

信州大学審査学位論文

ケールの長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の
認知機能に及ぼす影響

信州大学総合工学系研究科
生物・食料科学専攻

2020 年 9 月

久志本 尚子

略語表

AD	Alzheimer's disease
ARE	Antioxidant response element
BHT	3,5-Di- <i>tert</i> -4-butylhydroxytoluene
BSA	Bovine serum albumin
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EP300	E1A-associated protein p300
FBS	Fetal bovine serum
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
HDAC	Histone deacetylase
HSE	Heat shock element
HSF1	Heat shock factor 1
HSP	Heat shock protein
KE	Kale extract
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KJ	Kale juice
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
MDA	Malondialdehyde
mTOR	mammalian Target of rapamycin
NF- κ B	Nuclear factor kappa B

Nrf2	Nuclear factor E2 related factor 2
PBS	Phosphate buffered saline
PDL	Population-doubling level
PVDF	Poly vinyl difluoride
QOL	Quality of life
ROS	Reactive oxygen species
SAM	Senescence-accelerated mouse
SAMP	Senescence-accelerated mouse prone
SAMP8	Senescence-accelerated mouse prone 8
SAMR	Senescence-accelerated mouse resistant
SIRT1	Sirtuin 1
SOD	Super oxide dismutase
TBA	2-thiobarbituric acid
TBS-T	Tris buffered saline with tween 20
TCA	Trichloroacetic acid
TRAP	Telomeric repeat amplification protocol
TUNEL	TdT-mediated digoxigenin (biotin)-dUTP nick end labeling
8-OHdG	8-hydroxy-guanosine

目次

第 1 章 序論.....	1
図表.....	6
第 2 章 ケールの長期摂取が認知機能に及ぼす影響.....	12
第 1 節 目的.....	12
第 2 節 材料および方法.....	13
第 3 節 結果および考察.....	23
第 4 節 要約.....	27
図表.....	28
第 3 章 ケールの長期摂取が海馬遺伝子発現に及ぼす影響.....	36
第 1 節 目的.....	36
第 2 節 材料および方法.....	37
第 3 節 結果および考察.....	41
第 4 節 要約.....	45
図表.....	46
第 4 章 総合考察.....	52
謝辞.....	55
参考文献.....	56

第 1 章 序論

1. 研究の背景

地球規模での高齢化は深刻な社会問題であり、加齢に伴う認知機能低下は人々の QOL (Quality of life) を著しく低下させる。日本でも「平均寿命と健康寿命との差の拡大」などが問題視され、政府は「予防健康」や「認知症対策」に注力している¹⁾。抗老化手段としては、適度な運動やカロリー制限とともに食品機能性成分の摂取が挙げられ²⁻⁴⁾、これまでにクルクミンやカテキンといった特定の食品成分の有効性が報告されている^{5,6)}。しかしながら、「食べて認知機能低下を抑制する」という観点から、天然の食品原料を対象にした研究は比較的少ないのが現状である。近年、機能性表示食品の需要が急速に拡大しており、健康飲料「青汁」においても認知機能改善や睡眠の質改善といった新機能に注目が集まっている。参考として、表 1 に青汁関連の機能性表示食品の概要 (2015~2019 年) を示した。ケール (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) は、栄養素に富み、青汁の原材料としてよく用いられるアブラナ科野菜である。その機能性についても抗酸化作用や抗がん作用などが示されてきたが^{7,8)}、認知機能に及ぼす影響に関する知見はほとんど得られていない。

2. 老化

老化は「時間経過に伴う生理機能の低下」と定義され、特に活性酸素種 (ROS: Reactive oxygen species) による酸化ストレスは生体に深刻な影響を及ぼす⁹⁾。老

化の特徴として、ゲノム不安定性、テロメア短縮、エピジェネティック変化、タンパク質恒常性障害、栄養感知システム障害、ミトコンドリア機能障害、細胞老化、幹細胞の枯渇、および細胞間コミュニケーションの変化などが提唱されている¹⁰⁾。参考として、表2に老化の各特徴（詳細）を示した。脳の老化の特徴としては、酸化損傷分子の蓄積、ニューロンのカルシウム恒常性の障害、適応細胞ストレス応答の障害、神経伝達障害、炎症、およびエネルギー代謝障害が挙げられる¹¹⁾。脳海馬は、認知機能に重要な役割を果たすが老化の影響を受けやすく、老化海馬では海馬容量減少、シナプス可塑性障害、および神経新生障害が生じている¹²⁻¹⁴⁾。シナプス可塑性障害は認知機能を著しく損ない、その主要形態として長期増強 (LTP : Long-term potentiation) および長期抑圧 (LTD : Long-term depression) が知られている^{15,16)}。

3. 生体内防御機構

生体内には外部ストレスなどに対する防御機構が備わっており、例えば抗酸化酵素や分子シャペロンが挙げられる。主要な抗酸化酵素/抗酸化物質として、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD : Super oxide dismutase)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx : Glutathione peroxidase)、およびグルタチオン (GSH : Glutathione) などが知られている。これらの発現は、転写因子 Nrf2 (Nuclear factor E2 related factor 2) により制御されている^{17,18)}。分子シャペロンは、タンパク質の折り畳み補助や異常タンパク質の再折り畳み/分解により、タンパク質恒常性の維持を担っている。主要な分子シャペロンの熱ショックタンパク質 (HSP : Heat

shock protein) は、脳における異常タンパク質の凝集抑制により神経変性疾患の予防に寄与している¹⁹⁻²¹⁾。参考として、図1にHSPによるタンパク質の品質管理を介した抗老化の概念図を示した。メインシャペロンとして熱ショックタンパク質(HSP: Heat shock protein) 70 および HSP90 が、補助シャペロンとして HSP40 が知られている。HSP の発現は、熱ショック因子 1 (HSF1: Heat shock factor 1) により制御されている²²⁾。

4. 抗老化手段

抗老化手段として、適度な運動、カロリー制限、および食品機能性成分の摂取などが提唱されている²⁻⁴⁾。カロリー制限は幅広い生物種で寿命延長効果が確認されており、メカニズムとしてサーチュイン1 (SIRT1: Sirtuin 1) の発現増加が示されている²³⁾。食品機能性成分については、カロテノイドによる抗がん作用や²⁴⁾、レスベラトロール、トコトリエノール、ケルセチン、ケンフェロール、アピゲニン、ウロリチン、スペルミジン、およびナリンゲニンなどによる老化や疾患への有効性が報告されている²⁵⁾。認知機能改善効果については、生理活性ペプチド²⁶⁾、セサミノール²⁷⁾、ジンセノサイド Rg1²⁸⁾、プロアントシアニジン²⁹⁾、クルクミン⁵⁾、カテキン⁶⁾、オレウロペイン³⁰⁾、カルノシン酸³¹⁾、ロズマリン酸³¹⁾、ノビレチン³²⁾、フォルシチアシド³³⁾、レスベラトロール³⁴⁾、DHA³⁵⁾、イカリイン³⁶⁾、およびギンコライド³⁷⁾などの有効性が確認されている。

5. 老化促進マウス SAMP8

老化促進マウス（SAM：Senescence-accelerated mouse）は、認知障害や認知症のモデル動物としてよく用いられている。SAMは老化特徴や寿命を基準とした選択交配により作製された近交系マウスであり、早期老化近交系（SAMP：Senescence-accelerated mouse prone）および正常老化近交系（SAMR：Senescence-accelerated mouse resistant）からなる。SAMP8（Senescence-accelerated mouse prone 8）は、SAMRと比較してより早期の記憶学習障害、免疫応答障害、および概日リズム障害などを示す³⁸⁾。その他、酸化ストレス障害、炎症、インスリン抵抗性、ミトコンドリア機能障害、脳血管障害、アテローム発生、肝機能障害、不安行動障害、聴覚障害、および軽度身体障害などの発生が確認されている³⁹⁾。

6. ケール

アブラナ科野菜は最も消費量が多い野菜であり、抗酸化や抗がん作用^{7,8)}などの機能性報告が行われてきた。ケールは、ビタミン、ミネラル、および食物繊維などに富み、健康飲料の原材料としてもよく用いられている。例えば、他の葉菜類と比してカリウムやカルシウムを豊富に含む⁴⁰⁾。参考として、表3にケールの基本栄養組成を示した⁴¹⁾。主要アミノ酸はグルタミン酸、プロリン、およびアスパラギン酸⁴²⁾、主要ポリフェノールはフェルラ酸、ケンフェロール、カフェ酸、シナピン酸、ケルセチン、および*p*-クマル酸⁴³⁾である。主要カロテノイドはβ-カロテン⁴⁴⁾およびルテイン⁴⁵⁾、主要グルコシノレートはグルコラファニンである。グルコシノレートは、内在性酵素ミロシナーゼや腸内細菌のはたらき

により、スルフォラファンなどのイソチオシアネートに変換される^{46,47)}。参考として、表4にケールのその他栄養組成を示した。ケールの機能性については、抗がん^{48,49)}、抗酸化⁵⁰⁾、抗肥満⁵¹⁾、心血管保護⁵²⁾、および免疫賦活作用⁵³⁾などが報告されているが、認知機能に及ぼす影響はほとんど明らかにされていない。

7. 研究の目的

本研究では、ケールの長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の認知機能に及ぼす影響について調べた。まず第2章では、ケール摂取が空間記憶学習能力および生体内酸化ストレス状態に及ぼす影響を検討した。さらに、分子メカニズムの解明のため、脳および肝臓における抗酸化酵素や HSP の発現解析を実施した後、有効成分同定を試みた。第3章では、学習記憶に重要な脳の部位である海馬に焦点を当て、供試マウスの海馬での遺伝子発現変動を網羅的に解析した。

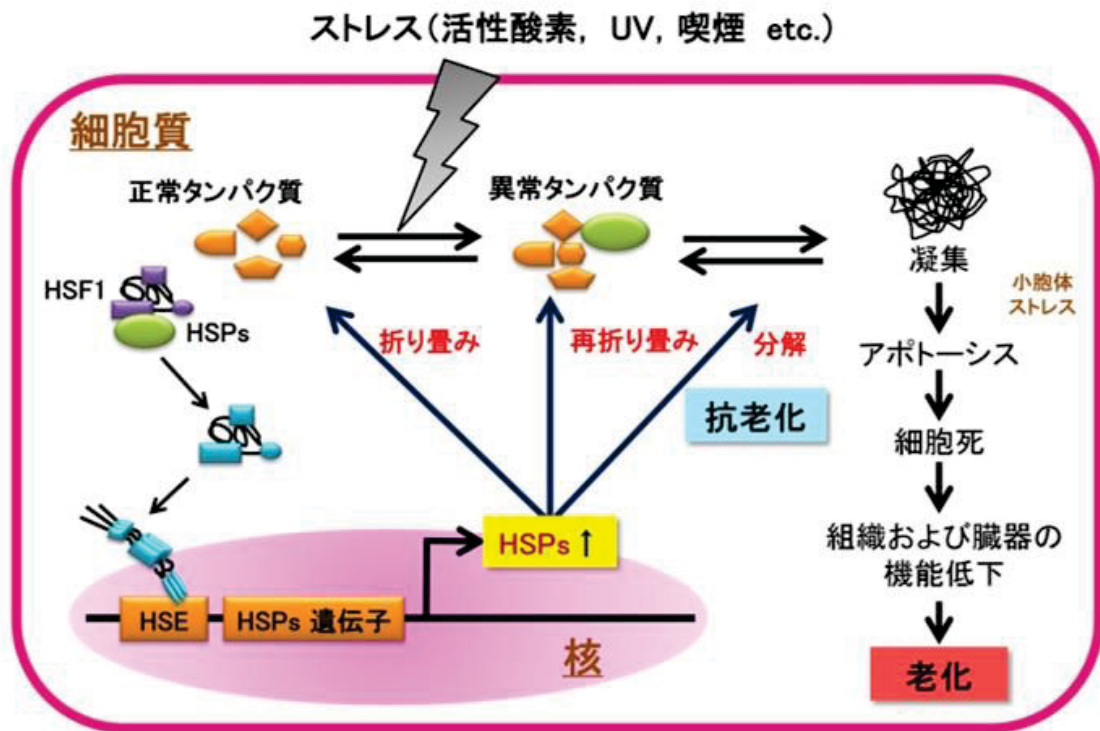


図 1. HSP によるタンパク質の品質管理を介した抗老化の概念図

表 1. 青汁関連の機能性表示食品の概要 (2015~2019 年)

関与成分	機能
GABA	高血圧改善機能、気分を前向きにする機能
難消化性デキストリン	血糖値上昇抑制機能
ルテイン	目の調子を整える機能
イチョウ葉由来フラボノイド配糖体	記憶力サポート機能
ビフィズス菌 BB536	腸内環境改善機能、整腸機能
ヒアルロン酸 Na	肌の水分保持機能、肌の乾燥緩和機能
L-テアニン	睡眠の質改善機能、ストレス緩和機能
ボタンボウフウ由来クロロゲン酸	血糖値上昇抑制機能
ターミナリアベリリカ由来没食子酸	脂肪/糖の吸収抑制機能
キトサン	コレステロール吸収抑制機能
アフリカマンゴノキ由来エラグ酸	体脂肪/中性脂肪の低減機能
葛の花由来イソフラボン	体重/腹部脂肪の低減機能
イソマルトデキストリン	血糖値上昇抑制機能

表 2. 老化の各特徴（詳細）

分類	特徴	概要
主要特徴 （老化における分子損傷の 主要原因）	ゲノム不安定性	DNA 完全性/安定性低下は老化を促進、DNA 修復機構の活性化は抑制する。評価手法：TUNEL 法 (TdT-mediated digoxigenin (biotin)-dUTP nick end labeling method) (DNA 断片化検出)。
	テロメア短縮	テロメアの短縮は老化を促進、テロメラーゼの再活性化は抑制する。評価手法：テロメラーゼ反復配列増幅プロトコル (TRAP: Telomeric repeat amplification protocol)。
	エピジェネティック変化	エピジェネティクス機構の破綻は老化を促進する。エピジェネティクス変化：DNA メチル化、ヒストン蛋白質修飾。ヒストンデアセチルトランスフェラーゼ：SIRT。評価手法：クロマチン免疫沈降 (ChIP: Chromatin immunoprecipitation) など。
	タンパク質恒常性障害	タンパク質恒常性障害は老化を促進する。タンパク質恒常性維持機構：分子シャペロン、オートファジー・リソソーム系、およびユビキチン・プロテアソーム系など。評価手法：HSP 測定、ユビキチン化タンパク質検出、プロテアソーム活性測定、およびオートファジー検出など。

拮抗的特徴 (低レベルでは生物を損傷から保護するが、高レベルでは有害となる特徴)	栄養感知システム障害	栄養感知因子/システムの制御不全は老化を促進する。栄養感知因子/システム: 成長ホルモン、IIS (インスリン/IGF-1 シグナル) 経路など。評価手法: SIRT 検出、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR : mammalian Target of rapamycin) 検出など。
	ミトコンドリア機能障害	ミトコンドリア機能低下は、ATP 産生減少などにより老化を促進する。原因: SIRT1 活性低下など。評価手法: シトクロム c オキシダーゼ活性測定、ミトコンドリア膜電位測定など。
	細胞老化	細胞老化は、不可逆的な細胞周期停止状態であり、老化を促進する。細胞老化の原因: テロメア短縮、DNA 損傷、酸化ストレスなど。評価手法: 細胞増殖検出、酸性 β ガラクトシダーゼ活性測定、核小体の変化検出、DNA 損傷検出。
統合的特徴 (蓄積損傷を補償できない場合に発生する特徴)	幹細胞の枯渇	幹細胞の枯渇は、組織の再生能力低下により老化を促進する。造血能力減少は貧血や骨髄性悪性腫瘍の原因となる。
	細胞間コミュニケーションの変化	神経ホルモンシグナル伝達経路は、炎症促進や免疫低下を介した細胞周辺/細胞外環境変化により減弱される。

