

茶カテキンの脳機能低下抑制作用における機構解明 —脳移行に関する検討—

海野 けい子

静岡県立大学薬学部 准教授

緒言

アルツハイマー病を含む認知症は加齢に伴い増加することから、「加齢」は最大の危険因子であり、「老化」はそれを促進する。したがって「老化予防」は認知症予防の重要な戦略となる。老化の一因として酸化ストレスの重要性が指摘されていることから、われわれは強力な抗酸化作用を有する緑茶カテキンに着目した。これまでに、緑茶カテキン摂取により脳内の酸化傷害が軽減され、加齢に伴う脳の萎縮および学習・記憶能の低下が抑制されることを、老化促進モデルマウス (SAMP10) を用い明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。ラットに緑茶カテキン (エピガロカテキнгаレート, EGCG) (図1) を経口投与すると、極微量ながら脳からEGCGが検出されることが報告されているが⁶⁻⁸⁾、緑茶カテキンが脳内にどの程度取込まれ、またどのようなカテキンが有効であるのか、十分な解明には至っていない。最近エピカテキンおよびカテキンについて、マイクロダイアリシスによるサンプリング法⁹⁾、ラットおよびヒトの血液脳関門 (BBB) モデル細胞を用いた検討¹⁰⁾が行われ、少なくともカテキンおよびエピカテキンはBBBを通過することが示された。

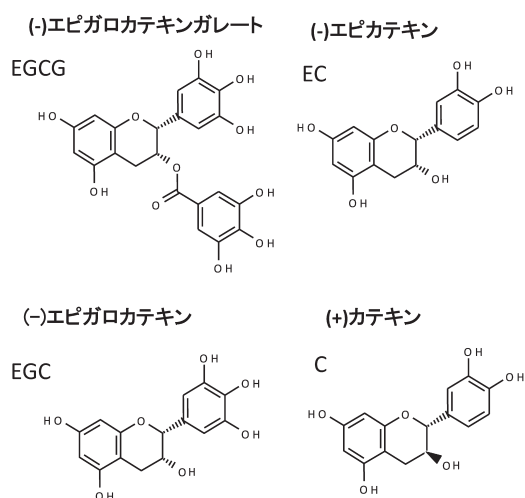


図1 緑茶中のカテキン類

しかし、緑茶に含まれる種々のカテキン分子の中で最も多いものはEGCGであり、その構造からカテキンやエピカテキンはBBB透過性が異なる可能性が考えられることから、本研究ではEGCGの脳への移行性に焦点を当て、脳に対する作用の解明をめざした。さらにその成果とともに、マウスおよび培養神経細胞を用い *in vivo* および *in vitro* の両面からEGCG等の作用を検討し、緑茶カテキンによる脳機能低下抑制作用の機構解明をめざした。

実験方法

1. 実験動物、緑茶カテキンの投与および学習判定

老化促進モデルマウス (SAMP10, 4週齢, 雄) は日本エスエルシー(株)より購入し、12月齢になるまで飼育した。1ケージ6匹ずつで飼育し、固形飼料 (CE-2, 日本クレア(株)) は自由摂取とした。緑茶カテキン (Sunphenon 70S, 太陽化学(株)) は0.2 mg/mLの濃度で水に溶解した。EGCG、EGC (太陽化学(株)) およびGA (MP Biomedicals) は0.1 mMの水溶液を、飲水としてマウスに自由摂取させた。11月齢になった時点で、ステップスルー装置 (MGS-003, 室町機械(株)) を用いた受動回避試験により学習能を判定した。動物実験は静岡県立大学における実験動物に関する指針に従って行った。

2. カテキンの脳内移行性

カテキン類の脳内移行性の検討は、BBBキット (RBT-24, ファーマコセル(株)) (図2) を使用した。インサート内側 (血管腔側) にEGCG、EGCあるいはGAを終濃度30 μ Mとなるように加え、30分間37°Cで静かに振とうした。プレートのウェル側 (脳実質側) から900 μ L、インサート側の培養液から200 μ Lを回収し、速やかに凍結した。回収した血管腔側および脳実質側の画分について、EGCG等の濃度をLC-MS/MSにて測定

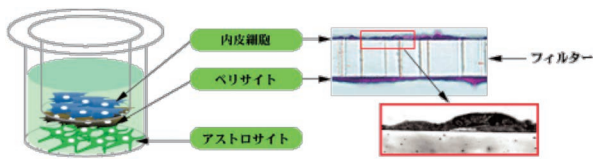


図2 血液脳関門モデル

ファーマコセル(株)ホームページより引用。

した。脳への移行性が高いことが知られているカフェインをポジティブコントロールとして3回実験を行い、EGCG等の透過係数ならびに脳内移行性(透過率%)を求めた。

3. 培養神経細胞

DMEM:F-12 (1:1)/10% FBS培地に懸濁したヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞(ACTT, CRL-2266株)(1.0×10^5 cells/mL) $500 \mu\text{L}$ を、24 wellプレートの各wellに播種した。EGCG、EGCおよびGAはDMSOに溶解し、各wellに $1 \mu\text{L}$ を添加した。このとき、EGCG、EGCおよびGAの最終濃度が $0 \sim 1.0 \mu\text{M}$ になるように適宜希釈した。細胞を5% CO_2 存在下、 37°C で48時間培養した。

