

平成 27 年度 博士論文

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

垣尾 翔大

目次

第1章 序論.....	2
第2章 実験材料.....	7
第1節 試薬.....	7
第2節 試薬調製.....	11
第3節 機器.....	13
第4節 細胞.....	15
第3章 実験方法.....	16
第1節 細胞培養.....	16
第2節 コーヒー豆抽出液の調製.....	16
第3節 RT-PCR法による各種遺伝子の発現検討.....	16
第4節 WST assayによる細胞毒性の検討.....	19
第5節 quantitative RT-PCR法による各種遺伝子の発現変動の解析.....	20
第6節 G93ASOD1変異体発現細胞の作製.....	20
第7節 HSP70遺伝子発現の検討.....	23
第8節 BDNFの働きに対するコーヒー豆抽出液の影響.....	23
第9節 VEGF発現に対するコーヒー豆抽出液の影響.....	25
第10節 統計的解析.....	27
第4章 実験結果.....	28
第1節 各神経系細胞における神経保護関連遺伝子の発現検討.....	28
第2節 コーヒー豆抽出液及びコーヒー主成分の神経細胞に対する毒性.....	28
第3節 SOD1G93A発現SH-SY5Y細胞の作製及び変異体発現の影響.....	28
第4節 HSP70発現に対するコーヒー豆抽出液の影響.....	29
第5節 BDNFの働きに対するコーヒー豆抽出液の影響.....	30
第6節 VEGF発現に対するコーヒー豆抽出液の影響.....	32
第7節 AD関連遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液の影響.....	35
第5章 考察.....	61
第1節 SOD1G93A発現細胞及びHSP70遺伝子発現変化について.....	61
第2節 BDNFの働きに対する影響について.....	62
第3節 VEGF発現に対する影響について.....	63
第4節 AD関連遺伝子発現に対する影響について.....	65
第5節 総括.....	66
第6章 参考文献.....	67
第7章 謝辞.....	81

第1章 序論

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ある。コーヒーはコーヒー豆を200~220°Cで15~20分焙煎し、挽いた粉末を抽出した飲料のことで、この焙煎の過程で、コーヒー豆中の成分が加水分解を含めた様々な化学反応により、その成分量が変化することが報告されている (Fig.1) [1]。この成分の代表的なものとして、糖類や脂質、アミノ酸、タンパク質の他にアルカロイドの一つとして知られるカフェインやトリゴネリン、ポリフェノールであるクロロゲン酸、クロロゲン酸が加水分解されて生成される、コーヒーの匂いの元であるカフェ酸、ジテルペンであるカーヴェオールやカフェストールが含まれている。

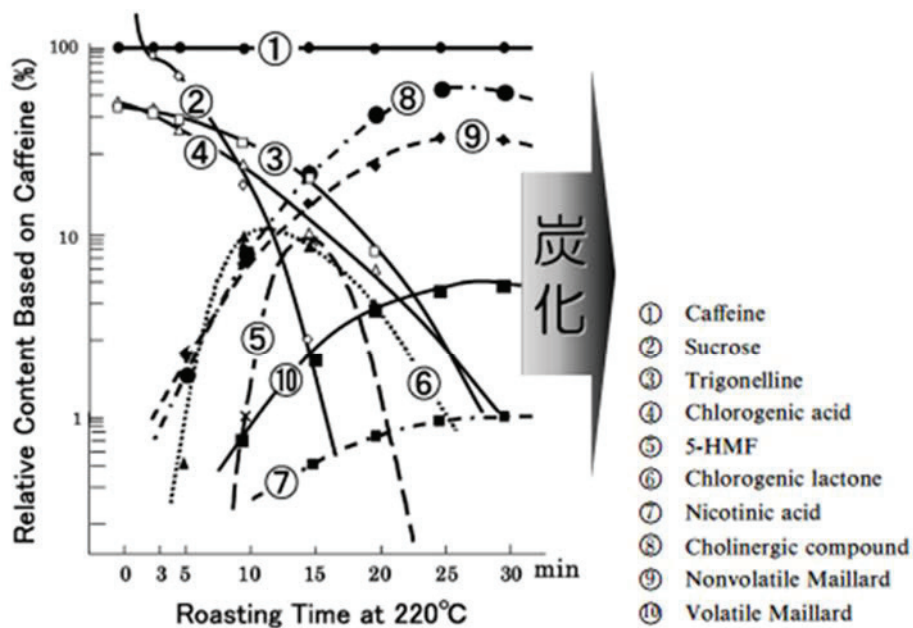


Fig.1 コーヒー豆焙煎による成分顔料の変化
(出典: 岡幾多郎、コーヒーの糖尿病予防効果を説明する栄養成分の薬理学)

コーヒーは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[2-6]。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[4]、1日800mLのコーヒー摂取がPDのリスクを80%低下させること[5]、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[6]、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。

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) や nerve growth factor (NGF)、glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) 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の抑制や延命に効果があることが報告されている[2,3,7]。特に NGF は脳内で海馬に、GDNF はシュワン細胞やアストロサイトにほぼ限局した発現をしているのに対し、BDNF は海馬、大脳皮質で高い発現を示すほか、脳内で広く発現しており[8]、その働きは神経栄養因子の中でも特に重要なものとなっている。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栄養効果を発揮する[8]。TrkB は約 800 個のアミノ酸からなる 145 kDa の分子で、受容体型チロシンキナーゼであり、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ[8]。二量体のリガンドが結合することで TrkB も二量体化し、細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化することで細胞内にシグナルが伝達する (Fig.2) [8]。TrkB がリン酸化され、細胞内にシグナルが伝達すると、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) 経路や Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) /Protein kinase B (Akt) 経路などの経路が活性化され、転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) が転写活性化する (Fig.2) [8]。これらのシグナルが活性化されることにより、BDNF 自身の遺伝子発現が誘導され、また長期増強 (Long-term potentiation) や神経突起の伸長などが誘導される[8]。

BDNF と神経変性疾患の関連については、様々な報告がなされている。アルツハイマー病モデルマウスにおいて、TrkB シグナルの阻害により空間記憶力が低下する一方で、TrkB を高発現させると空間記憶力が回復すること[9]、またアミロイドβの蓄積、毒性に対して海馬の神経を保護、治癒することが報告されている[10]。また、BDNF が黒質のドーパミン作動性

神経の生存を維持することや[11,12]、6-ヒドロキシドパミンによる細胞死から保護すること[13]、パーキンソン病患者で黒質の BDNF mRNA /タンパク発現が低下していること[14,15]、などが明らかとなっている。ALS モデル動物においては、BDNF を増加させることや[16]、TrkB の変異体の発現を低下させることにより[17]、ALS の発症が遅延することが報告されている。このように、BDNF と神経変性疾患には深い関わりがあることが明らかとなっている。

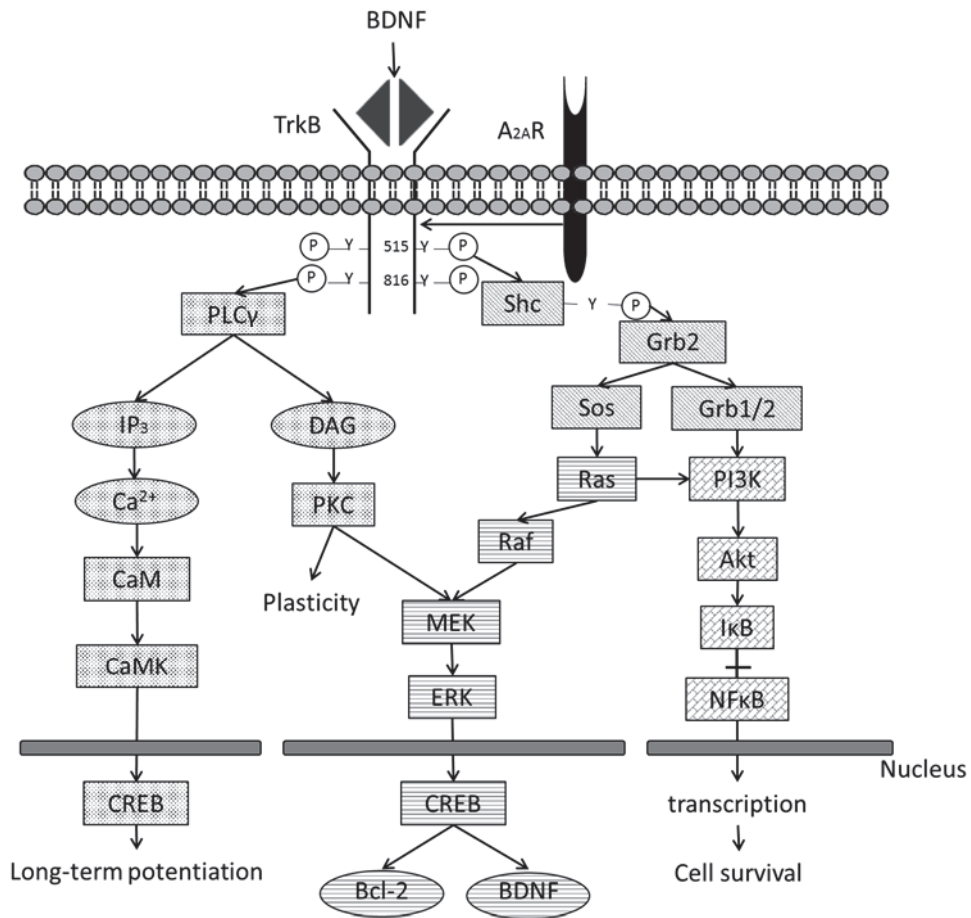


Fig.2 TrkB signaling pathway

一方、Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管内皮増殖因子として知られており、血管新生や細胞増殖をシグナルするタンパクであり、近年、神経保護効果を有することが報告された[18-20]。VEGF は VEGF receptor (VEGFR) に結合することでシグナルを伝達する[21]。VEGFR に VEGF が結合するとダイマーが形成され、細胞内ドメインのチロシン残基が自己リン酸化することで細胞内にシグナルが伝達する[21-23]。細胞内にシ

グナルが伝達すると MAPK 経路や PI3K/Akt 経路が活性化され、細胞の生存や DNA 合成が促進される[24]。

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[25,26]。HIF は HIF-1 α と HIF-1 β という二つのサブユニットから構成されており、HIF-1 α の発現は reactive oxygen species (ROS) や抗酸化剤の量により制御されている[27]。HIF-1 α は通常、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されることにより、発現量が抑制されている[27,28]。すなわち、HIF-1 α は 402 番目と 564 番目のプロリンがヒドロキシル化されることで von Hippel-Lindau protein (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化を受け、プロテアソーム依存的に分解される (Fig.3) [29-32]。プロリンヒドロキシル化は酸素を補因子として要求する prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) により行われる[33,34]。しかし、低酸素状態になるとこの PHD2 の活性が低下し、HIF-1 α のプロリンヒドロキシル化が抑制される[27,35]。プロリンヒドロキシル化を受けなかった HIF-1 α は核内に移行し、HIF-1 β とヘテロダイマーを形成、DNA 上の Hypoxia Responsive Element (HRE) に結合することでターゲット遺伝子の転写を活性化する (Fig.3) [36]。

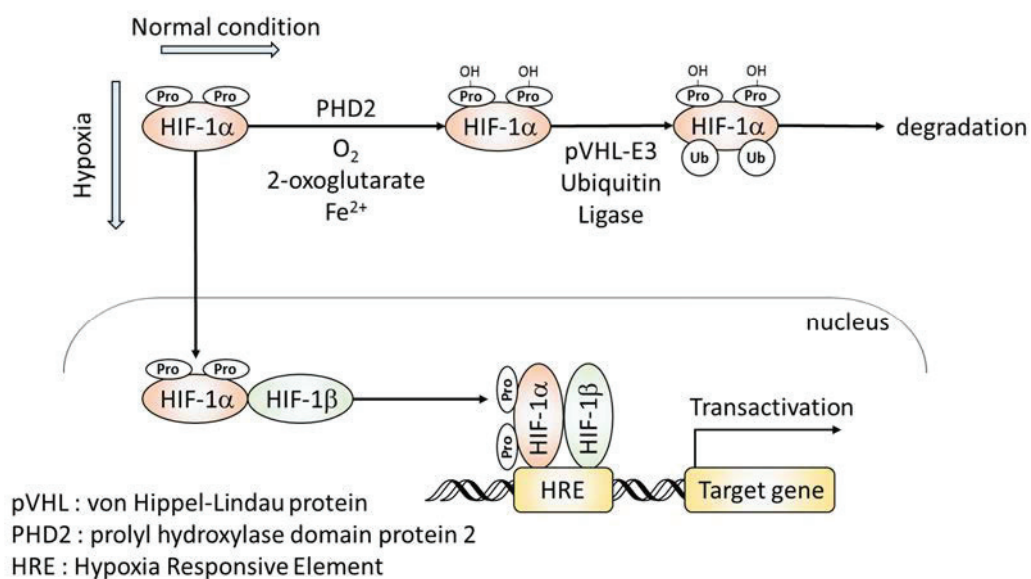


Fig.3 HIF-1 α の分解/転写活性化のメカニズム

VEGF と神経変性疾患の関連についても、様々な報告がなされている。VEGF 欠損マウスが ALS に酷似した運動ニューロン障害を引き起こすことや[37,38]、VEGF を ALS モデルラットの脳室に直接投与することで ALS 発症抑制や生存の延長に働くことが報告されている[39-41]。また、VEGF 発現に関与する遺伝子の変異型が ALS 発症リスクと深く関連していることが示された[37,42]。また、VEGF は主にドパミン作動性神経に保護効果があり、6-hydroxydopamine (6-OHDA) 誘導性の神経細胞死を抑制することや[43]、VEGF 分泌細胞を移植することで、行動学、病理学の両面でパーキンソン病の予防に働くことが報告されている[44,45]。

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 を用いて研究を行った。

第2章 実験材料

第1節 試薬

1) 細胞培養

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	ナカライテスク株式会社
Ham's F12 Medium	ナカライテスク株式会社
Minimum Essential Medium (MEM)	ナカライテスク株式会社
Minimum Essential Medium Alpha (MEM α)	ナカライテスク株式会社
Fetal Bovine Serum (FBS)	GIBCO
Non-essential amino acid (NEAA)	GIBCO
Penicillin-streptomycin liquid	ナカライテスク株式会社
0.25% trypsin-1 mM EDTA solution	ナカライテスク株式会社
Blasticidin	INVIVOGEN
Puromycin	INVIVOGEN
Trypan blue stain 0.4%	GIBCO
All- <i>trans</i> retinoic acid	和光純薬工業株式会社
Fugene 6	PROMEGA
Polybrene	SIGMA-ALDRICH

2) 試料、試薬

コーヒー(ハウスブレンド)	スターバックスコーヒージャパン
デカフェコーヒー	ネスレジャパン
生豆	やなか珈琲店
Caffeine	SIGMA-ALDRICH
Chlorogenic acid	SIGMA-ALDRICH
Caffeic acid	SIGMA-ALDRICH
Trigonelline hydrochloride	SIGMA-ALDRICH
Kahweol	LKT laboratory, Inc
Cafestol	LKT laboratory, Inc
Pyrogallol	SIGMA-ALDRICH
Pyrocatechol	SIGMA-ALDRICH
Hydroxyhydroquinone	SIGMA-ALDRICH
Gallic acid	東京化成工業株式会社
Baicalein	SIGMA-ALDRICH
Paraquat	SIGMA-ALDRICH
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	PEPROTECH
Deferoxamine mesylate salt	SIGMA-ALDRICH

Echinomycin	Enzo Life Science
U0126	和光純薬工業株式会社
SP600125	和光純薬工業株式会社
LY294002	Cayman Chemical
SB202190	SIGMA-ALDRICH
Wortmannin	ナカライテスク株式会社
Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ)	慶應義塾大学理工学部梅沢一夫教授より拝受
MG132	Enzo Life Science
Cycloheximide (CHX)	ナカライテスク株式会社
1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP ⁺)	SIGMA-ALDRICH
Dimethyl sulfoxide	和光純薬工業株式会社
3) タンパク抽出	
2-amino-2-hydroxynethyl-1,3-popanediol 999 (Tris)	和光純薬工業株式会社
EDTA	和光純薬工業株式会社
Sodium Chloride (NaCl)	ナカライテスク株式会社
Nonited P-40	SIGMA-ALDRICH
Protease inhibitor	ナカライテスク株式会社
Phosphatase inhibitor	ナカライテスク株式会社
6×SDS buffer	ナカライテスク株式会社
4) タンパク定量	
Bradford	BIO-RAD
Albumin standard	Thermo
5) Immunoblotting	
Acrylamide	ナカライテスク株式会社
N,N'-methylene bis	和光純薬工業株式会社
Hydrochloric acid	ナカライテスク株式会社
Sodium dodecylsulfate (SDS)	和光純薬工業株式会社
N,N,N',N',-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)	和光純薬工業株式会社
Ammonium persulfate (APS)	BIO-RAD
Glycine	ナカライテスク株式会社
Precision Plus Protein Dual Color	BIO-RAD
Methanol	関東化学株式会社
スキムミルク	雪印メグミルク

Bovine serum albumin	SIGMA-ALDRICH
Tween20	関東化学株式会社
ECL	GE Healthcare

6) 抗体

Anti TrkB antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-TrkB (Y516) antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-TrkB (Y816) antibody	Cell Signaling Technology
Anti Akt antibody	Santa Cruz Biotechnology
Anti pAkt (S473) antibody	Cell Signaling Technology
Anti p44/42 MAPK antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-p44/42 MAPK (T202/Y204) antibody	Cell Signaling Technology
Anti CREB antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-CREB (S133) antibody	Capital Biosciences
Anti p38 MAPK antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-p38 MAPK (T180/Y182) antibody	Cell Signaling Technology
Anti SAPK/JNK antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-SAPK/JNK (T183/Y185) antibody	Cell Signaling Technology
Anti NF- κ B antibody	Cell Signaling Technology
Anti p-NF- κ B (S536) antibody	Cell Signaling Technology
Anti Nrf2 antibody	Santa Cruz Biotechnology
Anti HIF-1 α antibody	Cell Signaling Technology
Anti hydroxy-HIF-1 α (P564) antibody	Cell Signaling Technology
Anti PHD2 antibody	Cell Signaling Technology
Anti HSP70 antibody	R&D Systems
Anti Cu/Zn SOD antibody	StressMarq Biosciences Inc.
Anti BACE1 antibody	abcam
Anti Flag antibody	SIGMA-ALDRICH
Anti β -actin antibody	Santa Cruz Biotechnology
Anti Lamin B antibody	Santa Cruz Biotechnology
Anti rabbit IgG HRP linked antibody	GE Healthcare
Anti mouse IgG HRP linked antibody	GE Healthcare
Anti goat IgG HRP linked antibody	Dako-Japan

7) RNA 抽出

ISOGEN	和光純薬工業株式会社
Chloroform	関東化学株式会社

Isopropyl alcohol	関東化学株式会社
Ethanol	関東化学株式会社
滅菌水	ナカライテスク株式会社
8) 逆転写反応	
ReverTra Ace (100 U/ μ M)	TOYOBO
Random Primer (25 pmol/ μ M)	TOYOBO
dNTP mixture	TOYOBO
RNase inhibitor	TOYOBO
5 \times RT buffer	TOYOBO
9) real-time PCR	
FastStart Universal SYBR Green Master mix	Roche
SsoFast Evagreen Supermix	BIO-RAD
10) SOD 活性測定	
SOD Assay Kit	同仁化学研究所
11) Flow cytometry	
Anti-Human TrkB/NTRK2 Antibody (PE)	Sino Biological Inc.
Mouse IgG1, kappa monoclonal (PE/Cy5 [®])-Isotype Control	abcam
Human BDNF-Biotin	alomone labs
FITC-Streptavidin	Invitrogen
12) ELISA	
Human VEGF-A Platinum ELISA Kit	eBioscience
13) PHD 活性測定	
[5- ¹⁴ C]- α -ketoglutaric acid	Moravek Biochemicals
dithiothreitol (DTT)	SIGMA-ALDRICH
ammonium ferrous sulfate	SIGMA-ALDRICH
ascorbic acid	和光純薬工業株式会社
catalase	ナカライテスク株式会社
(Pro-Pro-Gly) ₁₀ \times 9 H ₂ O peptide	ペプチド研究所
α -ketoglutaric acid	SIGMA-ALDRICH
Succinate	ナカライテスク株式会社
2,4-dinitrophenylhydrazine	東京化成工業株式会社

第2節 試薬調製

1) medium

• DMEM : Ham's F-12(1:1)培地の調製 (継代用)

DMEM (high glucose)	300 mL
Ham's F-12	300 mL
FBS	100 mL (15%)
NEAA	7 mL
Penicillin-Streptomycin liquid	7 mL (100 units/mL)

• DMEM : Ham's F-12(1:1)培地の調整 (分化用)

DMEM (high glucose)	500 mL
Ham's F-12	500 mL
NEAA	10 mL
Penicillin-Streptomycin liquid	10 mL (100 units/mL)
All- <i>trans</i> retinoic acid	100 μ L (10 μ M)

• DMEM 培地の調製

DMEM (high glucose)	500 mL
FBS	50 mL (10%)
Penicillin-Streptomycin liquid	5 mL (100 units/mL)

• MEM 培地の調製

MEM	500 mL
FBS	50 mL (10%)
NEAA	10 mL
Penicillin-Streptomycin liquid	5 mL (100 units/mL)

• MEM α 培地の調製

MEM α	500 mL
FBS	50 mL (10%)
Penicillin-Streptomycin liquid	5 mL (100 units/mL)

2) PBS(-)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
<u>KH₂PO₄</u>	<u>0.2 g</u>
精製水	up to 1000 mL

3) Tris-EDTA buffer

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM

4) 1×TAE

Tris	4.8 g
Acetic acid	1.14 mL
<u>EDTA · 3Na · H₂O</u>	<u>0.41 g</u>
精製水	up to 1000 mL

6) ポリアクリルアミドゲル

・濃縮ゲル (ミニゲル 2 枚分)

1 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 mL
30% Acrylamide	0.84 mL
精製水	2.8 mL
10% SDS	50 μL
10% APS	50 μL
TEMED	10 μL

・分離ゲル (ミニゲル 2 枚分)

	7.5%	10%	12%	15%
1 M Tris-HCl pH 8.7	4.84 mL	4.84 mL	4.84 mL	4.84 mL
30% Acrylamide	2.5 mL	3.3 mL	4 mL	5 mL
精製水	2.5 mL	1.7 mL	1 mL	0 mL
10% SDS	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
10% APS	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL
TEMED	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