表 3. ケールの基本栄養組成

Component	Mean \pm SD (fresh weight)
Dry matter	17.08 \pm 0.30 (%)
Total protein	4.16 \pm 0.22 (g/100 g)
Fat	0.67 \pm 0.01 (g/100 g)
Ash	2.11 \pm 0.12 (g/100 g)
Total carbohydrates	10.14 \pm 0.23 (g/100 g)
Dietary fiber	8.39 \pm 1.09 (g/100 g)
Vitamin C	62.27 \pm 13.72 (mg/100 g)
Na	38.50 \pm 1.02 (mg/100 g)
K	440.20 \pm 11.02 (mg/100 g)
Ca	384.80 \pm 2.03 (mg/100 g)
Mg	34.90 \pm 1.86 (mg/100 g)
Zn	0.83 \pm 0.18 (mg/100 g)
Cu	0.05 \pm 0.02 (mg/100 g)
Mn	0.86 \pm 0.06 (mg/100 g)
Nitrites, NaNO ₂	0.34 \pm 0.08 (mg/100 g)
Nitrates, NaNO ₃	120.60 \pm 1.23 (mg/100 g)

表 4. ケールのその他栄養組成

Component	Mean or Mean \pm SD (fresh weight*)
Total amino acids	3621 (mg/100 g)
Glutamic acid	450 \pm 34 (mg/100 g)
Proline	434 \pm 17 (mg/100 g)
Aspartic acid	349 \pm 17 (mg/100 g)
Leucine	299 \pm 10 (mg/100 g)
Arginine	229 \pm 10 (mg/100 g)
Total polyphenol	2236 \pm 25 (mg/100 g)
Ferulic acid	1464 \pm 22 (mg/100 g)
Kaempferol	363 \pm 10 (mg/100 g)
Caffeic acid	253 \pm 5 (mg/100 g)
Sinapic acid	107 \pm 2 (mg/100 g)
Quercetin	87 \pm 1 (mg/100 g)
<i>p</i> -coumaric acid	69 \pm 5 (mg/100 g)
Total carotenoid	23.10~26.00 (mg/100 g)
β -carotene	3.80~4.53 (mg/100 g)
Lutein	4.80~11.50 (mg/100 g)
Total glucosinolate	11~53 (μ mol/g dry weight)
Glucoraphanin	94.50~159.70 (mg/100 g)

*except for glucosinolate

第 2 章 ケールの長期摂取が認知機能に及ぼす影響

第 1 節 目的

本章では、ケールの長期摂取が認知機能に及ぼす影響を検討した。まず、SAMP8 にケール搾汁 (KJ : Kale juice) 粉末を長期摂取させた後、空間記憶学習能力をモリス水迷路試験により評価した。また、生体内酸化ストレス状態を各種酸化ストレスマーカーおよび抗酸化物質の濃度測定により評価した。続いて、メカニズム解明のため、脳および肝臓における抗酸化酵素や HSP の発現解析を実施した。さらに、KJ 粉末の HPLC 分画物をヒト正常二倍体線維芽細胞 (TIG-1) 細胞に処理した際の HSP70 誘導作用を指標として、有効成分同定を試みた。

第 2 節 材料および方法

1. 材料

KJ 粉末（デキストリン 2.5 倍散）は、ヤクルトヘルスフーズ株式会社より入手し、ケールを洗浄後、細かく砕きながら搾汁して得られた搾汁液を噴霧乾燥して調製されたものを使用した。MF 飼料（通常食）は、オリエンタル酵母工業より購入した。

2. 試薬類

遠心式濃縮フィルター（Centrifuge Filters Amicon Ultra-0.5 mL 10K Ultracel®-10K Membrane）は Merck Milipore より、8-hydroxy-guanosine（8-OHdG）測定キットは日本老化抑制研究所より購入した。Malondialdehyde（MDA）は富士フィルム和光純薬より、Trichloroacetic acid（TCA）、2-thiobarbituric acid（TBA）および 3,5-Di-tert-4-butylhydroxytoluene（BHT）は Sigma-Aldrich Japan より購入した。RNeasy Mini Kit は QIAGEN より、HSP40、HSP70 および β -actin のプライマーは医学生物学研究所より、High Capacity RNA-to-cDNA Kit および Fast SYBR Green Master Mix は Applied Biosystems より購入した。RIPA Lysis Buffer および Pierce Western Blotting Substrate は Thermo より、Dc Protein Assay Kit は Bio-Rad より、Poly vinyl difluoride（PVDF）膜（Clear Blot Membrane-P）は ATTO より購入した。抗 HSP70 抗体（HSP70/HSP72、pAB）は Enzo Life Science より、HSF1 抗体は Santa Cruz Biotechnology より、抗 β -actin 抗体（Anti-Beta-Actin（CT））は ANA SPEC より、

二次抗体（anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated anti-body）は Santa Cruz Biotechnology より購入した。Tri reagent は Molecular Research Center より、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover は TOYOBO より、KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit は KAPA BIO SYSTEMS より購入した。

3. 実験動物

11 週齢の雄性 SAMP8 マウスを日本エスエルシーより購入し、5 週間の予備飼育後、実験に供した。飼料および水は自由に与え、温度 20~23 °C、相対湿度 40~70%、および 12 時間明暗サイクル（明期：8:00-20:00）の条件下で飼育した。本動物実験は、信州大学動物実験委員会の承認を得て信州大学動物実験実施規程を遵守して行った。

4. マウス実験

MF 飼料をミキサーで粉砕した後、KJ 粉末を 0.8% (w/w) になるよう混合し、蒸留水を添加しながら成形し、定温恒温器 (IN-602、ヤマト科学) を用いて 45 °C で一晩乾燥したものを KJ 粉末含有飼料とした。16 週齢の雄性 SAMP8 マウスをコントロール群（プラセボ群）（n = 8）および KJ 群（n = 8）の 2 群に分け、コントロール群には MF 飼料を、KJ 群には 0.8% (w/w) KJ 粉末含有 MF 飼料を摂取させた。1 週間ごとの摂餌量および体重測定の結果、群間での有意差はみられなかった（データは示さず）。摂取開始から 16 週目に、モリス水迷路試験により空間記憶学習能力を測定した。認知機能評価の 1~2 日後に CO₂ 麻酔下で脳、肝

臓、および血清を採取した。

5. 空間記憶学習能力の測定

モリス水迷路試験は、円形プール内の逃避台への到達時間を指標とした空間記憶学習能力の評価手法である。直径 120 cm、深さ 50 cm の円形プールに水を張り、水温を 25 ± 1 °C に調節し、水面下 1 cm に直径 11 cm、高さ 10 cm の逃避台を設置した。トライアル試験として、1 日 3 回の試行を連続 4 日間行い、マウスを円形プールに入れて 60 秒間行動を観察し、逃避台に到達しなかった場合は逃避台に誘導して 10 秒間位置を記憶させた。5 日目にプローブ試験として、逃避台を除去したプールにマウスを入れ 120 秒間行動を観察し、逃避台があった場所への初回到達時間を測定した。

6. 生体内酸化ストレス状態の評価

6-1. 血中 DNA 損傷マーカー濃度の測定

マウス 2 匹分の血清各 200 μ L を 1 つのチューブに分注した後、遠心式濃縮フィルター (Centrifuge Filters Amicon Ultra-0.5 mL 10K Ultracel®-10K Membrane) に入れて遠心分離 (14,000 \times g、15 分間、室温) して、1,000 kDa 以上のタンパク質画分を濃縮し、得られた上清を 8-OHdG 測定に供した。サンプル液またはスタンダード液を 96 well プレートに 50 μ L/well 分注し、一次抗体溶液を 50 μ L/well 分注した後、4 °C で一晩一次抗体反応させた。続いて、洗浄液 250 μ L/well で 3 回洗浄し、二次抗体を添加した後、室温で 1 時間二次抗体反応させた。洗浄液 250

$\mu\text{L}/\text{well}$ で3回洗浄し、発色剤溶液 $100\ \mu\text{L}/\text{well}$ を添加した後、室温/遮光で15分間発色反応させた。最後に、反応停止液 $100\ \mu\text{L}/\text{well}$ を添加し、 $450\ \text{nm}$ 吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 680、Bio-Rad) により測定した。

6-2. 脳内過酸化脂質マーカー濃度の測定

脳 $100\ \text{mg}$ に Phosphate buffered saline (PBS) $1.2\ \text{mL}$ を添加し、氷上でマッシャーおよび超音波ホモジネーター (SLPe40、BRANSON) により破砕抽出した。脳ホモジネート $800\ \mu\text{L}$ に $500\ \text{mM}$ BHT を $8\ \mu\text{L}$ 添加し、測定で使用するまで $-80\ ^\circ\text{C}$ で保存した。測定前に、脳ホモジネート $500\ \mu\text{L}$ に 30% TCA $300\ \mu\text{L}$ 、 $5\ \text{N}$ HCl $150\ \mu\text{L}$ 、および 0.3% (w/v) TBA $300\ \mu\text{L}$ を添加し、 $90\ ^\circ\text{C}$ で15分間加熱した後、遠心分離 ($12,000\times g$ 、10分間、室温) した。得られた上清 $200\ \mu\text{L}$ の $532\ \text{nm}$ 吸光度を分光光度計 (UV-1700、SHIMADZU) により測定した。

6-3. 脳内抗酸化物質濃度の測定

6-2. で作製した脳ホモジネートに 10% スルホサリチル酸溶液を添加してタンパク質を沈殿させた後、遠心分離 ($11,000\times g$ 、10分間、 $4\ ^\circ\text{C}$) した。得られた上清 $25\ \mu\text{L}$ に $4\ \text{mM}$ EDTA、 $0.2\ \text{mM}$ NADPH、 $0.5\ \text{mM}$ DTNB、および $100\ \text{U}/\text{mL}$ GSH 還元酵素含有 $100\ \text{mM}$ PBS $125\ \mu\text{L}$ を添加し、 $25\ ^\circ\text{C}$ で5分間インキュベートした後、 $412\ \text{nm}$ 吸光度を分光光度計 (UV-1700、SHIMADZU) により測定した。

7. 抗酸化酵素および HSP 遺伝子の発現解析

肝臓および脳の total RNA は、RNeasy Mini Kit を用いて調製した。RNA 濃度は 260nm 吸光度が 1.00 のとき 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるものとして計算した。cDNA 合成には、260nm/280nm 吸光度比が 1.8~2.1 を示し、かつ変性アガロースゲル電気泳動で 28S および 18S rRNA が確認できたものを使用した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて total RNA 2 μg からテンプレート cDNA 合成し、定量的リアルタイム PCR に供した。PCR には Fast SYBR Green Master Mix および StepOne Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用い、プレインキュベート (95 °C、3 分間)、熱変性 (95 °C、3 秒間)、アニーリング (60 °C、20 秒間)、伸長 (72 °C、1 分間) の条件で 40 サイクル増幅させた。ハウスキーピング遺伝子として β -actin mRNA を用いて、Cu/Zn SOD、Mn SOD、HSP70、HSP40、HSP90 α および HSP90 β の mRNA 発現量を比較 Ct 法 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法) により解析した。各プライマー配列を以下に示した。

β -actin : 5'-TATGCCTTCAACATGAAGAGCGCC-3' (forward) および
5'-CTTGTCACGACCTTCTTCTTGTC-3' (reverse)、

Cu/Zn SOD : 5'-TCAACGCCACCGAGGAGAAGTA-3' (forward) および
5'-CAATGTGGCCGTGAGTGAGGT-3' (reverse)、

Mn SOD : 5'-CTCCAGTCACCCATGACCTT-3' (forward) および
5'-TGCTCTTTCCATCAGGGTTC-3' (reverse)、

HSP70 : 5'-GCGGCAAAGACAAGAAAAG-3' (forward) および
5'-GAAGTGGTCCTCCCAGTCAT-3' (reverse)、

HSP40 : 5'-AAAGGCAGAGGCTGACAAGA-3' (forward) および

5'-AGGGGAGGCATTTCTTCAGT-3' (reverse)、

HSP90 α : 5'-GGACCTCATTTTAATCCTC-3' (forward) および

5'-CGATCTTCAATGGACACAT-3' (reverse)、

HSP90 β : 5'-CACTATTGGCAACGAGCGGTTC-3' (forward) および

5'-ACTTGCGGTGCACGATGGAG-3' (reverse)

8. 脳内 HSP70 および HSF1 タンパク質の定量

脳または肝臓 100 mg に RIPA Lysis Buffer 300 μ L を添加し、氷上でマッシャーおよびソニケーターで破碎した後、遠心分離 (14,000 \times g、10 分間、4 $^{\circ}$ C) して上清を-20 $^{\circ}$ C で保存した。DC Protein assay kit で得られた上清のタンパク質濃度を定量した後、RIPA Lysis Buffer でタンパク質濃度を 5 mg/mL に調整してサンプル溶液とした。サンプル溶液 5 μ L を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、セミドライ式ブロッキング装置 (ATTO、AE-6677) により PVDF 膜に転写した後、1% Bovine serum albumin (BSA) -Tris buffered saline with tween 20 (TBS-T) 溶液中でブロッキング (1 時間、室温) した。抗 HSP70 抗体の 1,000 倍希釈 TBS-T 溶液、抗 HSF1 抗体の 1,000 倍希釈溶液、または抗 β -actin 抗体の 750 倍希釈溶液中で一次抗体反応 (90 分間、室温) した。続いて、二次抗体 (anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated anti-body) の 2,500 倍希釈液中で二次抗体反応 (1 時間、室温) した。発光基質溶液 Pierce Western Blotting Substrate により発光反応 (1 分間、室温) した後、化学発光撮影装置 (Ez Capture MG AE-9300H-CS、ATTO)

を用いて PVDF 膜を撮影し、解析ソフトウェア (Image saver 5、ATTO) でタンパク質量を解析した。

9. KJ 抽出物の調製

KJ 粉末 7 g にメタノール 14 mL を添加し、氷上でポリトロンホモジナイザー (PT6000、KINEMATICA) および超音波ホモジナイザー (SLPe40、BRANSON) で破碎抽出した後、遠心分離 ($4,000 \times g$ 、 4°C 、10 分間) した。得られた上清を遠心分離 ($15,000 \times g$ 、 4°C 、15 分間) し、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過した後、エバポレートおよび凍結乾燥したものを KJ 抽出物とした。

10. HPLC による KJ 抽出物の分画

KJ 抽出物溶液を InertSep C18 cartridge column (2 g/12 mL) (GL Science) にアプライし、10%メタノール 6 mL で洗浄した後、60%メタノール 4 mL で溶出し、HPLC 分析および分取に供した。分析は、Inertsil ODS-3 カラム ($5 \mu\text{m}$ 、 $4.6 \times 250 \text{ mm}$) (ジールサイエンス) を用いて、インジェクション量 $20 \mu\text{L}$ 、流速 1.0 mL/min で溶離した。分取は、Inertsil ODS-3 カラム ($5 \mu\text{m}$ 、 $10 \times 250 \text{ mm}$) (ジールサイエンス) を用いて、インジェクション量 $500 \mu\text{L}$ 、流速 5.0 mL/min で溶離した。ガードカラムは Inertsil ODS-3 PREP Guardd Cartidge (ジールサイエンス)、カラムオーブンは CTO-10A VP (SHIMADZU)、ポンプは PU-2089 Plus (日本分光)、UV 検出器は UV-2075 Plus (日本分光) を使用した。移動相は、溶離液 A (水-0.2% 酢酸) および溶離液 B (アセトニトリル) を用いて、カラム温度 40°C 、

280 nm で UV 検出した。移動相のグラジエント条件は以下に示した。

0–4.5% B (0–18 分)、4.5–12% B (18–30 分)、12–20% B (30–50 分)、20–85% B (50–65 分)、85–100% B (65–75 分)、100% B (75–80 分)、100–0% B (80–85 分)、0% B (85–95 分)。

分取画分 (F1~F5、F4-1~F4-8) の HPLC クロマトグラムを図 6 に示した。分画溶液は 40 °C でエバポレートした後、凍結乾燥して-20 °C で保管した。

11. TIG-1 細胞の培養

TIG-1 細胞は JCRB 細胞バンクより購入し、10%ウシ胎児血清 (FBS:Fetal bovine serum)、100 µg/mL ストレプトマイシン、および 100 units/mL ペニシリン含有 MEM- α 培地中で CO₂ インキュベーター (SCA-80DR、ASTEC) を用いて培養 (37 °C、5% CO₂) した。集団倍加数 (PDL : Population-doubling level) = 27~39 の細胞懸濁液 1.5 mL (7.5×10⁴ cells/mL) を 6 cm² シャーレに播種し、2 日間の培養により 70~90%コンフルエントにした後、実験に供した。