培地を除去した後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した。各wellにトリプシン $80 \mu\text{L}$ を加え接着していた細胞を浮遊させた後、DMEM:F-12 (1:1)/10% FBS培地 $500 \mu\text{L}$ を加えた。細胞懸濁液をサンプルチューブに移し、 1200 rpm で5分遠心した。上清を除き、細胞にDMEM:F-12 (1:1)/10% FBS培地を $100 \mu\text{L}$ 加えた。得られた細胞懸濁液 $10 \mu\text{L}$ にトリパンブルー液 $10 \mu\text{L}$ を加え、セルカウンターを用いて生細胞数を計数した。EGCG等を加えないとき(DMSOのみ)の細胞数を100%として、細胞増殖の程度を相対値として示した。

統計解析

結果は平均値±標準誤差で表し、一元配置分散分析を行った後、ボンフェローニ多重比較検定により比較を行った。 p 値が0.05未満の場合に統計的に有意に差があると判断した。

実験結果

1. マウス脳機能に対する緑茶カテキンの作用

緑茶カテキンを自由摂取させた老化促進モデルマウス(SAMP10)について、脳機能を評価した結果、加齢時に認められる学習能の低下が、緑茶カテキン摂取によ

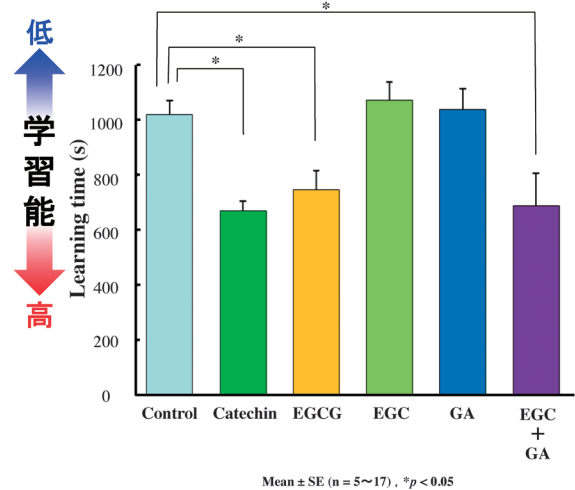


図3 マウスの学習能に対する緑茶カテキンの効果

緑茶カテキン(Catechin)は 0.2 mg/mL の濃度で水に溶解した。EGCG、EGC、GAは 0.1 mM の濃度で水に溶解した。老化促進モデルマウス(SAMP10)に緑茶カテキン等を自由摂取させ、11月齢の時点でステップスルー受動回避試験により、学習能を判定した。学習に要した時間が長いほど、学習能が低下していることを意味する(*, $p < 0.05$)。

り有意に抑制された(図3)。緑茶カテキン水溶液中のEGCGの濃度は 0.1 mM であり、緑茶カテキンとEGCG(0.1 mM)を摂取していた場合と比較した結果、ほぼ同等の学習能低下抑制作用が認められたことから、脳機能低下抑制作用において主要な役割を担っているカテキンはEGCGであることが示された(図3)。

EGCGは、腸内細菌によりエピガロカテキン(EGC)と没食子酸(GA)に分解されることから¹¹⁾、EGC、GA、ならびにEGCとGAを同時に摂取した場合について、マウスの脳機能に対する作用を比較した。その結果、EGCあるいはGAを摂取していたマウスでは効果が認められなかったが、EGCとGAを同時に摂取していた場合は、EGCGと同程度に脳機能の低下が抑制された(図3)。

2. カテキン類のBBB透過性

緑茶カテキン類がどの程度脳内に取り込まれるのかを明らかにするため、BBBキットを用いEGCG、EGCおよびGAについて、透過係数ならびに30分間の透過率を測定した。カフェインは脳への移行性が高いことが知られており、本実験においてカフェインの透過係数は $31.3 \pm 2.49 (10^{-6} \text{ cm/s})$ であった。EGCGおよびEGCの透過係数は、各々 9.31 ± 0.32 および $11.56 \pm 1.05 (10^{-6} \text{ cm/s})$ であり、両者の透過係数には有意な差はないこと、

