

末梢組織が産生するBDNFに着目した雑穀の
うつ病予防・改善効果の検討

長崎国際大学 薬学部

中島 健輔

うつ病は重大な健康被害をもたらす精神疾患であるが、有効な予防手段はない。さらに、セロトニンおよびノルアドレナリンなどのモノアミンをターゲットとした既存の抗うつ薬では改善しない症例も多い。従って、うつ病の予防手段の確立ならびに新規作用機序を有する抗うつ物質の発見が待ち望まれている。

1997年、「神経細胞の新生・成長を担う脳由来神経栄養因子 (BDNF) の脳内における減少が、うつ病の発症につながる」という神経可塑性仮説が提唱された¹⁾。また、うつ病の主要な発症原因であるストレスにより海馬の BDNF 濃度が低下すること^{2,3)}、さらに、脳内への BDNF 投与がラットのうつ様症状を改善することが報告され⁴⁾、脳内 BDNF 濃度の上昇は、うつ病の予防・改善につながると考えられるようになった。

BDNF は“脳由来”という名称ながら、脳だけでなく種々の末梢組織においても産生される^{5,6)}。さらに、BDNF は血液脳関門を通過し、脳へ移行することも知られている⁷⁾。これらの背景から、研究代表者は末梢組織において BDNF の産生を促進する物質は、脳内 BDNF 濃度の上昇をもたらす、うつ病予防・改善効果を示すのではないかとこの着想を得た。この着想に基づき、我々はヒト腎がん細胞 ACHN の BDNF 産生・分泌能を明らかにし、ACHN 細胞を用いた BDNF 産生・分泌促進物質の探索を行ってきた。

雑穀は健康食品として広く認知されているが、うつ病に対する効果の検討は見当たらない。しかし 2018 年、ライ麦パンの摂取により、ヒトの血中 BDNF 濃度が上昇するという報告がなされた⁸⁾。また、雑穀に多く含有されるポリフェノール・フェルラ酸についても BDNF 産生・分泌促進作用が報告されている。これらの報告から、雑穀は BDNF 産生・分泌促進作用を機序とする抗うつ食品素材になり得ると考えられた。

本研究では、①ACHN 細胞を用いた「BDNF 産生・分泌促進作用を有する雑穀類」の探索、②雑穀類の BDNF 産生・分泌促進機序の解明、③ラット血清中 BDNF 濃度へ及ぼす雑穀類の影響の検討を行い、「末梢組織における BDNF 産生・分泌促進作用を機序とする抗うつ食品素材」としての雑穀の可能性を探った。

【実験方法】

1. 雑穀メタノール抽出物の調製

雑穀 (赤米、アマランサス、アワ、イナキビ、黒米、小麦ふすま、全粒粉小麦、そば玄穀、そばの実、ハト麦ぬか、緑米) を Tube Mill 100 (Ika, Saufen, Germany) を用いて粉碎し、粉碎試料 5 g に 10–30 mL のメタノールを加え 12 時間攪拌した。15,000 × g、4 °C で 5 分間遠心後、その上清から残渣を得、Dimethyl sulfoxide (DMSO) により終濃度 40 mg/mL とした。

2. 細胞培養

ヒト腎がん細胞 ACHN は 10 %ウシ胎児血清添加 Dulbecco's modified eagle medium 培地中にて、37 °C、5 %CO₂ 条件下で培養した。

3. MTT 試験

ACHN 細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 個/100 μ L/ウェルとなるように播種した。24 時間培養後、所定濃度の雑穀メタノール抽出物を添加し、さらに 24 時間培養した。MTT 試薬を 200 μ g/mL になるよう各ウェルに添加し、4 時間培養後、培地を吸引除去した。細胞内で生成したホルマザンを 100 μ L の DMSO に溶解し、振とう混和した。その後、波長 570 nm における吸光度を測定し、コントロールの吸光度との比率を細胞生存率とした。

4. ACHN 細胞を用いた BDNF 産生・分泌促進作用を有する雑穀の探索

ACHN 細胞をプレートに 4×10^5 個/mL/ウェルとなるように播種し、24 時間培養した。Dulbecco's phosphate buffered saline で細胞を洗浄後、MTT 試験により決定した細胞生存率に影響を及ぼさない濃度の雑穀メタノール抽出物を加えた培地を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、培地を回収し、市販の ELISA kit により培地中 BDNF 濃度を測定した。