12. KJ 抽出物および HPLC 分画物処理による HSP70 遺伝子発現変動解析

TIG-1 細胞を KJ 抽出物、分画物 F1~F5、または分画物 F4-1~F4-8 含有培地 [終濃度 80 µg/mL、0.1% Dimethyl sulfoxide (DMSO)] 中で 24 時間培養した。コントロール群は 0.1% DMSO 含有培地中で 24 時間培養した。培養後、培地を除去し、PBS で 2 回洗浄した後、1.4 mL の Tri Reagent を添加してピペッティングにより細胞を回収した後、total RNA を調製した。RNA の濃度および純度検定

を行った後、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて total RNA 2 µg からテンプレート cDNA 合成し、定量的リアルタイム PCR に供した。PCR には KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit および Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (Takara) を用い、プレインキュベート (95 °C、3 分間)、熱変性 (95 °C、3 秒間)、アニーリング (60 °C、20 秒間)、伸長 (72 °C、1 分間) の条件で 40 サイクル増幅させた。ハウスキーピング遺伝子として β -actin mRNA を用いて、HSP70 の mRNA 発現量を比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) により解析した。各プライマー配列は以下に示した。

β -actin : 5'-CAGTGTGGGTGACCCCGT-3' (forward) および

5'-CCCAGCCATGTACGTTGCTA-3' (reverse)

HSP70 : 5'-TCACCATCACCAACGACAAG-3' (forward) および

5'-AGCCCCTCATCCTCCACG-3' (reverse)

13. HSP70 誘導作用の有効成分同定

ESI-MS および NMR 分析は住化分析センターに委託した。ESI-MS スペクトルは、LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) により取得した。各サンプルはメタノールに溶解した。800 MHz (^1H) および 200 MHz (^{13}C) における NMR スペクトル (^1H 、 ^{13}C 、DQFCOSY、HSQC、および HMBC) は、FT-NMR 装置 AVANCE II 800US2 型 (Bruker Biospin) により記録した。 ^1H -NMR 化学シフト値は 0 ppm における基準物質テトラメチルシラン、 ^{13}C -NMR 化学シフト値は 39.5 ppm における DMSO-d₆ を基準に算出した。各サンプルは DMSO-d₆ に溶解した。

14. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表した。有意差検定は、スチューデントの t 検定により実施した ($p < 0.05$)。

第 3 節 結果および考察

1. KJ 摂取が認知機能および生体内酸化ストレス状態に及ぼす影響

KJ 含有飼料を 16 週間摂取させた後、SAMP8 の空間学習記憶能力をモリス水迷路試験により評価した。その結果、プローブ試験における逃避台への到達時間は、KJ 群でコントロール群と比較して有意に短縮した (図 2A)。遊泳速度は各群間で有意差はみられなかった (図 2B)。生体内酸化ストレスマーカーである血中 8-OHdG および脳内 MDA 濃度は、KJ 群で有意に低値を示した (図 3A、図 3B)。脳内 GSH 濃度は、KJ 群で有意に高値を示した (図 3C)。GSH はグルタミン酸、システイン、およびグリシンからなるトリペプチドであり⁵⁴⁾、過酸化脂質の消去を担う GPx の補因子としても機能している。また、GSH は核内因子 κ B (NF- κ B : Nuclear factor kappa B) などの転写因子の制御により、抗アポトーシスに寄与している⁵⁵⁾。よって、KJ 摂取が認知機能および生体内酸化ストレス状態を有意に改善することが明らかとなった。

2. KJ 摂取が抗酸化酵素および HSP 発現に及ぼす影響

肝臓における抗酸化酵素や HSP 遺伝子の発現解析の結果、KJ 摂取による Cu/Zn SOD、HSP70、HSP40、HSP90 α および HSP90 β の有意な発現増加が認められた (図 4A)。脳においても、HSP70 遺伝子 (図 4B)、HSP70 および HSF1 タンパク質 (図 5) の有意な発現増加がみられた。ケールの HSP 誘導作用に関する報告は、筆者の知る限り本研究が初めてである。食品素材の HSP 誘導作用は、

ブルーベリー⁵⁶⁾、ココア⁵⁷⁾、およびアスパラガス抽出物⁵⁸⁾に関する報告があるが、その例は多くない。

分子シャペロンは神経変性疾患の有望な治療標的であり^{59, 60)}、HSP70 誘導によるアルツハイマー病 (AD : Alzheimer's disease) 予防への有効性などが示されている⁶¹⁾。また、HSP70 誘導は NF- κ B 阻害を介した神経炎症抑制や⁶²⁾抗アポトーシス⁶³⁾に関与している。HSP 誘導のメカニズムについて、HSF1 は非ストレス下で HSP との結合により不活性化されている。他方、ストレス下では、HSF1 は HSP からの乖離、三量体化、リン酸化、および核内移行を経て、プロモーター領域である熱ショックエレメント (HSE : Heat shock element) に結合して HSP を発現誘導する²²⁾。HSF1 の Ser230 残基のリン酸化は HSF1 活性化に重要であるが⁶⁴⁾、HSF1 の Lys298 残基のスモイル化や⁶⁵⁾、Lys80 残基のアセチル化は HSF1 の活性化を阻害する。一方、SIRT1 による Lys80 残基の脱アセチル化や⁶⁶⁾、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ EP300 (E1A-associated protein p300) による Lys208/Lys298 残基のアセチル化⁶⁷⁾は、HSF1 活性の安定化に寄与する。よって、ケール摂取がこれらの機構に作用することで、HSF1 の活性化や活性の安定化に寄与していることが予想される。

SOD や GSH の発現は Nrf2 により制御されている。非ストレス下で Nrf2 はストレスセンサー分子 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) により不活性化されている。他方、ストレス下で Nrf2 は Keap1 からの乖離、リン酸化、および核内移行を経て、プロモーター領域である抗酸化応答配列 (ARE : Antioxidant response element) に結合して抗酸化酵素を発現誘導する⁶⁸⁾。ケール由来成分に

よる Nrf2 活性化作用について、イソチオシアネート⁶⁹⁾、フェルラ酸⁷⁰⁾、および β -カロテン⁷¹⁾の有効性が示されている。なお、イソチオシアネートなどの求電子剤は、Keap1 のシステイン残基の修飾により Nrf2 を活性化する⁷²⁾。したがって、ケール中のポリフェノール、カロテノイド、およびグルコラファニンなどが Nrf2 活性化に関与していることが推察される。

3. KJ 摂取による HSP70 誘導作用の有効成分同定

KJ 抽出物およびその HPLC 分画物(F1~F5)を TIG-1 細胞に処理したところ、KJ 抽出物および F4 の処理群において、HSP70 遺伝子の有意な発現増加がみられた(図 7A)。さらに、F4 の分画物(F4-1~F4-8)を用いて同様の検討を実施したところ、F4-6 および F4-7 の処理群において、HSP70 遺伝子の有意な発現増加がみられた(図 7B)。F4-6 および F4-7 を ESI-MS および NMR 分析に供した結果、F4-7 中の有効成分候補として 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose が同定された。図 8 に化学構造式を示した。ESI-MS (負イオンモード) は、 m/z 723.2143[M-H]⁻($C_{33}H_{39}O_{18}$ についての計算値、723.2142)を示した。有効成分の構造は、 $1D$ - 1H -、 $1D$ - ^{13}C -、 $2D$ -DQF-COSY-、および $2D$ -HSQC スペクトルで決定した。分析結果を以下に示した。

1H -NMR(800 MHz, deuterated DMSO) ; 7.55(1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-7'), 7.53(1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-7), 7.27(1H, s, H-2'), 7.06(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-6'), 6.99(2H, s, H-2, 6), 6.76(1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.44(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8), 6.44(1H, d, $J = 15.8$ Hz, H-8'), 5.78(1H, d, $J = 8.4$ Hz, glc-1), 4.91(1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, glc-2), 4.20(1H, d, $J = 7.8$ Hz, glc-1'), 4.04(1H, d, $J = 10.2$ Hz, glc-6a), 3.79(3H, s, -OCH₃), 3.77(6H, s, -OCH₃),

3.65-3.59(4H, m, glc-3,5, 6b), 3.45(1H, m, glc-4), 3.13(1H, dd, J = 8.6, 8.6 Hz, glc-3'),
3.06(3H, m, glc-4,4',5'), 2.98(1H, dd, J = 8.4, 8.3 Hz, glc-2')

¹³C-NMR(200 MHz, deuterated DMSO) ; 165.7(C-9), 165.0(C-9'), 149.3(C-4'),
148.1(C-3,5), 148.1(C-3'), 147.4(C-7) , 145.5(C-7'), 138.8(C-4), 125.5(C-11), 123.9(C-
1), 123.4(C-6'), 115.4(C-5'), 114.0(C-8'), 113.5(C-8), 106.6(C-2'), 103.1(glc-1'),
91.9(glc-1), 76.9(glc-5'), 76.7(glc-5), 76.4(glc-3'), 73.4(glc-3), 72.5(glc-2'), 70.0(glc-4'),
69.5(glc-4), 67.8(glc-6), 61.0(glc-6'), 56.1(OCH₃), 55.6(OCH₃)

1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose はアブラナ科で既知のポリフェノールであるが、
HSP 誘導に関する報告は、筆者が知る限り本研究が初めてである。1-sinapoyl-2-
feruloylgentiobiose 以外では、ポリフェノールやグルコシノレートの関与が予想
され、フェルラ酸⁷³⁾、ケンフェロール⁷⁴⁾、およびスルフォラファン⁷⁵⁾による
HSP70 誘導作用が示されている。ケルセチンは HSP 誘導阻害作用が報告されて
いる⁷⁶⁾。ケールは 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose の類縁体である disinapoyl-
gentiobioside、diferuloyl-gentiobioside、および disinapoyl,feruloyl-gentiobioside を含
有しており⁷⁷⁾、これらの関与も推察される。なお、食品成分による HSP 誘導作
用については、クルクミン、 α -フムレン、ウルソール酸、およびリコピンの効
果が確認されている⁷⁵⁾。

第 4 節 要約

本章では、ケールの摂取が SAMP8 の認知機能に及ぼす影響について調べた。SAMP8 に 0.8% (w/w) KJ 含有 MF 飼料を 16 週間摂取させたところ、モリス水迷路試験における逃避箱への到達時間は、KJ 摂取によりコントロール群と比べて有意に短縮した。また、KJ 群における各種酸化ストレスマーカーの減少および抗酸化物質の増加が確認された。分子メカニズムとしては、脳内 HSP70 誘導作用が示唆され、有効成分候補として 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose を同定した。参考として、図 9 にケールの長期摂取による HSP 誘導を介した抗老化作用の概念図を示した。

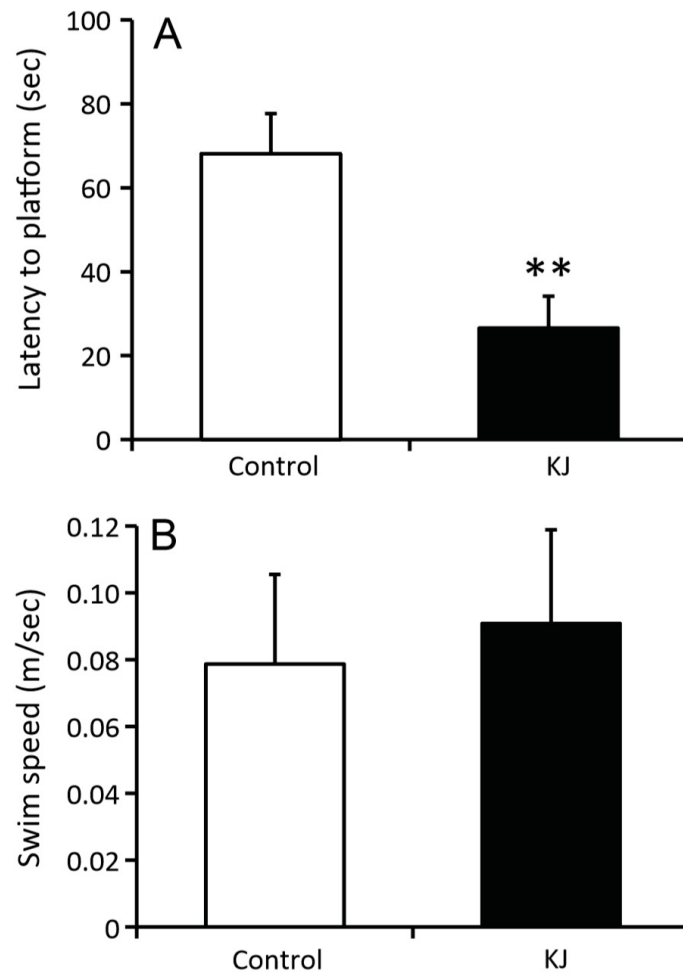


図 2. KJ 摂取が空間記憶学習能力に及ぼす影響

A : モリス水迷路試験における逃避台への到達時間 ; B : 遊泳速度。□ : コントロール群 (プラセボ群) ; ■ : KJ 群。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.01$ を**で表記した。

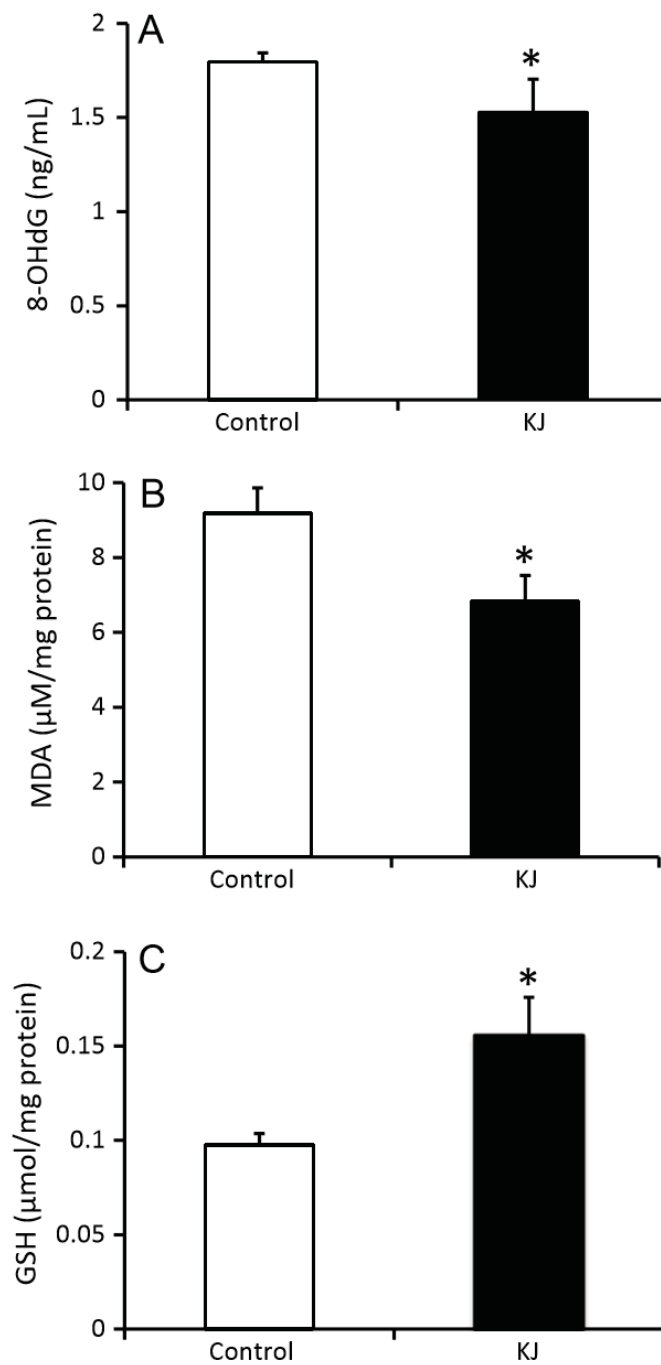


図 3. KJ 摂取が生体内酸化ストレス状態に及ぼす影響

A : 血中 8-OHdG 濃度 ; B : 脳内 MDA 濃度 ; C : 脳内 GSH 濃度。□ : コントロール群 (プラセボ群) ; ■ : KJ 群。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.05$ を*で表記した。

