

氏名・（本籍）	かきお しょうた 垣尾 翔大（京都府）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲第 4389 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	コーヒー成分による神経保護効果の作用メカニズムの解析
論文審査委員	(主査) 教授 田村 悦臣（薬学博士） (副査) 教授 三澤 日出巳（博士（薬学）） 教授 齋藤 英胤（医学博士）

論文内容の要旨

【背景・目的】

神経変性疾患とは、ある特定の神経細胞群が徐々に障害を受け、脱落してしまう病気である。アルツハイマー病（Alzheimer's disease; AD）やパーキンソン病（Parkinson's disease; PD）、筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS）などが代表的な神経変性疾患として知られている。多くの神経変性疾患には家族性（Familial）と孤発性（Sporadic）があり、いずれも異常タンパクの蓄積が確認されているものの、明確な原因は明らかになっておらず、また治療法も確立されていない。

一方、コーヒーは世界中で愛飲されている飲料の一つで、近年様々な神経変性疾患に対して予防効果を持つことが疫学研究などから明らかとなっている。1日3~5杯のコーヒーの摂取がADのリスクを65%低下させること、1日800 mLのコーヒー摂取がPDのリスクを80%低下させること、ALSの患者が健常人に比べてコーヒーを摂取する機会が少ないことなどが報告されている。しかし、コーヒーの神経保護効果の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。

神経成長因子（Nerve growth factor; NGF）や脳由来神経栄養因子（Brain derived neurotrophic factor; BDNF）などの神経栄養因子は様々な神経変性疾患に対して疾患の発症抑制や延命に効果があることが報告されている。BDNFはその高親和性の受容体であるtropomyosin-related kinase type B (TrkB)に結合し、TrkBをリン酸化することで神経保護効果を発揮する。TrkBがリン酸化され、細胞内にシグナルが伝達すると、MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) 経路やPI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase) /Akt 経路などが活性化され、長期増強（Long-term potentiation）や神経突起の伸長などが誘導される。

一方、血管内皮増殖因子（Vascular endothelial growth factor; VEGF）は血管新生や細胞増殖をシグナルするタンパクであるが、近年、神経保護効果を有することが報告されている。VEGFはVEGF receptor (VEGFR)に結合することで細胞内にシグナル

を伝達する。VEGF の発現は転写因子である低酸素応答因子 (hypoxia inducible factor; HIF) により制御されている。HIF のサブユニットの 1 つである HIF-1 α の発現は、ROS や抗酸化活性により正負に制御されている。

そこで、本研究では、コーヒーによる神経保護効果のメカニズムの解明を目指し、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いて BDNF の働きに対する影響及び VEGF の発現に対する影響に着目して研究を行った。

【方法】

細胞培養：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は 15%FBS を含む DMEM/Ham's F-12 培地(1:1)で培養した。TrkB シグナルの検討には、10 μ M の ATRA で 6 日間分化させた細胞を用いた。

コーヒー豆抽出液の調製：コーヒー粉（コロンビア産、アラビカ種）8 g を 95°C の精製水 140 mL によりドリップ式で抽出した。

TrkB シグナルに対するコーヒー豆抽出液の影響：分化 6 日目の SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液（ \sim 2%(v/v)）を添加し、2 時間後に BDNF（20 ng/mL）を添加、任意の時間後にタンパクを抽出し、TrkB 及びその下流のシグナル因子の活性化について Immunoblot 法により検討した。

BDNF 遺伝子発現に対する影響：分化 6 日目の SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加し、2 時間後に BDNF を添加、4 時間後に Isogen を用いて RNA を抽出、逆転写を経て qRT-PCR により遺伝子発現の変化について検討した。

膜表面上の TrkB 発現に対する影響：分化 6 日目の SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加、2 時間後に細胞を回収し、抗 TrkB 抗体液に懸濁、膜表面上の TrkB 発現についてフローサイトメーターにより観察した。

BDNF による神経突起の伸長に対する影響：分化 4 日目の SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加し、2 時間後に BDNF を添加、48 時間後に写真を撮影し、神経突起長を Image J を用いて測定した。

VEGF 分泌量に対するコーヒー豆抽出液の影響：3 日間培養した SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液（ \sim 2%(v/v)）を添加、12 時間後に培養上清中の VEGF タンパク量について ELISA 法により測定した。

VEGF 遺伝子発現に対する影響：3 日間培養した SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加、8 時間後に RNA を抽出、逆転写を経て qRT-PCR により遺伝子発現の変化について検討した。

HIF-1 α タンパク発現に対する影響：3 日間培養した SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加、4 時間後にタンパクを抽出し、Immunoblot 法により発現変化を検討した。各阻害剤はコーヒー添加の 1 時間前に処理した。

HIF-1 α プロリンヒドロキシ化に対する影響：3 日間培養した SH-SY5Y 細胞に

MG132 を処理、1 時間後にコーヒー豆抽出液を添加、4 時間後にタンパクを抽出し、Immunoblot 法により発現変化を検討した。またプロリンヒドロキシラーゼ (PHD) 活性について *in vitro* で $[1-^{14}\text{C}]$ コハク酸の量を測定することで検討した。