5. ACHN 細胞における BDNF の mRNA 発現量に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響

雑穀のメタノール抽出物存在下、ACHN 細胞を 24 時間培養し、トリゾール試薬にて RNA を抽出した。その後、逆転写により得た cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、BDNF の mRNA 発現量を測定した。使用したプライマー配列を以下に示す。BDNF (F:5'-TTTGGTTGCATGAAGGCTGC-3', R:5'-GCCGAACTTTCTGGTCCTCA-3'), 18S rRNA (F:5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3', R:5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3')。

6. ラット血清 BDNF 濃度に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響

6 週齢の雄性 SD ラット (日本エスエルシー株式会社, 浜松) を購入し、1 週間の馴化後、試験に供した。動物飼育室は明暗周期 12 時間 (明期 7:00 - 19:00)、室温 22 ± 2 °C、湿度約 60 %で管理した。プラスチックケージにラットを 5 匹ずつ収容し、固形飼料 (CE-2) および水は自由摂取とした。

雑穀メタノール抽出エキスの溶媒留去物を 50 mg/kg/day の用量で 4 週間にわたりゾンデを用いて経口投与した。最終投与の 6 時間後に採血し、 $1,200 \times g$ 、4 °C で 10 分間、遠心分離を行い血清を得た。血清 BDNF 濃度は市販の ELISA kit を用いて測定した。

本研究課題に係る動物実験は、長崎国際大学薬学部研究倫理委員会の承認を得 (承認番号: 第 139 号)、長崎国際大学薬学部動物実験指針に基づき行った。

7. 統計解析

データは平均±標準偏差で示した。統計解析は、2 群間の比較は *t* 検定、多群間の比較は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行い、*P* < 0.05 を有意差ありとした。

【結果および考察】

1. ACHN 細胞の BDNF 産生・分泌に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響

ACHN 細胞の生存率に影響を及ぼさない雑穀メタノール抽出物濃度を決定するため、MTT 試験を行った。アマランサス、アワ、小麦ふすま、そば玄穀、そばの実、ハト麦ぬかおよび緑米のメタノール抽出物は 100 μg/mL まで ACHN 細胞の生存率に有意な影響を及ぼさなかった。イナキビは 50 μg/mL、赤米、黒米および全粒粉小麦については 25 μg/mL まで ACHN 細胞の生存率に影響を与えなかった (図 1)。

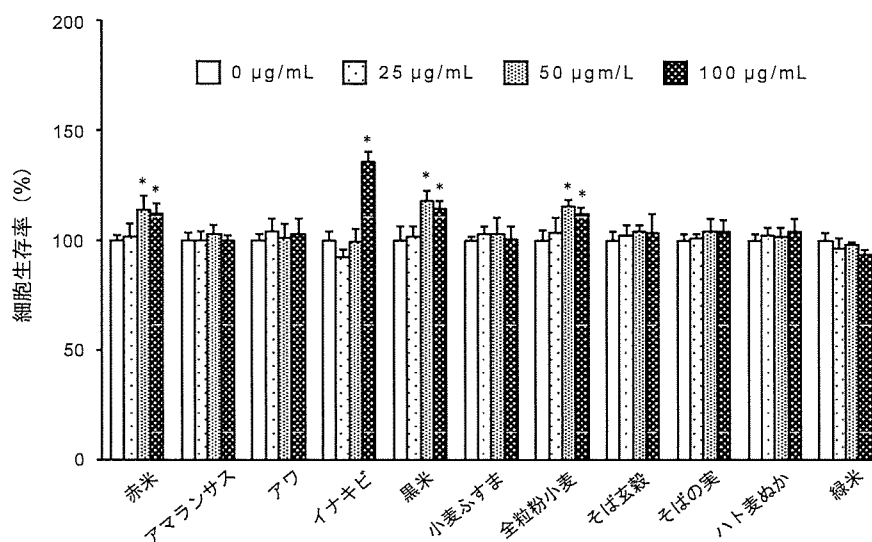


図1 ACHN細胞の生存率に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響
データは平均±標準偏差で示した (n = 6) 。* *P* < 0.05 vs 非添加群

続いて、BDNF 産生・分泌に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響を ACHN 細胞の生存率に影響しなかった濃度にて検討した。アワのメタノール抽出物は ACHN 細胞の BDNF 産生・分泌を有意に促進したが、アワを除く雑穀抽出物にはその作用は認められなかった (図 2)。健常人の血清中 BDNF 濃度は、うつ病患者のそれと比して約 1.21 倍であったという報告がなされている⁹⁾。本検討では ACHN 細胞の培養培地中 BDNF 濃度は、アワのメタノール抽出物処理によりコントロールに比して約 1.2 倍に上昇しており、この上昇の程度から、アワはうつ病の予防・改善効果を示す食品素材になり得るものと推察される。

