

令和元年6月15日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00882

研究課題名(和文) コレステロール酸化物が誘導するアルツハイマー病に対するビタミンEの抑制機構

研究課題名(英文) Mechanism of inhibition of oxysterol-induced Alzheimer's disease by vitamin E

研究代表者

野口 範子 (Noguchi, Noriko)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40198578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：24(S)-ヒドロキシコレステロール(24S-OHC)は、脳内のコレステロール代謝に重要であるが、アルツハイマー病との関係が注目される。24S-OHCは、小胞体に存在するエステル化酵素の作用を受けて、小胞体膜内に脂肪滴様構造を形成し、膜の破綻を招いて、シャペロンタンパク質の細胞質への流出を引き起こす。

ビタミンE同族体は側鎖の二重結合の有無により、トコトリエノール(Toc3)とトコフェロール(Toc)に分けられるが、24S-OHCによるシャペロン流出と神経細胞死はTocによってのみ抑制された。Tocの小胞体膜安定化効果が24S-OHCによる細胞死抑制に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本において、アルツハイマー病(AD)の発症原因の究明と予防方法の確立は喫緊の課題である。本研究により、脳特異的にコレステロールから産生される24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)が神経細胞死を誘導するメカニズムが解明された。ビタミンEのAD抑制効果に関する研究は数多く行われてきたが、明瞭な結論は得られていない。その理由として、8種類あるビタミンE同族体の構造の特性に注目して評価した研究が少ないことが考えられる。24S-OHCが誘導する神経細胞死を抑制するビタミンEの構造を明らかにした本研究の成果は、メカニズムに立脚したAD予防確立に貢献する。

研究成果の概要(英文)：While 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) plays an important role in cholesterol metabolism in the brain, its contribution in pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) has received attention. 24S-OHC was esterified by action of the enzyme at endoplasmic reticulum (ER) and caused formation of lipid droplet-like structure and disruption of ER membrane integrity, resulting in release of ER chaperones into cytosol. Vitamin homologues are divided into two group, tocotrienol (Toc3) and tocopherol (Toc), with and without double bonds at their side chain. The chaperone release and cell death induced by 24S-OHC were inhibited by Toc but not by Toc3. The critical effect of the side chain of vitamin E on ER membrane integrity and 24S-OHC-induced cell death was indicated.

研究分野：生化学

キーワード：オキシステロール コレステロール 神経細胞死 アルツハイマー病 ビタミンE 小胞体ストレス 脂肪滴 24S-ヒドロキシコレステロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは血液脳関門を通過できないため、脳内でグリア細胞がコレステロールを産生して神経細胞に供給している。脳内で過剰になったコレステロールは、神経細胞に特異的に発現している酵素 (CYP46A1) の作用により、血液脳関門を通過できる 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) に変換されて血液循環へ排出される。従って、24S-OHC は脳のコレステロール代謝に重要な役割を担っている。

一方、アルツハイマー病(AD)患者の血液や脳脊髄液には、健常人より高い濃度の 24S-OHC が検出され、24S-OHC と神経変性疾患発症との関係が注目されている。当研究室では、24S-OHC が濃度依存的に神経細胞死を誘導することを明らかにしてきた。

ビタミン E の AD 抑制効果に関する研究は数多く行われてきたが、明瞭な結論は得られていない。ビタミン E には構造がわずかに異なる 8 種類の同族体が存在する。それぞれの構造の特性に注目して評価した研究が少ないことが、ビタミン E の AD 抑制効果を明確にできない原因の一つになっていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、24S-OHC が誘導する神経細胞死に対する、ビタミン E 同族体の抑制効果を比較し、神経細胞死抑制に最適なビタミン E の混合比を提案するとともに、ビタミン E の細胞死抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を、8 種類の同族体のうちの 4 種類、 α -体、 γ -体のトコフェロール (Toc) と α -体、 γ -体のトコトリエノール (Toc3) について、それぞれ単独および様々な混合比で処理した。24S-OHC 誘導性神経細胞死への影響について、WST 法を用いて調べた。レチノイン酸(RA)処理により分化させた細胞の細胞死への抑制効果を評価した。活性酸素種と脂質過酸化物の産生については、それぞれを特異的に検出する蛍光プローブを用いて FACS で評価した。24S-OHC-脂肪酸エステル産生への影響は、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を用いて細胞内の 24S-OHC とそのエステル体を定量した。脂肪滴様構造形成への影響について、蛍光試薬(Nile Red)染色法や電子顕微鏡を用いて評価した。CaMKII のリン酸化や小胞体ストレス応答タンパク質の活性化は western blot 法により調べた。

