

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00876

研究課題名(和文) 認知症に対する脂質栄養改善に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on improvement of lipid nutrition for dementia

研究代表者

宮澤 大介 (Miyazawa, Daisuke)

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：70434553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：無血清条件下で細胞の生存を検討したところ、分化誘導条件下においてはアラキドン酸(10 μM)に比べてDHA(10 μM)で細胞死に対する抑制効果が観察された。脂肪酸添加1日後に、A (0.5 μM)を添加し、細胞の生存について検討した。A 添加2～3日後に脂肪酸添加群で細胞の生存が上昇する傾向が観察された。

1%血清条件下で、DEX、dbcAMP非存在下、DEX、dbcAMPによる分化条件下、分化条件下+20 μM DHA存在下で小胞グルタミン酸トランスポーター2(VGLUT2)の発現を検討したところは分化6日目で、分化+DHAで未分化に対して有意に発現上昇が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系株化細胞であるNG108-15細胞を用いて無血清条件下やA の各種濃度について多価不飽和脂肪酸がいくつかの条件下で神経保護作用を示すかを検討しメカニズムを解明する。シナプス小胞は、神経伝達物質等を取り込み、シナプス間隙へ神経伝達物質等の放出を制御している。これらの発現や制御が様々な脳機能の制御や疾患との関わりが種々報告されている。シナプス小胞形成に関する因子の発現量について多価不飽和脂肪酸、特にDHAが影響を及ぼすのかを検討する。これらのメカニズムの解明の一端を担うことができると考えられる。ヒトの健康について脂肪酸に関する脂質栄養の観点から寄与することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Under serum-free conditions, DHA (10 μM) had an inhibitory effect on cell death as compared to arachidonic acid (10 μM) under differentiation-inducing conditions. One day after the addition of fatty acid, A (0.5 μM) was added, a tendency was observed that cell survival increased in the fatty acid-added group 2-3 days after the addition of A . Under 1% serum undifferentiation condition (the absence of DEX and dbcAMP), differentiation conditions, differentiation conditions +20 μM DHA, the expression of vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2) in differentiation+DHA was a significantly increased as compared to undifferentiation.

研究分野：脂質栄養学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 神経保護

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎える日本において健康寿命の延伸は大きな課題である。特に認知症は重要な社会の問題の一つとなっている。アルツハイマー型認知症ではアミロイド (A β) がオリゴマーを形成し、神経細胞のシナプスの機能を抑制したり、細胞死を誘導することで細胞の脱落を引き起こしたり、脳内で虚血状態が起きることで低酸素、低栄養状態が引き起こされ、病態が引き起こされることが想定されている。

多価不飽和脂肪酸にはリノール酸やアラキドン酸などの n-6 系列と リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの n-3 系列がある。脳の乾燥重量の半分は脂質であり、AA や DHA などの多価不飽和脂肪酸が多く存在している。これら多価不飽和脂肪酸は、脳機能に様々な役割を果たしていることが示されている。また申請者は、n-3 系脂肪酸を制限食を給餌したマウスでは脳内 DHA 量の減少がみられ、神経保護作用のある神経栄養因子である、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 量が減少することを示した。

また疫学的調査で多価不飽和脂肪酸の摂取と認知機能についての調査はいくつかあるものの多価不飽和脂肪酸の役割に関するメカニズムについての報告は多くはない。

2. 研究の目的

これまでの研究背景から多価不飽和脂肪酸の神経保護作用に関するメカニズムを検討することは重要であると考えられる。よって神経系株化細胞である NG108-15 細胞を用いて無血清条件下や A β の各種濃度について多価不飽和脂肪酸がいくつかの条件下で神経保護作用を示すかを検討しメカニズムを解明することを考えた。

シナプス小胞は、神経伝達物質等を取り込み、シナプス間隙へ神経伝達物質等の放出を制御している。これらの発現や制御が様々な脳機能の制御や疾患との関わりが種々報告されている。シナプス小胞形成に関する因子の発現量について多価不飽和脂肪酸、特に DHA が影響を及ぼすのかを検討することを考えた。

これらのメカニズムの解明の一端を担うことができると考えられる。ヒトの健康について脂肪酸に関する脂質栄養の観点から考察することに寄与できると考えた。

3. 研究の方法

神経系株化細胞である NG108-15 細胞を用いた。NG108-15 細胞はマウス神経芽細胞腫/ラットグリオーマ細胞のハイブリドームであり、dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) やデキサメタゾン (DEX) によって分化誘導を受ける。また各種神経伝達物質や神経栄養因子の受容体などを有するため、神経系のモデルとして各種解析に利用されている。