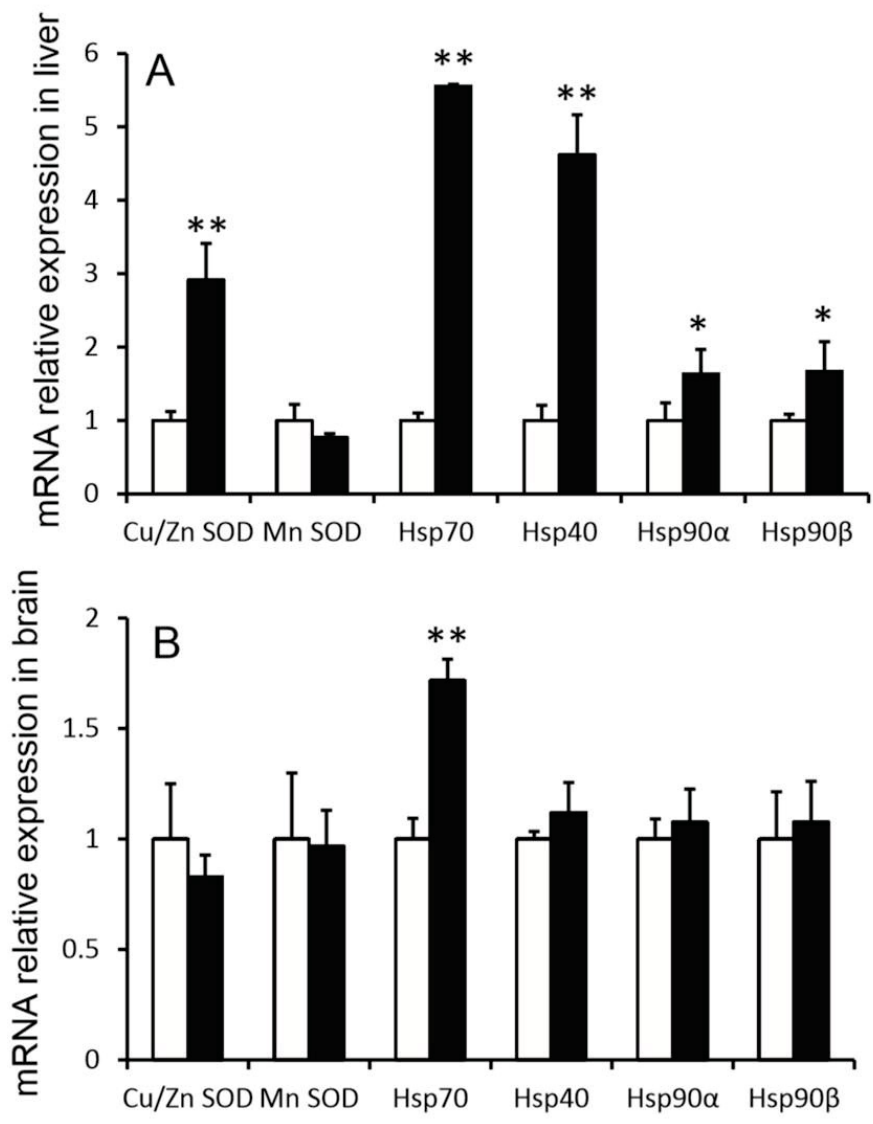


図 4. KJ 摂取が抗酸化酵素および HSP の遺伝子発現に及ぼす影響

A : 肝臓 ; B : 脳。□ : コントロール群 (プラセボ群) ; ■ : KJ 群。データは平均値 ± 標準偏差で表した。p < 0.05 を*、p < 0.01 を**で表記した。

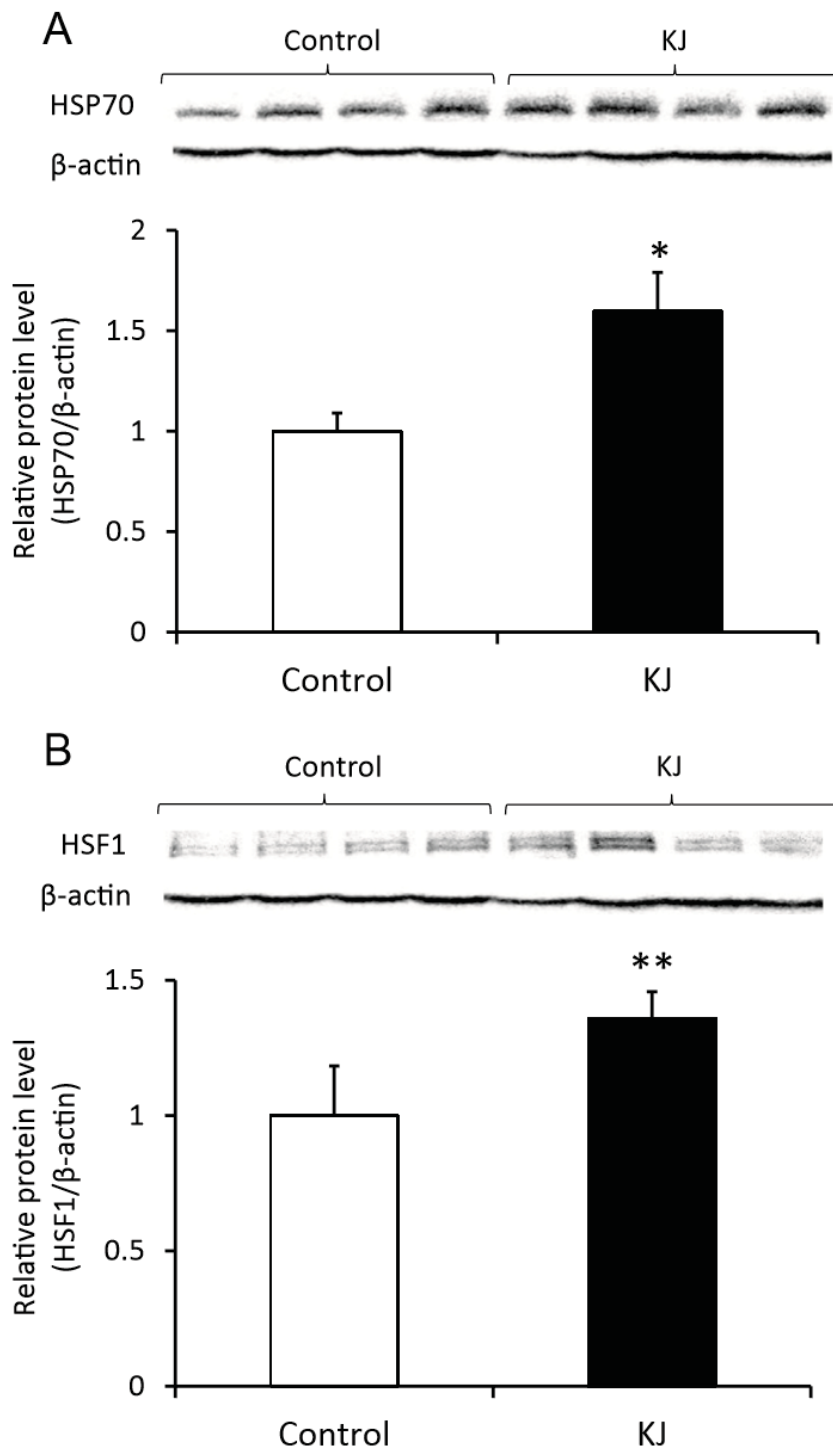


図 5. KJ 摂取が脳内 HSP70 および HSF1 のタンパク質発現に及ぼす影響

A : HSP70 ; B : HSF1。□ : コントロール群 (プラセボ群) ; ■ : KJ 群。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**で表記した。

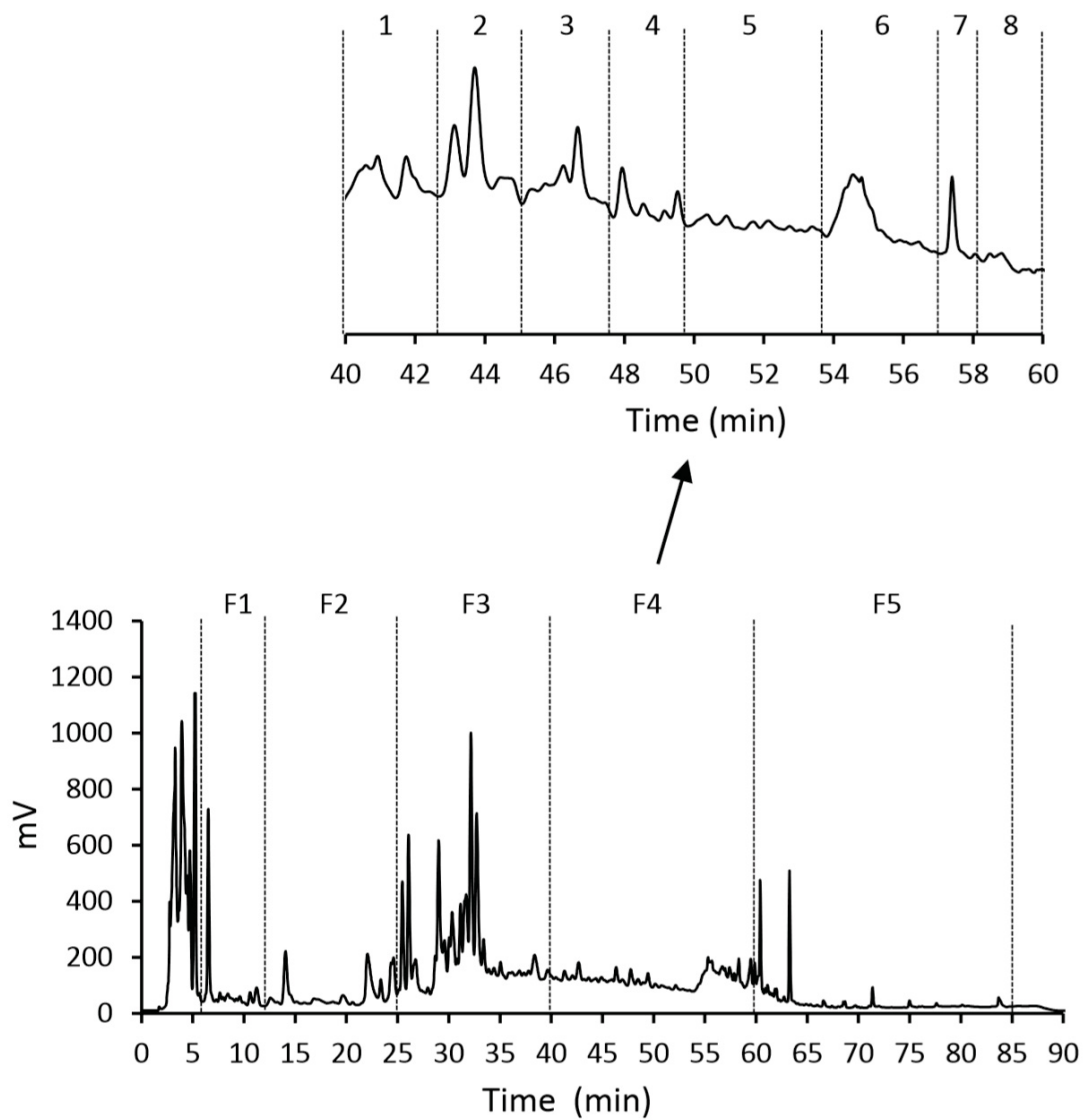


図 6. KJ 分画物の HPLC クロマトグラム

F1~F5 : KJ 分画物 F1~F5 ; 1~8 : KJ 分画物 F4-1~F4-8。

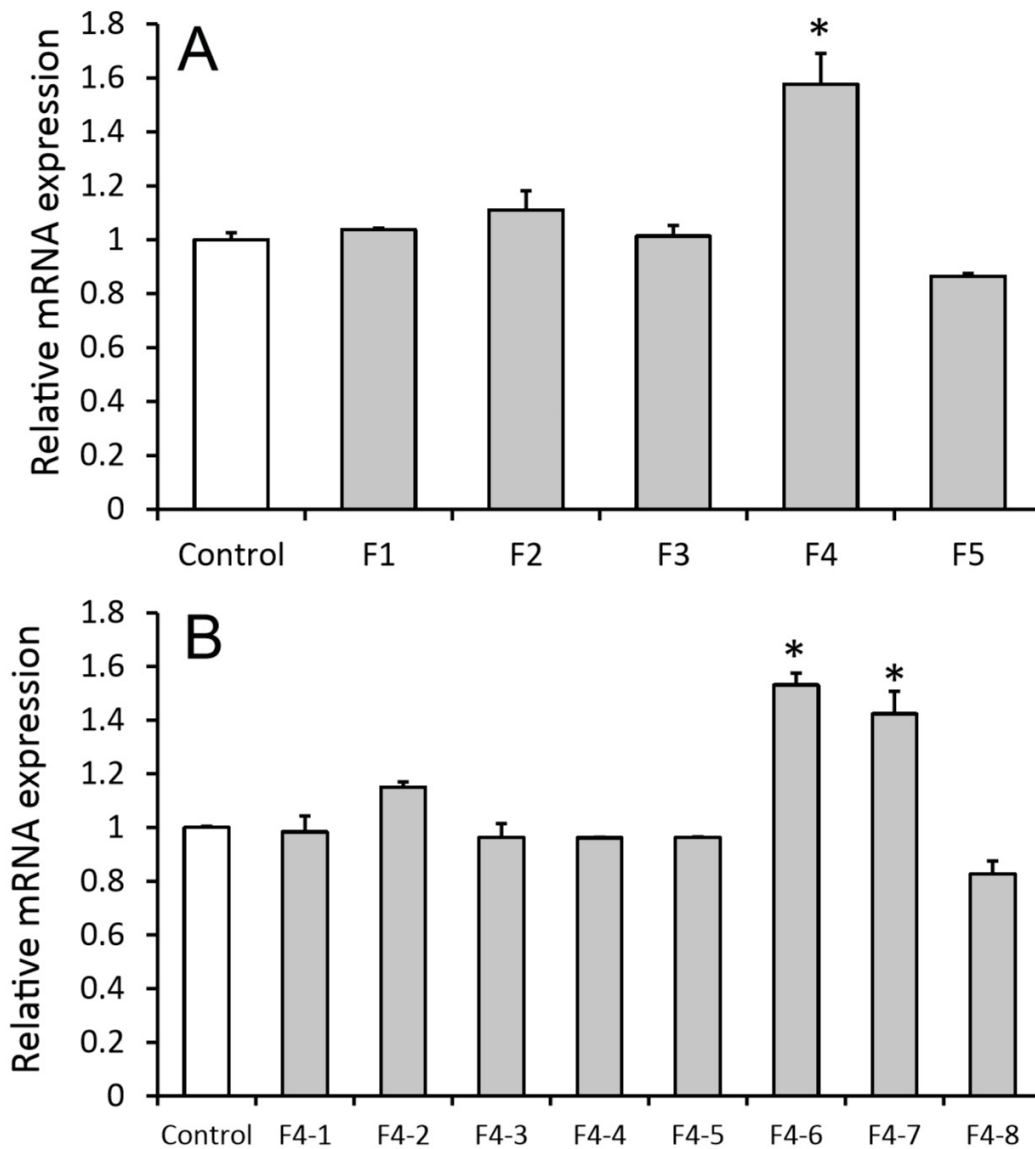


図 7. KJ 分画物が TIG-1 細胞の HSP70 遺伝子発現に及ぼす影響

A : F1~F5 ; B : F4-1~F4-8。□ : DMSO 処理群 (終濃度 0.1%) ; ■ : F1~F5 または F4-1~F4-8 処理群 (終濃度 80 μ g/mL、0.1% DMSO)。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.05$ を*で表記した。

