

(P-20)

# シキミ酸と NGF との相乗効果による脳機能低下予防の 基礎検討

北池 秀次<sup>1</sup>、庄野 正行<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 徳島大学技術支援部、<sup>2</sup> 徳島大学大学院医歯薬学研究部 法医学分野)

KITAIKE Syuji, SHONO Masayuki :

## Preliminary Study on the Prevention of Cognitive Decline through the Synergistic Effects of Shikimic Acid and NGF

Neurons produce neurotrophic factors involved in differentiation and survival, providing metabolic support. Among these factors, Nerve Growth Factor (NGF) has been investigated for its application in clinical trials, as it regulates not only neuronal growth but also differentiation. Shikimic acid, a compound with various pharmacological effects and multiple optical activities, is reported to exhibit cell growth and proliferation effects. In this study, we investigated the basic mechanism by which shikimic acid promotes neuronal differentiation. Shikimic acid solution was added to PC12 cell culture medium, and the influence of NGF on neuronal differentiation was examined. This report summarizes our findings.

### 1. はじめに

脳機能を支える神経細胞や、補助的役割を持つアストロサイトなどグリア細胞において、神経栄養因子産生を促進させる成分が注目されている。神経細胞は、分化・生存に関わる神経栄養因子を産生して代謝的支援を行っており、神経栄養因子の中でも NGF(Nerve Growth Factor)は分化作用や神経軸索を伸長する神経成長因子<sup>1)</sup>として治験への応用が試みられてきた。近年は天然化学物質の総称であるファイトケミカル(Phytochemical)が生薬の成分として多くの研究が行われており、ポリフェノール類は抗酸化作用によりアミロイドβの蓄積を抑制する効果や、成分には細胞成長及び増殖効果があると言われている<sup>2)</sup>。シキミ酸は分子内に多くの光学活性を有する様々な薬理効果をもつ化合物ということもあり、本研究では PC12 細胞培養液にシキミ酸溶液を添加し、NGF の因子によって神経細胞の分化<sup>3)</sup>が促進される基礎検討を行ったので報告する。

### 2. 方法

#### (1) 実験材料

本実験に供したシキミ酸は、富士フィルム和光純薬株式会社より入手した。培養細胞は、PC12 細胞を DS ファーマバイオメディカル株式会社より入手した。

#### (2) 試薬類

使用した試薬類は、4',6-Diamidino-2-phenylindole,

dihydrochloride(DAPI)は同仁化学、PBS(-)は富士フィルム和光純薬株式会社、4.5g/l Glucose with L-Gln, Sodium(DMEM)はナカライテスク株式会社、Nerve Growth Factor(NGF)はメルク株式会社、FetalBovineSerum(FBS)は BioWes 社、Penicillin-Streptomycin Solution は、DS ファーマバイオメディカル株式会社より入手した。その他の試薬は全て市販の特級以上のものを用いた。

#### (3) シキミ酸溶液の調製と細胞の培養

シキミ酸粉末 1g/10mL/PBS を滅菌フィルター(0.22 μm)でろ過し、原液とした。培養液は 100 μg/mL になるよう調整した。細胞は、神経のモデル細胞として使用されるラット副腎髄質由来 PC12 細胞を用いた。初期培養は Greene と Tischler の方法に準じ、10%FBS、それぞれ 1%の Penicillin 及び Streptomycin を含む DMEM 培地を用い、5%CO<sub>2</sub> と 95%空気の気相下、37°Cで行った。増殖を確認しながら 80%程度のコンフルエントになったところで継代を行った。

#### (4) 生細胞数の蛍光強度

生細胞数は一般的に MTT 法、コロニー法等で測定されているが、DAPI による細胞核染色を用いることで細胞を計測し易くした。タイプ 1 コラーゲンで前処理済の 35mm ディッシュに 5×10<sup>3</sup>cells/mL 密度で播種し、NGF は濃度が 50ng/mL を超えないよう 7 日間添加し、70%Ethanol で 1 時間固定した<sup>4)</sup>。DAPI 1 μg/mL/1M NaCl で 1 時間の細胞核染色後、室温静置して、遮光下

で倒立蛍光顕微鏡により Ex:365nm、Em:450nm、露出固定、対物レンズ 20 倍で蛍光強度を測定した。

### (5) 神経突起伸長の測定

細胞は同様にコラーゲンで前処理済の 35mm ディッシュに  $1 \times 10^5$  cells/mL 密度で播種した。24 時間培養後、0.5%FBS の培養培地に交換し、NGF 及びシキミ酸溶液を添加して 3 日間培養した。シキミ酸溶液の試薬添加から培養後、位相差顕微鏡下で細胞を観察した。細胞体の長径より神経突起が伸長と判定した細胞について評価した。