7) ポリアクリルアミドゲル電気泳動泳動 buffer

Tris	1.52 g
Glycine	7.2 g
<u>SDS</u>	<u>0.5 g</u>
精製水	up to 500 mL

8) transfer buffer

Glycine	7.21 g
Tris	1.51 g
<u>Methanol</u>	<u>100 mL</u>
精製水	up to 500 mL

9) T-TBS

Tris	6.1 g
NaCl	8.1 g
<u>Tween 20</u>	<u>250 μL</u>
精製水	up to 500 mL

第3節 機器

1) CO₂ インキュベーター

BHA-11 ESPEC

2) 遠心機

Optima TM TLX Ultracentrifuge BECKMAN

MX-300 TOMY

CPW-80X HITACHI

3) 超音波破碎機

VP-050 TAITEC

4) 吸光度測定器

Biospec Nano SHIMAZU

Infinite M200 pro TECAN

5) Thermal cycler		
PTC-100 Programmable Thermal Controller		MJ RESEARCH, INC
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient		TaKaRa
6) ゲル撮影装置		
Omega Lum G		aplegen
Alpha Imager® Mini		Alpha Innotech
7) real-time PCR		
CFX96 Real-Time System		BIO-RAD
8) コールターカウンター		
Beckman Coulter Vi-CELL		Beckman coulter
9) Flow cytometer		
BD LSR II		日本ベクソンデッキンソン社
10) Immunoblotting		
・泳動装置		
Mini-PROTEIN Tetra system		BIO-RAD
・泳動電源		
パワーパック ™ Basic		BIO-RAD
パワーパック ™ HC		BIO-RAD
・自動現像機		
KODAK X-O mat 1000 Processor		KODAK
11) 位相差顕微鏡		
ECLIPSE Ti-U		Nikon
12) 蛍光顕微鏡		
HS オールインワン蛍光顕微鏡		KEYENCE
13) 液体シンチレーションカウンター		
LSC-3500		ALOKA
LSC-6101		ALOKA

第 4 節 細胞

SH-SY5Y

IMR-32

NB-1

HEK293T

DS Pharma Biomedical Co. Ltd

理化学研究所

理化学研究所

理化学研究所

第3章 実験方法

第1節 細胞培養

SH-SY5Y 細胞は 15% FBS、100 units/mL Penicillin-100 µg/mL Streptomycin、1% NEAA を含む DMEM/Ham's F-12 培地 (1:1) で 37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。また SH-SY5Y 細胞は、10 µM の All-*trans* retinoic acid (ATRA) 刺激により分化した。HEK293T 細胞、NB-1 細胞、IMR-32 細胞はそれぞれ 10% FBS、100 units/mL Penicillin-100 µg/mL Streptomycin 含有 DMEM、MEM α 、MEM で培養した。細胞は 1.0×10⁵ 個/mL で播種し、それぞれ 10 cm dish は 10 mL、6 cm dish は 4 mL、3.5 cm dish は 1.5 mL、6 well plate は 2 mL、12 well plate は 1 mL、24 well plate は 500 µL、96 well plate は 100 µL の medium で培養した。

第2節 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後、0.22 µm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。これを 100%(v/v) として用いた。

第3節 RT-PCR 法による各種遺伝子の発現検討

第1項 細胞からの RNA 抽出

3日間培養した細胞を PBS (-) で wash し、ISOGEN 1 mL を加えて細胞を懸濁、1.5 mL tube に移した、サンプル 1 mL に対して chloroform 200 µL を加え vortex 後、室温で 2分静置し、12,000 g、4°C で 15分遠心した。上清 500 µL を別の 1.5 mL tube に移し、そこに 500 µL の isopropanol を加え vortex 後、室温で 10分静置し、12,000 g、4°C で 15分遠心した。ペレットを残して上清を捨て、1 mL の 70% Ethanol を加え転倒混和後、12,000 g、4°C で 5分遠心した。上清を捨て、さらに 12,000 g、4°C で 3分遠心し、ペレットを乾燥させた後、滅菌水 30 µL に完全に溶解させ、-80°C で保存した。抽出した RNA 2 µL を用

いて 260 nm での吸光度を測定し、RNA 量を求めた。

第 2 項 total RNA から cDNA の合成 (Reverse Transcription)

第 3 章、第 3 節、第 1 項により抽出した RNA 1 µg 相当量を Random primer 1 µL、5×RT buffer 4 µL、40 units/µL RNase inhibitor 0.2 µL、10 mM dNTP mixture 2 µL、ReverTra Ace 1 µL (全量 20 µL) を用いて、30°C で 10 分、42°C で 60 分、90°C で 5 分反応させ、逆転写反応を行った。

第 3 項 PCR 法による遺伝子発現の検討

第 3 章、第 3 節、第 2 項により調製した cDNA 溶液を 1 µL テンプレートとし、Go Taq Green Master mix 10 µL、50 µM primer (Forward) 0.1 µL、50 µM primer (Reverse) 0.1 µL (全量 20 µL) を用いて PCR を行った。PCR は 95°C 2 分 (1 cycle)、95°C 1 分、58°C 1 分、72°C 1 分 (35 cycle)、72°C 5 分 (1 cycle) の条件で行った。反応終了後、PCR 産物を 1% アガロースゲルで 100 V、30 分泳動、10 ng/mL etidium bromide で染色後、紫外光にて写真撮影した。

各遺伝子の増幅には以下の primer を用いた。

Table. 1 Primer 配列 (F: forward R: reverse 5' to 3')

Target mRNA		5' to 3'
18s rRNA (90 bp)	F	TGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAG
	R	AGTCAAATTAAGCCGCAGGC
BDNF (135 bp)	F	GAAGGCTGCAGGGGCATAGAC
	R	TACACAAGAAGTGTCTATCCTTAT
TrkB (127 bp)	F	ACGATGGTGCAAACCCAAAT
	R	CCGGTTTTATCAGTGACGTCTGT

A _{2A} R (136 bp)	F	GAATCCCTTCATCTACGCCTACC
	R	GCCATGAGCTGCCAAGACC
SOD1 (134 bp)	F	CTCTCAGGAGACCATTGCATCAT
	R	CCAATTACACCACAAGCCAAACG
DNMT3A (239 bp)	F	GCCACCTCTTCGCTCCGCTG
	R	GATGATGTCCAACCCTTTTCGCAA
VEGF (133 bp)	F	AGGCCAGCACATAGGAGAGA
	R	TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT
HSP70 (183 bp)	F	AACACCGTGTTTGACGCGAA
	R	GGTCAGCACCATGGACGAGA
ARC (237 bp)	F	CCTCCCAGGGGAGAGTAGAA
	R	TTTGTGGGAACCTTGAGACC
c-Fos (188 bp)	F	ATGATGTTCTCGGGCTTCAA
	R	GTGGGAATGAAGTTGGCACT
EGR1 (246 bp)	F	AGCTGGAGGAGATGATGCTG
	R	GCACCTTCTCGTTGTTTCA
HIF-1 α (83 bp)	F	CATCAGCTATTTGCGTGTGAGGA
	R	AGCAATTCATCTGTGCTTTCATGTC
APP (110 bp)	F	TGCTTAGTTGGTGAGTTTGTAAGTGAT
	R	ACGGTGTGCCAGTGAAGATG
BACE1 (173 bp)	F	CACCACCAACCTTCGTTTGC
	R	TTAGGTAGAGTGAGATGACTGGGAAA
BACE2 (121 bp)	F	CAGAAGCTACAGATTCTCGTTGACA
	R	AGCCCTTGGAGCGGTATGT

IDE (173 bp)	F	GTCCTGTTGTTGGAGAGTTCCCATGTCA
	R	GGGGAATCTTCAGAGTTTTGCAGCCAT
PHD2 (182 bp)	F	CGACCTGATACGCCACTGTA
	R	CCTTGGCATCCCAGTCTTTA
VEGFR1 (172 bp)	F	AAGCAAACCACACTGGCTTC
	R	ACGAGCTCCCTTCCTTCAGT
VEGFR2 (160 bp)	F	CCTCTGTGGGTTTGCCTAGT
	R	CTTTGCTCACTGCCACTCTG
VEGFR3 (165 bp)	F	GAGAGCACCGAGGTCATTGT
	R	CAGTGCCTTTCCATCCTTGT
HK2 (81 bp)	F	ATCCCTGAGGACATCATGCGA
	R	CTTATCCATGAAGTTAGCCAGGCA
GLUT1 (111 bp)	F	GGGCAAGTCCTTTGAGATGC
	R	AGGGCTGTGGGTGACACTTCA
GDNF (120 bp)	F	GCTGAGCAGTGA CTCAAATATG
	R	AGCACTGCCATTTGTTTATCTG
NGF (159 bp)	F	ATGGCATGCTGGACCCAAGCTC
	R	GGTTCCGCCTGTATGCCGATCA

第 4 節 WST assay による細胞毒性の検討

3 日間培養した細胞にコーヒー豆抽出液をそれぞれ 10%(v/v)までの濃度で、またコーヒーの主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリンをそれぞれ 100 μ M までの濃度で添加し、24 時間後、PBS(-)で wash、10%WST-8 含有 medium を加えた。37°C、5% CO₂ インキュベーターで 1.5 時間培養し、450 nm の吸光度を測定した。

第 5 節 quantitative RT-PCR 法による各種遺伝子の発現変動の解析

第 1 項 細胞からの RNA 抽出

3 日間培養した細胞にコーヒー豆抽出液を添加し、24 時間までの任意の時間後に PBS(-) で wash、1 mL の ISOGEN で細胞を回収した。以下第 3 章、第 3 節と同様の方法で RNA を抽出、RT により cDNA を得た。

第 2 項 real-time PCR による発現変動の検討

第 3 章、第 5 節、第 1 項の通りに調製した cDNA 溶液を 10 倍に希釈した。2 μ L をテンプレートとし、SYBR Green master mix 5 μ L、50 μ M primer (Forward) 0.025 μ L、50 μ M primer (Reverse) 0.025 μ L (全量 10 μ L)を用いて PCR を行った。PCR は 95°C 10 分 (1 cycle)、95°C 15 秒、60°C 1 分 (40 cycle)の条件で行った。各遺伝子の増幅には Table 1 の primer を用いた。各遺伝子発現量の補正は 18s rRNA で行った。

第 6 節 G93ASOD1 変異体発現細胞の作製

第 1 項 プラスミドの作製

レトロウイルス発現ベクター MSCV-Puro 及び MSCV-Puro-N-Flag を用いた。SOD1 クローン cDNA は理化学研究所より購入した。まず初めに、制限酵素認識サイトを組み込むため、以下のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR を行い、TA cloning を経て、大腸菌に形質導入した。

*Eco*RI-SOD1-A

5'-CCCGAATTCATGGCGACGAAGGCCGTGTG-3'

*Xho*I-SOD1-B

5'-CCCCTCGAGTTATTGGGCGATCCCAATTAC-3'

*Xho*I-C-Flag-SOD1-B

5'-CCCCTCGAGTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTTGGGCGATCCCAATTAC-3'

得られたプラスミドの配列を制限酵素処理、Sequence 解析により確認後、それぞれのプラスミドをテンプレートとして Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて mutagenesis PCR により SOD1G93A 変異体を作製した。以下に示したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた。

5'- GACTGCTGACAAAGATGCTGTGGCCGATGTGTC-3' (sense)

5'- GACACATCGGCCACAGCATCTTTGTCAGCAGTC-3' (antisense)

第2項 レトロウイルスの調製

HEK293T 細胞 (0.3×10^5 cells/mL) を 10 cm dish に播種し、2 種類のヘルパーベクター (pE-Eco helper, pGP helper) を各 1.3 μ g、レトロウイルス発現ベクターを 1.4 μ g の計 4.0 μ g を 12 μ L の Fugene 6 を用いてトランスフェクトした。16 時間培養後、培地を除き、新しい培地を 4 mL 加えた。6 時間後にレトロウイルスを含む培養上清を回収し、更に新しい培養培地を加えた。この操作を更に 2 日間繰り返し、回収したレトロウイルス含有培養培地を 0.45 μ m のフィルターで濾過し、 -80°C で保存した。

第3項 レトロウイルス感染

第3章、第6節、第2項で回収したレトロウイルス含有培養培地にポリブレンを 10 μ g/mL になるように混和し、SH-SY5Y 細胞 (0.3×10^5 cells/mL) に加えた。翌日新しい培養培地に交換し、更に 2 日間培養後、セクションを行った。Ecotropic receptor 発現細胞の作製には 5 μ g/mL の Blasticidin を用い、SOD1G93A 発現細胞の作製には 2 μ g/mL の Puromycin を用いた。

第4項 immunoblot 法による発現確認

細胞を PBS(-) で wash 後、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor

cocktail) を加えて細胞を溶解した。細胞溶解液を 4°C、15,000 r.p.m. で 5 分間遠心分離し、上清を用いて Bradford 法によりタンパク定量を行った。タンパク量を一定にそろえ、SDS サンプル buffer を加え、100°C で 10 分間加熱した。それぞれのタンパク 10 µg をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、500 mA の定電流で 90 分間通電し、PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク/T-TBS (0.05% Tween 2 含有 TBS) を用いて 1 時間ブロッキングを行った。抗体 (1:1000) を加えた 5% スキムミルク/T-TBS に PVDF 膜を入れ、4°C で一晩静置した。次に PVDF 膜を T-TBS で 10 分間洗浄し、これを 3 回繰り返した。2 次抗体 (1:3000) を加えた 5% スキムミルク/T-TBS に PVDF 膜を浸し、室温で 1 時間静置した。その後 PVDF 膜を T-TBS で 5 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。ECL 反応液を用いて目的のタンパクを可視化した。

第 5 項 トリパンプルー染色による細胞増殖の検討

細胞を 0.25×10^5 cells/mL で播種し、24、48、72、96 時間後に PBS(-) で細胞を wash、200 µL の 0.25% トリプシン・EDTA で細胞を剥がした。室温で 5 分放置し、培養用の medium を 350 µL 加え、トリパンプルー染色により生存細胞数を測定した。

第 6 項 SOD1 活性の測定

細胞を PBS(-) で 2 回 wash し、セルスクレーパーで剥がして回収した。1,000 g で 5 分遠心し、上清を取り除いた後、ホモジナイザーにより細胞膜を破砕した。新たに PBS(-) を 300 µL 加えて細胞を懸濁し、4°C、10,000 g で 15 分間遠心、上清をサンプルとして用いた。SOD1 の活性測定は SOD1 Assay Kit を用いて行った。まず上清を用いて 5 倍の希釈系列を作製し、サンプルとした。それぞれのサンプル 20 µL に対して WST working solution 200 µL、Enzyme working solution 20 µL を加え、37°C で 20 分反応させ、450 nm の吸光度を測定した。また、bradford 法によりタンパク濃度を算出し、タンパク量当たりの SOD1 活性に補正した。

第 7 項 パラコートによる酸化ストレスに対する細胞増殖の検討

細胞を 0.5×10^5 cells/mL で播種し、翌日パラコートを 50, 75, 100, 150, 200 μ M で添加した。72 時間後に PBS(-) で wash、以下第 3 章、第 6 節、第 5 項と同様の方法で生存細胞数について測定した。

第 7 節 HSP70 遺伝子発現の検討

0.5×10^5 cells/mL で播種した SH-SY5Y 細胞を 3 日間培養し、コーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、またはデカフェコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、コーヒー主成分 (100 μ M)、焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、カテコール類 (~ 50 μ M) を添加した。8 時間後に PBS(-) で wash 後、RNA 抽出、RT により cDNA を合成し、real-time PCR により発現変動を検討した。

第 8 節 BDNF の働きに対するコーヒー豆抽出液の影響

第 1 項 BDNF による TrkB のリン酸化

6 日間分化させた SH-SY5Y 細胞に BDNF を 5、10、20 ng/mL で添加し、5、10、15 分後に 150 μ L の Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail) を加えて細胞を溶解した。以下 bradford 法によりタンパク量をそろえ、50 μ g を用いて Immunoblot 法により TrkB のリン酸化について検討した。

第 2 項 BDNF/TrkB シグナルに対するコーヒー豆抽出液の影響

6 日間分化させた SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液またはデカフェコーヒー豆抽出液を 2.0%(v/v) で添加し、2 時間後に BDNF (20 ng/mL) を添加、0~120 分後に 150 μ L の Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した。濃度依存性及び主成分による影響を検討する際は、それぞれ 6 日間分化させた SH-SY5Y 細胞に添加し、2 時間後に BDNF (20 ng/mL) を添加、

15分後に 150 μ L の Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した。CREB について検討する際は、6日間分化させた SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を添加し、2時間後に BDNF (20 ng/mL) を添加、120分後に 150 μ L の Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した。以下 bradford 法によりタンパク量をそろえ、TrkB の検出には 50 μ g のタンパクを用いて、他のシグナル因子の検出には 10 μ g のタンパクを用いて Immunoblot 法を行った。各タンパク質のリン酸化体について検出する際には 1%BSA/T-TBS を用いてブロッキングを行った。

第3項 BDNF 遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

第3章、第8節、第2項と同様に刺激を行い、BDNF 添加後 4 時間後に細胞を PBS(-) で wash、RNA 抽出、RT により cDNA を合成し、real-time PCR により発現変動を検討した。LY294002 (10 μ M) の添加は BDNF 添加の 1 時間前に行った。

第4項 膜表面上の TrkB 発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

6日間分化させた SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を 2.0%(v/v) で添加し、2時間後に細胞を PBS(-) で wash、500 μ L の 0.25%トリプシン・EDTA を用いて細胞を回収した。回収した細胞に PE 標識された抗 TrkB 抗体液、または isotype control として PE 標識抗マウス IgG1 抗体液を加え、on ice で 20 分間反応させた。反応終了後細胞を回収、PBS(-) で 2 回 wash し、フローサイトメーターを用いて 1×10^4 個の細胞について解析した。

第5項 BDNF・TrkB 結合能に対するコーヒー豆抽出液の影響

6日間分化させた SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を 2.0%(v/v) で添加し、2時間後に 10 ng/mL の human BDNF・Biotin を添加し、on ice で 45 分間反応させた。Ice cold PBS(-) で wash 後、Streptavidin-FITC (1:2000) を加え、氷上で 1 時間反応させた。反応終了後 ice cold PBS(-) で 2 回 wash し、蛍光顕微鏡で観察、またはフローサイトメーターを用いて 1×10^4 個の細胞について解析した。

第6項 BDNFによる神経突起の伸長に対するコーヒー豆抽出液の効果

4日間分化させた SH-SY5Y 細胞にコーヒー豆抽出液を 0~2.0%(v/v)で添加し、2時間後に BDNF (50 ng/mL) を添加、48時間後に顕微鏡を用いて各濃度4か所ずつ写真を撮影、全ての写真について、写真内の全ての神経突起の長さについて Image J を用いて測定した。

第9節 VEGF発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

第1項 VEGF遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

0.5×10^5 cells/mL で播種した SH-SY5Y 細胞を3日間培養し、コーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、またはデカフェコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、コーヒー主成分 (100 μ M)、焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、カテコール類 (~50 μ M) を添加した。DFX (100 μ M) はポジティブコントロールとして用いた。添加後8時間後に細胞を PBS(-)で wash、RNA 抽出、RT により cDNA を合成し、real-time PCR により発現変動を検討した。エキノマイシン (5 nM)、U0126 (5 μ M)、SB202190 (10 μ M) の添加はコーヒー豆抽出液添加の1時間前に行った。

第2項 VEGF分泌量に対するコーヒー豆抽出液の影響

0.5×10^5 cells/mL で播種した SH-SY5Y 細胞を3日間培養し、コーヒー豆抽出液 (0~2.0%(v/v)) を添加した。12時間後、培養上清を回収し、Human VEGF-A Platinum ELISA キットを用いて ELISA 法により VEGF 分泌量を検討した。まずチューブを2回洗浄し、Sample Diluent を 50 μ L ずつ加え、そこにサンプルを 50 μ L ずつ加えた。室温で2時間振盪し、wash buffer で6回洗浄した。次に Biotin-Conjugate を 100 μ L ずつ加え、室温で1時間振盪した。Wash buffer で6回洗浄後、Streptavidin-HRP を 100 μ L ずつ加え、室温で1時間振盪した。Wash buffer で6回洗浄後、TMB Substrate Solution を 100 μ L ずつ加え、遮光して30分室温で反応し、Stop Solution を 100 μ L ずつ加え、450 nm の吸光度を測定した。

第3項 HIF-1 α タンパク発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

0.5 \times 10⁵ cells/mL で播種した SH-SY5Y 細胞を 3 日間培養し、コーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、またはデカフェコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、コーヒー主成分 (100 μ M)、焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液 (2.0%(v/v))、有機溶媒分画抽出物 (2.0%(v/v)相当)、Sep Pak C₁₈ 分画抽出物 (2.0%(v/v)相当)、カテコール類 (\sim 50 μ M) で添加した。DFX (100 μ M) はポジティブコントロールとして用いた。添加後 4 時間後に 150 μ L の Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した。またシグナル因子の発現変動の検討には、コーヒー豆抽出液添加後 0 \sim 180 分後のサンプルを用いた。核タンパクの抽出は細胞を PBS(-)で回収後、400 μ L の A buffer (10 mM HEPES-KOH(pH 7.8), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA(pH 8.0), 0.1% NP-40, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail) を加えて細胞を溶解し、5,000 r.p.m.で 2 分間遠心分離し、ペレットを 150 μ L の Lysis Buffer で溶解した。更に超音波破碎によりペレットを破碎し、4 $^{\circ}$ C、15,000 r.p.m.で 5 分間遠心分離し、上清を核タンパクとして回収した。回収後、bradford 法によりタンパク量をそろえ、10 μ g のタンパクを用いて Immunoblot 法を行った。各タンパク質のリン酸化体について検出する際には 1%BSA/T-TBS を用いてブロッキングを行った。U0126 (5 μ M)、SB202190 (10 μ M)、SP200125 (10 μ M)、wortmannin (10 nM)、LY294002 (10 μ M)、DHMEQ (10 μ g/mL) の添加はコーヒー豆抽出液添加の 1 時間前に行った。

第4項 HIF-1 α のヒドロキシル化に対するコーヒー豆抽出液の影響

0.5 \times 10⁵ cells/mL で播種した SH-SY5Y 細胞を 3 日間培養し、MG132 (10 μ M) を添加した。1 時間後にコーヒー豆抽出液 (0 \sim 2.0%(v/v)) または PG (50 μ M)、CTC (10 μ M)、HHQ (25 μ M) を添加した。添加後 4 時間後までに 150 μ L の Lysis Buffer を加えて細胞を溶解し、bradford 法によりタンパク量をそろえ、10 μ g のタンパクを用いて Immunoblot 法を行った。

第5項 PHD 活性に対するコーヒー豆抽出液の影響

PHD の活性は[5-¹⁴C]- α -ケトグルタル酸から生成される[1-¹⁴C]コハク酸の量を定量することで測定した。残存した[5-¹⁴C]- α -ケトグルタル酸はジニトロフェニルヒドラゾンとして沈殿させ、取り除いた。SH-SY5Y 細胞を Lysis Buffer で溶解し、bradford 法によりタンパク量をそろえた。4 μ g のタンパク質を 0.5 mM DTT、50 μ M 硫酸アンモニウム鉄(II)、1 mM アスコルビン酸、2 mg/mL BSA、0.4 mg/mL カタラーゼ、0.3 mM [5-¹⁴C]- α -ケトグルタル酸(1700 Bq)、40 mM Tris-HCl(pH 7.5)、50 μ M (Pro-Pro-Gly)₁₀×9H₂O peptide を含む反応液(最終 25 μ L)で 37°C、10 分反応させた。反応終了後、20 mM α -ケトグルタル酸-20 mM コハク酸溶液を 25 μ L、0.16 M 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (30% HClO₄) 溶液を 25 μ L ずつ加え、室温で 30 分間反応させた。さらに 1 M α -ケトグルタル酸を 50 μ L 加え、室温で 30 分間反応させ、3,000 *g*で 5 分遠心し、上清 100 μ L 中の放射活性を、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した[46,47]。