本研究で検討を行った雑穀のうち、アワのみが BDNF 産生・分泌促進作用を示した要因として、健常人において血清中 BDNF 濃度上昇効果が報告されているゼアキサンチンの関与が考えられる¹⁰⁾。アワはゼアキサンチンを多く含有するが¹¹⁾、他の雑穀類については、ゼアキサンチンの含有量は極めて少ないと報告されている¹²⁾。そのため、ゼアキサンチン含有量の多い雑穀類であるアワのみが、BDNF 産生・分泌促進作用を示したものと考えられる。今後、ゼアキサンチンならびにゼアキサンチンを豊富に含む食品素材の、ACHN 細胞における BDNF 産生・分泌促進作用を検討する予定である。

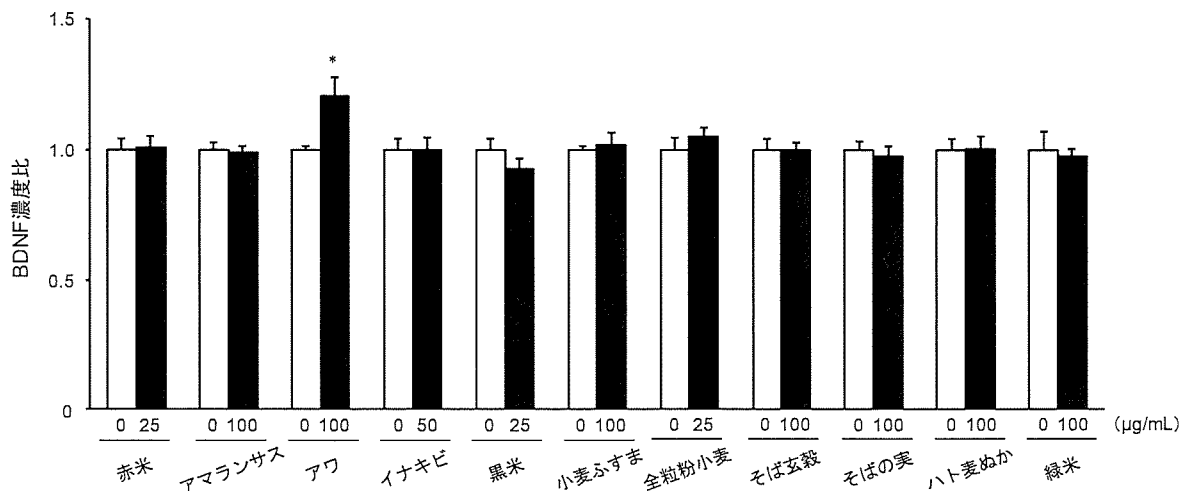


図2 ACHN細胞のBDNF産生・分泌に及ぼす雑穀メタノール抽出物の影響
データは平均±標準偏差で示した (n = 6) 。* P < 0.05 vs 非添加群

2. ACHN 細胞における BDNF の mRNA 発現量に及ぼすアワのメタノール抽出物の影響

アワのメタノール抽出物の BDNF 産生・分泌促進作用に、ACHN 細胞の BDNF の mRNA 発現量の増加が関与しているか否かを検討するため、リアルタイム PCR を行った。その結果、アワは ACHN 細胞の BDNF の mRNA 発現量に有意な影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 3)。この結果から、アワのメタノール抽出物による ACHN 細胞の培地中 BDNF 濃度の上昇は、BDNF の産生促進によるものではなく、分泌の促進によるものである可能性が高いと考えられた。BDNF の細胞外への分泌に関与する因子として calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) などが知られている¹³⁾。今後、これらの因子に及ぼすアワの影響を解析する予定である。

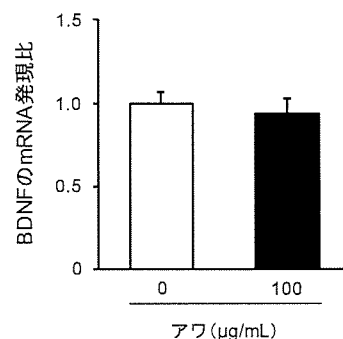


図3 ACHN細胞のBDNFのmRNA発現に及ぼすアワのメタノール抽出物の影響
データは平均±標準偏差で示した (n = 3) 。

3. ラット血清 BDNF 濃度に及ぼすアワのメタノール抽出物の影響

ACHN 細胞を用いた検討によってアワのメタノール抽出物の BDNF 産生・分泌促進作用が明らかとなった。続いて、ラット血清 BDNF 濃度に及ぼすアワの影響を検討した。4 週間にわたってアワのメタノール抽出物の溶媒留去物を経口投与した (50 mg/kg/day)。アワ抽出物投与群のラット血清 BDNF 濃度は、非投与群のそれに比して上昇傾向を示したものの有意差はなかった (図 4)。