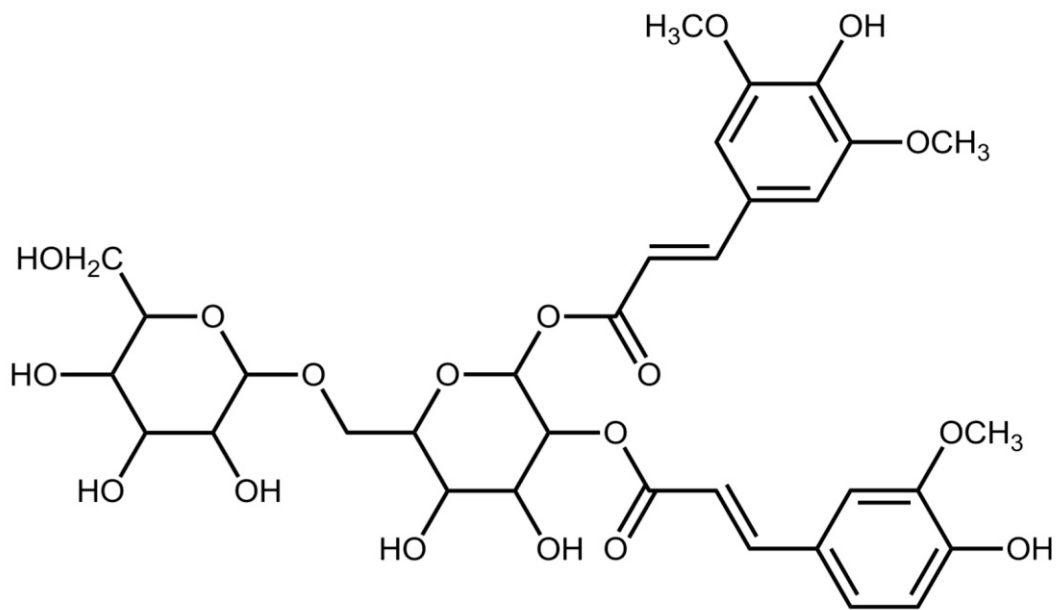


図 8. HSP70 誘導作用の有効成分候補の化学構造式

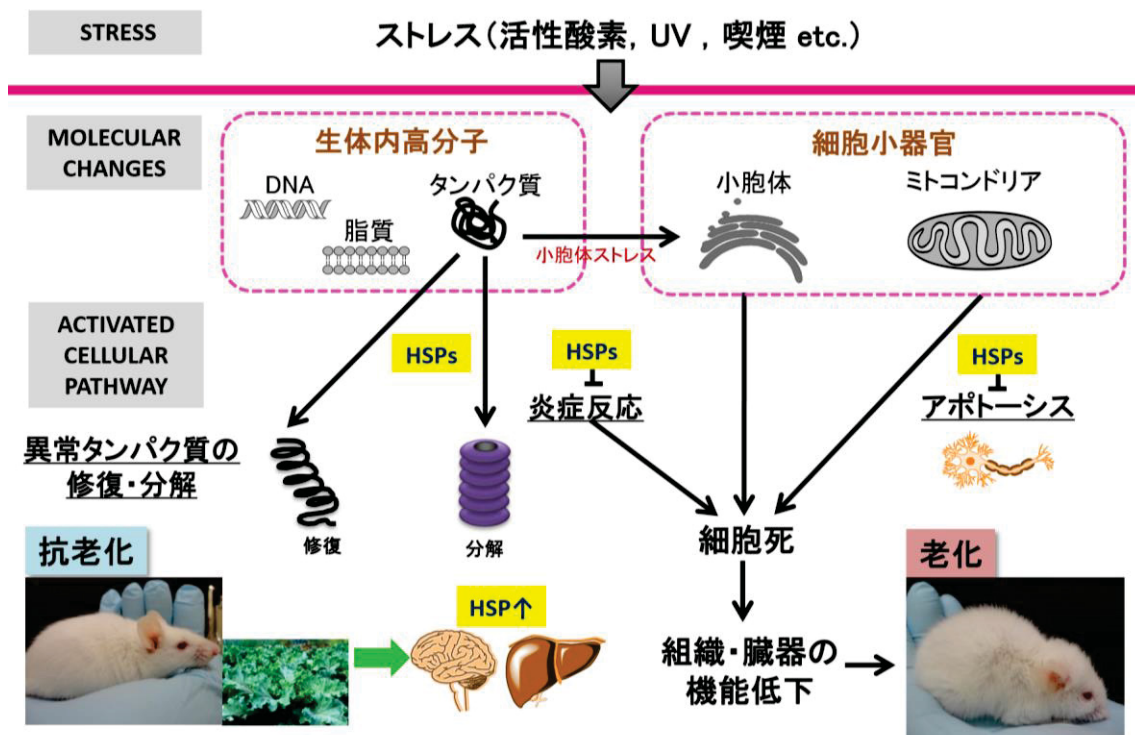


図 9. ケールの長期摂取による HSP 誘導を介した抗老化作用の概念図

第3章 ケールの長期摂取が海馬遺伝子発現に及ぼす影響

第1節 目的

第2章では、KJ摂取が脳内HSP70誘導作用によりSAMP8の認知機能低下を抑制することを明らかにしたが、全脳の解析であったため、記憶を司る脳海馬での発現変動については明らかになっていない。そこで本章では、学習記憶に重要な脳の部位である海馬に焦点を当て、ケール抽出物(KE: Kale extract)の摂取が海馬遺伝子発現に及ぼす影響についてDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。

第 2 節 材料および方法

1. 材料

KJ は、第 2 章と同様、ヤクルトヘルスフーズ株式会社より入手したものを使用した。AIN-93M 飼料（通常食）は、オリエンタル酵母工業より購入した。

2. 実験動物

14 週齢の雄性 SAMP8 マウスを日本エスエルシーより購入し、2 週間の予備飼育後、実験に供した。飼料および水は自由に与え、温度 20~23 °C、相対湿度 40~70%、および 12 時間明暗サイクル（明期：8:00-20:00）の条件下で飼育した。本動物実験は、信州大学動物実験委員会の承認を得て信州大学動物実験実施規程を遵守して行った。

3. KE の作製

KJ 粉末 10 g にメタノール 20 mL を添加した後、氷上でポリトロンホモジナイザー (PT6000、Kinematica AG) および超音波ホモジナイザー (SLPe40、BRANSON) を用いて破碎抽出した。抽出液を遠心分離 (4,000 × g、4 °C、10 分間) した後、上清を遠心分離 (15,000 × g、4 °C、15 分間) し、エバポレートおよび 0.45 μm フィルターで濾過した。濾液をメタノール 30 mL および MilliQ 水 30 mL で前処理した固相抽出カラム (InertSep C18 (5 g/20 mL)、ジーエルサイエンス) にアプライし、5%メタノール 20 mL で洗浄した後、65%メタノール 20 mL で溶出し、エ

バポレートおよび凍結乾燥して、使用するまで -20°C で保存した。

4. マウス実験

16週齢の雄性 SAMP8 マウスをコントロール群 ($n = 12$) および KE 群 ($n = 12$) の 2 群に分け、それぞれに AIN-93M 飼料、0.05% (w/w) KE 含有 AIN-93M 飼料を摂取させた。1週間ごとの摂餌量および体重測定の結果、群間での有意差はみられなかった (データは示さず)。KE 摂取開始から 31 週目に老化度評点による老化度判定を、32 週目にバーンズ迷路試験による空間記憶学習能力評価を実施した。バーンズ迷路試験終了後、イソフルラン麻酔下で脳を全摘出した後、両側海馬を採取して液体窒素で凍結し、DNA マイクロアレイ解析で使用するまで -80°C で保存した。

5. 老化度判定

老化度評点の検討項目は、行動 (反応性、受動性)、皮膚および被毛 (光沢、粗雑、脱毛)、皮膚潰瘍、眼疾患 (眼周囲病変、白内障、角膜潰瘍、角膜混濁)、および背骨湾曲からなる。各カテゴリーは 5 段階 (グレード 0~4) で評価され、グレード 0 は特に変化がないことを、グレード 4 は最も深刻な変化があることを表す。

6. 空間記憶学習能力の測定

バーンズ迷路は、円周上に等間隔で配置された 20 個の穴を有する円形テーブル (直径 90 cm、高さ 90 cm) から構成される。迷路周囲の四方の壁には、視覚

的な手がかりとなる幾何学模様を描写したポスターを設置した。20 個の穴の 1 つをランダムに選択して逃避箱を設置し、マウスが円形テーブル中央から逃避箱に到達するまでの時間を測定した。2 日間のトレーニングで逃避箱の位置を記憶させた後、3 日目に最終試験として逃避箱への到達時間を測定し、空間記憶学習能力を評価した。マウスの行動は、オーバーヘッドカメラおよびビデオ行動解析ソフトウェア (ANY-maze video tracking system software、Stoelting) で記録し、得られたデータは平均値±標準偏差で示した。

7. 海馬遺伝子発現変動解析

RNA 抽出試薬 (TRIzol Reagent、Thermo Fisher Scientific) および RNA 精製キット (RNeasy mini kit、QIAGEN) を用いて、各群よりランダムに選択した海馬サンプル (n=3) から total RNA を抽出した。DNA マイクロアレイ解析はフィルジェン社に委託した。アレイには 22,100 以上の遺伝子発現を解析可能な Clariom S Array (Thermo Fisher Scientific) を用いて、DNA マイクロアレイシステム (GeneChip® scanner 3000 7G、Affymetrix) によりシグナル検出した。得られたデータは、解析ソフトウェア (Micro Array Data Analysis Tool Ver3.2、フィルジェン) を用いて解析した。KE 群における遺伝子の発現比がコントロール群の 1.3 倍以上に増加、あるいは 0.77 倍以下に低下した遺伝子のうち、*t* 検定により *p* 値 0.05 未満を統計的に有意な発現変動遺伝子とした。さらに、 $Z\text{-score} > 0$ かつ $p < 0.05$ の条件を満たす経路を有意パスウェイとした。*p* 値はフィッシャーの正確確率検定により算出し、この値が小さいほど 2 つの遺伝子セット間でそのパスウェイをもつ遺伝子の比率に違いがあるといえる。 $Z\text{-score}$ とは平均から標準偏差

がどれくらい離れているかを示した値であり、 p 値だけでは平均値より多いか少ないかを識別することができないため、Z-score と p 値と組み合わせた判定法を使用した。

8. 統計処理

データは平均値±標準偏差で表した。有意差検定は、スチューデントの t 検定により実施した ($p < 0.05$)。

第 3 節 結果および考察

1. KE 摂取が老化症状に及ぼす影響

KE 摂取開始から 31 週目に SAMP8 の老化度を老化度評点により評価した。その結果、評点の合計値は KE 群でコントロール群と比較して有意に低値を示した (図 10)。行動 (反応性、受動性)、皮膚および被毛 (光沢、粗雑、脱毛) の各項目点数は KE 群で有意に低値であった (表 5)。参考として、図 11 に各群の代表個体の外観写真を示した。よって、ケール摂取が老化症状を有意に改善することが示唆された。

ケール由来成分による外観老化抑制効果については、フェルラ酸、カフェ酸、ケンフェロール、およびケルセチンなどによる皮膚炎症抑制、皮膚再生促進、コラーゲン分解抑制、およびメラニン形成抑制や⁷⁸⁻⁸²⁾、カロテノイドによるコラーゲン分解抑制⁸³⁾、グルコラファニンによる皮膚薄化改善作用⁸⁴⁾などが報告されている。HSP70 誘導による皮膚老化抑制作用も示されていることから⁸⁵⁾、第 2 章で同定した 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose の寄与も期待される。

2. KE 摂取が空間記憶学習能力に及ぼす影響

KE 摂取開始から 32 週目に SAMP8 の空間記憶学習能力をバーンズ迷路試験により評価した。その結果、2 日間のトレーニング期間を経た最終試験において、KE 群の逃避箱への到達時間はコントロール群と比べて有意に短縮した (図 12)。したがって、KE 摂取による認知機能低下抑制が確認された。なお、第 2 章のモ

リス水迷路試験は強制水泳テストとして身体的ストレスが大きいいため、本章ではマウスが暗所を好む習性に基づくバーンズ迷路試験⁸⁶⁾を採用した。認知機能の評価においては、複数の記憶学習試験により確認することが推奨されている。

3. KE 摂取が海馬遺伝子発現に及ぼす影響

KE 摂取後の海馬遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、KE 群で有意な発現変動がみられた遺伝子 ($p < 0.05$) のうち、発現比が 1.3 倍以上の遺伝子は 216 個、0.77 倍以下の遺伝子は 241 個であった。

パスウェイ解析の結果、統計上有意に高発現であったパスウェイ ($Z\text{-score} > 0$ かつ $p < 0.05$) は G タンパク質共役受容体に関する 2 経路、「Non-odorant GPCRs」および「Monoamine GPCRs」であった。これらの経路には、メラニン濃縮ホルモンやタキキニンなどの神経ペプチド受容体 (*Mchr1*、*Tacr1*) や、カンナビノイド受容体 (*Cnr1*) およびセロトニン受容体 (*Htr1b*、*Htr5b*) 遺伝子が含まれていた (表 6)。よって、KE 摂取が海馬の神経ペプチド受容体やセロトニン受容体の遺伝子を高発現させる作用があることが示唆された。

一方、KE 群で有意に低発現であったパスウェイ ($Z\text{-score} > 0$ かつ $p < 0.05$) は「Complement and coagulation cascades」や「Blood clotting cascade」といった補体・血液凝固系や、「Focal adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway」などを含む 5 経路であった。補体・血液凝固系にはフィブリノーゲンといった血液凝固因子 (*F5*、*Fgb*) が、「Focal adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway」にはコラーゲンやインテグリンなどの焦点接着部位の構成タンパク質 (*Colla2*、*Itgb4*) の

遺伝子が含まれていた。また、発現減少が認められた「Adipogenesis genes」には脂肪酸生合成酵素 (*Scd1*) などの遺伝子が含まれていた。その他、インスリン様成長因子 (*Igf2*) や骨形成タンパク質 (*Bmp6*) などの遺伝子群は KE 群で低発現していた (表 7)。以上より、KE 摂取が血液凝固因子や細胞接着分子などの遺伝子を発現抑制していることが示唆された。

G タンパク質共役受容体は、外部刺激に対する細胞応答の大部分を仲介しており、そのリガンドのメラニン濃縮ホルモンやタキキニンは内分泌機能、摂食調節、および記憶学習などに関与している^{87,88)}。メラニン濃縮ホルモン受容体 1 およびタキキニン受容体 1 は LTP 促進に寄与しており^{89,90)}、タキキニン受容体 1 は脳血管障害の予防にも関係している⁹¹⁾。セロトニンは記憶に重要な役割を果たし⁹²⁾、セロトニン受容体 1B 活性化による神経伝達制御⁹³⁾が報告されている。また、セロトニンは睡眠/概日リズム制御によりアルツハイマー病 (Alzheimer disease、AD) の予防にも関与している^{94,95)}。カンナビノイド受容体 1 は、炎症性サイトカイン産生やミクログリア活性化の抑制により、神経炎症抑制に寄与している⁹⁶⁻⁹⁸⁾。したがって、前記遺伝子群の高発現が認知機能低下の抑制に関与していることが推察される。

一方、補体・血液凝固系に関する遺伝子群、具体的には血液凝固因子 (*F5*、*Fgb*) の発現量は KE 群で有意に低かった。血液凝固反応は障害局所の止血血栓の形成に不可欠であるが、加齢に伴う過剰な活性化は、炎症や血栓形成により認知障害の原因となる⁹⁹⁾。フィブリノーゲン β 鎖 (*Fgb*) と AD の原因タンパク質との相互作用は、異常フィブリン塊形成により AD を悪化させることが示されている¹⁰⁰⁾。焦点接着 PI3K-Akt-mTOR 経路は、海馬の老化と密接に関連し、高齢サル海馬における発現増加が確認されている¹⁰¹⁾。焦点接着部位の構成タンパク質について、加齢に伴うコラーゲン増加による脳血管容量減少や^{102,103)}、インテ