第10節 統計的解析

Student's t 検定により統計的解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な変化とした。

第4章 実験結果

第1節 各神経系細胞における神経保護関連遺伝子の発現検討

IMR-32、SH-SY5Y、NB-1 のそれぞれの神経細胞において、BDNF、TrkB、A₂AR、SOD1、TDP43、FUS の遺伝子発現について検討した。IMR-32 は TDP43 の発現が低く、NB-1 は TrkB の発現が低かった (Fig.4)。SH-SY5Y はすべての遺伝子の発現が確認できた。

第2節 コーヒー豆抽出液及びコーヒー主成分の神経細胞に対する毒性

IMR-32、SH-SY5Y、NB-1 のそれぞれの神経細胞について、コーヒー豆抽出液及びコーヒー主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリンの 24 時間曝露での毒性について、WST assay により検討した。コーヒー豆抽出液については、IMR-32 で 1.25%(v/v)から、SH-SY5Y 細胞では 5%(v/v)から、NB-1 細胞では 2.5%(v/v)から毒性が見られた (Fig.5A, C, E)。一方コーヒー主成分については、コーヒー中に含まれるよりも高い濃度 (100 μ M) でも毒性は見られなかった (Fig.5B, D, F)。

第3節 SOD1G93A 発現 SH-SY5Y 細胞の作製及び変異体発現の影響

ALS の原因遺伝子として SOD1 遺伝子の G93A 変異が報告されている[48]。そこで、SOD1G93A を発現した ALS のモデル細胞を作製することとした。変異体を発現させる細胞としては、BDNF、TrkB、A₂AR が発現しており (Fig.4)、また別の ALS 原因遺伝子として報告されている FUS の変異体発現細胞が報告されている[49]SH-SY5Y 細胞を用いた。コントロール細胞、tag なしの細胞 (SOD1WT、SOD1G93A)、N 末に Flag tag をつけた細胞 (SOD1WT-N-Flag、SOD1G93A-N-Flag)、C 末に Flag tag をつけた細胞 (SOD1WT-C-Flag、SOD1G93A-C-Flag) の 7 種類の細胞を作製した。この 7 種類の細胞について細胞増殖を検討したところ、C-Flag の 2 種類の細胞で増殖が低下し、また N-Flag の 2 種類の細胞でも若干の増殖抑制が確認された (Fig.6B)。SOD1G93A の変異では SOD 活性が変化しないことが報告されているが[50]、コントロールの細胞に比べて SOD1 を導入した細胞

では変異の有無にかかわらず、活性の上昇が確認できた (Fig.6C)。これまでの結果を踏まえ、今後の検討には tag なしの細胞を用いることとした。次に SOD1 変異体発現細胞では酸化ストレス耐性が低下すると報告されているため[51]、パラコート感受性について検討した。しかし、パラコート感受性には変化が見られなかった (Fig.6D)。その一方で、分子シャペロンである HSP70 の遺伝子発現について検討したところ、SOD1G93A で SOD1WT に比べて有意な発現の上昇が見られた (Fig.6E)。また、コーヒー豆抽出液刺激による HSP70 遺伝子発現変化について検討したところ、コーヒー豆抽出液により発現は上昇し、その上昇は SOD1G93A でより大きかった (Fig.6F)。

第 4 節 HSP70 発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

前節の結果から、SH-SY5Y 細胞においてコーヒー豆抽出液により HSP70 遺伝子発現が誘導されることがわかった。そこで、HSP70 発現誘導の活性成分について検討した。まず、コーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))刺激後の経時変化を調べたところ、刺激後 6-9 時間をピークに発現が上昇し、15 時間後以降では元のレベルまで戻った (Fig.7A)。そこで、以後の HSP70 遺伝子発現の検討は刺激後 8 時間後で行うこととした。次に、デカフェコーヒー豆抽出液でも同様の変化が見られるか検討したところ、コーヒー豆抽出液では用量依存的な発現誘導が見られたのに対し、デカフェコーヒー豆抽出液ではほとんど変化が見られず、コーヒー豆抽出液による発現誘導にはカフェインなど、デカフェ処理により取り除かれる成分が必要であることがわかった (Fig.7B)。コーヒー豆抽出液による誘導がデカフェコーヒー豆抽出液中の成分とカフェインとが相互作用することによる可能性について検討したところ、デカフェコーヒー豆抽出液単独の刺激とデカフェコーヒー豆抽出液+カフェインの刺激とで誘導の大きさにほとんど変化は見られずカフェインが他の成分と相互作用することによる変化ではないことが明らかとなった (Fig.7C)。次に、コーヒー主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリンによる影響を見たところ、カフェ酸とトリゴネリンの刺激で誘導が見られたが、コーヒー豆抽出液程大きな変化は見られず、用いた濃度 (100

μM) はコーヒー2.0%(v/v)以上相当するので、コーヒー豆抽出液による発現誘導はこれらの成分の以外の成分によるものであると考えられる (Fig.7D)。そこで HSP70 誘導活性を持つ成分について更に検討するため、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。その結果、生豆抽出液の刺激では変化は見られず、焙煎したコーヒー豆抽出液では発現誘導が見られたことから、HSP70 発現誘導成分は焙煎により生成される成分であると考えられる (Fig.7E)。カテコール類であるピロガロール (PG) やピロカテコール (CTC)、ヒドロキシヒドロキノン (HHQ) は焙煎によりクロロゲン酸が加水分解されて生成することが報告されている[52]。そこでこれらの成分による発現変化を検討したところ、HHQ の刺激で大幅に発現が誘導された (Fig.7F)。この結果より、コーヒー豆抽出液中の HSP70 誘導活性成分は HHQ である可能性が示唆された。

第 5 節 BDNF の働きに対するコーヒー豆抽出液の影響

第 1 項 ATRA による SH-SY5Y 細胞の分化

コーヒー豆抽出液による神経保護効果について、BDNF に対する影響による可能性について検討した。未分化の SH-SY5Y 細胞は BDNF の受容体である TrkB があまり発現していないため、ATRA により分化させ、TrkB の発現を誘導した[53]。ATRA 刺激により、培養日数依存的に TrkB の遺伝子、タンパクの発現が共に上昇していることが確認できた (Fig.8A, B)。また、コーヒー豆抽出液は分化に対しては影響を与えなかった (Fig.8C)。

第 2 項 BDNF による TrkB シグナルの活性化に対するコーヒー豆抽出液の影響

次に BDNF による TrkB シグナルの活性化に対するコーヒー豆抽出液の影響を検討した。まず、BDNF 濃度及び曝露時間について決めるため、BDNF による TrkB のリン酸化について検討した。その結果、BDNF の 20ng/mL までの濃度依存的、また 15 分までの時間依存的な TrkB のリン酸化が確認され (Fig.8D)、以後の実験は 20 ng/mL の BDNF15 分曝露で行うこととした。この条件でコーヒー豆抽出液の影響について検討したところ、TrkB の

リン酸化は 516 番目のチロシン (Y516)、816 番目のチロシン (Y816) とともに抑制された (Fig.9A)。また BDNF による Akt のリン酸化は TrkB 同様抑制されたのに対し、ERK1/2 のリン酸化はコーヒー豆抽出液単独で増加した (Fig.9A)。同様の影響をデカフェコーヒー豆抽出液について検討したところ、コーヒー豆抽出液程大きくはないものの、TrkB、Akt のリン酸化の抑制、及び ERK1/2 のリン酸化の増大が確認できた (Fig.9B)。また、コーヒー豆抽出液による変化はいずれもコーヒー用量依存的であることが確認できた (Fig.9C)。コーヒー豆抽出液中の活性成分について検討するため、コーヒー主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリンについて同様の検討を行ったが、これらの成分では BDNF による TrkB のリン酸化には影響が見られず、これらの成分による活性ではないことが示された (Fig.9E)。

BDNF/TrkB シグナルの活性化により BDNF の遺伝子発現が上昇することが報告されている[54]。そこで、コーヒー豆抽出液による BDNF 遺伝子発現に対する影響を検討した。まず BDNF 刺激による BDNF 遺伝子発現について検討したところ、刺激後 4 時間をピークに発現が上昇した (Fig.10A)。この BDNF による BDNF 発現誘導は、コーヒー豆抽出液及びデカフェコーヒー豆抽出液で抑制され (Fig.10B)、コーヒー用量依存的であり (Fig.10C)、コーヒー主成分には発現抑制活性はないことがわかった。(Fig.10D) これらは TrkB のリン酸化に対する変化と同様であった。また、焙煎による影響を見たところ、生豆には抑制効果はなく、焙煎により生成される成分が抑制活性を持つことが示された (Fig.10E)。BDNF の遺伝子発現制御には、ERK1/2/CREB のシグナルと Akt のシグナルの二つが報告されている[8]。本研究の結果より、BDNF/TrkB シグナルの下流の転写因子である CREB のリン酸化はコーヒー豆抽出液単独の添加で促進されることが示された (Fig.9D)。PI3K/Akt の阻害剤である LY294002 で処理したところコーヒー豆抽出液同様 BDNF による発現誘導が抑制された (Fig.10F)。

次に、コーヒー豆抽出液による BDNF/TrkB シグナル抑制のメカニズムについて検討するため、膜表面上の TrkB 発現の変化について検討したが、TrkB ポジティブな細胞の割合

はコーヒー豆抽出液添加の有無で差は見られなかった (Fig.11)。そこで、コーヒー豆抽出液が BDNF と TrkB との結合に影響を与えている可能性について検討したが、BDNF-TrkB の結合にもコーヒー豆抽出液は大きな影響を与えなかった (Fig.12A, B)。

SH-SY5Y 細胞は BDNF の刺激により、神経突起を伸長することが報告されている[8]。そこで、コーヒー豆抽出液による神経突起の伸長に対する影響を検討したところ、神経突起の伸長はコーヒー用量依存的に抑制された (Fig.13)。

第 6 節 VEGF 発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

第 1 項 コーヒー豆抽出液による VEGF 発現への影響及びそのメカニズム解析

コーヒーによる神経保護効果のメカニズムを明らかにするため、VEGF の発現に対する影響について検討した。まず VEGF 遺伝子発現に対する影響を検討したところ、コーヒー添加後 6-9 時間後をピークに VEGF 遺伝子発現量が上昇し、24 時間後には元の発現レベルに戻った (Fig.14A)。以後の VEGF 遺伝子発現の検討は全てコーヒー豆抽出液刺激後 8 時間後に行った。コーヒー豆抽出液による発現誘導はコーヒー用量依存的であったが、デカフェコーヒー豆抽出液では発現誘導はほとんど見られなかった (Fig.14B)。さらに VEGF の分泌量に対する影響を検討したところ、コーヒー用量依存的に増加することが示された (Fig.14C)。

次に、VEGF 遺伝子発現誘導のメカニズムを検討するため、VEGF 遺伝子の転写因子として報告されている HIF-1 α の発現に対する影響を検討した。コーヒー豆抽出液は添加後約 60 分後から HIF-1 α タンパク発現を誘導し、3 時間後がピークだった (Fig.15A, B)。HIF-1 α の誘導はコーヒー用量依存的であったのに対し、デカフェコーヒー豆抽出液の添加ではコーヒー豆抽出液添加程大きな誘導は見られなかった (Fig.15C)。HIF-1 α はその発現が上昇すると核内に移行、標的遺伝子の転写を活性化する[36]。そこで核内の活性化型 HIF-1 α について検討したところ、コーヒー豆抽出液添加後 30 分後から発現の上昇が見られた (Fig.15D)。一方、HIF-1 α の遺伝子発現に対する影響を検討したところ、影響は見られず、

コーヒーによる HIF-1 α 発現誘導が転写後調節による可能性が示唆された (Fig.15E)。HIF-1 α の DNA 結合阻害剤であるエキノマイシンによる影響を検討したところ、コーヒー豆抽出液による発現誘導はエキノマイシンの処理により抑制され、コーヒー豆抽出液による VEGF 発現誘導が HIF-1 α によることが示された (Fig.15F)。コーヒー豆抽出液により HIF-1 α が活性化されていることを更に確認するため、HIF-1 α を転写因子とする Glucose transporter 1 (GLUT1) 及び Hexokinase 2 (HK2) の遺伝子発現に対する影響を検討したところ、VEGF 同様 6 時間をピークとした発現誘導が見られ (Fig.16A, B)、またその誘導はエキノマイシンの処理により抑制された (Fig.16C, D)。

第 2 項 HIF-1 α /VEGF 誘導活性を持つコーヒー成分の同定

コーヒー豆抽出液中の HIF-1 α の誘導活性成分を検討するため、まずカフェイン単独での効果を検討したが、変化は見られなかった (Fig.17A, B)。そこで、カフェインがデカフェコーヒー豆抽出液中の他の成分と相互作用して効果を発揮している可能性について検討した。しかしデカフェコーヒー豆抽出液とカフェインを共添加してもデカフェコーヒー豆抽出液単独の添加と大きな変化は見られず、カフェインが他の成分と相互作用しているのではないと示された (Fig.17A, B)。次に、コーヒー主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリン、カーウェオール、カフェストールによる影響を検討したが、いずれの成分も HIF-1 α 誘導活性を持たなかった (Fig.17C-E)。活性成分について更に検討するため、コーヒー豆の焙煎による影響を検討した。生豆抽出液では変化が見られなかったが、焙煎したコーヒー豆抽出液の添加により、発現が誘導された (Fig.18B, C)。次に、活性が確認できた深煎りコーヒー豆抽出液について、等量のヘキサン、酢酸エチル、1-ブタノールで順次分画し、どの分画に活性成分が回収されるかを検討した (Fig.19A)。活性成分は酢酸エチルに回収された (Fig.19B)。続いて、この酢酸エチル画分を、中性カラムである Sep Pak C₁₈を用いて更に 3 つの画分に分画した (Fig.20A)。その結果、活性成分は主に 20%メタノールで回収される R2 画分に回収された (Fig.20B)。HPLC 分析よりこの画分には

カフェイン、及びピロカテコールが含まれていることがわかった (Fig.20C)。カフェインは単独では HIF-1 α 誘導活性を示さなかった (Fig.17D)、ピロカテコールが活性成分である可能性が考えられる。そこで、ピロカテコール (CTC) 及びカテコール類であるピロガロール (PG)、ヒドロキシヒドロキノン (HHQ) による影響について検討した (Fig.21A)。PG 及び CTC の刺激では VEGF 遺伝子発現、HIF-1 α タンパク発現ともに上昇したが、HHQ の刺激では HIF-1 α のタンパク発現には変化が見られず、VEGF 遺伝子発現のみ誘導が見られた (Fig.21B,C)。また、HPLC 分析よりカテコール類が含まれていなかった花王のヘルシアコーヒーの刺激では、HIF-1 α の発現誘導が見られなかった (Fig.21D)。

第3項 コーヒー豆抽出液による HIF-1 α 誘導メカニズムの解析

コーヒー豆抽出液による HIF-1 α 誘導メカニズムについて検討するため、まず各種シグナル伝達系の阻害剤による影響を検討した。コーヒー豆抽出液による HIF-1 α の誘導は ERK1/2 の阻害剤 U0126、p38 の阻害剤 SB202190 の処理により若干抑制され、NF κ B の阻害剤である DHMEQ の処理により完全に抑制された (Fig.22A)。U0126 及び SB202190 は VEGF の発現誘導も抑制し (Fig.22B)、更にコーヒー豆抽出液は ERK1/2 及び p38 のリン酸化を促進したことから (Fig.22C)、これらのシグナルを介して HIF-1 α を誘導していることが考えられる。一方、NF κ B のリン酸化に対しては影響が見られなかった (Fig.22C)。

HIF-1 α は通常酸素分圧では 402 番目と 564 番目のプロリン残基がヒドロキシル化を受けることによりユビキチン化を受け、プロテアソーム依存的な分解を受けている。そこで、コーヒー豆抽出液による、HIF-1 α のヒドロキシル化に対する効果について検討した。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 が検出され、コーヒー豆抽出液により用量依存的に減少した (Fig.23A)。MG132 処理により時間依存的なヒドロキシル化 HIF-1 α の発現上昇が確認できたが、コーヒー豆抽出液で処理するとヒドロキシル化 HIF-1 α の発現は変化しなかった (Fig.23B)。また、ピロカテコールも HIF-1 α のヒド

ロキシル化を阻害した (Fig.23C)。しかしコーヒー豆抽出液は細胞の PHD2 発現には影響しなかった (Fig.23D)。更に *in vitro*での PHD 酵素活性にも影響を与えなかった (Fig.23E)。そこで、コーヒー豆抽出液の添加の、PHD2 反応の補酵素である Fe^{2+} やアスコルビン酸に対する効果を検討した[55]。その結果、コーヒー豆抽出液による HIF-1 α の発現誘導は Fe^{2+} 、アスコルビン酸、カタラーゼなどの補充で抑制された (Fig.24A, C, E)。ピロカテコールによる HIF-1 α の誘導も、同様に抑制された (Fig.24B, D, F)。

第 7 節 AD 関連遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液の影響

日常的なコーヒーの摂取により、AD のリスクが低下するという報告がある[4]。そこで、SH-SY5Y 細胞における AD 関連遺伝子として知られる β -セクレターゼ (beta-site APP cleaving enzyme1; BACE1) やアミロイド前駆タンパク (amyloid precursor protein; APP)、インシュリン分解酵素 (insulin degrading enzyme; IDE)、そして神経栄養因子である NGF、TrkB、BDNF の遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液の影響を検討した。BACE1 や APP には大きな変化は見られなかったが (Fig.25A, B)、IDE 及び NGF の遺伝子発現は刺激後 6~12 時間をピークに誘導され (Fig.25C, D)、BDNF や TrkB についても刺激後 15~21 時間で誘導傾向が見られた (Fig.25E, F)。BACE1 については遺伝子発現には変化が見られなかった一方で、タンパク発現は添加後 12 時間をピークに減少した (Fig.26)。

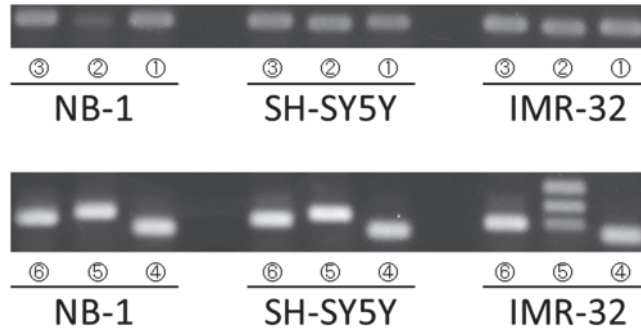


Fig.4 IMR-32、SH-SY5Y、NB-1細胞における各遺伝子発現の検討
 各細胞よりRNAを抽出、RTによりcDNAを合成し、PCR法により遺伝子発現について検討。①:BDNF、②:TrkB、③:A_{2A}R、④:SOD1、⑤:TDP43、⑥:FUS

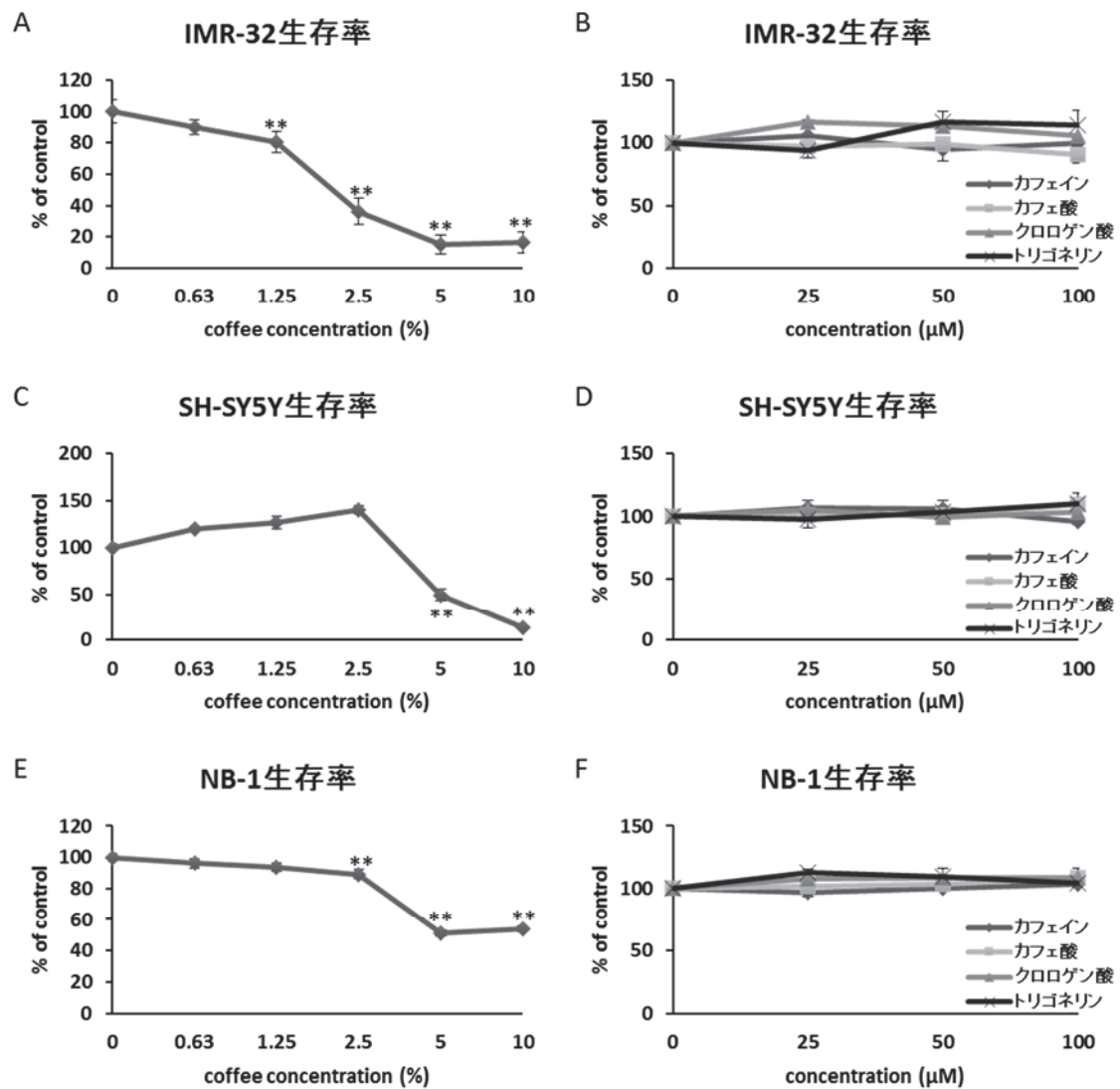


Fig.5 IMR-32、SH-SY5Y、NB-1細胞におけるコーヒー及びコーヒー主成分の毒性

それぞれの細胞について、コーヒー(A, C, E) 及びコーヒー主成分であるカフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、トリゴネリン(B, D, F)を添加、24時間曝露での毒性についてWST assayにより検討。(n=4, **p<0.01)。

