

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11004

研究課題名(和文)パーキンソン病の進行を抑える食品成分の解明：ドーパミン代謝の関係から

研究課題名(英文) Study of food components to suppress the progress of Parkinson's disease: from the metabolism of dopamine

研究代表者

中島 昭 (Nakashima, Akira)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：20180276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病においては中脳黒質のドーパミン神経細胞が選択的に障害されるが、その一つ理由としてドーパミン代謝産物であるドパール(3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde, DOPAL)の細胞内への過剰蓄積が想定されている。本研究ではカフェインを代表とするキサンチン誘導体だけでなく、食品成分に含まれるある種のフラボノイドが極めて強いドパール産生抑制効果を持っていることを発見した。また、NT5DC2という細胞内タンパク質がチロシン水酸化酵素の酵素活性調節を介して、ドーパミン合成・代謝に影響を与えている可能性を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分とパーキンソン病発症の関係については、コーヒーに含まれるカフェインが発症リスクを抑えることが疫学調査から報告されているが、メカニズムについては明確にされていない。本研究はミトコンドリア障害を誘発するドーパミン代謝産物ドパールの神経細胞内への過剰蓄積と、それを抑制することができる食品成分の解析を行い、ドーパミンの合成・代謝の視点から細胞障害メカニズムの解明を目指したものである。中脳黒質のドーパミン神経細胞の選択的な障害はパーキンソン病の特徴である。日常摂取する食品成分によるドパールの細胞内蓄積を抑制するメカニズムを明確にすることができれば、パーキンソン病発症の予防に有益となる。

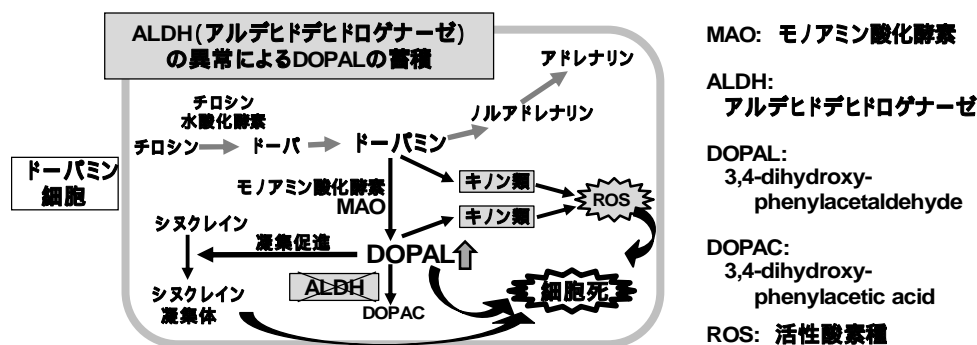
研究成果の概要(英文)：In Parkinson's disease, dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain are selectively impaired, and the one reason is assumed to be excessive accumulation of dopamine (DA) metabolite, 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL), in the cells. In this study, we found that not only xanthine derivatives such as caffeine but also certain flavonoids in food components have an extremely strong effect to suppress the production of DOPAL. We also discovered that the intracellular protein NT5DC2 may affect DA synthesis through the regulation of tyrosine hydroxylase activity.

研究分野：神経化学

キーワード：パーキンソン病、ドパール(DOPAL) キサンチン誘導体 ドーパミン代謝 NT5DC2

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患のパーキンソン病では、“選択的”にドーパミン産生細胞が障害を受ける。そのため、チロシン水酸化酵素から始まるドーパミン(カテコールアミン)合成が、細胞障害性物質であるキノン類の合成と関連して、パーキンソン病の発症と進行において非常に重要な役割を果たしていると考えられてきた。最近、モノアミン酸化酵素(MAO)によりドーパミンから産生される、細胞毒性が極めて高い中間代謝産物のドパール(3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde, DOPAL)が発見され、ミトコンドリア障害(アルデヒドデヒドロゲナーゼ ALDH の酵素活性低下)が起こると、ドパールが大量蓄積して神経細胞死が生じるとの重要な報告が行われた(下図: ドーパミン代謝)(Goldstein, J Neurochem. 2013)



