

神経細胞の突起伸長に対する大豆成分の効果

5年A組 栗山穂実

指導教員 櫻井 昭

1. 要約

認知症患者は年々増加していることが知られている。そこで先行研究により効果が示されていた大豆成分を神経細胞に添加し実験した。その結果、大豆成分であるアミノ酸(ロイシン、メチオニン)に突起伸長および細胞生存率を上昇させる効果は見られなかったが、大豆に含まれるダイゼインには、細胞生存率の回復が見受けられた。ダイゼインが神経細胞に作用する可能性を示すことができた。

キーワード 神経細胞 認知症 糖尿病 大豆エキス

2. 背景と目的

認知症は脳の神経細胞が通常より早く減少することで認知機能が低下する病気である。認知症の患者は年々増加していることが知られている。認知症を発症することで、記憶障害が起こり、日常生活が困難になる。以上のことから認知症の改善方法を探したいと思い、老化により減少した神経細胞のうち、残った神経細胞を保護し、突起を伸ばす物質を発見できれば、神経細胞が減少することで起きる記憶障害を遅らすことができるのではないかと考えた。そこで神経細胞に物質を加えると神経細胞に良い効果をもたらしたという先行研究がないか調べたところ、アルツハイマー病態の神経細胞に対して大豆発酵エキスを添加すると、神経突起形成細胞を増加させたという先行研究¹⁾を見つけた。しかしこの先行研究では大豆発酵エキスのどの物質が神経細胞に影響を及ぼしているのかわからなかったため、先行研究で注目されていた大豆発酵エキスや、脳に良いと言われる食材に多く含まれているアミノ酸(ロイシン、メチオニン)の神経細胞への影

響を検討することにした。また先行研究ではPC-12細胞を用いていたが、今回の実験では、認知症の記憶障害にも着目したかったため、記憶に関係する脳部位である海馬の神経細胞株(HT-22)を使用した。実験Ⅰでは神経細胞にアミノ酸(ロイシン、メチオニン)の濃度を変えて添加し、神経突起が伸長しているか調べた。実験Ⅱでは、神経細胞の生存率を低下させ、アミノ酸(ロイシン、メチオニン)をそれぞれ添加し細胞生存率の低下が改善するか測定した。また、添加する物質に、大豆イソフラボン(ダイゼイン)を追加した。神経細胞の生存率を低下させるために、神経細胞を高グルコース環境においた。これを糖尿病病態モデルとした。糖尿病の病態モデルは、糖尿病になると認知症になるリスクが上昇する点からも有用と考えた。

3. 実験方法

海馬の神経細胞(HT-22)

マウスの海馬の神経細胞株

試薬

L-Leucine と L-Methionine を、濃度を変

えて添加した。これらの試薬は東京化成工業から購入した。

Fiji

神経細胞の突起伸長を測るために使用したアプリケーション

3.1 実験 I 【神経突起伸長の測定】

4 ウェルカルチャースライドに 1.0×10^4 cells/ml に調節した HT-22 を 500 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、培養液をすて、各ウェルに各濃度に調整したアミノ酸(ロイシン、メチオニン)を添加した培養液 500 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、光学顕微鏡 10 倍で写真を撮影した。写真は各ウェルで 10 枚撮影した。撮影した写真のうち、細胞の全体を測れるものを選定して神経突起の長さを測定した(図 1)。

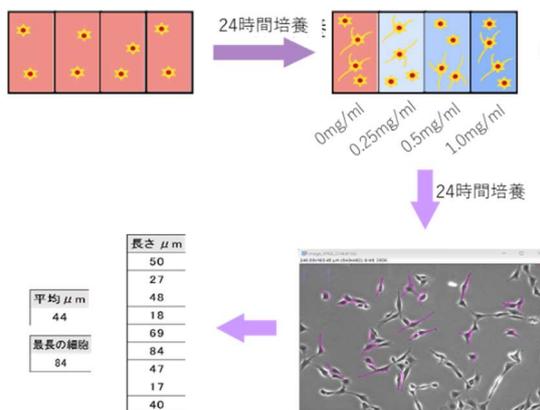


図 1：神経細胞突起伸長の測定方法

3.2 実験 II 【細胞生存率の測定】

XTT アッセイ法を用いた。96well plate に 5.0×10^3 cells/well の濃度で細胞を撒き、24 時間培養した。アミノ酸(ロイシン、メチオニン)、ダイゼインを添加した培地に交換し、24 時間培養した。その後、各 well に 50 μ L ずつ試薬を入れ培養した。この時、

細胞内で添加した試薬がミトコンドリアで代謝される。代謝されると試薬の色が変化し、色が濃いほど細胞が生存している。4 時間後、吸光度により色の濃淡を測定した(図 2)。