グリンが細胞老化誘導に関与していることが報告されている¹⁰⁴⁾。その他、インスリン様成長因子 2 (*Igf2*) と糖代謝障害¹⁰⁵⁾、ステアロイル-CoA 不飽和化酵素 1 (*Scd1*) と脂質代謝障害¹⁰⁶⁾、骨形成タンパク質 6 と神経新生減少 (*Bmp6*)¹⁰⁷⁾との関連性が示されている。以上より、上記遺伝子群の低発現も認知機能低下の抑制に関係していると考えられる。なお、本章では DNA マイクロアレイ解析のみの実施であったため、今後はさらにリアルタイム PCR やタンパク質発現解析との組み合わせによる検証が求められる。

有効成分については、KE は固相抽出によりビタミン C、ビタミン E、カロテノイドなどを除去して、ポリフェノール含有を高めた試料である。試料含有率も第 2 章 0.8% (w/w) から 0.05% (w/w) に減じていることから、主要な有効成分がポリフェノールであることが推察される。

第 4 節 要約

本章では、ケールの長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の海馬遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。SAMP8 に 0.05% (w/w) KE 含有 AIN-93M 飼料を 31 週間摂取させたところ、バーンズ迷路試験における逃避箱への到達時間は KE 群でコントロール群と比べて有意に短縮した。DNA マイクロアレイによる海馬遺伝子発現解析の結果、KE 摂取は G タンパク質共役受容体遺伝子を有意に高発現させる一方で、補体・血液凝固系遺伝子や焦点接着-PI3K-Akt-mTOR の経路に関する遺伝子については発現抑制していることが認められた。高発現経路には神経伝達物質の受容体に関する遺伝子が、低発現経路には血栓形成などに関する遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子群の発現変動が認知機能低下抑制に関与していることが推察された。

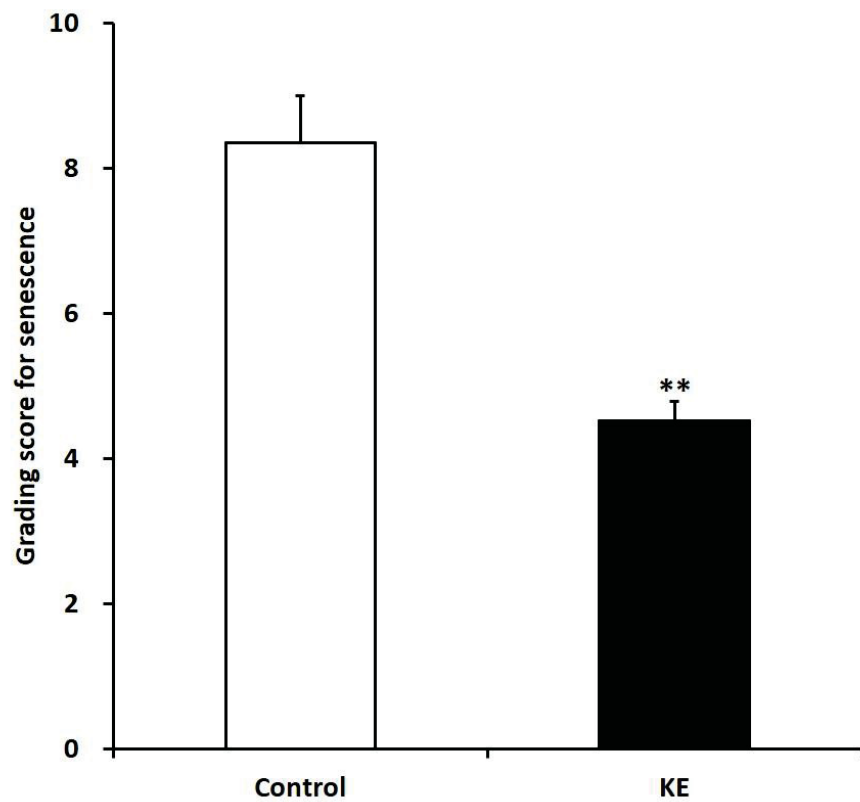


図 10. KE 摂取が老化症状に及ぼす影響

老化度評点の合計値。□：コントロール群（プラセボ群）；■：KE 群。データは
 平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.01$ を**で表記した。

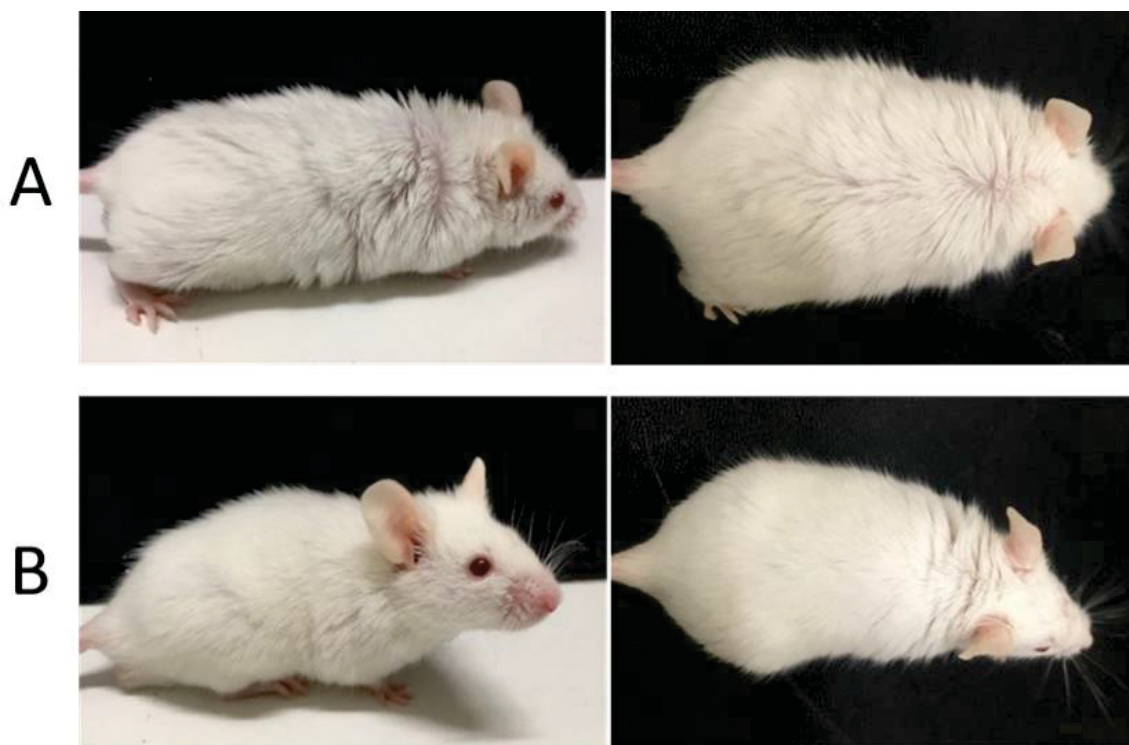


図 11. KE 摂取が外観老化に及ぼす影響

各群の代表個体の外観写真。A：コントロール群；B：KE 群。

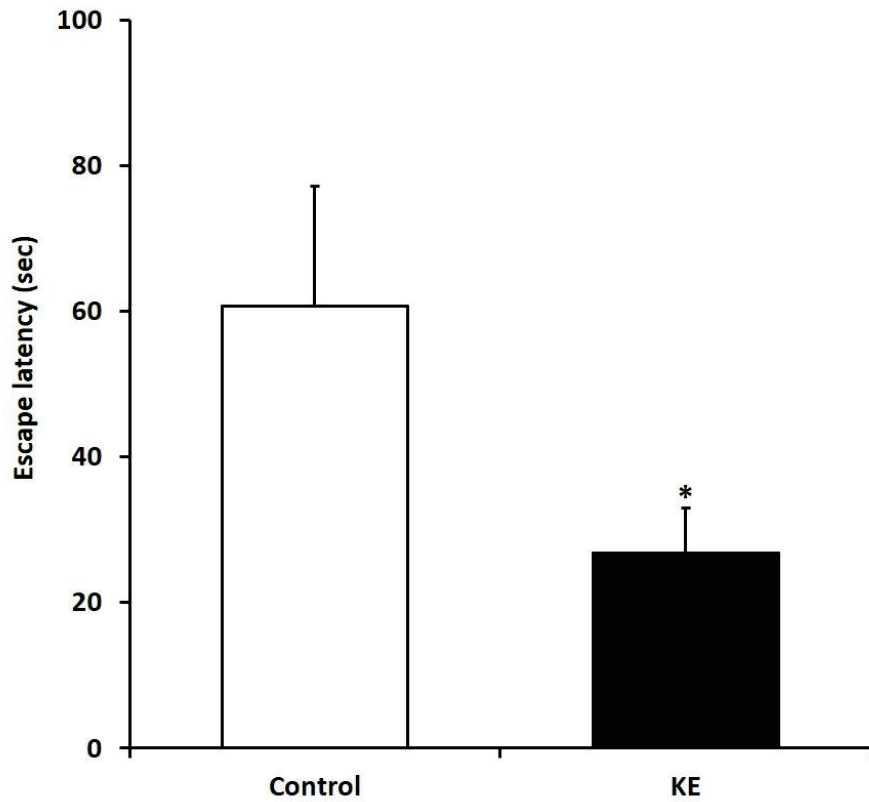


図 12. KE 摂取が空間記憶学習能力に及ぼす影響

バーンズ迷路試験における逃避箱への到達時間。□：コントロール群（プラセボ群）；■：KE 群。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.05$ を*で表記した。

表 5. KE 摂取が老化症状に及ぼす影響

Category	Item	Control	KE
Behaviors	Reactivity	1.13 ± 0.13	0.65 ± 0.08**
	Passivity	1.06 ± 0.16	0.46 ± 0.05**
Skin and hair	Glossiness	1.66 ± 0.12	0.90 ± 0.04**
	Coarseness	1.97 ± 0.13	1.29 ± 0.10**
	Hair loss	1.91 ± 0.17	1.19 ± 0.08**
Skin ulcer		0.03 ± 0.03	0.00 ± 0.00
Eye disease	Periophthalmic lesions,	0.44 ± 0.25	0.00 ± 0.00
	Cataract, Corneal ulcer,		
	Corneal opacity		
Lordokyphosis		0.31 ± 0.21	0.00 ± 0.00

老化度評点の各項目の点数。Behaviors (Reactivity, Passivity) : 行動 (反応性、受動性) ; Skin and hair (Glossiness, Coarseness, Hair loss) : 皮膚および被毛 (光沢、粗雑、脱毛) ; Skin ulcer : 皮膚潰瘍 ; Eye disease (Periophthalmic lesions, Cataract, Corneal ulcer, Corneal opacity) : 眼疾患 (眼周囲病変、白内障、角膜潰瘍、角膜混濁) ; Lordokyphosis : 背骨湾曲。データは平均値±標準偏差で表した。 $p < 0.01$ を**で表記した。

表 6. KE 群海馬における高発現経路

Pathway	Z-score	p-value	Gene Symbol (GenBank Gene ID)
Non-odorant GPCRs	2.333	0.032	<i>Mchr1</i> (207911), <i>Tacr1</i> (21336), <i>Htr1b</i> (15551), <i>Fzd4</i> (14366), <i>Cnr1</i> (12801), <i>Htr5b</i> (15564)
Monoamine GPCRs	3.133	0.039	<i>Htr1b</i> (15551), <i>Htr5b</i> (15564)

Mchr1, Melanin-concentrating hormone receptor 1; *Tacr1*, Tachykinin receptor 1; *Htr1b*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B; *Fzd4*, Frizzled homolog 4; *Cnr1*, Cannabinoid receptor 1 (brain); *Htr5b*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B.

表 7. KE 群海馬における低発現経路

Pathway	Z-score	p-value	Gene Symbol (Gene ID)
Complement and coagulation cascades	3.851	0.007	<i>Serpind1</i> (15160), <i>F5</i> (14067), <i>Cfd</i> (11537), <i>Fgb</i> (110135)
Focal adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway	2.679	0.014	<i>Irs3</i> (16369), <i>Cab39l</i> (69008), <i>Colla2</i> (12843), <i>Prlr</i> (19116), <i>Kitl</i> (17311), <i>Itgb4</i> (192897), <i>Fgf17</i> (14171), <i>Hsp90b1</i> (22027), <i>Itgb5</i> (16419)
Adipogenesis genes	2.719	0.023	<i>Irs3</i> (16369), <i>Scd1</i> (20249), <i>Prlr</i> (19116), <i>Cfd</i> (11537), <i>Bmp3</i> (110075)
Blood clotting cascade	3.621	0.027	<i>F5</i> (14067), <i>Fgb</i> (110135)
Endochondral ossification	2.638	0.041	<i>Bmp6</i> (12161), <i>Igf2</i> (16002), <i>Mgp</i> (17313)

Serpind1, Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade D, member 1; *F5*, Coagulation factor V; *Cfd*, Complement factor D (adipsin); *Fgb*, Fibrinogen beta chain; *Irs3*, Insulin receptor substrate 3; *Cab39l*, Calcium binding protein 39-like; *Colla2*, Collagen, type I, alpha 2; *Prlr*, Prolactin receptor; *Kitl*, Kit ligand; *Itgb4*, Integrin beta 4; *Fgf17*, Fibroblast growth factor 17; *Hsp90b1*, Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1; *Itgb5*, Integrin beta 5; *Scd1*, Stearoyl-Coenzyme A desaturase 1; *Bmp3*, Bone morphogenetic protein 3; *Bmp6*, Bone morphogenetic protein 6; *Igf2*, Insulin-like growth factor 2; *Mgp*, Matrix Gla protein.

第 4 章 総合考察

本研究では、ケールの長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の認知機能に及ぼす影響について調べた。その結果、ケール摂取が脳内 HSP70 誘導作用や、海馬における G タンパク質共役受容体、補体・血液凝固系、および焦点接着-PI3K-Akt-mTOR 経路などに関する遺伝子の発現変動により認知機能低下抑制に寄与することが示唆された。また、HSP 誘導作用の有効成分候補として、1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose を同定した。今後は、有効成分とその作用機序や、認知機能以外の有効性についてのさらなる検討が求められる。

有効成分については、1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose 以外にもフェルラ酸などのポリフェノールや、カロテノイドおよびグルコシノレートの関与が予想される。例えばフェルラ酸による神経炎症抑制¹⁰⁸⁾、神経伝達制御¹⁰⁹⁾、脳由来神経栄養因子の増加¹¹⁰⁾、および抗アポトーシス作用¹¹¹⁾などが報告されている。また、ケンフェロール¹¹²⁾、カフェ酸¹¹³⁾、ルテイン¹¹⁴⁾、およびグルコラファニン/スルフォラファン^{115, 116)}による神経保護作用が示されている。

有効成分の代謝吸収動態について、1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose は血液脳関門透過性が低く、脳に直接作用しているかどうかは不明である。ポリフェノールは植物において大部分が配糖体として存在し、ケールには kaempferol-3-O-sophoroside-7-O-glucoside、kaempferol-3-O-(feruloyl)sophoroside-7-O-glucoside、および quercetin-3-O-sophoroside-7-O-glucosid などのフラボノイド配糖体が多く含まれている^{117, 118)}。フラボノイド配糖体は、小腸上皮細胞で加水分解酵素によりアグリコンに変換された後、グルクロン酸/硫酸抱合やメチル化を受けて循環血

流中に入り、肝臓において二次代謝を受ける。吸収されずに大腸に到達したのも、腸内細菌叢によりフェノール酸などの低分子に分解されて循環血流中に入る¹¹⁹⁾。フラボノイド配糖体は、親化合物とその代謝物産物とが大きく異なることや、同一アグリコンであっても糖鎖の違いにより吸収率や吸収速度が変化していることが確認されている。また、胆汁酸結合がポリフェノールの生体可給性を著しく増加させることが示されている¹²⁰⁾。このように、有効性向上の観点からも有効成分の代謝吸収動態の解明が求められる。

構造活性相関について、1-sinapoyl-2-feruloylgentiobiose のシナピン酸-フェルラ酸結合がシナピン酸-シナピン酸結合よりも高い抗酸化活性を示すことが報告されている¹²¹⁾。また、フラボノイド配糖体のフラボノール B 環のヒドロキシル基や¹¹²⁾カテコール様構造¹²²⁾は抗酸化活性に寄与している。構造活性相関の解明にあたっては、例えばこれらの構造に着目した検討が有効であると考えられる。