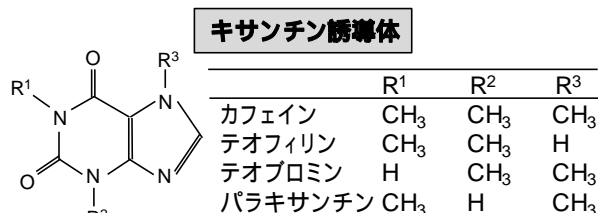
一方、コーヒー等に含まれるカフェインが、パーキンソン病の発症リスクを低下させることが疫学調査から報告されている(Ross, JAMA. 2000)。しかし、カフェインは、アデノシン A2A 受容体を介して神経細胞に影響を与えることや、炎症反応を抑制することが報告されているのみであり、「カフェインがなぜパーキンソン病の発症リスクを低下させるのか?」という「問い」に対しては明確な「答え」ができていない。

2. 研究の目的

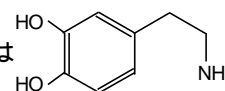
カフェイン等のキサンチン誘導体およびそれと類似構造を有する食品中の成分が、ドパールを始めとする細胞障害性ドーパミン代謝産物の産生に与える影響(代謝攪乱作用)を解析する。パーキンソン病の予防に有効な食品中の成分を解明することを目標としている。

加えて本研究では、キサンチン誘導体がカテコールアミンの構造に類似している点に着目しているが(下図: キサンチン誘導体構造)これ以外にも食品に含まれる類似構造の成分についても解析を行う。すなわち、これらの成分がドーパミン(カテコールアミン)合成経路や代謝経路に与える影響を俯瞰的に解析することで、ドパールを始めとするミトコンドリア障害物質の産生に与える影響を解明する。

神経変性疾患のパーキンソン病では、“選択的”にドーパミン産生細胞が障害を受ける理由が未だ十分に解明されていない理由は、現在知られている制御タンパク質(キナーゼやフォスファターゼなど)だけで、ドーパミン(カテコールアミン)合成経路や代謝経路を解析していることも一つの原因であると考えられる。その視点から、食品中の成分がドーパミン(カテコールアミン)合成経路や代謝経路に働く際の新規制御タンパク質にも着目して解析をする必要がある。



右の構造は **ドーパミン**
 キサンチン誘導体の構造はドーパミンに類似



3. 研究の方法

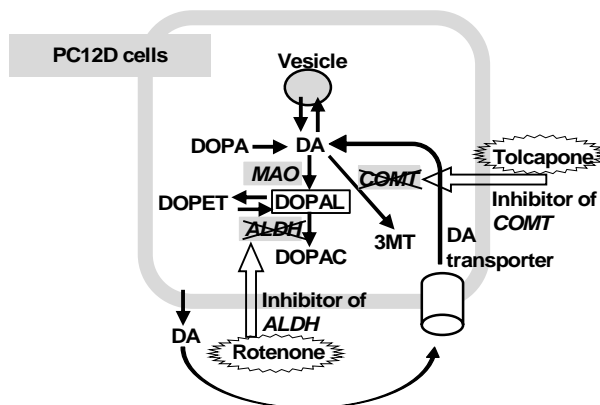
食品に含まれる成分が、カテコールアミン代謝経路に与える影響および細胞障害を減弱するメカニズムを、以下の方法を用いて解明した。

- 1) ドーパミン神経細胞障害モデル細胞の作製
- 2) 食品中成分の細胞障害モデルへ与える影響の解析
- 3) 細胞内カテコールアミン代謝の解析
- 4) 細胞内タンパク質の過剰蓄積および質的異常の解析

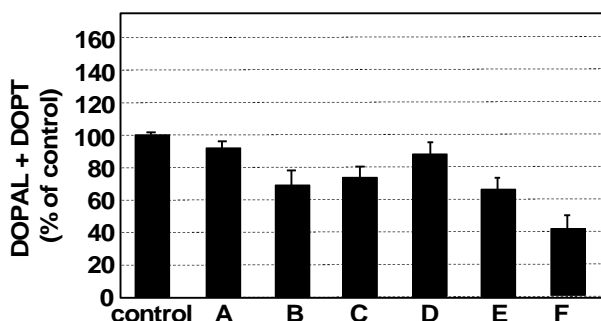
具体的には、ドパールの産生、・ドーパミンキノンの細胞内蓄積、および、シヌクレイン凝集を原因とする細胞障害について、細胞培養、細胞免疫染色、免疫沈降、ウェスタンブロット、HPLC、LC-MS/MS、RNAi などの方法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ラット副腎髄質由来 PC12D 細胞に、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の阻害薬であるロテノン (Rotenone) を添加した。さらに、ドーパミン代謝酵素のカテコール-O-メチル基転移酵素 (COMT) の阻害薬であるトルカポン (Tolcapone) を加えてドパールを蓄積させて、ミトコンドリア障害を誘発させることでドーパミン産生細胞の細胞障害モデル細胞を作製した(右図: 細胞障害モデル細胞の作製)。