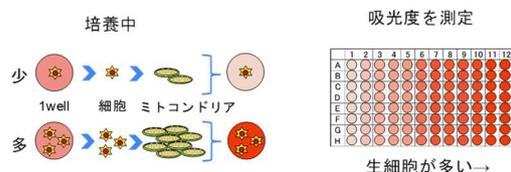


図 2：XTT アッセイ法

4. 結果及び考察

実験 I 【神経突起伸長の測定】

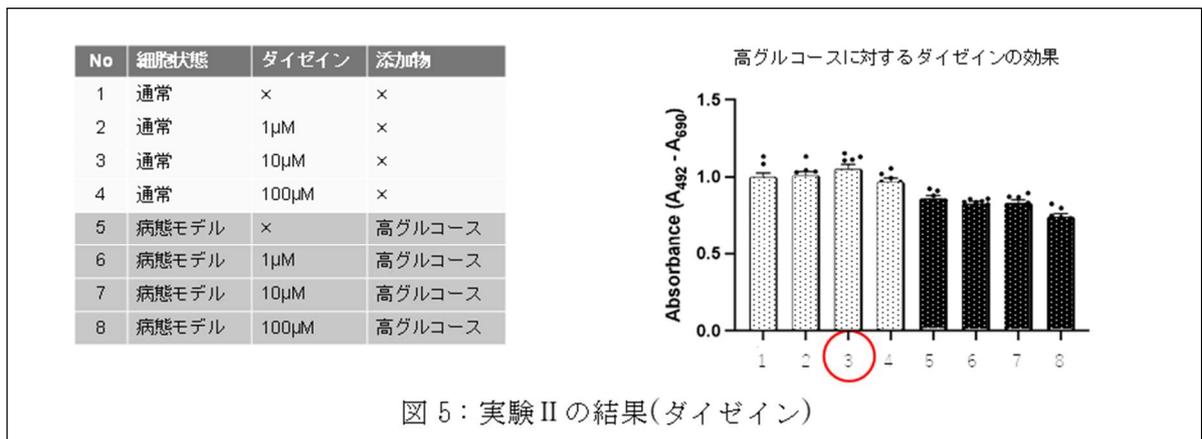
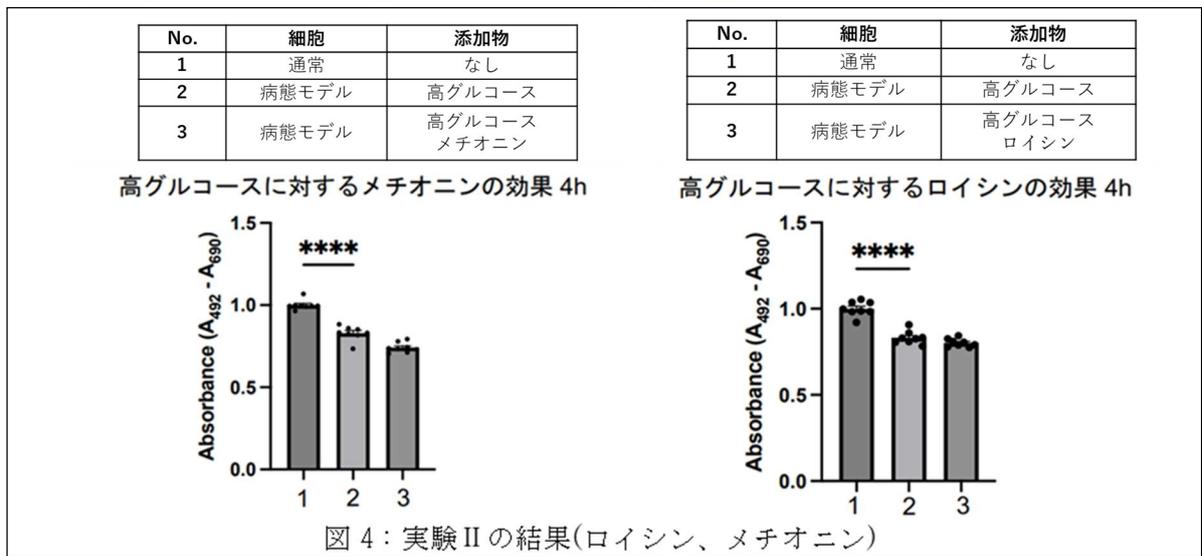
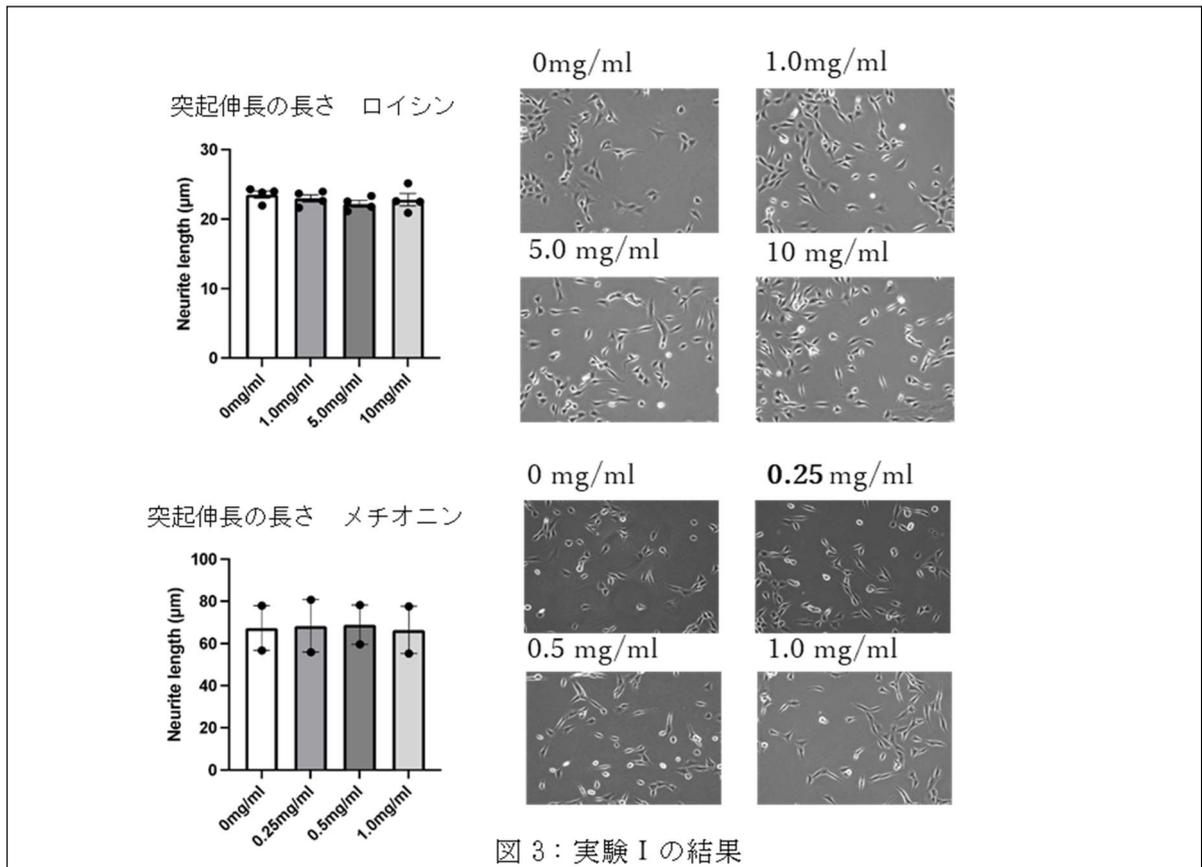
突起伸長の差に有意差はなかった。これはデータがばらついていたこと、培地に一定のアミノ酸が含まれていたため、変化が見にくかったと考えられる(図 3)。