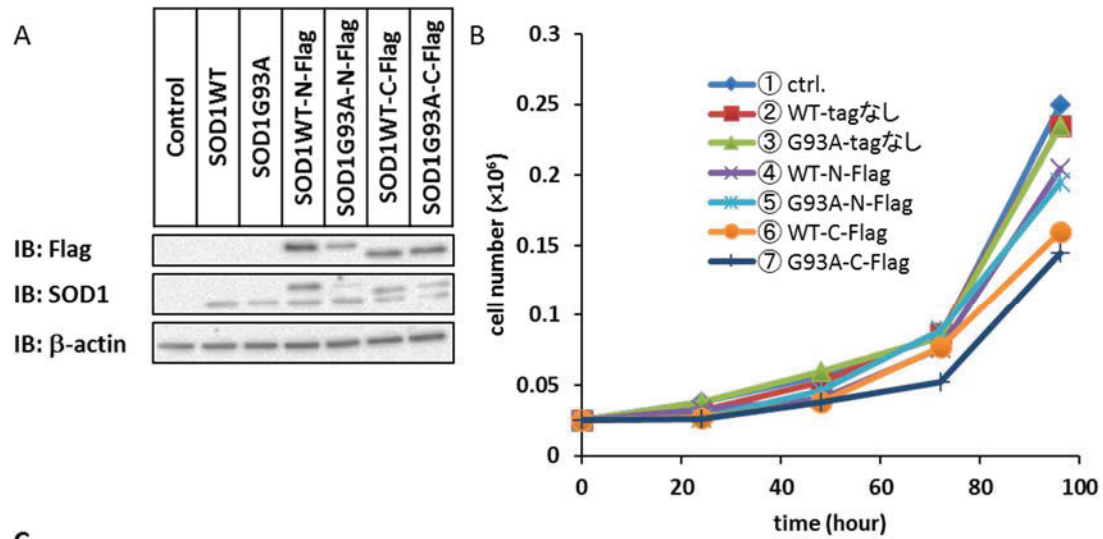
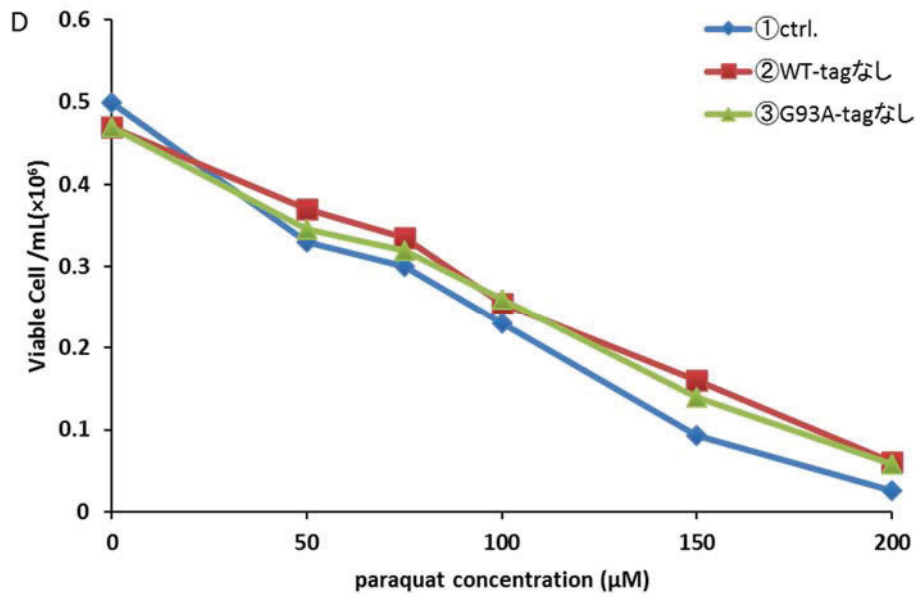


Fig.6 SOD1G93A発現による変化

SH-SY5Y細胞にSOD1WT及びSOD1G93Aを発現させ、その性質について検討した。(A)7種類の細胞(control、SOD1WT-tagなし、SOD1G93A-tagなし、SOD1WT-N-Flag、SOD1G93A-N-Flag、SOD1WT-C-Flag、SOD1G93A-C-Flag)について細胞溶解液を調製し、抗Flag抗体、抗SOD1抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B)7種類の細胞について15%FBS含有DMEM/Ham's F-12培地(1:1)で培養し、トリパンプルー染色により生存細胞数を測定した。(n=3)。(C)7種類の細胞から細胞溶解液を調製し、WST-1試薬を用いてSOD1活性について測定した。(n=2)。



	①	②	③
IC50 (μM)	92.1	108.9	108.8

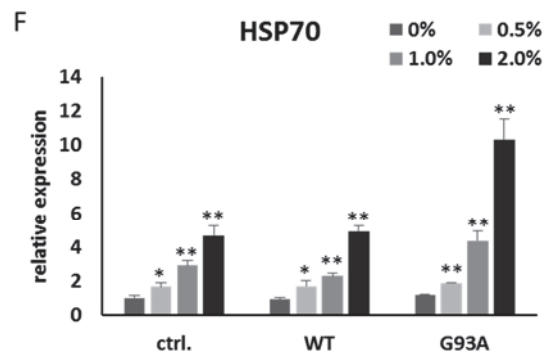
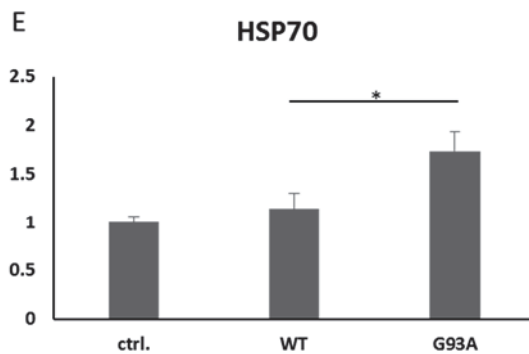


Fig.6 SOD1G93A発現による変化

(D) 3種類の細胞 (control、SOD1WT-tagなし、SOD1G93A-tagなし)について、パラコート刺激後72時間後の生存細胞数についてトリパンブルー染色により測定した。(n=4)。(E) 3種類の細胞についてHSP70の遺伝子発現をreal-time RT-PCR法により測定した。(n=3, *p<0.05)。(F) 3種類の細胞について、コーヒー豆抽出液刺激後8時間後のHSP70遺伝子発現をreal-time RT-PCR法により測定した。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)

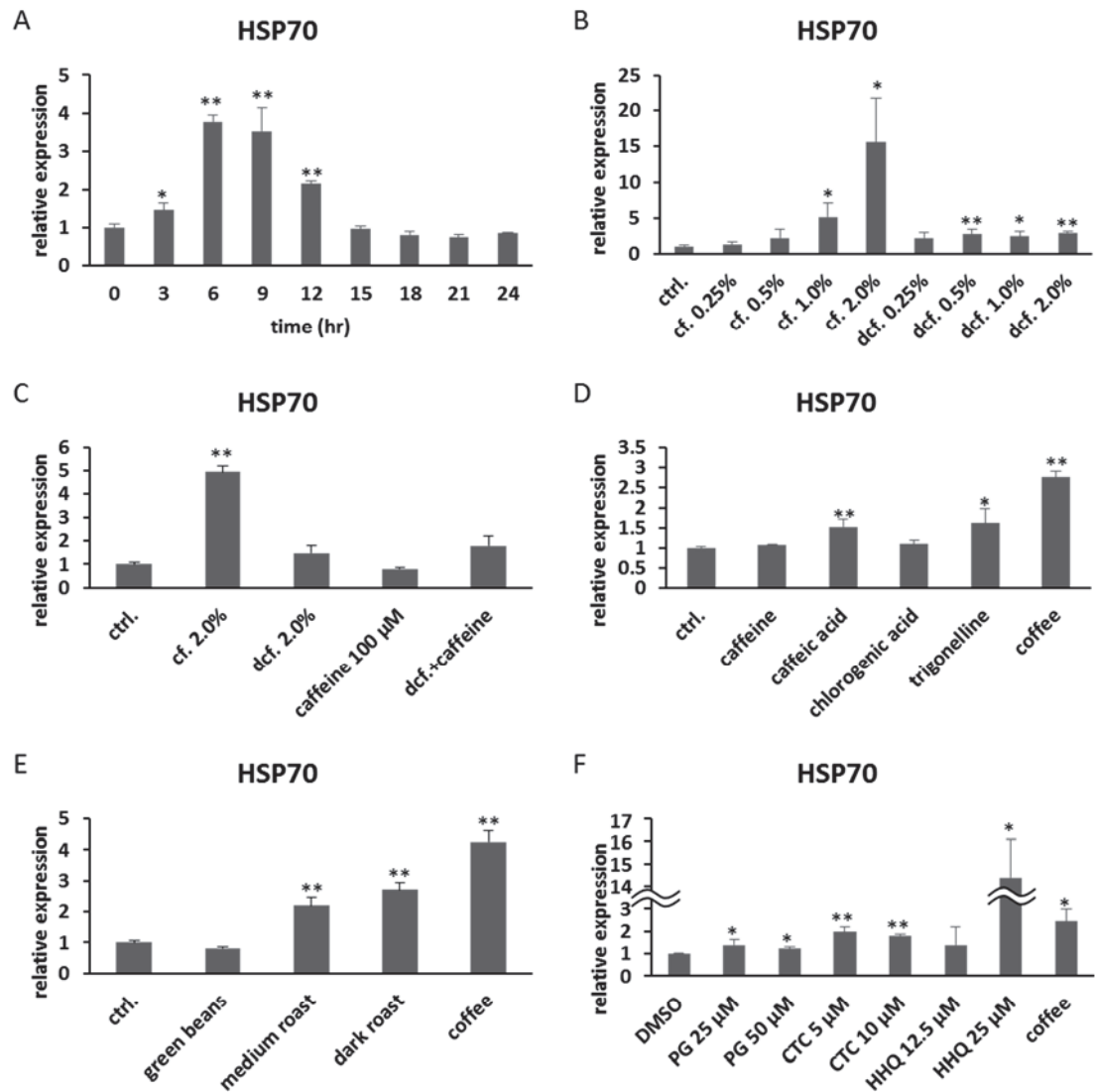


Fig.7 HSP70遺伝子発現に対するコーヒーの影響

SH-SY5Y細胞におけるHSP70遺伝子発現に対するコーヒー豆抽出液及び各成分による影響をreal-time RT-PCR法により検討した。(A) コーヒー豆抽出液刺激後時間依存的な発現変化。(B) コーヒー豆抽出液及びデカフェコーヒー豆抽出液刺激後8時間後の発現変化。(C) デカフェコーヒー豆抽出液+カフェイン刺激後8時間後の発現変化。(D) コーヒー主成分(100 μM)刺激後8時間後の発現変化。(E) 焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))刺激後8時間後の発現変化。(F) カテコール類(ピロガロール;PG、ピロカテコール;CTC、ヒドロキシヒドロキノン;HHQ)刺激後8時間後の発現変化。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)。

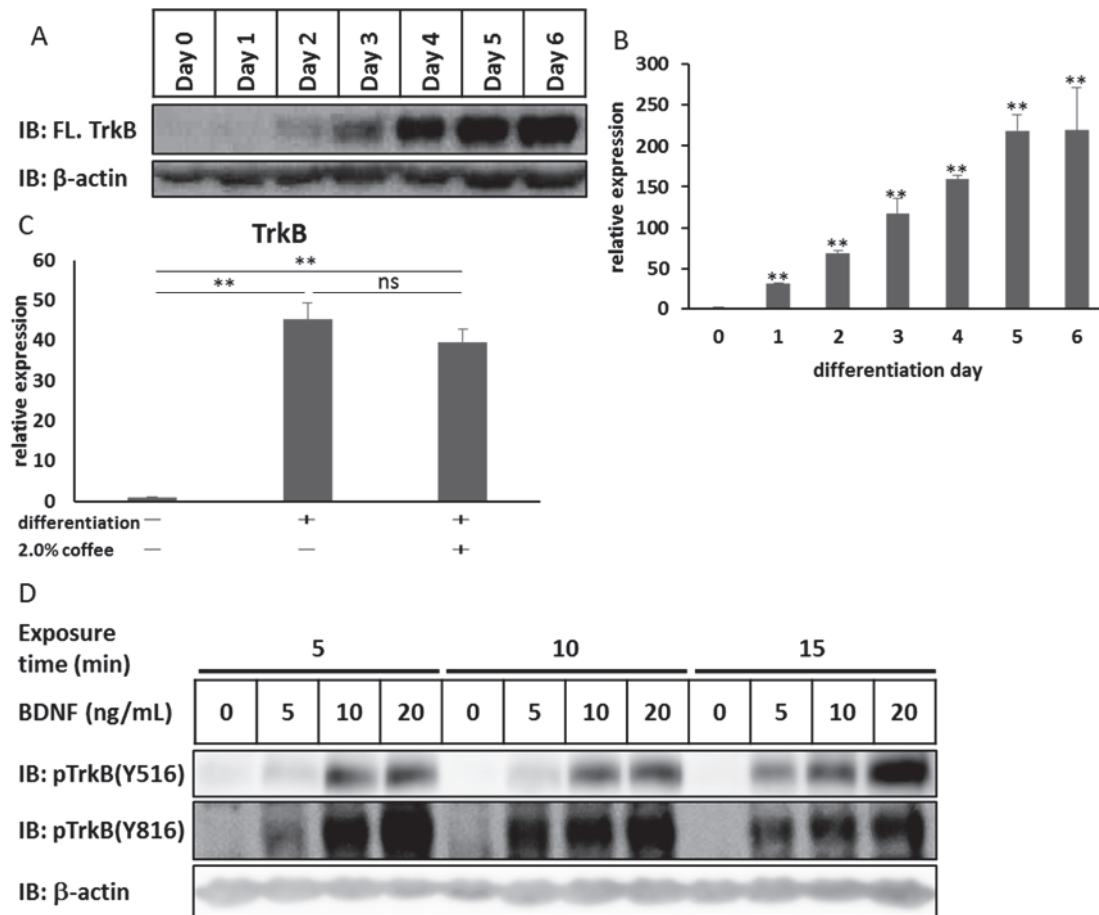


Fig.8 ATRAによるSH-SY5Y細胞の分化

ATRA刺激によるSH-SY5Y細胞の分化。(A) 分化0~6日目の細胞溶解液を調製し、抗TrkB抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 分化0~6日目のTrkB遺伝子発現をreal-time RT-PCR法により検討した。(n=3, **p<0.01)。(C) 分化に対するコーヒーの効果を生分化2日目のTrkB遺伝子発現についてreal-time RT-PCR法により検討した。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)。(D) 0~20 ng/mLのBDNF刺激した細胞の細胞溶解液を調製し、抗pTrkB(Y516)抗体、抗pTrkB(Y816)抗体を用いてイムノブロット法を行った。

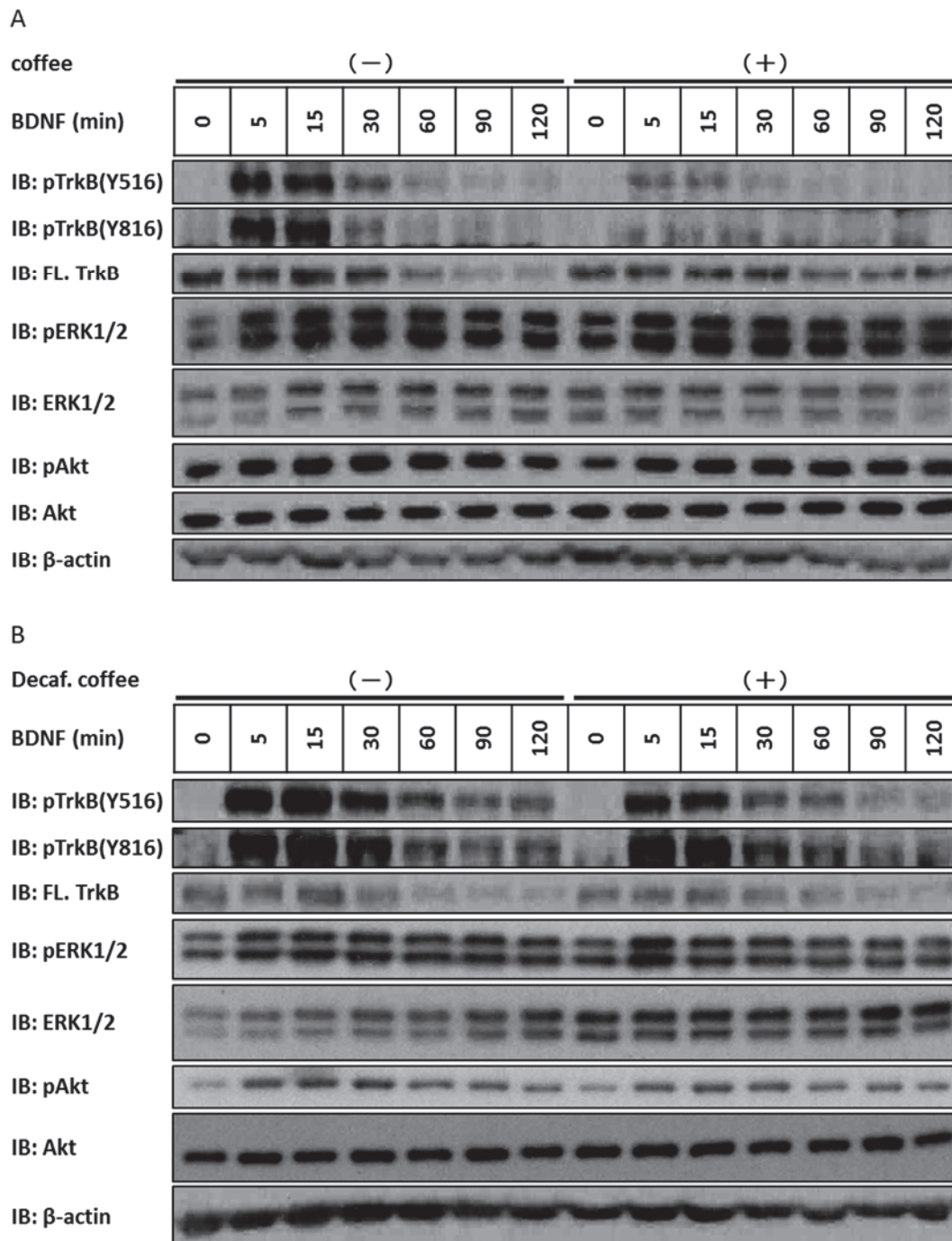


Fig.9 BDNFによるTrkBシグナルの活性化に対するコーヒーの影響

コーヒー豆抽出液(A)またはデカフェコーヒー豆抽出液(B)を添加し、2時間後にBDNF(20 ng/mL)を添加、任意の時間後に細胞溶解液を調製し、抗pTrkB(Y516)抗体、抗pTrkB(Y816)抗体、抗TrkB抗体、抗pERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体、抗pAkt抗体、抗Akt抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

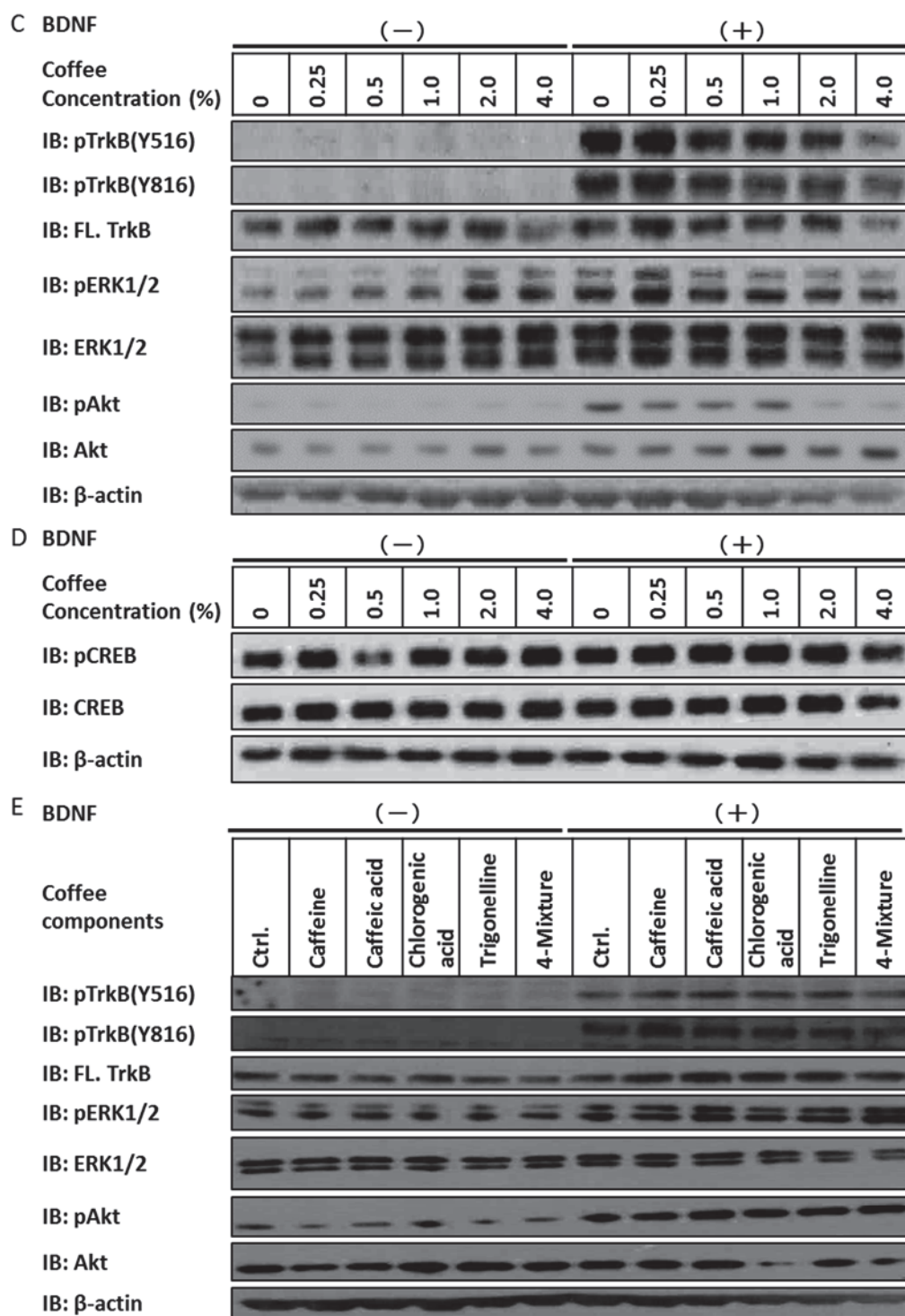


Fig.9 BDNFによるTrkBシグナルの活性化に対するコーヒーの影響

コーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v)) (C)、またはコーヒー主成分(100 μM) (E)を添加し、2時間後にBDNF(20 ng/mL)を添加、15分後に細胞溶解液を調製し、抗pTrkB(Y516)抗体、抗pTrkB(Y816)抗体、抗TrkB抗体、抗pERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体、抗pAkt抗体、抗Akt抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(D)コーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加し、2時間後にBDNF(20 ng/mL)を添加、2時間後に細胞溶解液を調製し、抗pCREB抗体、抗CREB抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