4. 研究成果

(1) 24S-OHC 誘導性神経細胞死に対するビタミン E の抑制効果

24S-OHC で SH-SY5Y 細胞を刺激すると、ネクロトーシス様の細胞死が誘導される。当研究室では、 α -体の Toc (側鎖に二重結合がない) は 24S-OHC 誘導性細胞死を抑制するが、Toc3 (側鎖に二重結合がある) は抑制しないことを明らかにしていたが、本研究により、 γ -体についても同様の結果が得られた。細胞内に活性酸素種を発生させるクメンヒドロペルオキシド(CumOOH)による細胞死に対しては、 γ -Toc と γ -Toc3 のいずれも抑制効果を示した (図 1)。

RA で分化させた SH-SY5Y 細胞を 24S-OHC で処理すると、アポトーシスが誘導された。この細胞死を α -Toc は抑制するが α -Toc3 は抑制しないことが示された。活性酸素種と脂質過酸化物の産生は、CumOOH 刺激で検出されたが、24S-OHC 処理では見られなかった。以上の結果から、分化・未分化にかかわらず、24S-OHC は細胞に酸化ストレスを亢進することなく細胞死を誘導し、Toc は α -体・ γ -体共に細胞死を抑制するが、Toc3 は α -体・ γ -体共にその機能がないことが明らかとなった。Toc による 24S-OHC 誘導性細胞死の抑制は、ラジカル捕捉型抗酸化以外の機能によることが示唆された。

次に、細胞を様々な濃度比の Toc と Toc3 で処理した場合に、24S-OHC 誘導性神経細胞死がどの様に抑制されるか調べた。細胞死は Toc の濃度に依存して抑制され、Toc3 の影響はほとんど見られなかった。 α -Toc と γ -Toc の混合比の違いは、24S-OHC 誘導性神経細胞死抑制効果に影響しなかった。

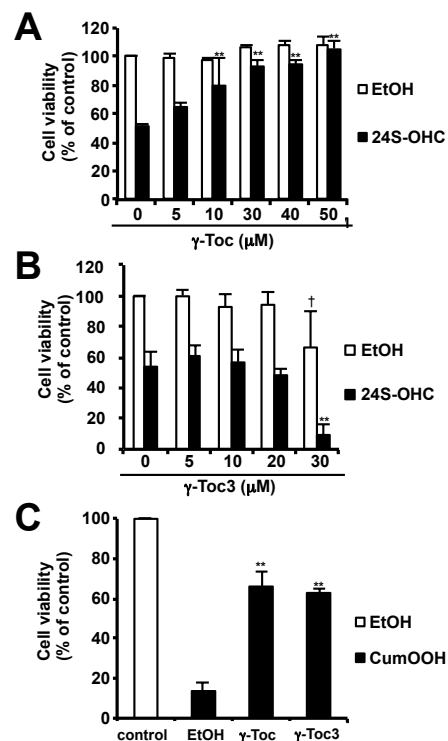


図1. 24S-OHCとcumene hydroperoxide (CumOOH) による神経細胞死に対する γ -Toc、 γ -Toc3の効果

(2) 24S-OHC の細胞内取り込みとエステル化へのビタミン E の影響

24S-OHC 処理後の細胞内 24S-OHC と 24S-OHC エステル体を GC-MS で定量し、これらに対する Toc の影響を解析した結果、影響しないことが明らかになった (図 2)。このことから、Toc の細胞死抑制は、細胞の 24S-OHC 取り込みやエステル化の抑制によるものではないことが明らかになった。

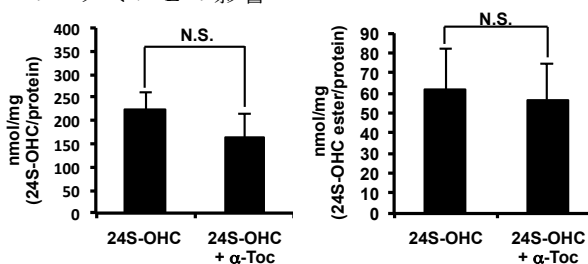


図2. 細胞内の24S-OHCとエステル体の濃度に対する α -Tocの影響 (mean \pm S.D. n=4, Student's t-test)