【結果】

①BDNF の機能に対するコーヒー豆抽出液の影響

all-*trans* レチノイン酸 (ATRA) により分化誘導した SH-SY5Y 細胞を、BDNF で刺激すると TrkB の 516 番目及び 816 番目のチロシンがともにリン酸化され、その下流に当たる ERK や Akt のリン酸化も促進された。コーヒー豆抽出液を添加した細胞では BDNF による TrkB のリン酸化が抑制された。Akt のリン酸化はコーヒー豆抽出液により抑制されたが、ERK のリン酸化には影響を及ぼさなかった。コーヒー豆抽出液による TrkB や Akt のリン酸化の抑制は用量依存的であり、カフェインやカフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリンなどのコーヒー主成分にはこの活性は見られなかった。

TrkB シグナルの活性化により、BDNF の遺伝子発現が誘導されることが知られているが、TrkB シグナルに対する影響同様、コーヒー豆抽出液の処理により BDNF による BDNF 遺伝子の発現誘導は抑制された。またその活性はコーヒー用量依存的であり、コーヒー主成分には見られなかった。更に、Akt の阻害剤である LY294002 処理により、BDNF による発現誘導は抑制された。以上より、コーヒー豆抽出液による BDNF 発現誘導の抑制は TrkB 及び Akt シグナルの抑制を介している可能性が考えられる。

次に、BDNF による TrkB のリン酸化に対するコーヒー豆抽出液の抑制メカニズムについて検討した。細胞膜表面上の TrkB 発現に対する影響について検討したが、コーヒー豆抽出液による細胞膜表面上の TrkB 発現は変化しなかった。次に BDNF と TrkB の結合に対する影響について検討したが、BDNF と TrkB の結合能に対してもコーヒー豆抽出液は影響をほとんど及ぼさなかった。したがって、コーヒー豆抽出液は細胞内での TrkB のリン酸化を抑制していることが示唆された。

SH-SY5Y 細胞は BDNF の刺激により、TrkB シグナルを介して神経突起を伸長することが知られている。コーヒー豆抽出液の影響を検討したところ、BDNF による神経突起伸長はコーヒー用量依存的に抑制された。

②VEGF 発現に対するコーヒー豆抽出液の効果

コーヒー豆抽出液の刺激により、VEGF 遺伝子発現は刺激後 6~9 時間をピークに誘導され、SH-SY5Y 細胞からの VEGF 分泌量もコーヒー用量依存的に増加した。VEGF の遺伝子発現誘導メカニズムについて検討するため、VEGF 遺伝子の転写因子である HIF-1 α について検討したところ、コーヒー刺激後 3 時間をピークに発現の誘導が見られた。また、それは用量依存的であった。核内の活性化型 HIF-1 α 発現は、刺激後 30 分から上昇した。一方、HIF-1 α 遺伝子の発現には変化が見られず、この HIF-1 α タンパ

ク発現変化が転写後調節によることが示された。コーヒー豆抽出液による VEGF 遺伝子発現誘導は HIF-1 α の DNA 結合阻害剤であるエキノマイシンの処理により抑制され、HIF-1 α の関与が確認できた。

コーヒー豆抽出液中の HIF-1 α 活性化成分について検討するため、コーヒーの主成分であるカフェインやカフェ酸クロロゲン酸、トリゴネリンによる影響を検討したが、これらは、HIF-1 α 誘導活性を示さなかった。次に、焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液による影響を検討した。生豆抽出液では HIF-1 α 誘導活性は見られなかったが、焙煎したコーヒー豆抽出液には HIF-1 α 誘導活性が見られ、活性成分は焙煎により生成する成分であった。そこで、深煎りコーヒー豆抽出液を有機溶媒で分画したところ、活性成分は酢酸エチル層に回収され、更に Sep Pak C₁₈ カラムで分画したところ、20%メタノール画分に回収された。この画分にはカフェインやピロカテコールが含有されていたため、コーヒー中に含まれるカテコール類による HIF-1 α 発現への影響を検討した。その結果、ピロカテコールにより HIF-1 α の発現が誘導され、ピロカテコールがコーヒー豆抽出液中の活性成分の候補であることが示唆された。ピロカテコールは焙煎によりクロロゲン酸が加水分解して生成することが知られており、これらの結果もピロカテコールが活性成分である可能性を裏付けるものとなった。

次にコーヒー豆抽出液による HIF-1 α 誘導メカニズムを検討した。HIF-1 α は通常酸素分圧ではプロリン残基が PHD によりヒドロキシル化を受け、ヒドロキシル化された HIF-1 α が E3 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される。そこで、コーヒー豆抽出液による HIF-1 α のプロリンヒドロキシル化に対する影響を検討した。プロテアソーム阻害剤である MG132 の処理によりヒドロキシル化 HIF-1 α の分解が抑制され、コーヒー豆抽出液の処理によりヒドロキシル化 HIF-1 α の発現が低下した。この結果から、コーヒー豆抽出液は HIF-1 α のプロリンヒドロキシル化の抑制を介して HIF-1 α の分解を抑制し、転写活性化を誘導することが明らかとなった。また、ピロカテコールが HIF-1 α のプロリンヒドロキシル化を抑制することも確認された。しかし、コーヒー豆抽出液は PHD 発現及び *in vitro* での酵素活性どちらについても影響は与えなかった。