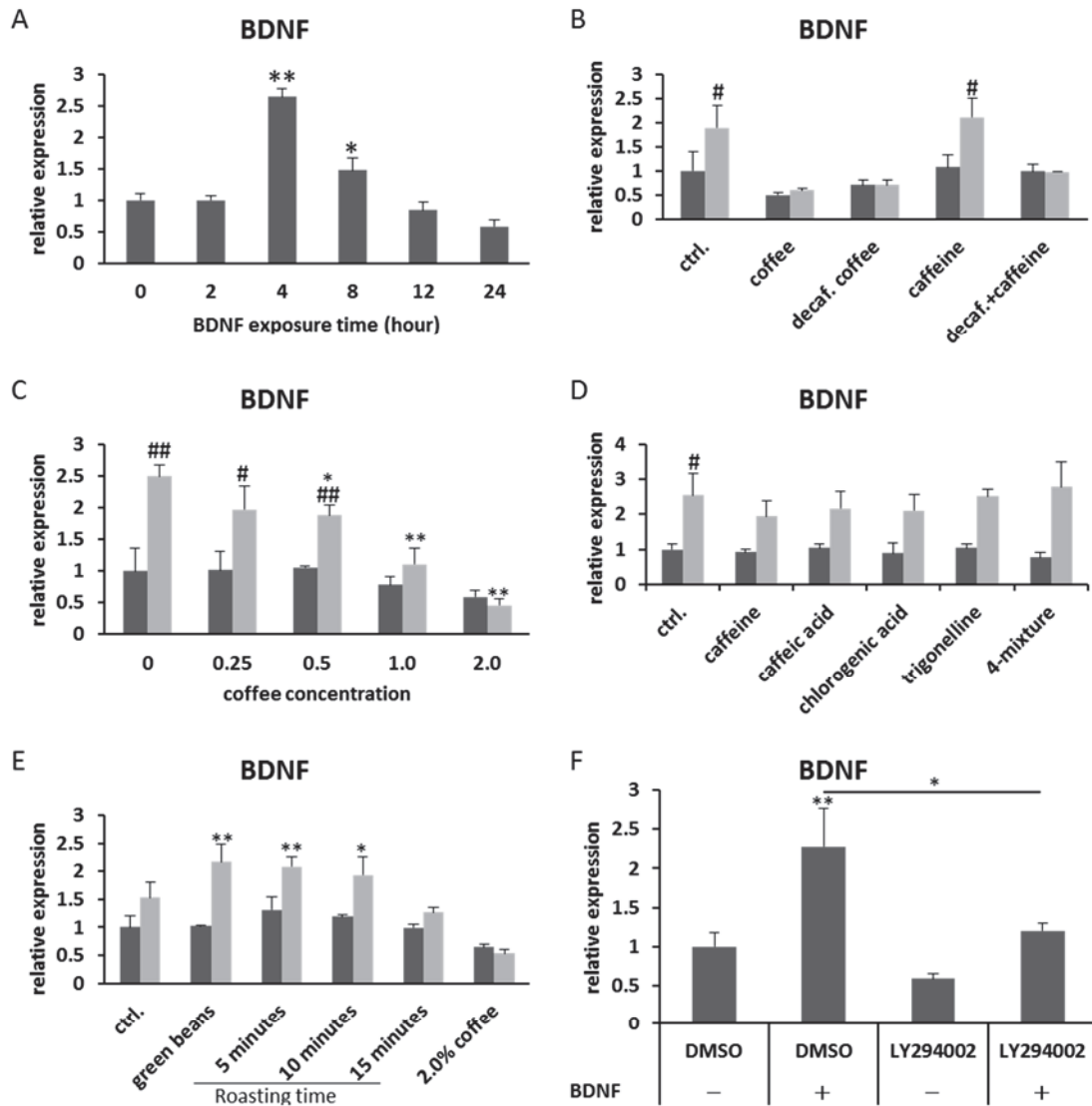


Fig.10 BDNF遺伝子発現に対するコーヒーの影響

SH-SY5Y細胞におけるBDNFによるBDNF遺伝子発現誘導に対するコーヒーの影響をreal-time RT-PCR法により検討した。(A) BDNF刺激後時間依存的な発現変化。(n=3, *p<0.05 **p<0.01) (B-E) コーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))、デカフェコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))、カフェイン(100μM) (B)、コーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v)) (C)、コーヒー主成分(100μM) (D)、焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v)) (E)添加後2時間後にBDNF(20ng/mL)添加、更に4時間後のBDNF遺伝子発現についてreal-time RT-PCR法により検討。(n=3, #p<0.05 ##p<0.01 vs BDNF(-) *p<0.05 **p<0.01 vs BDNF(+)) (F)LY294002(10μM)を添加し、1時間後にBDNF(20ng/mL)を添加、4時間後にBDNF遺伝子発現についてreal-time RT-PCR法により検討。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)。

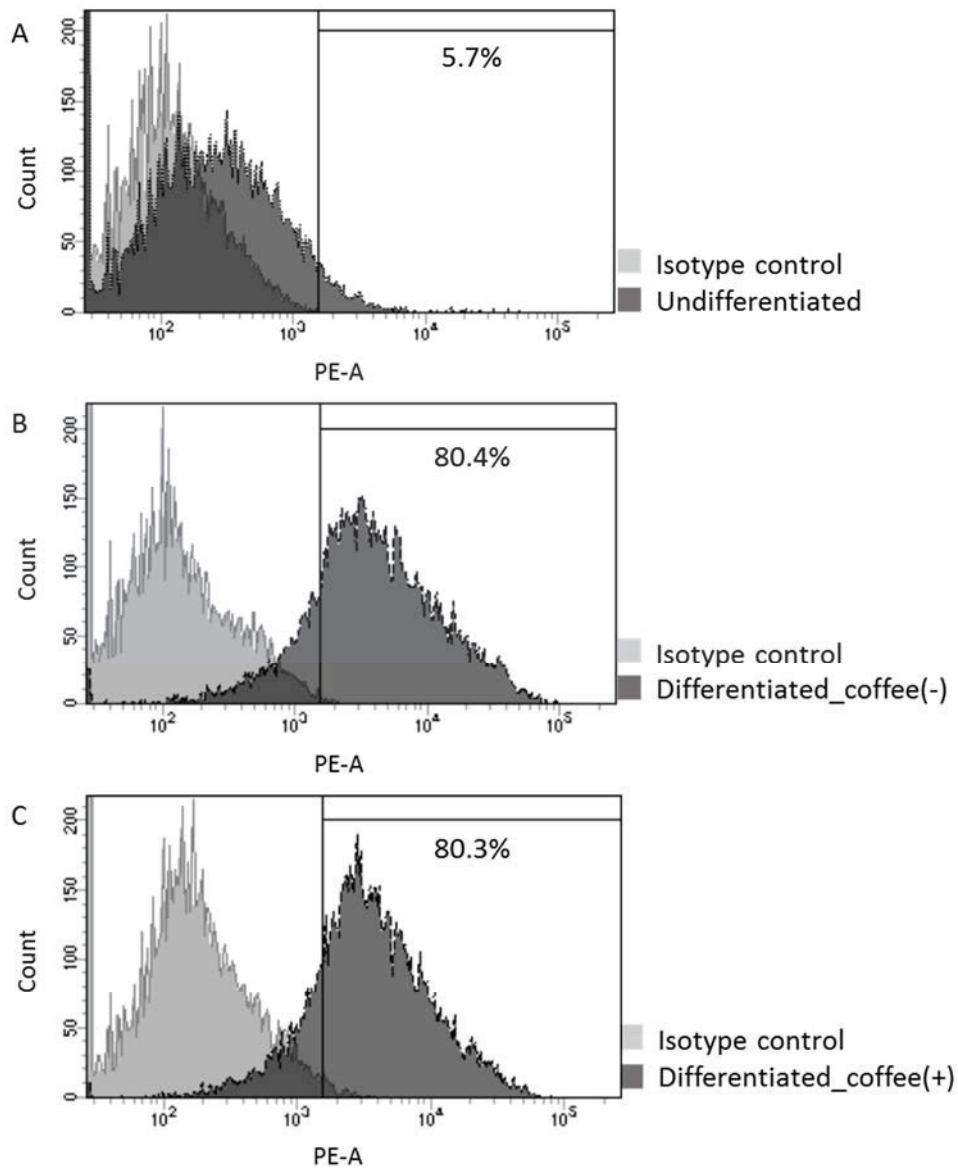


Fig.11 膜表面上のTrkB発現に対するコーヒーの影響

未分化(A)、または分化6日目(B, C)のSH-SY5Y細胞に精製水(A, B)またはコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v)) (C)を添加、2時間後に細胞を回収し、PE標識抗TrkB抗体を用いて膜表面上のTrkBを標識し、フローサイトメーターにより 1×10^4 個の細胞について解析した。

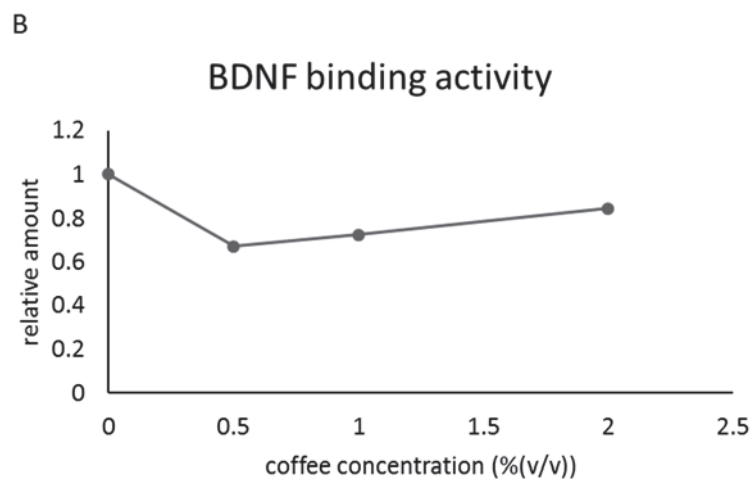
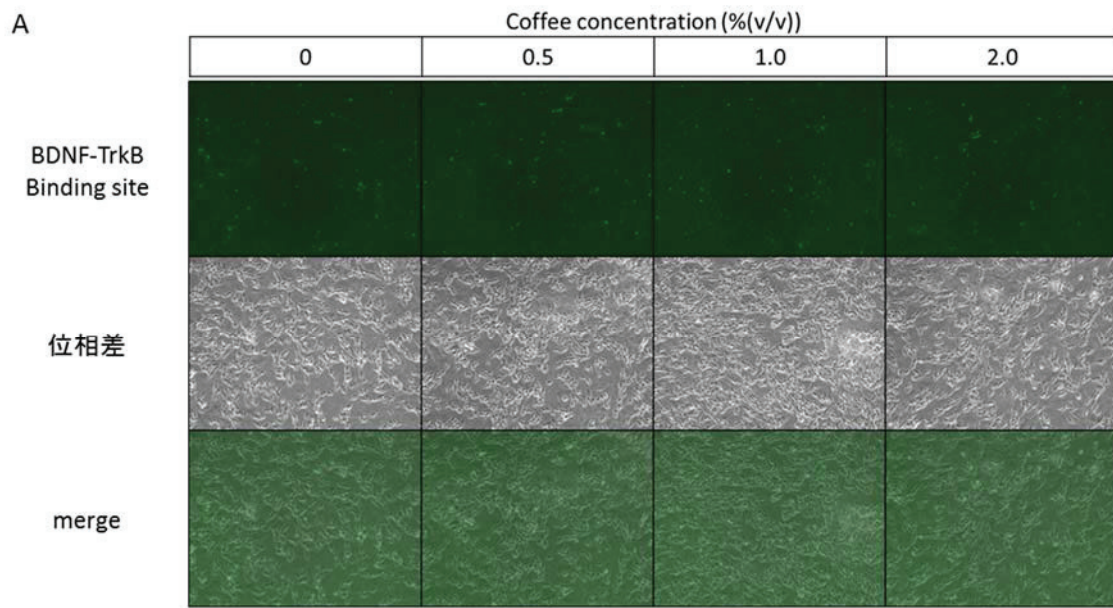


Fig.12 BDNF-TrkB結合に対するコーヒーの影響

分化6日目のSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加、2時間後にビオチン化BDNF(10 ng/mL)を添加し、氷上で45分間反応させた。次にstreptavidin-FITCを加え、氷上で1時間反応させ、蛍光顕微鏡で観察(A)、またはフローサイトメーターにより 1×10^4 個の細胞について解析(B)した。

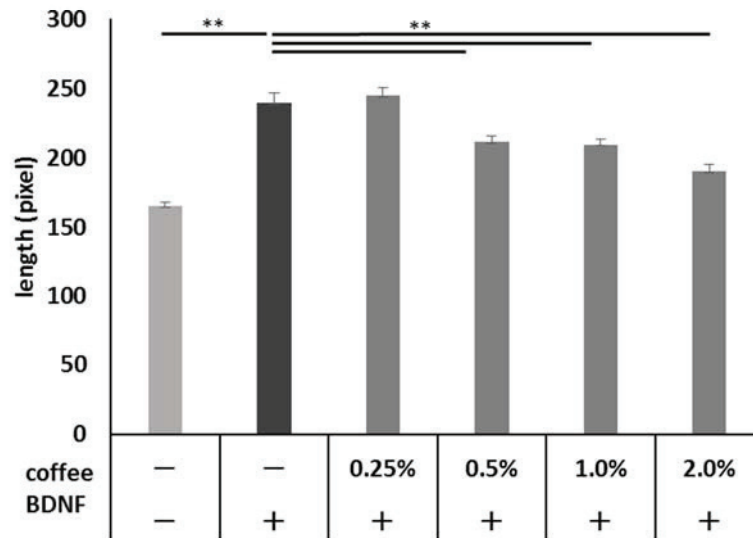
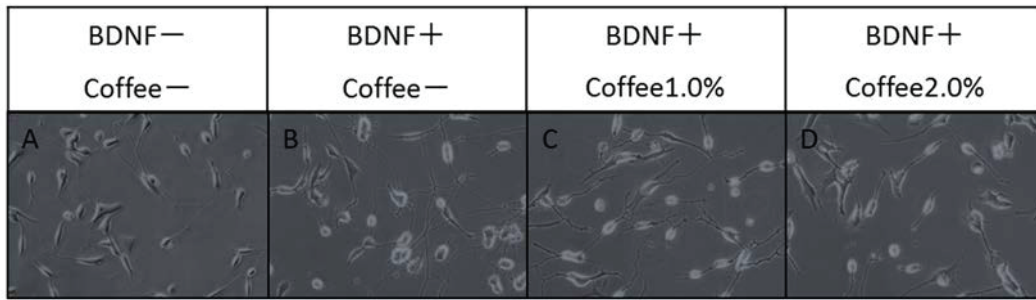


Fig.13 BDNFによる神経突起の伸長に対するコーヒーの影響

分化4日目のSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加、2時間後にBDNF(50 ng/mL)を添加し、48時間後に顕微鏡で各濃度4か所ずつ写真を撮影、ImageJを用いて神経突起長を測定した。(n=120, **p<0.01)。

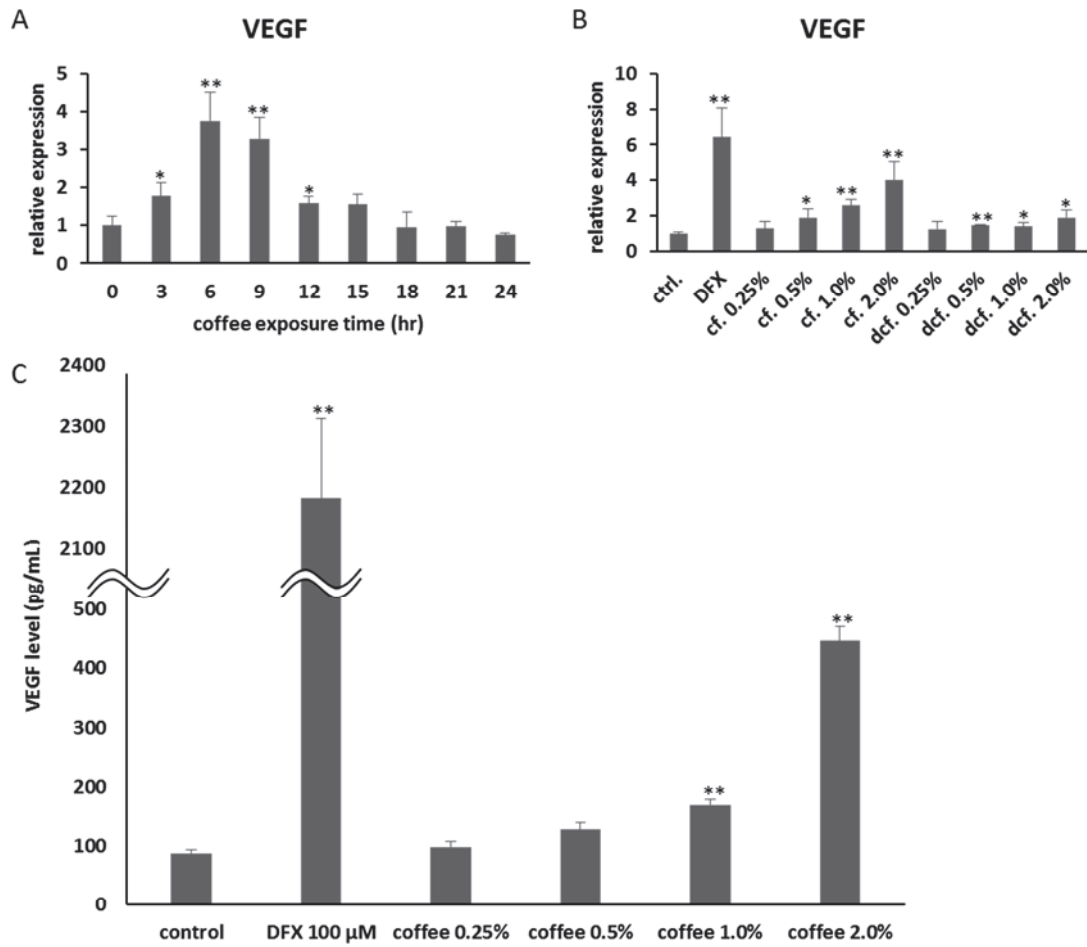


Fig.14 VEGF発現に対するコーヒーの影響

(A) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、任意の時間後のVEGF遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCT法により検討。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液、またはデカフェコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加、8時間後の遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCR法により検討。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)。DFX(デフェロキサミン; 100 μM)はポジティブコントロールとして用いた。(C) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加、12時間後培養上清を回収し、ELISA法によりVEGFタンパク量を定量した。(n=3, **p<0.01)。

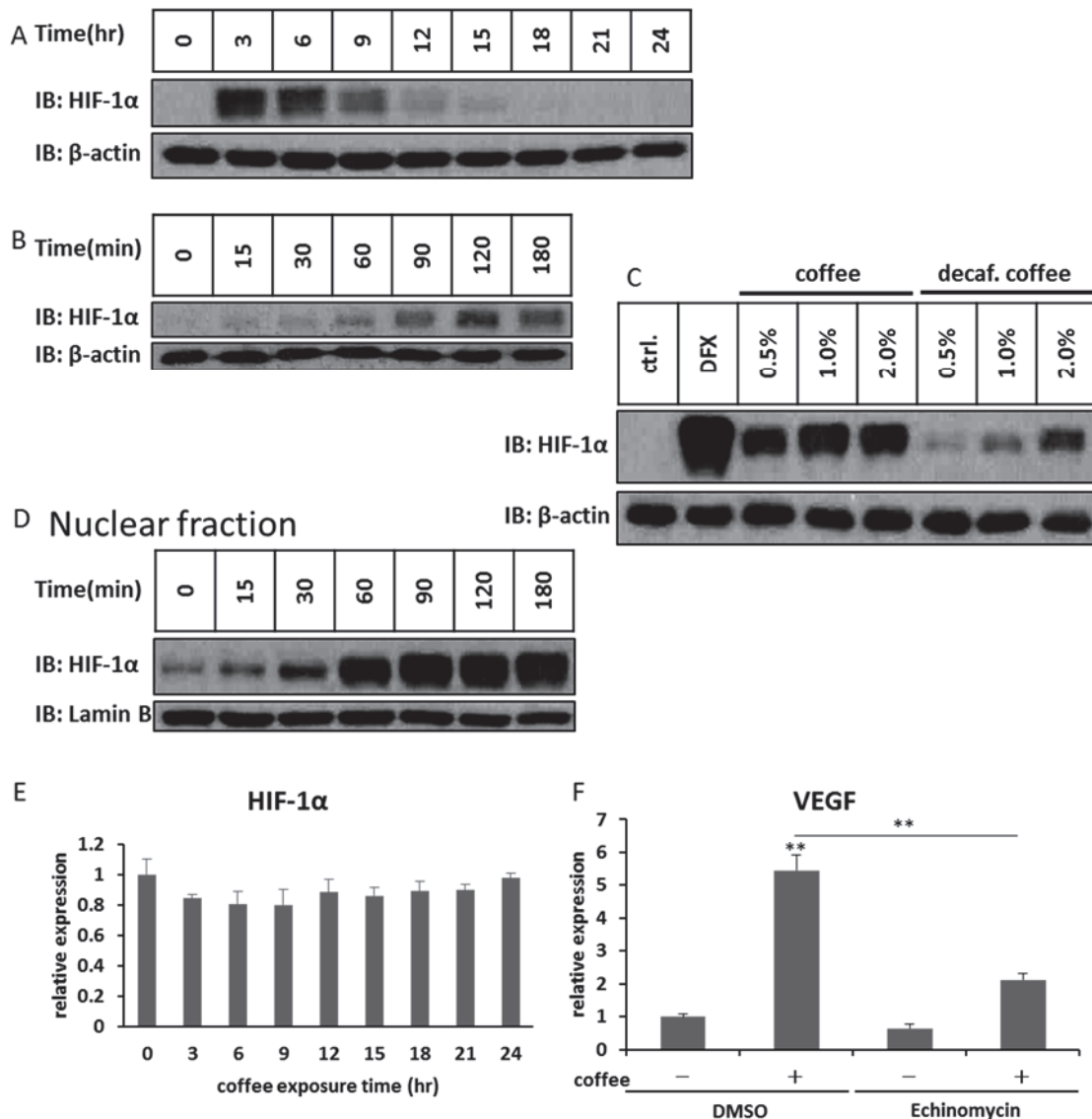


Fig.15 コーヒーによるHIF-1α発現に対する影響

(A-C) 抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(A) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、0-24時間までの任意の時間後に細胞溶解液を作製した。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、0-180分までの任意の時間後に細胞溶解液を作製した。(C) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液及びデカフェコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加、4時間後に細胞溶解液を作製した。(D) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、180分までの任意の時間後に核タンパクの溶解液を作製、抗HIF-1α抗体、抗Lamin B抗体を用いてイムノブロット法を行った。(E) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にエキノマイシン(5 nM)を添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加し8時間後のVEGF遺伝子発現についてreal-time RT-PCRにより検討した。(n=3, **p<0.01)。(F) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、0-24時間までの任意の時間後のHIF-1α遺伝子発現についてreal-time RT-PCR法により検討した。(n=3)