(3) 24S-OHC による脂肪滴様構造形成へのビタミン E の影響

中性脂質を染色する蛍光試薬 Nile Red で 24S-OHC 処理細胞内に脂肪滴様構造が検出されるが、Toc や Toc3 を処理しても減少することはない。この結果から、ビタミン E は 24S-OHC による脂肪滴様構造形成を抑制しないことがわかった (図 3)。電子顕微鏡を用いた観察により、24S-OHC による脂肪滴様構造は小胞体膜に形成される様子が捕らえられているが、その後、小胞体の膜の破綻が起こることもわかっている。Toc で処理した細胞では小胞体膜は破綻することなく正常に近い形状を保っていることがわかった。

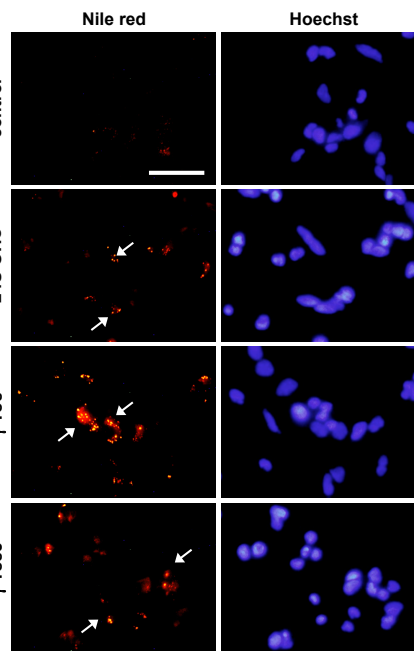


図3. 24S-OHC処理細胞内に観察される脂肪滴様構造に対する γ -Tocと γ -Toc3の影響

(4) 24S-OHC による CaMKII の活性化とビタミン E の影響

24S-OHC は RIPK1 のリン酸化を誘導することが示されていたが、これらは Toc も Toc3 も抑制しないことが明らかになった。24S-OHC は CaMKII のリン酸化を誘導することが新たにわかった。これに対して、Toc は抑制するが、Toc3 は抑制しないことが明らかになった。

(5) 24S-OHC による小胞体ストレスとビタミン E の影響

24S-OHC により小胞体ストレスの3つのセンサータンパク質は全て活性化されるが、Toc は部分的に抑制傾向を示すのみであった。また、小胞体ストレスのシグナルの下流にある細胞死誘導因子として知られる CHOP は、24S-OHC による細胞死に関係しないことがわかった。小胞体内腔に存在するシャペロンタンパク質の細胞質内への漏出が、細胞死誘導に深く関係することがわかった。24S-OHC は小胞体膜の破綻を引き起こし、その結果内腔のシャペロンが流出したと考えられる。このシャペロン流出を Toc は抑制するが、Toc3 は抑制しないことがわかった。Toc は Toc3 に比べて膜内での移動が制限され、膜の流動性を低下させることが知られている。Toc の小胞体膜安定化効果が 24S-OHC による細胞死抑制に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kimura Y., Asa M., Urano Y., Saito Y., Nishikawa K., Noguchi N., Tocopherol suppresses 24(S)-hydroxycholesterol-induced cell death via inhibition of CaMKII phosphorylation. *Biochimie*, 153, 203-209, 2018
DOI: 10.1016/j.biochi.2018.07.004. 査読あり
- ② Nakazawa T., Miyonoki Y., Urano Y., Uehara M., Saito Y., Noguchi N., Effect of vitamin E on 24(S)-hydroxycholesterol-induced necroptosis-like cell death and apoptosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 169:69-76, 2017
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.003. 査読あり
- ③ Kotani R., Urano Y., Sugimoto H., Noguchi N., Decrease of amyloid- β levels by curcumin derivative via modulation of amyloid- β protein precursor trafficking. *J. Alzheimer's Disease*, 56, 529-542, 2017
DOI: 10.3233/JAD-160794. 査読あり
- ④ Takabe W., Urano Y., Vo Ho D-K., Shibuya K., Tanno M., Kitagishi H., Fujimoto T., Noguchi N., Esterification of 24(S)-hydroxycholesterol induces formation of atypical lipid droplet-like structure leading to neuronal cell death. *J. Lipid Res.* 57, 2005-2014, 2016
DOI: 10.1194/jlr.M068775 査読あり