(1) 無血清条件下における多価不飽和脂肪酸の神経保護効果に添加濃度を複数用意し MTT アッセイによる細胞生存率から検討した。またこの時の細胞内情報伝達に関して p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)、p44/42 MAPK、stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化、protein kinase A (PKA)、protein kinase C (PKC) の活性について検討した。

(2) アミロイド添加による細胞死誘導の条件を検討後、多価不飽和脂肪酸の神経保護効果について MTT アッセイにより細胞生存率から検討した。

(3) 多価不飽和脂肪酸が、神経機能に関与するある因子として小胞グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1、VGLUT2) の発現量に及ぼす影響についてウエスタンブロットにより検討した。

4. 研究成果

(1) 無血清条件下で多価不飽和脂肪酸を添加し、細胞の生存について検討した。

dbcAMP、DEX による分化誘導条件下においてはアラキドン酸 (10 μ M) に比べて DHA (10 μ M) で細胞死に対する抑制効果が観察された。ただし、dbcAMP、DEX 非存在下では、両脂肪酸間に有意な差は見られなかった。また、50 μ M のアラキドン酸、DHA 添加では細胞の生存が低下した。

p38 MAPK (分化やアポトーシスに関与する)、p44/42 MAPK (細胞増殖等に関与する)、SAPK/JNK (分化、アポトーシス、神経系においてはエキソサイトーシスへの関与が報告されている) のリン酸化は dbcAMP、DEX による分化誘導刺激によって亢進した。しかし、脂肪酸の添加の有無や種類によってリン酸化に差は見られなかった。

PKA や PKC (神経の可塑性に関与) の活性は、dbcAMP、DEX による分化誘導刺激によって上昇した。しかし、脂肪酸の添加の有無や種類によって活性に差は見られなかった。

(2) 脂肪酸添加1日後に、A β 添加を添加し、A β 添加1~5日後の細胞の生存について検討した。脂肪酸濃度を 10 μ M、A β を 0.5 μ M で実施した。

A β 添加2~3日後に脂肪酸添加群で細胞の生存が上昇する傾向が観察された。しかし、A β 添加5日後には、脂肪酸添加群で細胞の生存が抑えられるという逆の傾向を示し、日数によって傾向が変わる可能性が示唆された。

(3) に1%血清条件下で DEX、dbcAMP 非存在下、DEX、dbcAMP による分化条件下、分化条件下 +

20 μ M DHA 存在下でシナプス小胞形成に関する因子について発現解析を行った。
まず DHA 添加により細胞の脂肪酸組成が変化を受けるのか検討した。DHA を添加することにより、有意に DHA の増加が見られた。

シナプス小胞膜タンパク質である Synaptophysin はシナプスのマーカーとしてシナプスの密度や神経細胞数の指標として用いられている。Synaptophysin は分化 5 日目で未分化に比べて発現上昇が見られたが、これは分化 + DHA で抑制傾向にあった。これは、細胞の分化日数を経時的に調べる必要があるかもしれない。