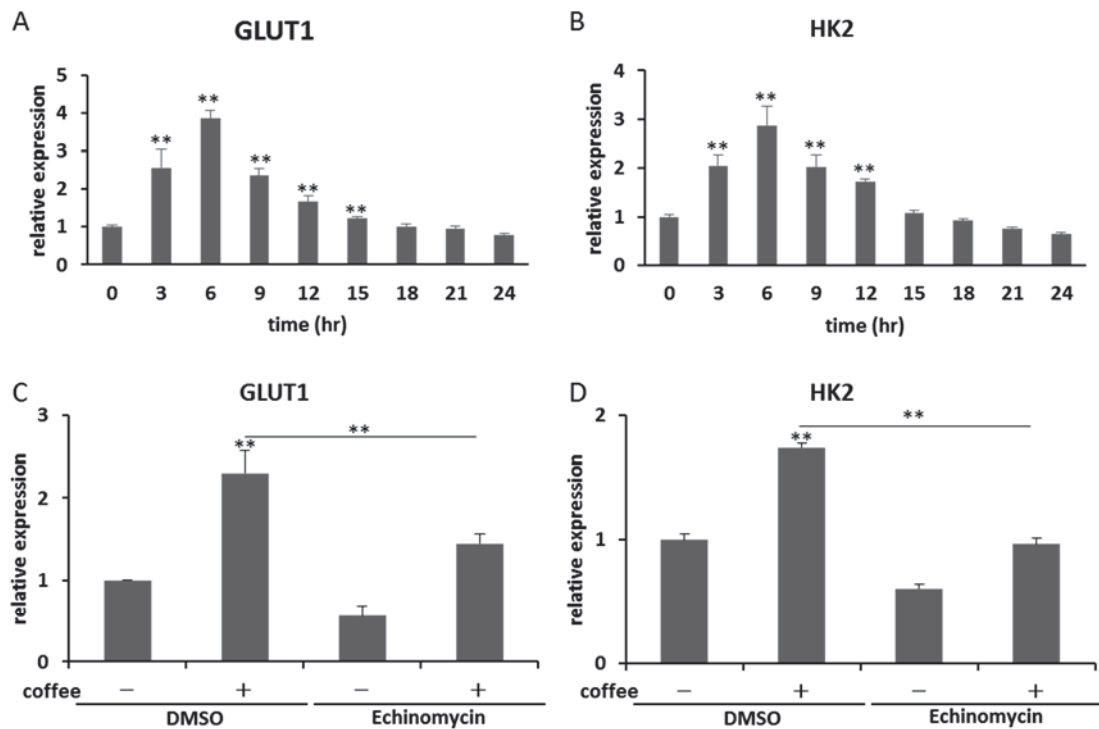


Fig.16 コーヒーによるGLUT1、HK2遺伝子発現に対する影響

(A, B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、任意の時間後のVEGF遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCT法により検討。(n=3, **p<0.01)。(C, D) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にエキノマイシン(5 nM)を添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加し8時間後のVEGF遺伝子発現についてreal-time RT-PCRにより検討。(n=3, **p<0.01)。

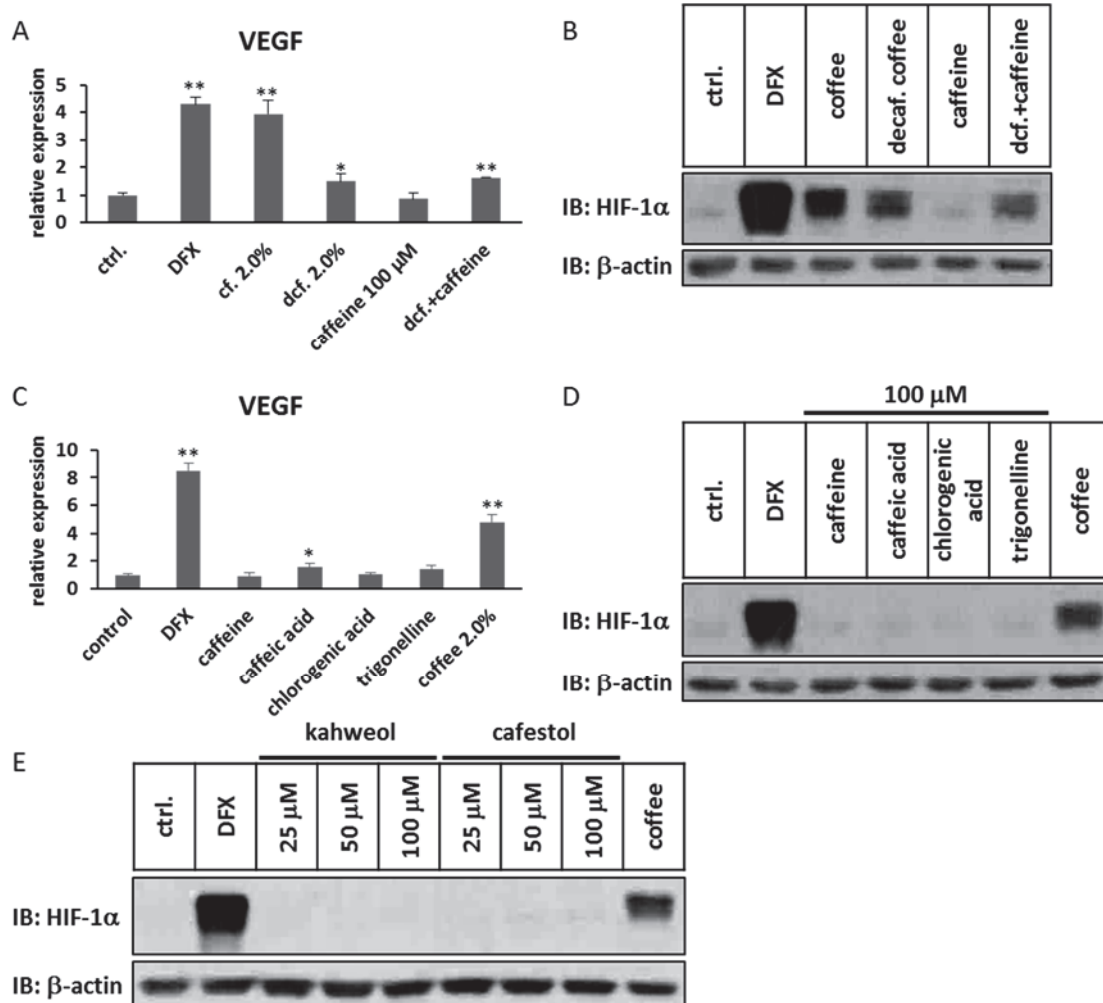
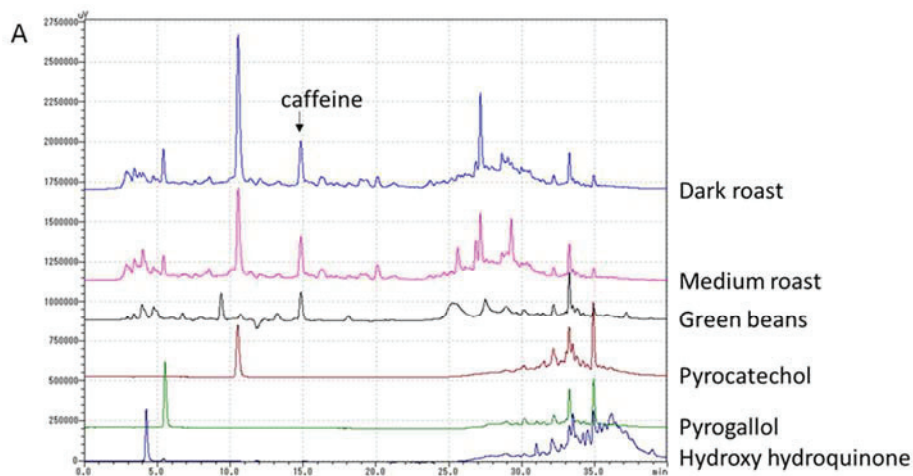


Fig.17 コーヒー成分によるVEGF/HIF-1α発現に対する影響

(A, B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))、デカフェコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))、カフェイン(100 μM)を添加、8時間後にVEGF遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより検討(A)(n=3, *p<0.05 **p<0.01)、または4時間後に細胞溶解液を作製し、抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った(B)。(C, D) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー主成分(100 μM)を添加、8時間後にVEGF遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより検討(C)(n=3, *p<0.05 **p<0.01)、または4時間後に細胞溶解液を作製し、抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った(D)。(E) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にカーウエオールまたはカフェストールを添加し、4時間後に細胞溶解液を作製し、抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。いずれもDFX(デフェロキサミン; 100 μM)をポジティブコントロールとして用いた。



Column: Inertsil ODS-3 4.6 × 250 mm
 Temperature: 40°C
 Solvent: A: 5% acetic acid, B: MeOH
 0→20→30→40 (min) 10→30→100→100 (B%)
 Flow rate: 1 mL/min
 Detection: PDA (190-400 nm), Fluorescence Ex 280 nm, Em 320 nm
 Sample amount: 5 µL

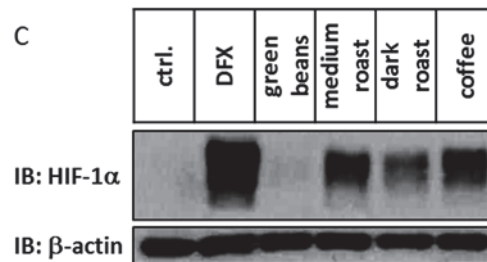
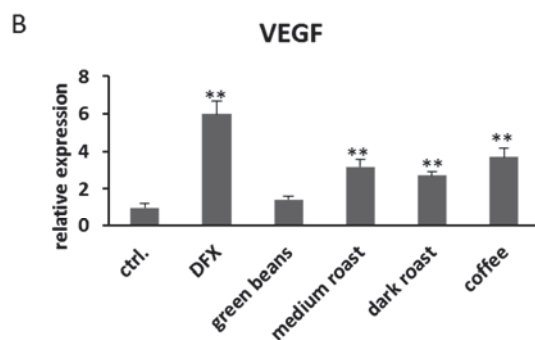
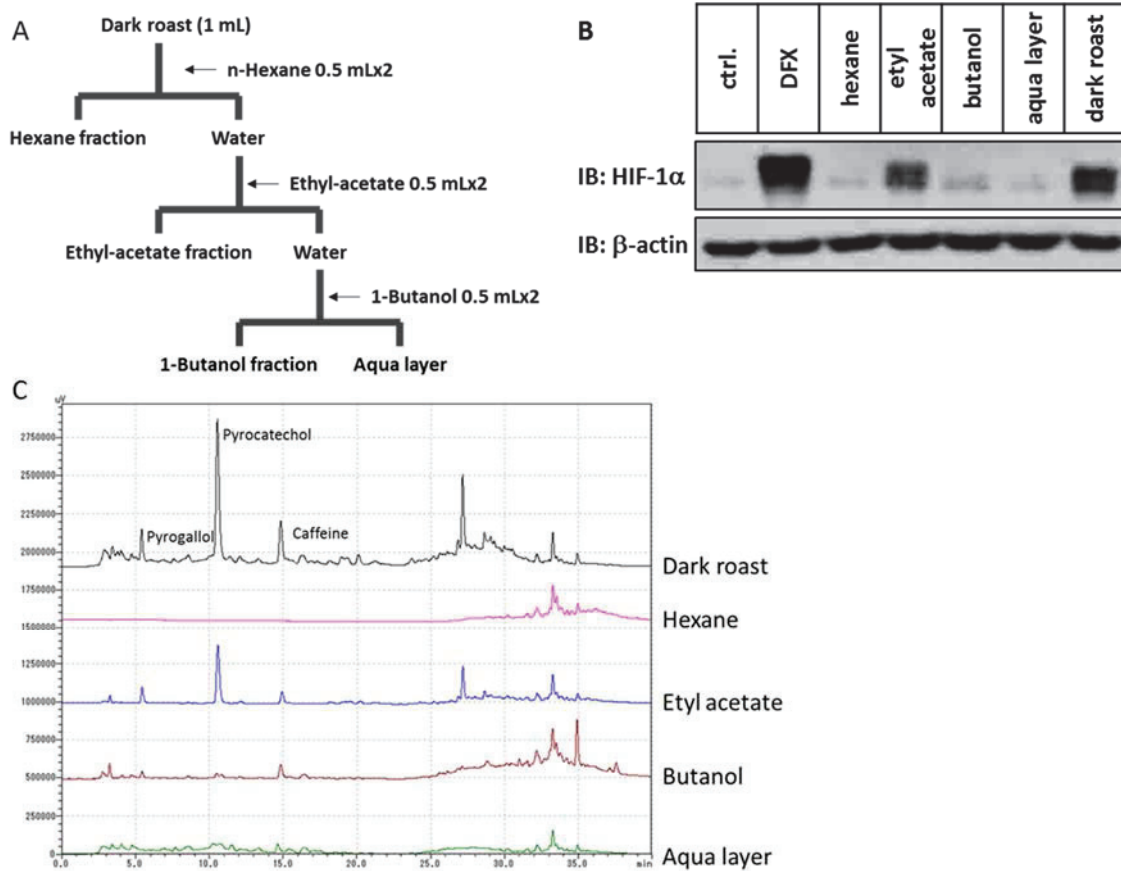


Fig.18 焙煎度の異なるコーヒー豆抽出液によるVEGF/ HIF-1α発現に対する影響

(A) 生豆、中煎りコーヒー豆、深煎りコーヒー豆抽出液のHPLC分析チャート。(B, C) 3日間培養したSH-SY5Y細胞に生豆、中煎りコーヒー豆、深煎りコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、8時間後にVEGF遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより検討(B)(n=3, *p<0.05 **p<0.01)、または4時間後に細胞溶解液を作製し、抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った(C)。DFX(デフェロキサミン; 100 µM)をポジティブコントロールとして用いた。



Column: Inertsil ODS-3 4.6 \times 250 mm

Temperature: 40°C

Solvent: A: 5% acetic acid, B: MeOH

0 \rightarrow 20 \rightarrow 30 \rightarrow 40 (min) 10 \rightarrow 30 \rightarrow 100 \rightarrow 100 (B%)

Flow rate: 1 mL/min

Detection: PDA (190-400 nm), Fluorescence Ex 280 nm, Em 320 nm

Sample amount: 5 μ L

Fig.19 深煎りコーヒーの有機溶媒分画によるHIF-1 α 発現に対する影響

(A) 深煎りコーヒー有機溶媒分画のフローチャート。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞に深煎りコーヒー有機溶媒分画をそれぞれ2.0%相当添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(C) 深煎りコーヒー有機溶媒分画のHPLC分析チャート。

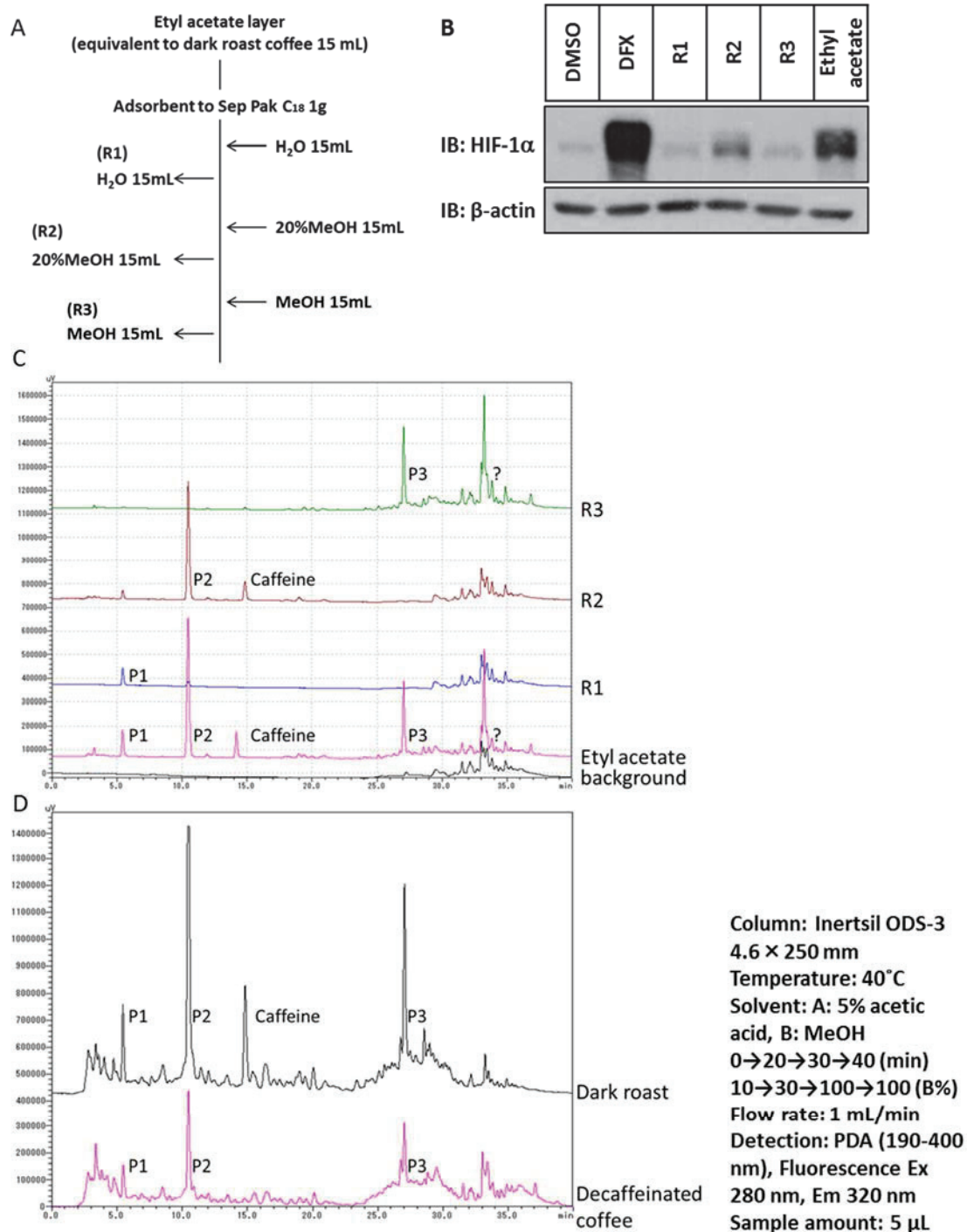


Fig.20 深煎りコーヒー酢酸エチル画分の中性カラム分画によるHIF-1 α 発現に対する影響
 (A) 深煎りコーヒー酢酸エチル画分の中性カラム分画のフローチャート。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞に深煎りコーヒー酢酸エチル画分の3分画をそれぞれ2.0%相当添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(C) 深煎りコーヒー酢酸エチル画分中性カラム分画のHPLC分析チャート。(D) decaffekoko-ひーのHPLC分析チャート

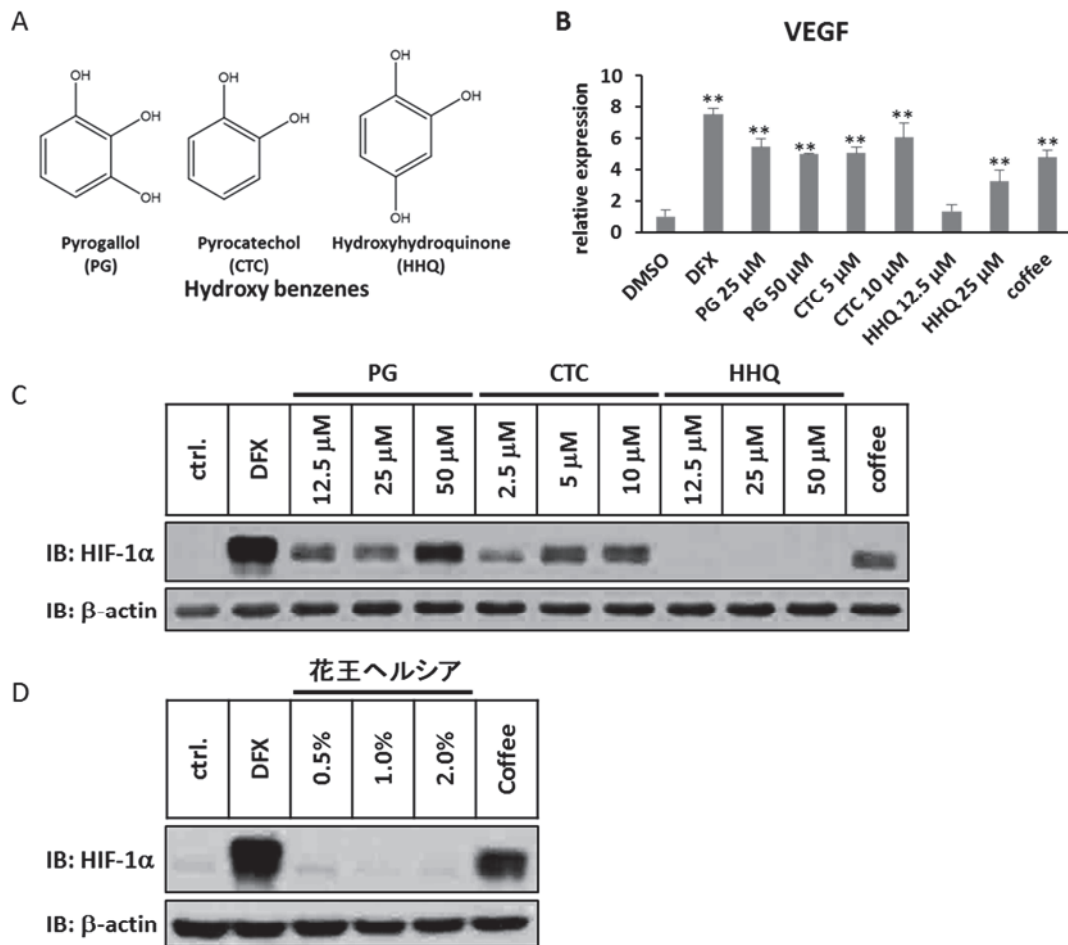


Fig.21 カテコール類によるVEGF/ HIF-1 α 発現に対する影響

(A) ピロガロール(PG)及びピロカテコール(CTC)、ヒドロキシヒドロキノン(HHQ)の構造。(B, C) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にPG、CTC、HHQを添加、8時間後にVEGF遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより検討(B)(n=3, *p<0.05 **p<0.01)、または4時間後に細胞溶解液を作製し、抗HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った(C)。DFX(デフェロキサミン; 100 μ M)をポジティブコントロールとして用いた。(D) 3日間培養したSH-SY5Y細胞に花王ヘルシアコーヒーを2.0%(v/v)添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