- ⑤ Shibuya K., Watanabe T., Urano Y., Takabe W., Noguchi N., Kitagishi H., Synthesis of 24(S)-hydroxycholesterol esters responsible for the induction of neuronal cell death. *Bioorgan. Med. Chem.*, 24:2559-2566, 2016
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.024. 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

- ① 木村勇輝、浦野泰臣、斎藤芳郎、野口範子、脂質が誘導する小胞体ストレスとビタミン E、第 30 回ビタミン E 研究会、2019
- ② 木村勇輝、浦野泰臣、西川喜代孝、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性細胞死に対するビタミン E の効果、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- ③ 高八美菜、浦野泰臣、杉本八郎、野口範子、Curcumin 誘導体 GT863 の A β 産生抑制機構の解明、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- ④ 浦野泰臣、野口範子、脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導における小胞体の関与、第 27 回日本 Cell death 学会学術集会、2018
- ⑤ 木村勇輝、浦野泰臣、野口範子、24S-ヒドロキシコレステロールが誘導する神経細胞死に対するビタミン E の抑制機構の解析、第 29 回ビタミン E 研究会、2018
- ⑥ 斎藤芳郎、中尾昌平、稲荷尚吾、三田雄一郎、野口範子、膵 β 細胞モデル MIN6 におけるセレン代謝とビタミン E の添加効果、第 29 回ビタミン E 研究会、2018
- ⑦ 木村勇輝、浦野泰臣、野口範子、24S-ヒドロキシコレステロールが誘導する神経細胞死に対するビタミン E 同族体の抑制作用のちがい、第 28 回ビタミン E 研究会、2017
- ⑧ Noguchi N., Urano Y., Vo Ho D-K., Araki H., and Kimura Y., ER stress plays important roles in 24S-hydroxycholesterol-induced neuronal cell death. 7th ENOR SYMPOSIUM, Oxysterols and sterol derivatives in health and disease, Brussels, 2017
- ⑨ Noguchi N., Regulation of cell signaling by lipid oxidation products and antioxidants, Gordon Research Conference-Oxidative Stress & Diseases, Italy, 2017
- ⑩ 浦野泰臣、野口範子、脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導機構の解析、第 59 回日本脂質生化学会、2017
- ⑪ 荒木宏文、浦野泰臣、Vo Ho D-K.、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死への小胞体ストレスの関与、第 90 回日本生化学会・第 40 回日本分子生物学会年会 (ConBio2017)、2017
- ⑫ 木村勇輝、浦野泰臣、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死に対するビタミン E の効果、第 90 回日本生化学会・第 40 回日本分子生物学会年会 (ConBio2017)、2017
- ⑬ 荒木宏文、浦野泰臣、Vo Ho D-K.、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死への IRE1 の関与、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

[図書] (計 2 件)

- ① Noguchi N., Action of Vitamin E Against Lipid Peroxidation and Cell Death, Niki E. (eds.) *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits*. Royal Society of Chemistry, Food Chemistry, Function and Analysis, pp. 165-172, 2018
- ② Saito Y. and Yoshida Y., Chemical Reactivity and Cellular Uptake of Tocopherols and Tocotrienols, Niki E. (eds.) *Vitamin E: Chemistry and Nutritional Benefits*. Royal Society of Chemistry, Food Chemistry, Function and Analysis, pp. 51-63, 2018

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：経鼻投与用医薬組成物
発明者：浦野泰臣、野口範子
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-222605
出願年：平成 29 年
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：細胞死抑制剤
発明者：浦野泰臣、野口範子、斎藤芳郎、山中一哲
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 6143435 号
取得年：平成 29 年
国内外の別：国内

[その他]

<http://systemlifescience.wixsite.com/system-life-science>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：斎藤 芳郎

ローマ字氏名：Yoshiro Saito

所属研究機関名：同志社大学、東北大学大学院大学

部局名：生命医科学部、薬学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70357060

研究分担者氏名：浦野 泰臣

ローマ字氏名：Yasuomi Urano

所属研究機関名：同志社大学

部局名：生命医科学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00546674