今後、投与量ならびに投与期間の変更を行い、再度検討を実施する必要があると考えられた。また、我々は拘束ストレス負荷がラット血清 BDNF 濃度を低下させることを明らかにしている。アワが拘束ストレス負荷ラットの血清 BDNF 濃度の低下を改善するか否かを今後、検討する予定である。

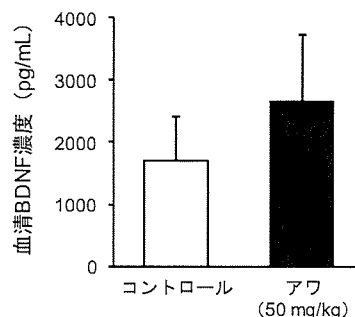


図4 ラット血清BDNF濃度に及ぼすアワのメタノール抽出物の影響
データは平均±標準偏差で示した (n=5)。

【要約】

脳内における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の増加は、うつ病の予防・改善をもたらすと考えられている。BDNF は脳だけでなく末梢組織においても産生され、さらに、血液脳関門を通過することから、我々は、末梢組織において BDNF の産生を促進する物質は、うつ病予防・改善作用を示すのではないかと考え、末梢性 BDNF 産生・分泌促進物質の探索を行ってきた。

本研究では、ヒト腎がん細胞 ACHN を利用して、種々の雑穀類の BDNF 産生・分泌促進作用の検討を行い、アワのメタノール抽出物にその効果を見出した。また、その BDNF 産生・分泌促進の機序には、BDNF の mRNA 発現量の変化は関与していないことを明らかとした。さらに、アワのメタノール抽出物の溶媒留去物 (50 mg/kg/day) を 4 週間にわたり、ラットに経口投与したが、アワ抽出物の血清 BDNF 濃度上昇作用を見出すことはできなかった。今後、投与量および投与期間などを見直す必要があると考えられる。

本検討により、アワの ACHN 細胞における BDNF 産生・分泌促進作用が明らかとなったことから、アワが「末梢組織における BDNF 産生・分泌促進作用を機序とする抗うつ食品」となり得る可能性が示された。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団ならびに関係者の皆さまに心より感謝申し上げます。

【文献】

- 1) Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* **54**: 597–606.
- 2) Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. 2009. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology* **34**: 762–772.
- 3) Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. 1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* **15**: 1768–1777.
- 4) Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* **22**: 3251–3261.
- 5) Endlich N, Lange T, Kuhn J, Klemm P, Kotb AM, Siegerist F, Kindt F, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Kuss AW, Nath N, Rettig R, Lendeckel U, Zimmermann U, Amann K, Stracke S, Endlich K. 2018. BDNF: mRNA expression in urine cells of patients with chronic kidney disease and its role in kidney function. *J Cell Mol Med* **22**: 5265–5277.
- 6) Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H. 1999. Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol* **155**: 1183–1193.
- 7) Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. 1998. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* **37**: 1553–1561.
- 8) Sandberg JC, Björck IME, Nilsson AC. 2018. Increased plasma brain-derived neurotrophic factor 10.5 h after intake of whole grain rye-based products in healthy subjects. *Nutrients* **10**: E1097.
- 9) Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. 2005. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry* **57**: 1068–1072.
- 10) Stringham NT, Holmes PV, Stringham JM. 2019. Effects of macular xanthophyll supplementation on brain-derived neurotrophic factor, pro-inflammatory cytokines, and cognitive performance. *Physiol Behav* **211**: 112650.
- 11) Zhang LZ, Liu RH. 2015. Phenolic and carotenoid profiles and antiproliferative activity of foxtail millet. *Food Chem* **174**: 495–501.

- 12) Wurtzel ET. 2004. Chapter five Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis. *Recent Adv Phytochem* **38**: 85–110.
- 13) Shinoda Y, Sadakata T, Nakao K, Katoh-Semba R, Kinameri E, Furuya A, Yanagawa Y, Hirase H, Furuichi T. 2011. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 373–378.