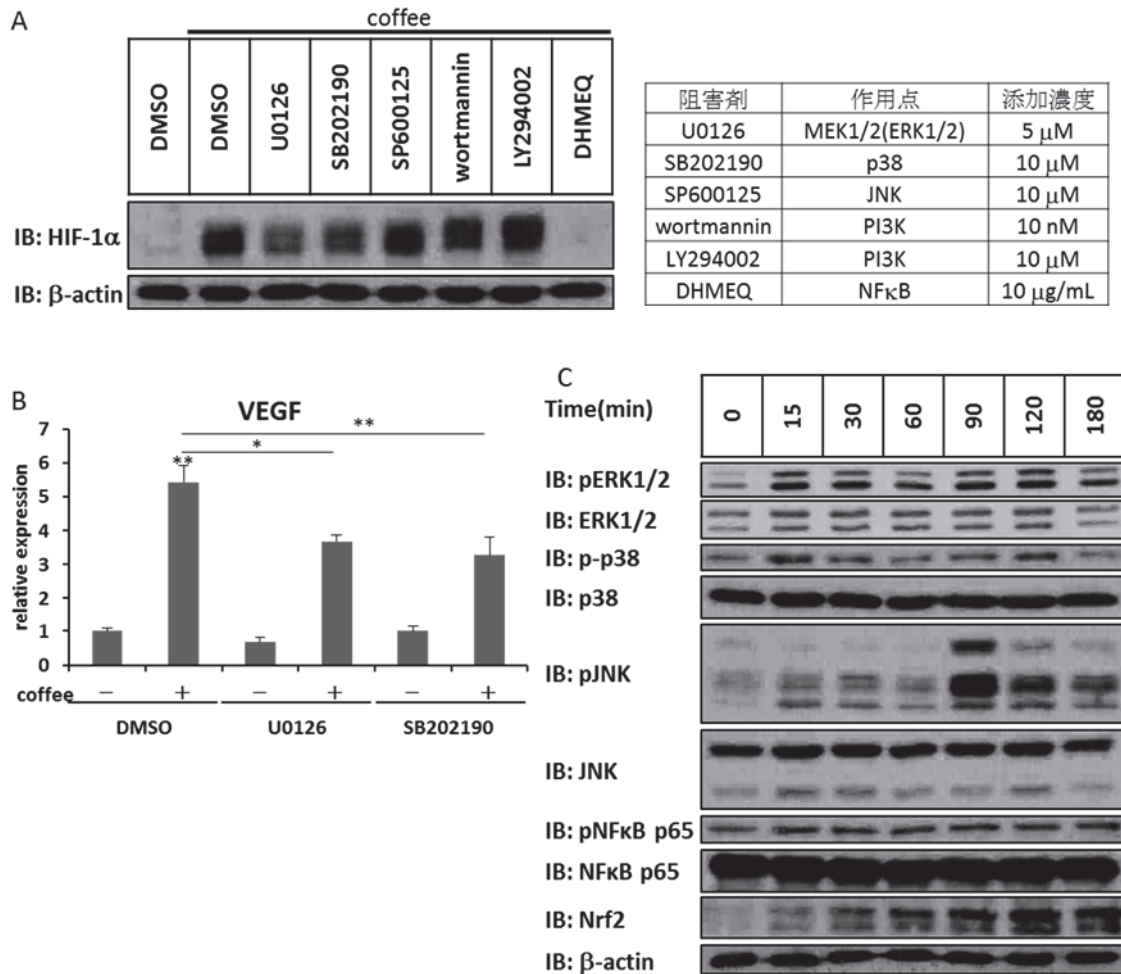


Fig.22 コーヒー豆抽出液によるシグナル因子に対する影響

(A) 3日間培養したSH-SY5Y細胞に各種阻害剤をtableの濃度で添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にU0126、SB202190をそれぞれ5 μ M、10 μ Mで添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加し、8時間後のVEGF遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより検討した。(C) コーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))添加後任意の時間で細胞溶解液を作製し、抗pERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体、抗p-p38抗体、抗p38抗体、抗pJNK抗体、抗JNK抗体、抗pNF κ B p65抗体、抗NF κ B p65抗体、抗Nrf2抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

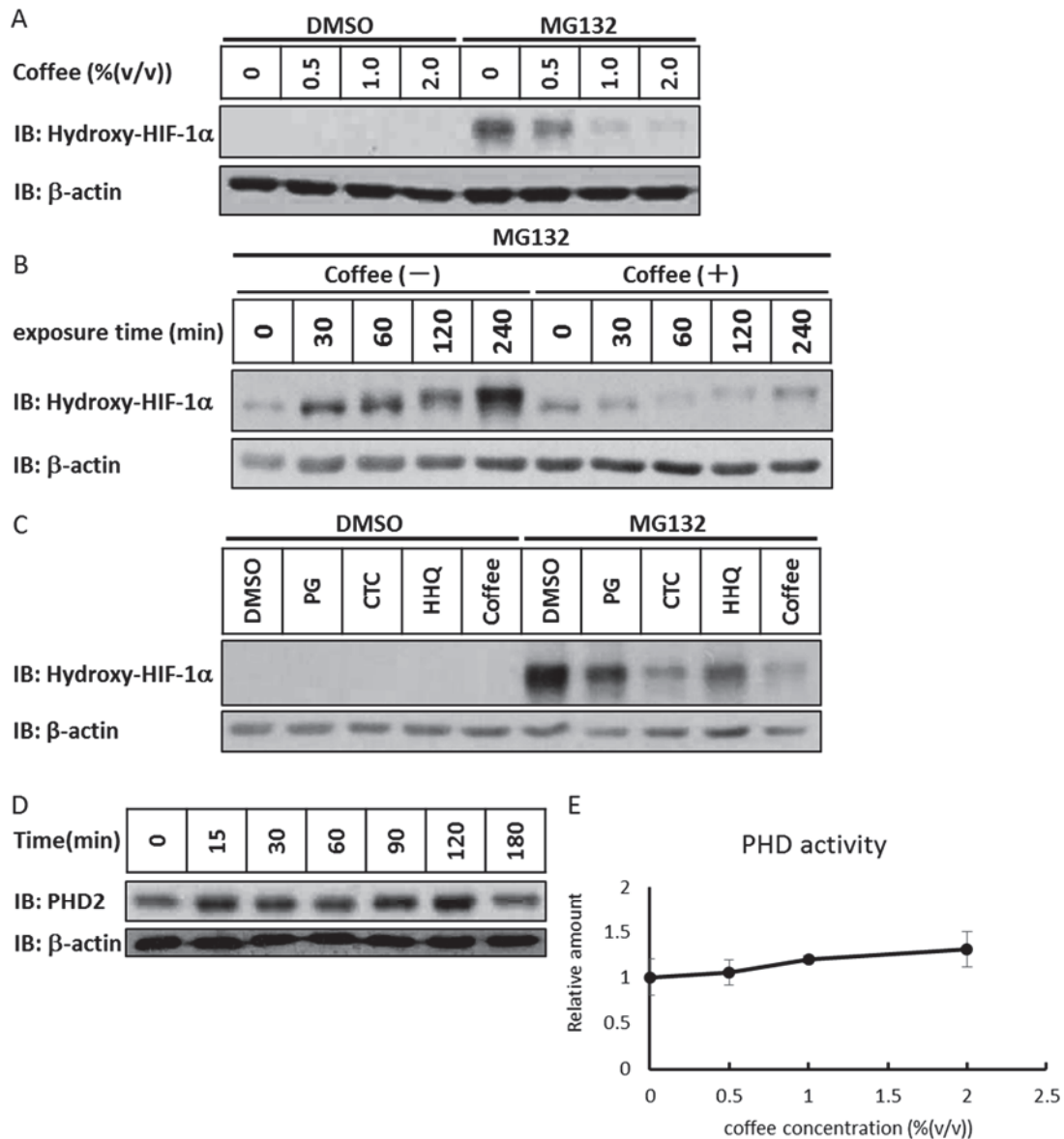


Fig.23 コーヒー豆抽出液によるHIF-1 α のヒドロキシル化に対する影響

(A) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にプロテアソーム阻害剤MG132(10 μ M)を添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(0-2.0%(v/v))を添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗Hydroxy-HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にプロテアソーム阻害剤MG132(10 μ M)を添加、1時間後にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加し、任意の時間後に細胞溶解液を作製、抗Hydroxy-HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(C) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にプロテアソーム阻害剤MG132(10 μ M)を添加、1時間後にPG(50 μ M)、CTC(10 μ M)、HHQ(25 μ M)を添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗Hydroxy-HIF-1 α 抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(D) 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、任意の時間後に細胞溶解液を作製、抗PHD2抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(E) SH-SY5Y細胞から細胞溶解液を作製、4 μ g相当を0-2.0%(v/v)のコーヒー豆抽出液、HIF-1 α ペプチド、[5-¹⁴C] α -ケトグルタル酸と37 $^{\circ}$ Cで10分反応させた。残った α -ケトグルタル酸はジニトロフェニルヒドラジンと反応させて沈殿し、上清中の[1-¹⁴C]コハク酸の量を測定した。

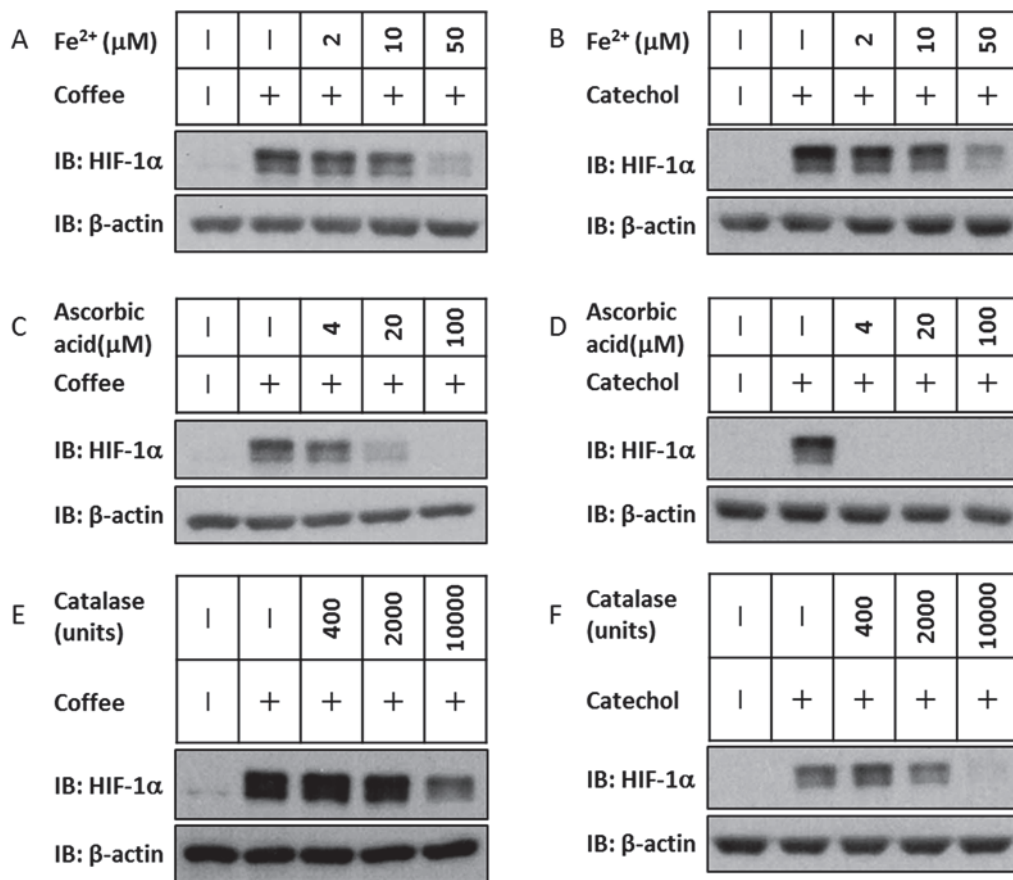


Fig.24 コーヒー豆抽出液/CTCによるHIF-1α発現誘導に対するPHD2補酵素の影響

3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v)) (A, C, E) またはピロカテコール(10 μM) (B, D, F)を添加、同時にFe²⁺(A, B)、アスコルビン酸(C, D)、カタラーゼ(E, F)を添加し、4時間後に細胞溶解液を作製、抗HIF-1α抗体、抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

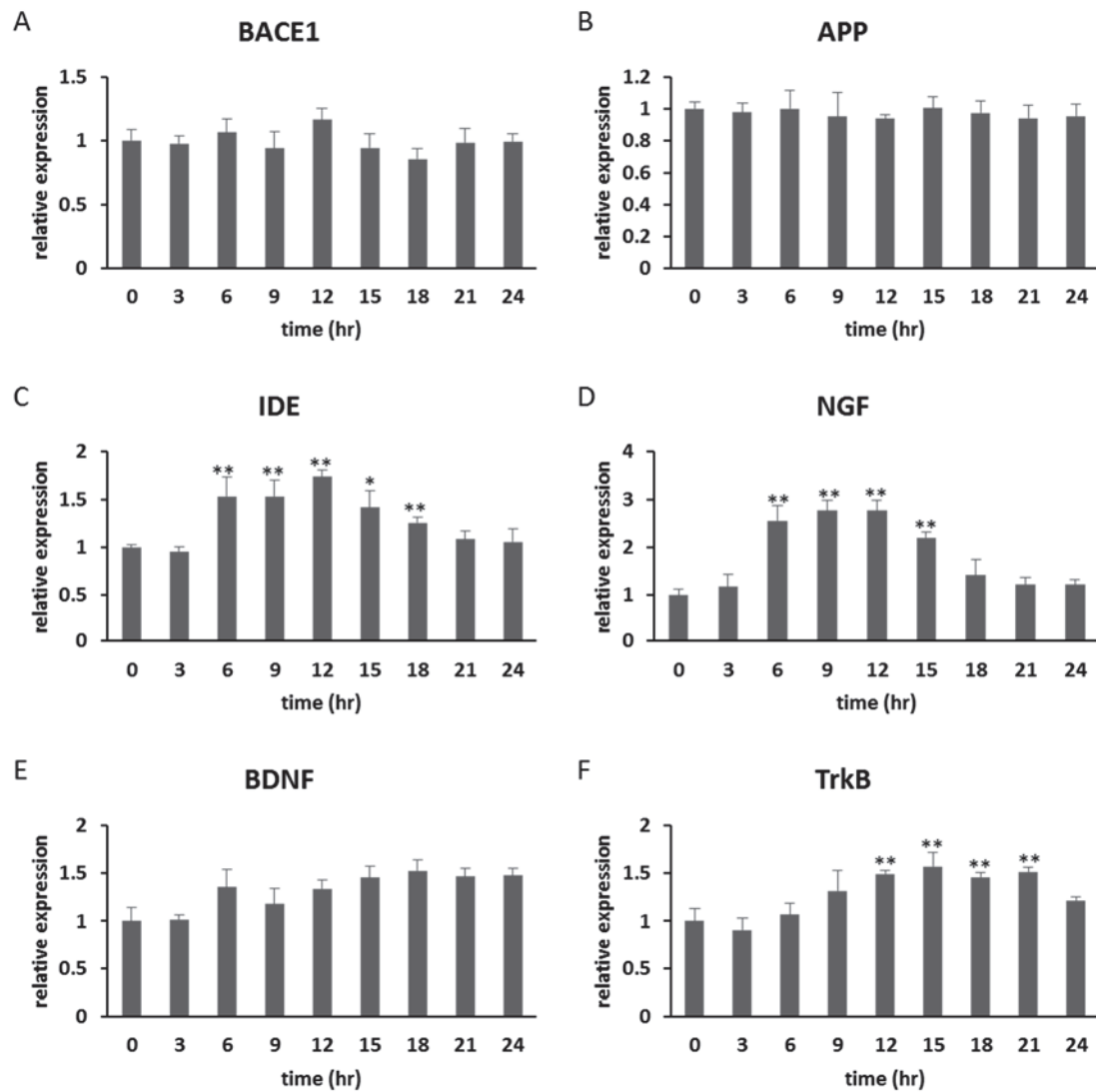


Fig.25 各種遺伝子発現に対するコーヒーの影響

3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、任意の時間後のBACE1(A)、APP(B)、IDE(C)、NGF(D)、BDNF(E)、TrkB(F)の遺伝子発現の変化をreal-time RT-PCT法により検討。(n=3, *p<0.05 **p<0.01)。

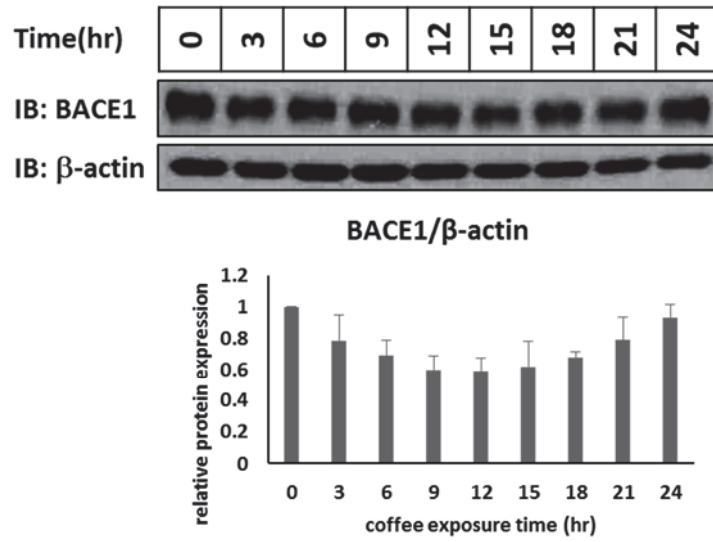


Fig.26 BACE1タンパク発現に対するコーヒーの影響
 3日間培養したSH-SY5Y細胞にコーヒー豆抽出液(2.0%(v/v))を添加、任意の時間後に細胞溶解液を作製、抗BACE1抗体、抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(n=3)

第5章 考察

第1節 SOD1G93A 発現細胞及び HSP70 遺伝子発現変化について

ALS の原因遺伝子として報告されている SOD1 遺伝子の G93A 変異体の発現細胞を解析した。SOD1 の変異については活性が低下する変異と変化しない変異とが報告されており [50]、G93A の変異は活性には影響がないことが報告されている。本研究の結果でも導入した SOD1 に活性があることが確認できた (Fig.6C)。一方、SOD1G93A 変異体発現細胞では酸化ストレスの感受性が上昇することが報告されているが [51]、パラコートの感受性については変化が見られなかったことから、本研究では酸化ストレス耐性の低下は見られなかった (Fig.6D)。パラコートは SOD1 の基質であるスーパーオキシドアニオンラジカルを発生させることで酸化ストレスを与えるが、本研究で G93A 変異では活性に変化がないことがわかっており、パラコートによる酸化ストレスでは影響が出なかったことが考えられる。報告されている酸化ストレス耐性の低下は、 H_2O_2 による酸化ストレスの耐性であるため、他の酸化ストレスで影響が出るか、更に検討していく必要がある。

一方、G93A 細胞で、HSP70 遺伝子の発現上昇が確認でき、更にコーヒー豆抽出液の添加により HSP70 遺伝子発現が誘導されること、G93A 細胞ではその誘導がより強いことを見出した (Fig.6E,F)。HSP70 は分子シャペロンとしての機能を持ち、変性したタンパク質やフォールディング段階で問題が生じ、機能できないタンパク質に結合し、タンパクの修復や変性抑制に働く [56]。また、修復が不可能なタンパク質に関してはユビキチン化を介し、プロテアソームによる分解へと導く。ALS や AD、PD は異常タンパクが蓄積するフォールディング病であると考えられているおり、HSP70 とこれらの疾患についてもこれまでに報告がされている。HSP70 を神経細胞に高発現させると $A\beta$ による毒性が軽減されることや [57]、AD モデルマウスにおいて、HSP70 の高発現により認知機能障害の低下が改善され、 $A\beta$ レベル及び神経細胞の脱落が低下すること [58]、HSP70 により α -シヌクレインによる神経毒性が軽減されること [59]、HSP70 の過剰発現により ALS モデルマウスが延命し、初代培養運動ニューロンにおけるタンパク凝集が減少すること [60]、などが報告されている。コ

ーヒー豆抽出液により HSP70 発現が上昇したことから、HSP70 の上昇を介して AD や PD、ALS などのフォールディング病に対して予防効果を発揮している可能性が示唆された。今後、コーヒー成分による HSP70 の遺伝子発現の解析のみではなく、タンパク発現やシャペロンの活性について、またその誘導活性を持つ成分について検討していくことが必要である。

第 2 節 BDNF の働きに対する影響について

本研究より、コーヒー豆抽出液が TrkB のリン酸化の抑制を介して BDNF/TrkB シグナルを調節することが示された (Fig.9A,C)。その一方で、近年神経保護効果を有するといわれているカフェインやクロロゲン酸、トリゴネリンなどは BDNF/TrkB シグナルに影響を与えなかった (Fig.9E) [61,62]。コーヒー豆抽出液による BDNF/TrkB シグナル抑制のメカニズムについて解明するには、より詳細な成分の同定が必要である。

TrkB のリン酸化抑制のメカニズムとしては、膜表面上の TrkB 発現や BDNF-TrkB の結合には影響が見られなかったことから (Fig.11,12)、コーヒー豆抽出液中の成分が①細胞内で TrkB の自己リン酸化を抑制する、②ホスファターゼ活性を上昇させる、などの可能性が考えられる。ホスファターゼ活性に関しては、Protein-tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) が BDNF-TrkB シグナルの活性を制御し、神経突起の伸長を抑制することが報告されている [63]。コーヒー成分により、この酵素活性が上昇している可能性も考えられ、今後解析する必要がある。

これまで BDNF の転写因子として、ERK1/2 シグナルを介した CREB が報告されている [64]。しかし、本研究の結果から、BDNF による CREB のリン酸化はコーヒー豆抽出液により抑制されず、また BDNF 非存在下でもコーヒー豆抽出液単独でリン酸化が促進されることがわかった (Fig.9D)。この結果より、本研究で見られた BDNF 遺伝子発現の制御には CREB 以外の転写因子が関与していることが考えられる。BDNF の転写因子としては CREB の他に Neuron-restrictive silencer factor (NRSF) やグルココルチコイド受容体

(GR) などの可能性も BDNF 遺伝子のプロモーター領域に結合可能な転写因子として示されており、これらの転写因子がコーヒー豆抽出液により影響を受けている可能性が考えられる。