表1 カテキン類のBBB透過性

サンプル	共存サンプル	透過係数 (10^{-6} cm/s)	脳内移行性 (%) (30 min)
EGCG	—	9.31±0.32	2.77±0.10
EGCG	EGC	7.29±0.35*	2.16±0.11*
EGC	—	11.56±1.05	3.43±0.31
EGC	EGCG	8.58±0.88	2.25±0.31
EGC	GA	4.16±0.89*	1.53±0.50*
GA	—	21.97±1.92	6.52±0.57
GA	EGC	18.68±1.56	5.55±0.46
Caffeine	—	31.30±2.49	9.30±0.74

BBBキット (RBT-24, ファーマコセル(株)) における、EGCG、EGCおよびGA単独、あるいは共存サンプル存在下での透過係数および脳内移行性。EGCGあるいはEGC単独の場合に比べ、共存サンプルにより有意に低下 ($p<0.05$) が見られた場合を*で示した。

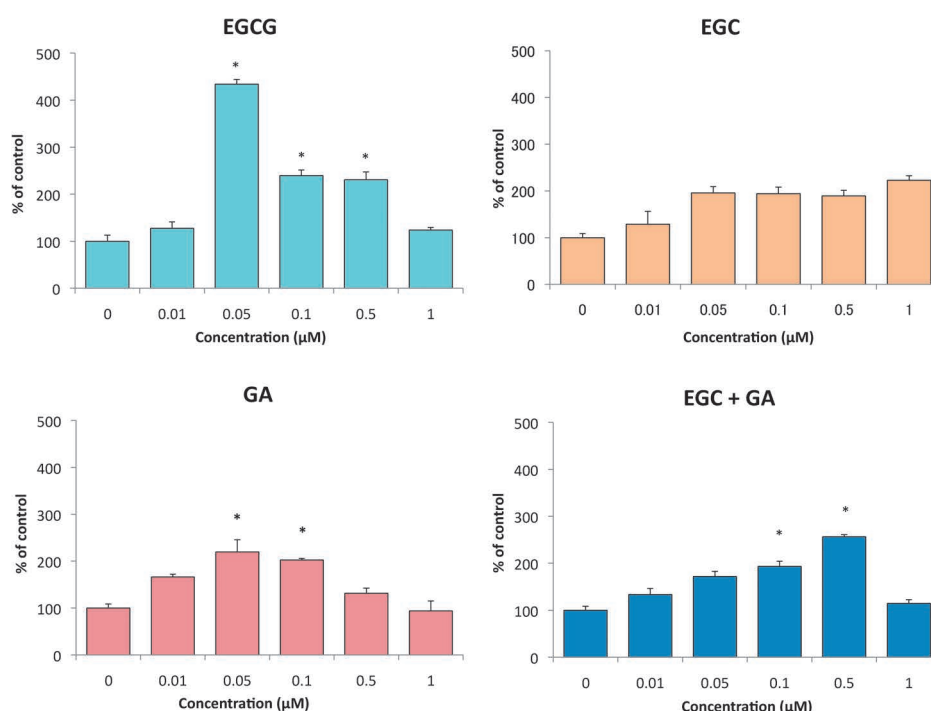


図4 神経細胞の増殖に対するEGCGの作用

培養神経細胞 (SH-SY5Y) (1.0×10^5 cells/ml) $500 \mu\text{L}$ を 24 well プレートの各wellに播種した。EGCG、EGCおよびGAはDMSOに溶解し、最終濃度が $0 \sim 1.0 \mu\text{M}$ になるように適宜希釈し、各wellに $1 \mu\text{L}$ を添加した。細胞を5% CO_2 存在下、 37°C で48時間培養した。各wellにトリプシン $80 \mu\text{L}$ を加え接着していた細胞を浮遊させた後、得られた細胞懸濁液 $10 \mu\text{L}$ にトリパンブルー液 $10 \mu\text{L}$ を加え、セルカウンターを用いて生細胞数を計数した (*, $p<0.05$)。

EGCGおよびEGCは、わずかであるが脳内に移行することが示された (表1)。GAの透過係数は高く、容易に脳内に移行していることが示された。次に、EGCGとEGCが共存した場合の透過性への影響を検討した結果、EGCGはEGC共存下で有意に透過性が低下することが示された。EGCはEGCGの共存により透過性が低下する傾向を示したが、GA共存により透過性が顕著に低下することが明らかとなった (表1)。一方GAは、EGC共存下でもほとんど透過性は影響を受けないことが明ら

かとなった。得られた透過係数を基に脳内移行性を求めた結果、EGCGとEGCの脳内移行性は各々2.8%と3.4%であった (表1)。

3. 培養神経細胞の増殖に対するEGCGの作用

脳内にとりこまれたEGCG等が脳神経細胞にどのような作用を及ぼすのか*in vitro*で検討した結果、EGCGとGAは $0.05 \mu\text{M}$ で細胞増殖を有意に促進した (図4)。一方EGCは $1 \mu\text{M}$ より低い濃度では有意な作用を示さな

