A, Kuwahara M, Haraguchi A, Tahara Y, Shibata S, Unique effects of flavonoids on circadian rhythm in vitro MEF from PER2::LUC mouse, SAPPORO SYMPOSIUM on BIOLOGICAL RHYTHM, 札幌, 2014年7月25日～27日