本研究より、コーヒー中の活性成分が吸収され脳に到達すると仮定すると、日常的なコーヒーの摂取により BDNF/TrkB シグナルが抑制される可能性があることが示唆された。このことはコーヒーが神経保護作用を示すという疫学研究とは相反する結果であり、コーヒーの作用点が BDNF/TrkB シグナル以外にあると考えられる。

第3節 VEGF 発現に対する影響について

本研究より、コーヒー豆抽出液により HIF-1 α の活性化を介して VEGF 発現が誘導されること (Fig.14A,C)、またそれがプロリンヒドロキシル化の抑制によることが示された (Fig.23A)。さらにその活性成分についてカテコール類である可能性が示唆された (Fig.21

B,C,23C)。カテコール類は本研究の HPLC 分析結果からも焙煎により抽出液中の濃度が上昇することが確認されており (Fig.19A)、焙煎によりクロロゲン酸から加水分解して生成することが報告されている (Fig.27) [52]。また、

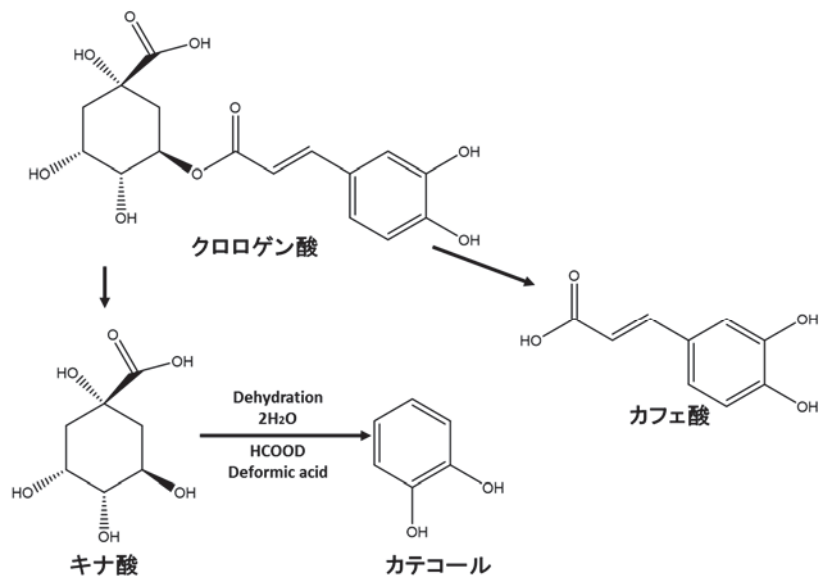


Fig.27 焙煎によるクロロゲン酸からカテコールの生成経路

花王ヘルシアコーヒーでは誘導が見られなかったが (Fig.21D)、当該コーヒーはクロロゲン酸の効果を強く発揮させるために HHQ を活性炭処理により除去しており、この過程で他のカテコール類も取り除かれていることが考えられる。デカフェ処理はスイス式水抽出

法という方法で行われているが、この過程でもカテコール類が取り除かれることが HPLC 分析により確認された (Fig.20D)。以上の結果から、カテコール類が活性成分であることが強く示唆された。カテコールやピロガロールは血液脳関門を通過し、脳内に到達することが報告されており [65]、これらのカテコール類が脳内へ移行し、神経保護効果を発揮している可能性が考えられる。

HIF-1 α 誘導メカニズムについては、プロリンヒドロキシル化が抑制されることは示したが、PHD2 には影響がなく、補因子の補充により発現誘導が抑制されたことから (Fig.24A-F)、コーヒー豆抽出液が補因子に影響を与えていることが考えられる。ROS は Fe²⁺、アスコルビン酸、カタラーゼの除去に働く物質であること、またコーヒー [66] やカテコール類 [67] による ROS の産生が報告されていることから、コーヒー豆抽出液やカテコールの添加により ROS が産生し、PHD2 の活性を阻害している可能性が示唆される。

また、コーヒー豆抽出液による HIF-1 α の誘導には、ERK1/2 や p38 などの MAPK 系が関与している可能性も示された (Fig.22A,B)。MAPK による HIF-1 α 転写活性化については、これまで *in vitro* で、ERK1/2 や p38 により HIF-1 α のリン酸化が亢進することや [68,69]、ERK1/2 や p38 の阻害により HIF-1 α に制御されたレポーター遺伝子の発現が低下すること [70]、などが報告されている。ERK1/2 や p38 の阻害剤により VEGF 遺伝子発現の誘導は抑制されたが、その抑制はエキノマイシンを処理した時よりも小さく、コーヒー豆抽出液による誘導にはこれらのシグナルと、前述の補因子の阻害の両方が関与していると考えられる。DHMEQ の処理により HIF-1 α の発現誘導が抑制されたのに対し、コーヒー豆抽出液の添加では NF κ B のリン酸化は確認できなかった (Fig.22A,C)。DHMEQ は NF κ B の核移行の阻害剤であるが、近年、Nrf2 の活性化に働くことも報告されており [71]、NF κ B とは別の経路でコーヒー豆抽出液による発現誘導を抑制したことが考えられる。

MPP⁺誘導性の PD モデル細胞において、HIF-1 α の活性化により神経細胞死が抑制されることや [72,73]、運動により一時的に低酸素状態を引き起こすことで神経保護効果が発揮されることも報告されており [74]、VEGF のみならず、HIF-1 α も神経変性疾患の治療ター

ゲットになることが考えられる。

本研究より日常的なコーヒーの摂取による神経保護作用が VEGF や HIF-1 α の発現誘導、活性化による可能性が示唆されたことから、コーヒー豆抽出液に含まれる HIF-1 α 活性化成分であるカテコール類について今後詳細に研究することで、ALS や PD の予防及び治療につながっていくことが期待できる。

第 4 節 AD 関連遺伝子発現に対する影響について

AD の原因の 1 つと考えられている A β は、APP が β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼにより切断されることで生じ、生成された A β は IDE やネプリライシン (NEP) などにより分解されることが報告されている [75,76]。本研究より、コーヒー豆抽出液により IDE の遺伝子発現が上昇し (Fig.25C)、BACE1 のタンパク発現が減少することが示された (Fig.26)。また、NEP の遺伝子発現は HIF-1 α により制御されていることも報告されており [77]、コーヒー豆抽出液により発現が上昇していることが考えられる。これより、コーヒー豆抽出液の添加により A β の産生が抑制され、分解が促進する可能性が示唆された。今後実際の A β 分泌量、特に毒性が強いとされる A β 42 の分泌量に対する影響を検討していく必要がある。

コーヒーによる神経保護作用は VEGF や NGF などが単独ではなく、協調的に働く可能性も考えられる。実際、ALS モデルマウスにおいて、GDNF と VEGF をともに分泌させることで、GDNF や VEGF を単独で分泌させた時よりも効果が大きいことが報告されており [78]、コーヒー摂取により、様々な因子が協調的に作用することでより強い神経保護効果が発揮されていることも考えられる。この点についてより明確に議論するには、それぞれの遺伝子・タンパクがどのような成分によって、どのようなメカニズムで発現制御されているかを詳細に研究していく必要がある。

第5節 総括

本研究より、コーヒー豆抽出液により SH-SY5Y 細胞において様々な遺伝子、タンパク発現が変動することが示された。それぞれの発現変動に関わるコーヒー成分やそのメカニズムについて解明していくことで、コーヒーによる神経保護効果について分子レベルで証明し、延いては神経変性疾患の予防や治療につながっていくことが期待できる。

第 6 章 参考文献

- [1] Yakugaku Zasshi. 2007 Nov;127(11):1825-36. Pharmacological bases of coffee nutrients for diabetes prevention. Oka K.
- [2] J Alzheimers Dis. 2010;20 Suppl 1:S167-74. doi: 10.3233/JAD-2010-1404. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. Eskelinen MH, Kivipelto M.
- [3] Ann Neurol. 2012 Dec;72(6):893-901. doi: 10.1002/ana.23687. Epub 2012 Oct 15. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, Schrag A.
- [4] J Alzheimers Dis. 2009;16(1):85-91. doi: 10.3233/JAD-2009-0920. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study. Eskelinen MH, Ngandu T, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M.
- [5] JAMA. 2000 May 24-31;283(20):2674-9. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Curb JD, Popper JS, White LR.
- [6] Am J Epidemiol. 2011 Nov 1;174(9):1002-8. doi: 10.1093/aje/kwr229. Epub 2011 Sep 26. Coffee and amyotrophic lateral sclerosis: a possible preventive role. Beghi E, Pupillo E, Messina P, Giussani G, Chiò A, Zoccolella S, Moglia C, Corbo M, Logroscino G; EURALS Group.

[7] *Neural Regen Res.* 2014 Aug 15;9(16):1506-8. doi: 10.4103/1673-5374.139474.

Possible protective action of neurotrophic factors and natural compounds against common neurodegenerative diseases. Numakawa T.

[8] *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42. Epub 2003 Mar 27. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Huang EJ, Reichardt LF.

[9] *Neurobiol Aging.* 2012 Jun;33(6):1122.e23-39. doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.006. Epub 2011 Dec 30. Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. Kempainen S,

Rantamäki T, Jerónimo-Santos A, Lavoisier G, Autio H, Karpova N, Kärkkäinen E,

Stavén S, Vicente Miranda H, Outeiro TF, Diógenes MJ, Laroche S, Davis S, Sebastião

AM, Castrén E, Tanila H.

[10] *Nat Med.* 2009 Mar;15(3):331-7. doi: 10.1038/nm.1912. Epub 2009 Feb 8.

Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primatemodels of Alzheimer's disease. Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada

S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao

MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH.

[11] *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Feb;7(1):18-21. Epub 2006 Oct 17. Role of neurotrophic

factors in depression. Castrén E, Vöikar V, Rantamäki T.

- [12] *Exp Neurol.* 2011 Mar;228(1):118-25. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.12.018. Epub 2010 Dec 28. Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. Baydyuk M, Nguyen MT, Xu B.
- [13] *Brain Res.* 2011 Mar 10;1378:105-18. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.090. Epub 2011 Jan 12. Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. Stahl K, Mylonakou MN, Skare Ø, Amiry-Moghaddam M, Torp R.
- [14] *J Neurol.* 2010 Apr;257(4):540-5. doi: 10.1007/s00415-009-5357-2. Epub 2009 Oct 22. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL.
- [15] *Exp Neurol.* 2000 Nov;166(1):127-35. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA.
- [16] *Front Neurosci.* 2010 Jun 11;4:32. doi: 10.3389/fnins.2010.00032. Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? Henriques A, Pitzer C, Schneider A.
- [17] *PLoS One.* 2012;7(6):e39946. doi: 10.1371/journal.pone.0039946. Epub 2012 Jun 27. Deletion of the BDNF truncated receptor TrkB.T1 delays disease onset in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Yanpallewar SU, Barrick CA, Buckley H, Becker J, Tessarollo L.

- [18] Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Sep 3;99(18):11946-50. Epub 2002 Aug 14. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA.
- [19] Neurosignals. 2005;14(5):207-21. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. Zachary I.
- [20] J Clin Invest. 2004 Jan;113(1):14-8. VEGF: a critical player in neurodegeneration. Storkebaum E, Carmeliet P.
- [21] FASEB J. 1999 Jan;13(1):9-22. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.
- [22] Med Sci Monit. 2000 Sep-Oct;6(5):1047-52. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. Joško J, Gwóźdź B, Jedrzejowska-Szypułka H, Hendryk S.
- [23] Cardiovasc Res. 2001 Feb 16;49(3):507-21. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Conway EM, Collen D, Carmeliet P.
- [24] Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Jul;2(7):a006502. doi: 10.1101/cshperspect.a006502. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. Koch S, Claesson-Welsh L.

- [25] *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4604-13. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL.
- [26] *Biochem Pharmacol.* 2000 Oct 15;60(8):1171-8. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. Berra E, Milanini J, Richard DE, Le Gall M, Viñals F, Gothié E, Roux D, Pagès G, Pouyssegur J.
- [27] *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27;94(11):5667-72. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L.
- [28] *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5510-4. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL.
- [29] *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jul 5;260(2):557-61. Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J.
- [30] *EMBO J.* 2001 Sep 17;20(18):5197-206. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.

- [31] *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3041-9. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels. Masson N, Ratcliffe PJ.
- [32] *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12;97(19):10430-5. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW.
- [33] *Science.* 2001 Nov 9;294(5545):1337-40. Epub 2001 Oct 11. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Bruick RK, McKnight SL.
- [34] *Cell.* 2001 Oct 5;107(1):43-54. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ.
- [35] *J Biol Chem.* 1996 Dec 13;271(50):32253-9. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF.
- [36] *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):858-61. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML.

[37] Nat Genet. 2003 Aug;34(4):383-94. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P.

[38] Trends Mol Med. 2004 Jun;10(6):275-82. VEGF: necessary to prevent motoneuron degeneration, sufficient to treat ALS? Lambrechts D, Storkebaum E, Carmeliet P.

[39] Nature. 2004 May 27;429(6990):413-7. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND.

[40] Ann Neurol. 2004 Oct;56(4):564-7. Vascular endothelial growth factor prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. Zheng C, Nennesmo I, Fadeel B, Hentzer JI.

[41] Nat Neurosci. 2005 Jan;8(1):85-92. Epub 2004 Nov 28. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P.

[42] *J Neurogenet.* 2004 Apr-Jun;18(2):429-34. VEGF promoter haplotype and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Terry PD, Kamel F, Umbach DM, Lehman TA, Hu H, Sandler DP, Taylor JA.

[43] *Exp Neurol.* 2014 Nov;261:720-32. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.08.019. Epub 2014 Aug 23. Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-18. Muñoz A, Garrido-Gil P, Dominguez-Mejide A, Labandeira-Garcia JL.

[44] *Brain Res.* 2005 Aug 16;1053(1-2):10-8. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Agari T, Wen Ji Y, Hayase H, Hamada H, Borlongan CV, Date I.

[45] *Neurochem Int.* 2011 Nov;59(6):945-53. doi: 10.1016/j.neuint.2011.07.005. Epub 2011 Jul 12. PI3-K/Akt and ERK pathways activated by VEGF play opposite roles in MPP⁺-induced neuronal apoptosis. Cui W, Li W, Han R, Mak S, Zhang H, Hu S, Rong J, Han Y.

[46] *Anal Biochem.* 1990 Feb 1;184(2):291-7. Assay for 2-oxoglutarate decarboxylating enzymes based on the determination of [1-¹⁴C]succinate: application to prolyl 4-hydroxylase. Kaule G, Günzler V.

[47] *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):234-9. Epub 2006 Oct 23. Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase. Tsukiyama F, Nakai Y, Yoshida M, Tokuhara T, Hirota K, Sakai A, Hayashi H, Katsumata T.

[48] *Nature.* 1993 Mar 4;362(6415):59-62. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al.

[49] *PLoS One.* 2012;7(4):e35050. doi: 10.1371/journal.pone.0035050. Epub 2012 Apr 6. Aberrant localization of FUS and TDP43 is associated with misfolding of SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. Pokrishevsky E, Grad LI, Yousefi M, Wang J, Mackenzie IR, Cashman NR.

[50] *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15923-31. Epub 2002 Feb 19. Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Hayward LJ, Rodriguez JA, Kim JW, Tiwari A, Goto JJ, Cabelli DE, Valentine JS, Brown RH Jr.

[51] *PLoS One.* 2013 Jun 28;8(6):e68256. doi: 10.1371/journal.pone.0068256. Print 2013. The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type. Richardson K, Allen SP, Mortiboys H, Grierson AJ, Wharton SB, Ince PG, Shaw PJ, Heath PR.

- [52] *J Agric Food Chem.* 2010 May 12;58(9):5465-70. doi: 10.1021/jf1005148. Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. Moon JK, Shibamoto T.
- [53] *Neuron.* 1993 Aug;11(2):321-31. Induction of TrkB by retinoic acid mediates biologic responsiveness to BDNF and differentiation of human neuroblastoma cells. Eukaryotic Signal Transduction Group. Kaplan DR, Matsumoto K, Lucarelli E, Thiele CJ.
- [54] *J Biol Chem.* 1999 Jun 4;274(23):16451-60. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and chemoprotection of human neuroblastoma cells. Middlemas DS, Kihl BK, Zhou J, Zhu X.
- [55] *Curr Opin Struct Biol.* 1999 Dec;9(6):722-31. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. Schofield CJ, Zhang Z.
- [56] *J Biol Chem.* 1990 Jul 25;265(21):12111-4. Heat shock proteins. Schlesinger MJ.
- [57] *J Neurosci.* 2004 Feb 18;24(7):1700-6. Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. Magrané J, Smith RC, Walsh K, Querfurth HW.
- [58] *J Neurosci.* 2011 Apr 6;31(14):5225-34. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Matsushima T, Suzuki T, Mizushima T.

[59] Science. 2002 Feb 1;295(5556):865-8. Epub 2001 Dec 20. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM.

[60] J Neurochem. 1999 Feb;72(2):693-9. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. Bruening W, Roy J, Giasson B, Figlewicz DA, Mushynski WE, Durham HD.

[61] J Alzheimers Dis. 2010;20 Suppl 1:S187-204. doi: 10.3233/JAD-2010-091387. Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. Santos C, Costa J, Santos J, Vaz-Carneiro A, Lunet N.

[62] Neurochem Int. 2012 Apr;60(5):466-74. doi: 10.1016/j.neuint.2012.02.004. Epub 2012 Feb 15. Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons. Kim J, Lee S, Shim J, Kim HW, Kim J, Jang YJ, Yang H, Park J, Choi SH, Yoon JH, Lee KW, Lee HJ.

[63] J Biol Chem. 2014 Nov 14;289(46):31682-92. doi: 10.1074/jbc.M114.603621. Epub 2014 Oct 6. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a novel regulator of central brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) signaling. Ozek C, Kanoski SE, Zhang ZY, Grill HJ, Bence KK.

[64] Brain Res Bull. 2013 Jul;96:45-53. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.04.009. Epub 2013 May 2. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. Zhang L, Zhao H, Zhang X, Chen L, Zhao X, Bai X, Zhang J.

[65] J Pharm Pharmacol. 1968 Sep;20(9):727-9. The penetration of catechol and pyrogallol into mouse brain and the effect on cerebralmonoamine levels. Rogers KJ, Angel A, Butterfield L.

[66] Mol Med Rep. 2015 Nov;12(5):7293-302. doi: 10.3892/mmr.2015.4377. Epub 2015 Sep 28. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. Priftis A, Stagos D, Konstantinopoulos K, Tsitsimpikou C, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Tzatzarakis MN, Kouretas D.

[67] J Biomed Sci. 1994 Mar;1(2):125-130. Generation of Hydrogen Peroxide, Superoxide Anion and the Hydroxyl Free Radical from Polyphenols and Active Benzene Metabolites: Their Possible Role in Mutagenesis. Lee SF1, Lin JK.

[68] J Biol Chem. 1999 Nov 12;274(46):32631-7. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha(HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J.

[69] *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4873-80. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS.

[70] *Mol Pharmacol.* 2001 May;59(5):1216-24. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H.

[71] *Org Biomol Chem.* 2011 Jun 21;9(12):4635-41. doi: 10.1039/c1ob05205e. Epub 2011 May 3. Chemoenzymatic synthesis of (2R,3R,4R)-dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a new activator of antioxidant transcription factor Nrf2. Niitsu Y1, Hakamata M, Goto Y, Higashi T, Shoji M, Sugai T, Umezawa K.

[72] *Neurochem Int.* 2010 Oct;57(3):198-205. doi: 10.1016/j.neuint.2010.05.008. Epub 2010 May 28. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. Wu Y, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W, Pan T.

[73] *xNeurosci Lett.* 2014 Sep 5;579:35-40. doi: 10.1016/j.neulet.2014.07.014. Epub 2014 Jul 17. Neuroprotection by Orexin-A via HIF-1 α induction in a cellular model of Parkinson's disease. Feng Y, Liu T, Li XQ, Liu Y, Zhu XY, Jankovic J, Pan TH, Wu YC.

[74] *Neuroscience*. 2015 Jun 4;295:23-38. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.015. Epub 2015 Mar 19. HIF1 α is necessary for exercise-induced neuroprotection while HIF2 α is needed for dopaminergic neuron survival in the substantia nigra pars compacta. Smeyne M, Sladen P, Jiao Y, Dragatsis I, Smeyne RJ.

[75] *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):4162-7. Epub 2003 Mar 12. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S.

[76] *Science*. 2001 May 25;292(5521):1550-2. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC.

[77] *J Neurochem*. 2014 Oct;131(1):4-11. doi: 10.1111/jnc.12795. Epub 2014 Jul 28. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates up-regulation of neprilysin by histone deacetylase-1 under hypoxia condition in neuroblastoma cells. Wang H, Sun M, Yang H, Tian X, Tong Y, Zhou T, Zhang T, Fu Y, Guo X, Fan D, Yu A, Fan M, Wu X, Xiao W, Chui D.

[78] *Mol Ther*. 2013 Aug;21(8):1602-10. doi: 10.1038/mt.2013.108. Epub 2013 May 28. Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model. Krakora D, Mulcrone P, Meyer M, Lewis C, Bernau K, Gowing G, Zimprich C, Aebischer P, Svendsen CN, Suzuki M.

第7章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導ご鞭撻をいただき、博士論文を完成するにあたり数知れぬほどのご助言を下さり、研究の方向性を示して下さりました本学衛生化学講座の田村 悦臣教授をはじめ、多胡 めぐみ准教授、清水 美貴子講師、中澤 洋介助教に深く御礼申し上げます。また、コーヒー豆抽出液の分画や成分分析について多大なるご指導をくださいました城西大学薬学部機能性食品科学研究室の古旗 賢二教授に心より感謝申し上げます。衛生化学講座に配属されてから3年半程、時には厳しく、時には親切にご指導くださいました現明治薬科大学薬学部衛生化学講座の服部 研之講師に深く感謝申し上げます。衛生化学講座に配属され、研究について右も左もわからない学部4年生のころから、数多くの質問に答えてくださり、また卒業してからも様々な相談に乗ってくださった串田祥先輩に心より御礼申し上げます。本研究の一部について共に実験し、研究を進行させてくれた高橋 克徳さん、秋山 菜由さん、福山 和也さんに深く御礼申し上げます。また、研究室で同じ院生として長い時間を共にしてきた鯉渕 芙由子さん、太田 遥香さん、青柳良平さん、高橋 國次さん、上田 史仁さん、牧 千洋さん、中山 拓哉さん、近藤 駿介さん、内原 脩貴さん、新野 智美さん、尤 聖淞さんに感謝申し上げます。また、後期博士課程の研究生活を共にし、長い間研究室生活を共にしてきた本学化学療法学講座博士課程3年の近藤 慎吾さんに深く御礼申し上げます。

また、小学校に入学してから21年間もの長い間、私が学生であることを認めてくださると共に、ずっと私の支えとなってくださった両親、姉に心より深く感謝いたします。

最後になりますが、私をここまで育ててくださった慶應義塾大学薬学部衛生化学講座のますますの発展を心からお祈りし、簡単ではございますが、御礼の言葉とさせていただきます。

平成28年 1月 19日

81354023

垣尾 翔大