【考察】

本研究により、SH-SY5Y 細胞において、コーヒー豆抽出液が TrkB の自己リン酸化を抑制することにより、BDNF/TrkB シグナルを抑制することが明らかとなった。TrkB リン酸化の抑制により、BDNF による Akt のリン酸化を介した BDNF 遺伝子発現の誘導及び神経突起の伸長が抑制された。コーヒー豆抽出液による TrkB リン酸化の抑制に関しては、細胞膜表面上の TrkB 発現や BDNF/TrkB 結合能には大きな影響が見られなかったことから、コーヒー豆抽出液が細胞内で TrkB の自己リン酸化を阻害している、もしくは、PTP1B (Protein-tyrosine phosphatase 1B) などのホスファターゼ活性を

促進している、などの可能性が考えられる。

本研究より、コーヒー豆抽出液により **BDNF/TrkB** シグナルが抑制されることが示唆された。この結果はコーヒーの神経保護効果を示す疫学研究と相反する結果であり、**BDNF/TrkB** シグナル以外にコーヒー豆抽出液の作用点があると考えられた。

一方、本研究よりコーヒー豆抽出液が **HIF-1 α** の活性化を介して **VEGF** 発現を上昇させること、またその活性成分がカテコール類であることを示した。カテコールやピロガロールは血液脳関門を通過することが報告されており、日常的なコーヒーの摂取によりこれらの成分が脳内に移行し、神経保護効果を発揮する可能性が考えられる。

PHD は **HIF-1 α** のプロリンヒドロキシ化を介して **HIF-1 α** の働きを抑制的に制御する重要な酵素であるが、細胞内のタンパク発現、*in vitro*での酵素活性ともにコーヒー豆抽出液による影響を受けなかった。このことから、コーヒー豆抽出液は **PHD** の発現や活性に直接作用するのではなく、補因子として要求されるアスコルビン酸や **Fe²⁺**、 α -ケトグルタル酸などの量に影響を与えている可能性が考えられる。今後、この点について詳細な研究が必要である。

VEGF による神経保護効果のメカニズムについてはまだ不明な点も多いが、**ALS** モデルマウスにおいて **VEGF** の投与による発症の遅延、運動機能の改善などが報告されており、また **VEGF** は特にドパミン作動性神経に強い保護効果を持つこと、**MPP⁺**誘導性の **PD** モデル細胞で **HIF-1 α** の活性化により神経細胞死が抑制されることなどが報告されている。そのため、**VEGF** は近年神経疾患の治療ターゲットとして注目されている。

本研究より、日常的なコーヒー摂取による神経保護作用が、**VEGF** の発現誘導、活性化による可能性が示唆されたことから、コーヒー豆抽出液中に含まれる **HIF-1 α** 活性化成分であるカテコール類の神経保護効果について今後より詳細に研究することで、神経変性疾患の予防及び治療につながっていくことが期待できる。

論文審査結果の要旨

アルツハイマー病やパーキンソン病などの認知症の予防・治療は現代医療における大きな課題である。認知症の発症原因である神経変性疾患は、いずれも異常タンパクの蓄積が確認されているものの、明確な原因は明らかになっておらず、また治療法も確立されていない。

一方、習慣的なコーヒー摂取が、様々な神経変性疾患に対して予防効果を持つことが疫学研究などから明らかとなっている。しかし、コーヒー摂取による神経保護効果の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。このような背景のもと、申請者はそのメカニズムの解明に取り組んだ。

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を神経系モデルとし、神経細胞栄養因子の中から、BDNF と VEGF を対象として、その作用に対するコーヒーの効果を検討した。結果は、要旨にあるように、BDNF 作用に対しては負の効果が、VEGF に対しては正の効果が得られた。特に、VEGF への作用についてはコーヒー中の活性成分の同定も行い、認知症の予防や治療への応用の可能性を示唆した。上記のように、日常的な飲料であるコーヒーを介した認知症の予防は、健康寿命の延長に貢献し、医療費の増大という国民の医療の問題解決へとつながる。その可能性の一端を分子レベルで解明できたことは、薬学の発展にとって十分に価値あるものである。申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺の知識も十分であり、博士（薬科学）を授与するにふさわしいと判断した。

論文目録

S. Kakio, Y. Nakazawa, M. Funakoshi-Tago, H. Tamura. Coffee modulates the function of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience and Medicine* 2015; 6: 165-174

S. Kakio, M. Funakoshi-Tago, K. Kobata, H. Tamura. Coffee induces vascular endothelial growth factor expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Nutritional Neuroscience*, accepted on 08 Dec 2015