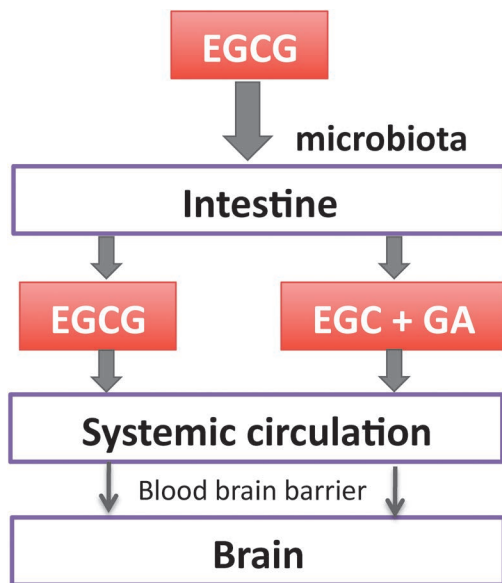


図5 EGCGの脳へのとりこみ

経口的に摂取されたEGCGは小腸から取り込まれ、血流を介して脳に至り、血液脳関門を経て脳実質細胞に取り込まれる。また一部のEGCGは腸内細菌により分解を受けEGCとGAとなつて、血流を介して脳に至る。

かったが、GA共存下では作用が増強されることが示された。

考 察

本研究により、EGCGが血流を介して脳に至ったとき、その3%程度は脳内に取り込まれることが示唆された。また培養神経細胞に対しEGCGは0.05 μM で、顕著な増殖促進作用を示した。緑茶を摂取したとき、ヒトでは摂取量の0.2~2.0%のカテキンが血漿中に取り込まれることが報告されており¹²⁾、数杯の緑茶を飲んだ場合、血漿中のカテキン濃度は1 μM 程度であると考えられる。今回得られた結果より、脳に取り込まれたEGCGの濃度において、EGCGは神経細胞に対し増殖促進的に作用している可能性が示された。EGCはEGCGとBBB透過性に違いはなかったが、*in vivo*および*in vitro*においてEGCGより作用が弱かった。EGCGは腸内細菌によりEGCとGAに分解されるが、EGCはGA共存下において作用が増強されることが、*in vivo*および*in vitro*において確認された。これらのことから緑茶を継続的に摂取することにより、EGCGおよびその代謝物が直接的に脳神

経細胞に作用することにより、脳機能低下を抑制している可能性が示された(図5)。マウスにおいて緑茶カテキン摂取により学習能の低下が抑制された有効量を、種差を考慮してヒトの場合に外挿すると、緑茶7~8杯に相当すると考えられる。これはヒトにおいて十分適用可能な摂取量であることから、緑茶の摂取は高齢者の脳の老化予防策として非常に有効であると考えられる。

要 約

緑茶カテキンを継続的に摂取した場合、マウスにおいて加齢に伴う脳機能の低下を有意に抑制することが明らかとなった。緑茶カテキンの中でEGCGが脳において主要な作用を示したが、EGCとGAを同時に摂取した場合も効果が見られた。EGCGとEGCは脳血液関門をわずかながら透過し、その透過率に有意な違いは認められなかったが、培養神経細胞に対する増殖促進作用はEGCGがEGCより低濃度で作用を示した。EGCGは腸内細菌によりEGCとGAに分解されるが、EGCとGAの両者が存在した場合は、培養細胞に対してもEGC単独のときより増殖促進効果が見られた。これらのことから緑茶カテキン、特にEGCGは、脳にわずかであるが取り込まれ作用を発揮するとともに、EGCとGAに分解された場合も脳に対し作用を示すことが明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) K. Unno, et al.: *Exp. Gerontol.*, **39**, 1027-1034, 2004.
- 2) K. Unno, et al.: *Biogerontology*, **8**, 89-95, 2007.
- 3) K. Unno, et al.: *Biofactors*, **34**, 263-271, 2008.
- 4) K. Unno, et al.: *Anti-Aging Medicine*, **8**, 75-81, 2011.
- 5) T. Sasaki, et al.: *Aging Cell*, **7**, 459-469, 2008.
- 6) M. Saganuma, et al.: *Carinogenesis*, **19**, 1771-1776, 1998.
- 7) T. Kohri, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4102-4112, 2001.
- 8) K. Nakagawa, T. Miyazawa: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **43**, 679-684, 1997.
- 9) L. Wo, et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 9377-9383, 2012.
- 10) A. Faria, et al.: *Food Funct.*, **2**, 39-44, 2011.
- 11) A. Takagaki, F. Nanjo: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 1313-1321, 2010.
- 12) K. Nakagawa, et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1981-1985, 1997.