## 3. 結果

図1に細胞核相対DNA量のヒストグラムを示す。

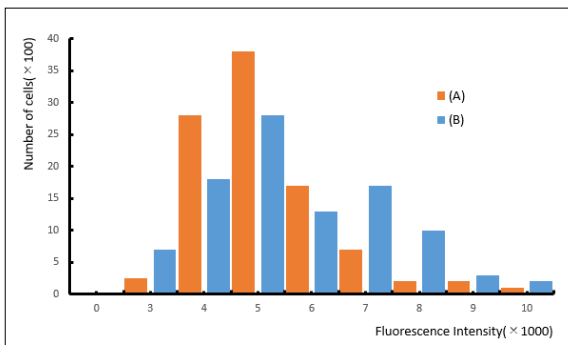


図 1. 細胞核相対 DNA 量ヒストグラム : (A)NGF、(B)対照

NGF は交感神経の発達過程で分化・生存維持し、神経細胞の成熟後は生存・機能維持作用を示す。そこでシキミ酸が NGF の存在下でどのような効果を示すのか検討した。神経突起の伸長を ImageJ で算出した結果、NGF50ng/ml 単独では、100~150  $\mu$ m の神経突起伸長を誘導したが、シキミ酸 1%を併用すると 150~250  $\mu$ m へと相乗的に増加した (図 2)。

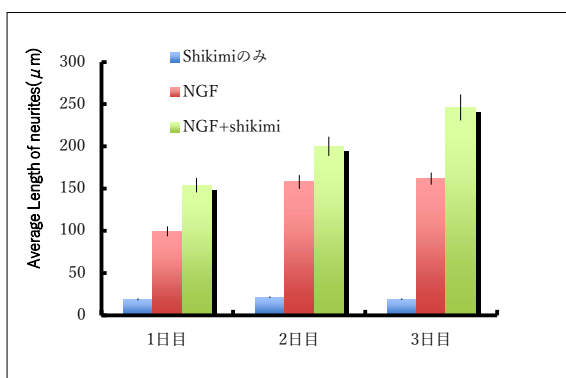


図 2. NGF、NGF+シキミ酸による神経突起の伸長変化

図 3 にシキミ酸と NGF を併用した時の細胞の位相差顕微鏡による比較画像を示した。NGF にシキミ酸を含有したものは形態変化及び突起形成して有意に多くなったものが見られた。NGF 添加によって細長く伸長して突起を形成するものが認められたが、シキミ

酸単独は神経突起伸長に有意な影響を及ぼさなかった。

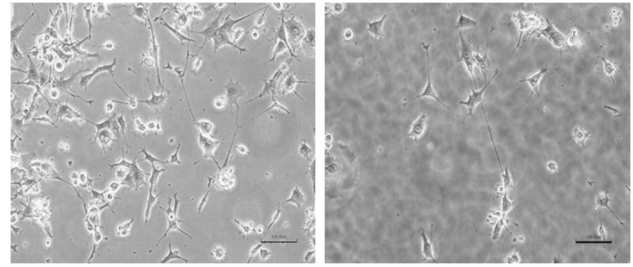


図 3. (左)NGF、(右)シキミ酸+NGF、Scale bar=100 $\mu$ m

## 4. 考察

PC12 細胞は腫瘍株で末梢交感神経細胞と同じ系譜であり、神経栄養因子の一つである NGF に応答して交感神経細胞に分化する特性を持つ。NGF は巨大な高分子タンパク質のため脳・血液関門を通過できないが、シキミ酸によって神経細胞は NGF などの因子をより分化・生存を促進させる効果が示唆された。実験に供したシキミ酸は、芳香族化合物であるヒドロキシ酸で唐檳などシキミ属の果実に多いが、収量が低いため再生可能な植物原料やコーヒー粕麩によるキノ酸から多段階の生合成を経て高生産される技術が進んでいる。カフェオイルキノ酸は認知症のひとつであるアルツハイマー病の予防効果や、アミロイド  $\beta$  から神経細胞を保護する作用があることも報告されている<sup>5)6)</sup>。シキミ酸と NGF との相乗作用は、同様の効果が期待される。

### 参考文献

- Greene L.A. and Shooter E.M. (1980), The nerve growth factor : biochemistry, synthesis, and mechanism of action, Annu. Rev. Neurosci 3 : pp. 353-402
- 藤井靖之(2023), 消化管で感じる味と生体調節作用, 化学と生物 61 : pp246-250
- David G. D., Stuart C. F., Eric M. S. and Marc W. K. (1985), Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors The J. of Cell Biology Vol.101: pp. 1799-1807
- 庄野正行(1991), DAPI 染色における高濃度 NaCl の細胞核 DNA 定量への影響, 臨床検査 35 : pp.307-308
- 韓ら(2012), カフェオイルキノ酸は神経細胞保護作用をもつ, 化学と生物 50 : pp77-79
- Taoufiq Benali et al. (2024), Pharmacological insights into the multifaceted biological properties of quinic acid Biotechnol Genet Eng Rev.40(4) :3408-3437