小胞グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1,2) の発現量を調べた。VGLUT1 は分化 5 日目、6 日目とも群間に顕著な差は見られなかった。一方、VGLUT2 は分化 6 日目で未分化に対して分化条件下で上昇傾向が観察され、分化 + DHA で未分化に対して有意に発現上昇が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Mizutani H, Nishimoto A, Hotta S, Ikemura K, Imai M, Miyazawa D, Ohta K, Ikeda Y, Maeda T, Yoshikawa M, Hiraku Y, Kawanishi S. | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Oxidative DNA Damage Induced by Pirarubicin, an Anthracycline Anticancer Agent, in the Presence of Copper(II). | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Res. | 6. 最初と最後の頁 2643-2648 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mizutani H, Hotta S, Nishimoto A, Ikemura K, Miyazawa D, Ikeda Y, Maeda T, Yoshikawa M, Hiraku Y, Kawanishi S. | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Pirarubicin, an Anthracycline Anticancer Agent, Induces Apoptosis Through Generation of Hydrogen Peroxide. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Res. | 6. 最初と最後の頁 6063 - 6069 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12054 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mizutani H, Hayashi Y, Hashimoto M, Imai M, Ichimaru Y, Kitamura Y, Ikemura K, Miyazawa D, Ohta K, Ikeda Y, Maeda T, Yoshikawa M, Hiraku Y, Kawanishi S. | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Acliarubicin, an Anthracycline: Role of Hydrogen Peroxide and Copper. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Res. | 6. 最初と最後の頁 3443-3451 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13490. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyazawa D, Ohara N, Yamada K, Yasui Y, Kitamori K, Saito Y, Usumi K, Nagata T, Nonogaki T, Hashimoto Y, Miyashiro Y, Homma S, Okuyama H. | 4. 巻 135 |
| 2. 論文標題 Dietary soybean oil, canola oil and partially-hydrogenated soybean oil affect testicular tissue and steroid hormone levels differently in the miniature pig. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Food Chem Toxicol. | 6. 最初と最後の頁 110927 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fct.2019.110927. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 大西浩之、宮澤大介、吉岡弘毅 | 4. 巻 62 |
| 2. 論文標題 糠漬けに伴うナスの物性変化と品種間差 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 大阪夕陽丘学園短期大学 紀要 | 6. 最初と最後の頁 53-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮澤大介、井上純奈、柳井琴音、田平知子、水谷秀樹、北森一哉、大原直樹 |
| 2. 発表標題 食餌脂肪酸が母親マウス脳の脂肪酸組成と神経栄養因子産生の及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 原田 有希, 中野 貴恵, 明村 あられ, 杉沢 奏音, 小栗 帆乃香, 宮澤 大介, 林 健志, 田平 知子 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を利用した転写因子MIBP1の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水谷 秀樹, 橋本 未耶美, 林 由佳, 宮澤 大介, 前田 徹, 平工 雄介, 川西 正祐 |
| 2. 発表標題 抗がん性抗生物質アクラルピシンによる酸化的DNA損傷とアポトーシス誘導 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|----------------------------|
| 1. 発表者名 宮澤大介 |
| 2. 発表標題 植物油と神経栄養因子産生 |
| 3. 学会等名 日本脂質栄養学会 第26回大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮澤大介、大西浩之、浅井香穂、岩田真由香、郭麻美、北森一哉、山田和代、大原直樹、奥山治美 |
| 2. 発表標題 親の食餌脂肪酸が乳仔マウス脳の神経栄養因子産生とプロテインキナーゼに及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本脂質栄養学会 第25回大会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山田和代、黒田詩織、後藤芹菜、大西浩之、宮澤大介、津嶋宏美、大久保剛、日比野英彦、大原直樹、奥山治美 |
| 2. 発表標題 2種のWistar系ラットに高脂肪食の及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本脂質栄養学会 第25回大会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮澤大介、大西浩之、浅井香穂、岩田真由香、郭麻美、北森一哉、山田和代、大原直樹、奥山治美 |
| 2. 発表標題 親の食餌脂肪酸が乳仔マウス脳のプロテインキナーゼに及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬剤師会東海支部 合同学術大会2016 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西川真衣、内藤由紀子、大原直樹、立松憲次郎、宮澤大介、奥山治美 |
| 2. 発表標題 カノーラ油毒性におけるレニン・アンギオテンシン系の関与と性差 |
| 3. 学会等名 カノーラ油毒性におけるレニン・アンギオテンシン系の関与と性差 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 古田汐里、石田康行、宮澤大介 |
| 2. 発表標題 数 μ lのヒト血清に含まれる多価不飽和脂肪酸成分の反応熱分解GCによる精密組成分析 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野友理香、横井直芽、小西紗矢;、紅露友梨樺、宮澤大介、林健志、田平知子 |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を利用した転写因子 MIBP1の機能解析 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大原直樹、西川真衣、立松憲次郎、内藤由紀子、宮澤大介、奥山治美 |
| 2. 発表標題 The target of canola oil toxicity in SHRSP and mechanisms underlying the toxicity |
| 3. 学会等名 日本薬理学会第93回年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 川瀬花恋、相川黎奈、有尾清加、宮崎知美、川端千穂、鈴木日菜子、宮澤大介、北森一哉、小崎康子 |
| 2. 発表標題 SHRSP5/Dmcrラットにおいて高脂肪食摂取により誘起される痛覚過敏：延髄の痛覚修飾機構が関与する可能性 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---|---------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 大西 浩之 (Ohnishi Hiroyuki) (90523316) | 北里大学・医療衛生学部・講師 (32607) | |