実験 II 【細胞生存率の測定】

糖尿病の病態モデルにアミノ酸(ロイシン、メチオニン)を添加した結果、細胞生存率の低下を改善する効果は無かった(図 4)。また、通常の細胞状態、糖尿病の病態モデルにそれぞれダイゼインを添加した結果、通常の細胞状態にダイゼイン 10 μ M を添加したとき細胞生存率がわずかに改善した(図 5)。このことから、10 μ M のダイゼインは神経細胞の生存率を増加させる可能性がある。

5. 今後の展望

脳に良いと言われている食品に多く含まれている成分(ビタミン E)を HT-22 に添加し、細胞生存率が改善するか調べる。神経突起伸長の測定にウェスタンブロッティング法を用い、ダイゼインが神経突起伸長の抑制を抑えるか実験する。



6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、全般にわたりの確なご指導をいただいた山下教授に深謝いたします。本研究に対して、実験のご指導をいただいた、宇野さん、櫻井先生、阿久津さん、研究室のみなさまに感謝いたします。SEEDS 事務局のみなさまには貴重な機会をいただき感謝いたします。

7. 参考文献

- [1] 富永 隆生ら、「大豆発酵エキスのアルツハイマー病態に対する *in vitro* での評価」、日本健康開発雑誌、2021
- [2] 文部科学省、「日本食品標準成分表 2020 年版(八訂)」、文部科学省、2020
- [3] 公益財団法人日本豆類協会、「健康づくりに果たす豆の役割」、公益財団法人日本豆類協会、2023