ポリフェノールの含有量や吸収率の向上には、栽培条件、栽培後の貯蔵条件、調理方法、加工方法、および抽出方法の最適化が有効である。ポリフェノール含有量は栄養、光、および温度などの影響を受け¹²³⁾、硫黄の施肥増加¹²⁴⁾、光合成活性放射線/UVB 照射や低温栽培¹²⁵⁾、および収穫後の低温貯蔵の有益性が示されている¹²⁶⁾。適切なブランチング処理、例えば沸騰水中での 90 秒間加熱は、ポリフェノール含有量や抗酸化活性を向上させる^{127,128)}。加工方法については、リン脂質複合体化、メチル化、およびナノ懸濁液化などの処理がポリフェノールの生体利用性や溶解度を改善することが確認されている¹²⁹⁾。高効率/収率の抽出技術として、マイクロ波支援抽出、超音波支援抽出、および超臨界流体抽などが挙

げられる¹³⁰⁾。例えば、ケール由来ポリフェノール抽出に適した条件として、80% エタノール水溶液による 60 分間の超音波処理が報告されている¹³¹⁾。

認知機能改善以外の有益性について、HSP70 誘導は虚血性脳障害¹³²⁾、脳卒中⁶³⁾、肝障害¹³³⁾、皮膚老化¹³⁴⁾、胃粘膜病変¹³⁵⁾、大腸炎¹³⁶⁾、血栓症¹³⁷⁾、および膝線維症¹³⁸⁾の改善にも有効であることが示されている。また、ケール摂取による腸内環境改善作用、例えば Firmicutes 門の増加、Bacteroidetes 門の減少、および酪酸増加が確認されている¹³⁹⁾。加齢に伴い Firmicutes 門は減少、Bacteroidetes 門は増加することが明らかとなっている¹⁴⁰⁾。また、長寿のヒト腸内で酪酸が高濃度であることや¹⁴¹⁾、酪酸による認知機能改善作用¹⁴²⁾、抗うつ作用¹⁴³⁾、および睡眠改善作用が報告されている¹⁴⁴⁾。したがって、ケール摂取が生体内の様々な部位で有効性を発揮することが期待される。

結論として、本研究により、ケールの長期摂取が加齢に伴う認知機能低下の予防に有効であることが示された。本研究の知見が、安全かつ有効なアンチエイジング食品開発に活用され、人々の QOL 向上に広く貢献できることを期待する。

謝辞

本研究において、終始懇切丁寧かつ熱心な御指導を賜りました信州大学大学院総合工学系研究科 中村 宗一郎 教授および片山 茂 教授に深甚なる感謝の意を表します。多くの教えと心のこもった叱咤激励を頂きましたことは感謝の念にたえません。

学位論文審査において、貴重な御助言を頂きました香川大学大学院農学研究科 小川 雅廣 教授、ならびに信州大学大学院総合工学系研究科 真壁 秀文 教授および米倉 真一 教授に厚く御礼申し上げます。

第2章の NMR 分析に御協力頂きました信州大学大学院総合工学系研究科 真壁 秀文 教授に深く感謝申し上げます。マウスの行動試験およびそのデータ解析についてご指導いただきました東京都健康長寿医療センター研究所の柳井修一先生に深く感謝申し上げます。また、日頃より多くの御支援を頂きました信州大学農学部食品化学研究室 杉山遥さん、今井理恵さん、丹治典子さん、内堀友貴さん、清水綾乃さん、有村美紗さん、市川紗貴さん、嶋七海さん、および松本果楠子さんをはじめとする研究室の皆様にご挨拶申し上げます。

最後に、いつも温かく見守り心の支えとなってくれた家族に感謝いたします。

皆様のおかげで、本学位論文を完成させることができました。本当にありがとうございました。

参考文献

- 1) 内閣府. 令和元年版高齢社会白書.
- 2) Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 295–301.
- 3) Kim, K. I., & Kim, C. H. (2013). Calorie restriction in the elderly people. *Journal of Korean Medical Science*, 28(6), 797–798.
- 4) Fiorentini, D., Zambonin, L., Dalla Sega, F. V., & Hrelia, S. (2015). Polyphenols as Modulators of Aquaporin Family in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 196914.
- 5) Xu, Y., Ku, B., Cui, L., Li, X., Barish, P. A., Foster, T. C., & Ogle, W. O. (2007). Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain Research*, 1162, 9–18.
- 6) Li, Q., Zhao, H. F., Zhang, Z. F., Liu, Z. G., Pei, X. R., Wang, J. B., Cai, M. Y., & Li, Y. (2009). Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic amp-response element binding protein signaling cascade. *Neuroscience*, 159(4), 1208–1215.
- 7) Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
- 8) Verhoeven, D.T., Goldbohm, R.A., van Poppel, G., Verhagen, H., & van den

- Brandt, P.A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5 (9), 733–748.
- 9) Haigis, M. C., & Yankner, B. A. (2010). The aging stress response. *Molecular Cell*, 40(2), 333–344.
- 10) López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217.
- 11) Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism*, 27(6), 1176–1199.
- 12) Fan, X., Wheatley, E. G., & Villeda, S. A. (2017). Mechanisms of Hippocampal Aging and the Potential for Rejuvenation. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 251–272.
- 13) Geinisman, Y., Detoleto-Morrell, L., Morrell, F., & Heller, R. E. (1995). Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Progress in Neurobiology*, 45(3), 223–252.
- 14) Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(5), 339–350.
- 15) Staubli, U., & Lynch, G. (1987). Stable hippocampal long-term potentiation

- elicited by 'theta' pattern stimulation. *Brain Research*, 435(1-2), 227–234.
- 16) Manahan-Vaughan D. (2000). Long-term depression in freely moving rats is dependent upon strain variation, induction protocol and behavioral state. *Cerebral Cortex*, 10(5), 482–487.
 - 17) Aitken, R. J., & Roman, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1(1), 15–24.
 - 18) Zhang, H., Davies, K., & Forman, H. J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 88(Pt B), 314–336.
 - 19) Jacob, P., Hirt, H., & Bendahmane, A. (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnology Journal*, 15(4), 405–414.
 - 20) Fujita, K., Yamafuji, M., Nakabeppu, Y., & Noda, M. (2012). Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: Focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 324256.
 - 21) Kalmar, B., & Greensmith, L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(4), 310–318.
 - 22) Stetler, R. A., Gan, Y., Zhang, W., Liou, A. K., Gao, Y., Cao, G., & Chen, J. (2010). Heat shock proteins: cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 92(2), 184–211.
 - 23) Redman, L. M., & Ravussin, E. (2011). Caloric restriction in humans: impact on

- physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(2), 275–287.
- 24) Nishino, H., Tokuda, H., Murakoshi, M., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuka, N., & Yano, M. (2000). Cancer prevention by natural carotenoids. *BioFactors*, 13(1-4), 89–94.
- 25) Gurău, F., Baldoni, S., Prattichizzo, F., Espinosa, E., Amenta, F., Procopio, A. D., Albertini, M. C., Bonafè, M., & Olivieri, F. (2018). Anti-senescence compounds: A potential nutraceutical approach to healthy aging. *Ageing Research Reviews*, 46, 14–31.
- 26) Katayama, S., & Nakamura, S. (2019). Emerging roles of bioactive peptides on brain health promotion. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1949–1955.
- 27) Katayama, S., Sugiyama, H., Kushimoto, S., Uchiyama, Y., Hirano, M., & Nakamura, S. (2016). Effects of Sesaminol Feeding on Brain A β Accumulation in a Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 4908–4913.
- 28) Zhu, G., Wang, Y., Li, J., & Wang, J. (2015). Chronic treatment with ginsenoside Rg1 promotes memory and hippocampal long-term potentiation in middle-aged mice. *Neuroscience*, 292, 81–89.
- 29) Gong, Y. S., Guo, J., Hu, K., Gao, Y. Q., Xie, B. J., Sun, Z. D., Yang, E. N., & Hou, F. L. (2016). Ameliorative effect of lotus seedpod proanthocyanidins on cognitive

- impairment and brain aging induced by D-galactose. *Experimental Gerontology*, 74, 21–28.
- 30) Farr, S. A., Price, T. O., Dominguez, L. J., Motisi, A., Saiano, F., Niehoff, M. L., Morley, J. E., Banks, W. A., Ercal, N., & Barbagallo, M. (2012). Extra virgin olive oil improves learning and memory in SAMP8 mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(1), 81–92.
- 31) Farr, S. A., Niehoff, M. L., Ceddia, M. A., Herrlinger, K. A., Lewis, B. J., Feng, S., Welleford, A., Butterfield, D. A., & Morley, J. E. (2016). Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiology & Behavior*, 165, 328–338.
- 32) Nakajima, A., Aoyama, Y., Nguyen, T. T., Shin, E. J., Kim, H. C., Yamada, S., Nakai, T., Nagai, T., Yokosuka, A., Mimaki, Y., Ohizumi, Y., & Yamada, K. (2013). Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behavioural Brain Research*, 250, 351–360.
- 33) Wang, H. M., Wang, L. W., Liu, X. M., Li, C. L., Xu, S. P., & Farooq, A. D. (2013). Neuroprotective effects of forsythiaside on learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse prone (SAMP8) mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 105, 134–141.
- 34) Izquierdo, V., Palomera-Ávalos, V., López-Ruiz, S., Canudas, A. M., Pallàs, M., & Griñán-Ferré, C. (2019). Maternal Resveratrol Supplementation Prevents Cognitive Decline in Senescent Mice Offspring. *International Journal of*

- Molecular Sciences, 20(5), 1134.
- 35) Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E. B., Ryan, A. S., Blackwell, A., Salem, N., Jr, Stedman, M., & MIDAS Investigators (2010). Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia : the Journal of the Alzheimer's Association*, 6(6), 456–464.
- 36) Chen, F. J., Liu, B., Wu, Q., Liu, J., Xu, Y. Y., Zhou, S. Y., & Shi, J. S. (2019). Icarin Delays Brain Aging in Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) Model via Inhibiting Autophagy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 369(1), 121–128.
- 37) Shi, C., Liu, J., Wu, F., & Yew, D. T. (2010). Ginkgo biloba extract in Alzheimer's disease: from action mechanisms to medical practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 107–123.
- 38) Akiguchi, I., Pallàs, M., Budka, H., Akiyama, H., Ueno, M., Han, J., Yagi, H., Nishikawa, T., Chiba, Y., Sugiyama, H., Takahashi, R., Unno, K., Higuchi, K., & Hosokawa, M. (2017). SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 37(4), 293–305.
- 39) Cheng, X. R., Zhou, W. X., & Zhang, Y. X. (2014). The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Research Reviews*, 13, 13–37.

- 40) Fadigas, J. C., A.M.P. dos Santos, R. M. de Jesus, D. C. Lima, W. D. Fragoso, J. M. David & S. L.C.. Ferreira. (2010). Use of multivariate analysis techniques for the characterization of analytical results for the determination of the mineral composition of kale. *Microchemical Journal*. 96, 352–356.
- 41) Sikora, E., & Bodziarczyk, I. (2012). Composition and antioxidant activity of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) raw and cooked. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 11(3), 239–248.
- 42) Lisiewska, Z., Kmiecik, W., & Korus, A. (2008). The amino acid composition of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), fresh and after culinary and technological processing. *Food Chemistry*, 108(2), 642–648.
- 43) Korus, A. (2011). Effect of preliminary processing, method of drying and storage temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1711–1716.
- 44) Korus, A., & Kmiecik, W. (2007). Content of carotenoids and chlorophyll pigments in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) depending on the cultivar and the harvest date. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 10(1), 328.
- 45) Abdel-Aal, e., Akhtar, H., Zaheer, K., & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4), 1169–1185.
- 46) Baenas, N., Marhuenda, J., García-Viguera, C., Zafrilla, P., & Moreno, D. A. (2019). Influence of Cooking Methods on Glucosinolates and Isothiocyanates

Content in Novel Cruciferous Foods. *Foods*, 8(7), 257.

- 47) Sasaki, K., Neyazaki, M., Shindo, K., Ogawa, T., & Momose, M. (2012). Quantitative profiling of glucosinolates by LC-MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 903, 171–176.
- 48) Verhoeven, D. T., Goldbohm, R. A., van Poppel, G., Verhagen, H., & van den Brandt, P. A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 5(9), 733–748.
- 49) Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10367–10372.
- 50) Sikora, E., & Bodziarczyk, I. (2013). Influence of diet with kale on lipid peroxides and malondialdehyde levels in blood serum of laboratory rats over intoxication with paraquat. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 12(1), 91–99.
- 51) Danesi, F., Govoni, M., D'Antuono, L. F., & Bordoni, A. (2016). The molecular mechanism of the cholesterol-lowering effect of dill and kale: The influence of the food matrix components. *Electrophoresis*, 37(13), 1805–1813.

- 52) Kural, B. V., Küçük, N., Yücesan, F. B., & Orem, A. (2011). Effects of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) leaves extracts on the susceptibility of very low and low density lipoproteins to oxidation. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 48(5), 361–364.)
- 53) Nishi, K., Kondo, A., Okamoto, T., Nakano, H., Daifuku, M., Nishimoto, S., Ochi, K., Takaoka, T., & Sugahara, T. (2011). Immunostimulatory in vitro and in vivo effects of a water-soluble extract from kale. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(1), 40–46.
- 54) Dringen, R., & Hirrlinger, J. (2003). Glutathione pathways in the brain. *Biological Chemistry*, 384(4), 505–516.
- 55) Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- 56) Galli, R. L., Bielinski, D. F., Szprengiel, A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2006). Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection. *Neurobiology of Aging*, 27(2), 344–350.
- 57) Oishi, K., Okauchi, H., Yamamoto, S., & Higo-Yamamoto, S. (2020). Dietary natural cocoa ameliorates disrupted circadian rhythms in locomotor activity and sleep-wake cycles in mice with chronic sleep disorders caused by psychophysiological stress. *Nutrition*, 75-76, 110751.
- 58) Ito, T., Maeda, T., Goto, K., Miura, T., Wakame, K., Nishioka, H., & Sato, A. (2014). Enzyme-treated asparagus extract promotes expression of heat shock

- protein and exerts antistress effects. *Journal of Food Science*, 79(3), 413–419.
- 59) Turturici, G., Sconzo, G., & Geraci, F. (2011). Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochemistry Research International*, 2011, 618127.
- 60) Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., & Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational Neurodegeneration*, 6, 6.
- 61) Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(14), 5225–5234.
- 62) Kim, N., Kim, J. Y., & Yenari, M. A. (2012). Anti-inflammatory properties and pharmacological induction of Hsp70 after brain injury. *Inflammopharmacology*, 20(3), 177–185.
- 63) Lanneau, D., de Thonel, A., Maurel, S., Didelot, C., & Garrido, C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 1(1), 53–60.
- 64) Holmberg, C. I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J. O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R. I., Eriksson, J. E., & Sistonen, L. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *The EMBO Journal*, 20(14), 3800–3810.

- 65) Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., & Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(8), 2953–2968.
- 66) Raynes, R., Pombier, K. M., Nguyen, K., Brunquell, J., Mendez, J. E., & Westerheide, S. D. (2013). The SIRT1 modulators AROS and DBC1 regulate HSF1 activity and the heat shock response. *PloS One*, 8(1), e54364.
- 67) Raychaudhuri, S., Loew, C., Körner, R., Pinkert, S., Theis, M., Hayer-Hartl, M., Buchholz, F., & Hartl, F. U. (2014). Interplay of acetyltransferase EP300 and the proteasome system in regulating heat shock transcription factor 1. *Cell*, 156(5), 975–985.
- 68) Keum, Y. S., & Choi, B. Y. (2014). Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecules*, 19(7), 10074–10089.
- 69) Toyama, T., Shinkai, Y., Yasutake, A., Uchida, K., Yamamoto, M., & Kumagai, Y. (2011). Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1117–1122.
- 70) Ma, Z. C., Hong, Q., Wang, Y. G., Liang, Q. D., Tan, H. L., Xiao, C. R., Tang, X. L., Shao, S., Zhou, S. S., & Gao, Y. (2011). Ferulic acid induces heme oxygenase-1 via activation of ERK and Nrf2. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 5(6), 299–305.

- 71) Ben-Dor, A., Steiner, M., Gheber, L., Danilenko, M., Dubi, N., Linnewiel, K., Zick, A., Sharoni, Y., & Levy, J. (2005). Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(1), 177–186.
- 72) Rojo, A. I., Innamorato, N. G., Martín-Moreno, A. M., De Ceballos, M. L., Yamamoto, M., & Cuadrado, A. (2010). Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia*, 58(5), 588–598.
- 73) Cheng, C. Y., Kao, S. T., & Lee, Y. C. (2019). Ferulic Acid Exerts Anti-apoptotic Effects against Ischemic Injury by Activating HSP70/Bcl-2- and HSP70/Autophagy-Mediated Signaling after Permanent Focal Cerebral Ischemia in Rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 47(1), 39–61.
- 74) Park, S. H., Gong, J. H., Choi, Y. J., Kang, M. K., Kim, Y. H., & Kang, Y. H. (2015). Kaempferol Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Mucus Hypersecretion in Airway Epithelial Cells And Ovalbumin-Sensitized Mice. *PloS One*, 10(11), e0143526.
- 75) Ohnishi, K., Ohkura, S., Nakahata, E., Ishisaka, A., Kawai, Y., Terao, J., Mori, T., Ishii, T., Nakayama, T., Kioka, N., Matsumoto, S., Ikeda, Y., Akiyama, M., Irie, K., & Murakami, A. (2013). Non-specific protein modifications by a phytochemical induce heat shock response for self-defense. *PloS One*, 8(3), e58641.
- 76) Ahn, J. H., Luo, W., Kim, J., Rodina, A., Clement, C. C., Aguirre, J., Sun, W., Kang, Y., Maharaj, R., Moulick, K., Zatorska, D., Kokoszka, M., Brodsky, J. L., & Chiosis, G. (2011). Design of a flexible cell-based assay for the evaluation of

- heat shock protein 70 expression modulators. *Assay and Drug Development Technologies*, 9(3), 236–246.
- 77) Fernandes, F., Sousa, C., Ferreres, F., Valentão, P., Remião, F., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2012). Kale extract increases glutathione levels in V79 cells, but does not protect them against acute toxicity induced by hydrogen peroxide. *Molecules*, 17(5), 5269–5288.
- 78) Shimojo, Y., Ozawa, Y., Toda, T., Igami, K., & Shimizu, T. (2018). Probiotic *Lactobacillus paracasei* A221 improves the functionality and bioavailability of kaempferol-glucoside in kale by its glucosidase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 9239.
- 79) Dudonné, S., Poupard, P., Coutière, P., Woillez, M., Richard, T., Mérillon, J. M., & Vitrac, X. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4527–4536.
- 80) Pluemsamran, T., Onkoksoong, T., & Panich, U. (2012). Caffeic acid and ferulic acid inhibit UVA-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant defense system in keratinocyte HaCaT cells. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 961–968.
- 81) Jeong, J. Y., Liu, Q., Kim, S. B., Jo, Y. H., Mo, E. J., Yang, H. H., Song, D. H., Hwang, B. Y., & Lee, M. K. (2015). Characterization of Melanogenesis Inhibitory Constituents of *Morus alba* Leaves and Optimization of Extraction Conditions

- Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 20(5), 8730–8741.
- 82) Almeida, I. F., Pinto, A. S., Monteiro, C., Monteiro, H., Belo, L., Fernandes, J., Bento, A. R., Duarte, T. L., Garrido, J., Bahia, M. F., Sousa Lobo, J. M., & Costa, P. C. (2015). Protective effect of *C. sativa* leaf extract against UV mediated-DNA damage in a human keratinocyte cell line. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 144, 28–34.
- 83) Meinke, M. C., Nowbary, C. K., Schanzer, S., Vollert, H., Lademann, J., & Darvin, M. E. (2017). Influences of Orally Taken Carotenoid-Rich Curly Kale Extract on Collagen I/Elastin Index of the Skin. *Nutrients*, 9(7), 775.
- 84) Chawalitpong, S., Ichikawa, S., Uchibori, Y., Nakamura, S., & Katayama, S. (2019). Long-Term Intake of Glucoraphanin-Enriched Kale Suppresses Skin Aging via Activating Nrf2 and the TβRII/Smad Pathway in SAMP1 Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(35), 9782–9788.
- 85) Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y., & Mizushima, T. (2010). Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5848–5858.
- 86) Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R., & Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*, 81(6), 905–915.

- 87) Adamantidis, A., & de Lecea, L. (2009). A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. *Peptides*, 30(11), 2066–2070.
- 88) Langosch, J. M., Kupferschmid, S., Heinen, M., Walden, J., Herpfer, I., Fiebich, B. L., & Lieb, K. (2005). Effects of substance P and its antagonist L-733060 on long term potentiation in guinea pig hippocampal slices. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(2), 315–319.
- 89) Pachoud, B., Adamantidis, A., Ravassard, P., Luppi, P. H., Grisar, T., Lakaye, B., & Salin, P. A. (2010). Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. *Journal of Neurophysiology*, 104(3), 1417–1425.
- 90) Afrah, A. W., Fiskå, A., Gjerstad, J., Gustafsson, H., Tjølsen, A., Olgart, L., Stiller, C. O., Hole, K., & Brodin, E. (2002). Spinal substance P release in vivo during the induction of long-term potentiation in dorsal horn neurons. *Pain*, 96(1-2), 49–55.
- 91) Daschil, N., Kniewallner, K. M., Obermair, G. J., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Marksteiner, J., & Humpel, C. (2015). L-type calcium channel blockers and substance P induce angiogenesis of cortical vessels associated with beta-amyloid plaques in an Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Aging*, 36(3), 1333–1341.
- 92) Naughton, M., Mulrooney, J. B., & Leonard, B. E. (2000). A review of the role of serotonin receptors in psychiatric disorders. *Human Psychopharmacology*, 15(6), 397–415.

- 93) Guo, J. D., & Rainnie, D. G. (2010). Presynaptic 5-HT(1B) receptor-mediated serotonergic inhibition of glutamate transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuroscience*, 165(4), 1390–1401.
- 94) Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., & Takai, K. (2012). Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *The European Journal of Neuroscience*, 35(11), 1762–1770.
- 95) Slats, D., Claassen, J. A., Verbeek, M. M., & Overeem, S. (2013). Reciprocal interactions between sleep, circadian rhythms and Alzheimer's disease: focus on the role of hypocretin and melatonin. *Ageing Research Reviews*, 12(1), 188–200.
- 96) Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., & Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research*. *Brain Research Reviews*, 30(1), 77–105.
- 97) Ershler, W. B., & Keller, E. T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual Review of Medicine*, 51, 245–270.
- 98) Albayram, O., Alferink, J., Pitsch, J., Piyanova, A., Neitzert, K., Poppensieker, K., Mauer, D., Michel, K., Legler, A., Becker, A., Monory, K., Lutz, B., Zimmer, A., & Bilkei-Gorzo, A. (2011). Role of CB1 cannabinoid receptors on GABAergic neurons in brain aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 11256–11261.

- 99) Morgan B. P. (2018). Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Seminars in Immunopathology*, 40(1), 113–124.
- 100) Ahn, H. J., Zamolodchikov, D., Cortes-Canteli, M., Norris, E. H., Glickman, J. F., & Strickland, S. (2010). Alzheimer's disease peptide beta-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21812–21817.
- 101) Meng, S., Xia, W., Pan, M., Jia, Y., He, Z., & Ge, W. (2020). Proteomics profiling and pathway analysis of hippocampal aging in rhesus monkeys. *BMC Neuroscience*, 21(1), 2.
- 102) Wolfson, M., Budovsky, A., Tacutu, R., & Fraifeld, V. (2009). The signaling hubs at the crossroad of longevity and age-related disease networks. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(3), 516–520.
- 103) Bourasset, F., Ouellet, M., Tremblay, C., Julien, C., Do, T. M., Oddo, S., LaFerla, F., & Calon, F. (2009). Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 56(4), 808–813.
- 104) Cho, K. A., Ryu, S. J., Oh, Y. S., Park, J. H., Lee, J. W., Kim, H. P., Kim, K. T., Jang, I. S., & Park, S. C. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42270–42278.
- 105) Pedrós, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallàs, M., Vázquez-Carrera, M., Casadesús, G., Folch, J., & Camins, A. (2014). Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of

- APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(9), 1556–1566.
- 106) Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., & Mattson, M. P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2070–2075.
- 107) Gobeske, K. T., Das, S., Bonaguidi, M. A., Weiss, C., Radulovic, J., Disterhoft, J. F., & Kessler, J. A. (2009). BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. *PloS One*, 4(10), e7506.
- 108) Rehman, S. U., Ali, T., Alam, S. I., Ullah, R., Zeb, A., Lee, K. W., Rutten, B., & Kim, M. O. (2019). Ferulic Acid Rescues LPS-Induced Neurotoxicity via Modulation of the TLR4 Receptor in the Mouse Hippocampus. *Molecular Neurobiology*, 56(4), 2774–2790.
- 109) Chen, J., Lin, D., Zhang, C., Li, G., Zhang, N., Ruan, L., Yan, Q., Li, J., Yu, X., Xie, X., Pang, C., Cao, L., Pan, J., & Xu, Y. (2015). Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. *Metabolic Brain Disease*, 30(1), 129–136.
- 110) Liu, Y. M., Hu, C. Y., Shen, J. D., Wu, S. H., Li, Y. C., & Yi, L. T. (2017). Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. *Physiology & Behavior*, 169, 184–188.
- 111) Ren, Z., Zhang, R., Li, Y., Li, Y., Yang, Z., & Yang, H. (2017). Ferulic acid exerts

- neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(5), 1444–1456.
- 112) Lei, Y., Chen, J., Zhang, W., Fu, W., Wu, G., Wei, H., Wang, Q., & Ruan, J. (2012). In vivo investigation on the potential of galangin, kaempferol and myricetin for protection of D-galactose-induced cognitive impairment. *Food Chemistry*, 135(4), 2702–2707.
- 113) Liang, G., Shi, B., Luo, W., & Yang, J. (2015). The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 11, 18.
- 114) Johnson E. J. (2014). Role of lutein and zeaxanthin in visual and cognitive function throughout the lifespan. *Nutrition Reviews*, 72(9), 605–612.
- 115) Foti Cuzzola, V., Galuppo, M., Iori, R., De Nicola, G. R., Cassata, G., Giacoppo, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2013). Beneficial effects of (RS)-glucoraphanin on the tight junction dysfunction in a mouse model of restraint stress. *Life Sciences*, 93(7), 288–305.
- 116) Subedi, L., Cho, K., Park, Y. U., Choi, H. J., & Kim, S. Y. (2019). Sulforaphane-Enriched Broccoli Sprouts Pretreated by Pulsed Electric Fields Reduces Neuroinflammation and Ameliorates Scopolamine-Induced Amnesia in Mouse Brain through Its Antioxidant Ability via Nrf2-HO-1 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 3549274.
- 117) Ferreres, F., Fernandes, F., Oliveira, J. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade,

- P. B. (2009). Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(6), 1209–1220.
- 118) Zietz, M., Weckmüller, A., Schmidt, S., Rohn, S., Schreiner, M., Krumbein, A., & Kroh, L. W. (2010). Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2123–2130.
- 119) Bondonno, C. P., Croft, K. D., Ward, N., Considine, M. J., & Hodgson, J. M. (2015). Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. *Nutrition Reviews*, 73(4), 216–235.
- 120) Yang, I., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B., (2018). In vitro digestion with bile acids enhances the bioaccessibility of kale polyphenols. *Food & Function*, 9(2), 1235–1244.
- 121) Fiol, M., Adermann, S., Neugart, S., Rohn, S., Mügge, C., Schreiner, M., Krumbein, A., & Kroh, L.W (2012). Highly glycosylated and acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) — Structure–antioxidant activity relationship. *Food Research International*, 47(1), 80–89.
- 122) Olsen, H., Aaby, K., & Borge, G. I. (2009). Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2816–2825.

- 123) Gawlik-Dziki, U. (2008). Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 109(2), 393–401.
- 124) Li, J., Zhu, Z., & Gerendás, J. (2008). Effects of Nitrogen and Sulfur on Total Phenolics and Antioxidant Activity in Two Genotypes of Leaf Mustard. *Journal of Plant Nutrition*, 31(9), 1642–1655.
- 125) Neugart, S., Fiol, M., Schreiner, M., Rohn, S., Zrenner, R., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2013). Low and moderate photosynthetically active radiation affects the flavonol glycosides and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) dependent on two low temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB*, 72, 161–168.
- 126) Starzynska, A., Leja, M., & Mareczek, A. (2003). Physiological changes in the antioxidant system of broccoli flower buds senescing during short-term storage, related to temperature and packaging. *Plant Science*, 165, 1387–95.
- 127) Podsędek, A., Sosnowska D., Redzynia, M., & Koziolkiewicz, M. (2008). Effect of domestic cooking on the red cabbage hydrophilic antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(10), 1770–1777.
- 128) Cai, C., Miao, H., Qian, H., Yao, L., Wang, B., & Wang, Q. (2016). Effects of industrial pre-freezing processing and freezing handling on glucosinolates and antioxidant attributes in broccoli florets. *Food Chemistry*, 210, 451–456.
- 129) Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367–3387.

- 130) Bursać Kovačević, D., Maras, M., Barba, F. J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J. M., & Putnik, P. (2018). Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: A review. *Food Chemistry*, 268, 513–521.
- 131) Oniszczyk, A., & Olech, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction and LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*. *Industrial Crops and Products*, 83, 359–363.
- 132) Turturici, G., Sconzo, G., & Geraci, F. (2011). Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochemistry Research International*, 2011, 618127.
- 133) Gao, Z., Zhang, J., Li, L., Shen, L., Li, Q., Zou, Y., Du, X., & Zhao, Z. (2016). Heat shock proteins 27 and 70 contribute to the protection of Schisandrin B against d-galactosamine-induced liver injury in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(4), 373–378.
- 134) Shirato, K., Takanari, J., Koda, T., Sakurai, T., Ogasawara, J., Ohno, H., & Kizaki, T. (2018). A standardized extract of *Asparagus officinalis* stem prevents reduction in heat shock protein 70 expression in ultraviolet-B-irradiated normal human dermal fibroblasts: an in vitro study. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 23(1), 40.
- 135) Rokutan K. (2000). Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15 Suppl, D12–D19.
- 136) Tanaka, K., Namba, T., Arai, Y., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K., Nakai, A., & Mizushima, T. (2007). Genetic evidence for a protective role for

- heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23240–23252.
- 137) Duerschmied, D., & Bode, C. (2016). Hsp70 preventing thrombosis: benefit without burden?. *Cardiovascular Research*, 110(3), 291–292.
- 138) Lee, J. M., Lee, K. G., Choi, H. S., Kim, E. S., Keum, B., Seo, Y. S., Jeon, Y. T., Chun, H. J., Lee, H. S., Um, S. H., & Kim, C. D. (2018). Increased heat shock protein 70 expression attenuates pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 53(10-11), 1404–1410.
- 139) Uyeno, Y., Katayama, S., & Nakamura, S. (2014). Changes in mouse gastrointestinal microbial ecology with ingestion of kale. *Beneficial Microbes*, 5(3), 345–349.
- 140) Biagi, E., Candela, M., Turrone, S., Garagnani, P., Franceschi, C., & Brigidi, P. (2013). Ageing and gut microbes: perspectives for health maintenance and longevity. *Pharmacological Research*, 69(1), 11–20.
- 141) Cai, D., Zhao, S., Li, D., Chang, F., Tian, X., Huang, G., Zhu, Z., Liu, D., Dou, X., Li, S., Zhao, M., & Li, Q. (2016). Nutrient Intake Is Associated with Longevity Characterization by Metabolites and Element Profiles of Healthy Centenarians. *Nutrients*, 8(9), 564.
- 142) Bourassa, M. W., Alim, I., Bultman, S. J., & Ratan, R. R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health?. *Neuroscience Letters*, 625, 56–63.
- 143) Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic

regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(5), 355–367.

- 144) Szentirmai, É., Millican, N. S., Massie, A. R., & Kapás, L. (2019). Butyrate, a metabolite of intestinal bacteria, enhances sleep. *Scientific Reports*, 9(1), 7035.