この障害モデル細胞に、種々の食品成分に含まれるキサンチン誘導体およびその他の物質を添加して培養を継続することで、カテコールアミン(ドーパミン)合成経路およびその代謝経路に与える影響、特にミトコンドリア障害を誘発する物質であるドパールおよびドペット (3,4-dihydroxyphenylethanol, DOPET) の産生に与える影響を解析した。食品成分であるカフェインを代表とするキサンチン誘導体以外にも、抗酸化活性を有するある種のフラボノイドが極めて強いドパール産生抑制効果をすることを発見した(下図: ドパール産生抑制効果)。キサンチン誘導体やフラボノイドであっても、その構造の一部が変わるだけで、ドパールとドペットの産生抑制効果は大きく変化した。最も抑制効果が大きいものでは、産生を 60%抑制した(下図)。

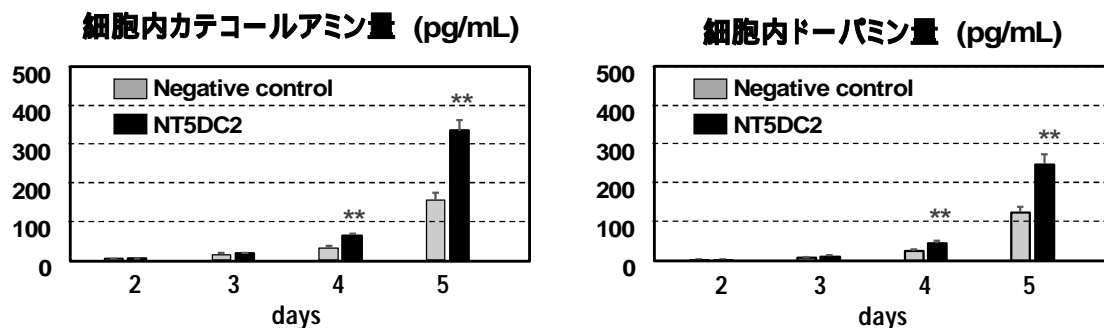


キサンチン誘導体およびフラボノイドをモデル細胞に濃度 50 μ M となるように添加して、3 時間反応後、medium 中のドパールとドペット量を HPLC で解析した。A から F はキサンチン誘導体およびフラボノイドであるが、投稿準備中のため成分名を A から F とした。図にはないが物質 F は更なる低濃度でも抑制効果を示した。

これまで、カフェインがパーキンソン病発症のリスクを抑制することが報告されているが、その分子メカニズムを解析した報告は多く存在しない。本研究は、強毒性を有するドパール産生抑制効果から解析を行い、キサンチン誘導体(カフェイン、テオフィリンなど)だけでなく、フラボノイドも強い産生抑制効果を有することを明らかにした。パーキンソン病と果物に多く含まれるフラボノイドの関連は、食生活の視点から有益な情報を提供することが出来ると考えられる。

(2) NT5DC2 という細胞内新規タンパク質がカテコールアミン合成系、特にチロシン水酸化酵素の Ser 残基のリン酸化制御を介して酵素活性調節に関わっている可能性を発見した。この発見はラット副腎髄質由来 PC12D 細胞の細胞破砕液を、抗チロシン水酸化酵素抗体と免疫沈降し

て共沈するタンパク質をトリプシン分解後、それを LC-MS/MS 解析・データベース解析を行うことによりなされた。そして、NT5DC2 はチロシン水酸化酵素と結合している可能性を推定した。さらに NT5DC2 を RNAi でダウンレギュレーションすることで、ドーパミン産生が増加することを明らかにした(下図)。すなわち、NT5DC2 はドーパミン産生に抑制的に働くタンパク質であることを明確にした(BBRC 2019, J Neural Trnasm 2020 に報告)。一方、上記のドパール産生抑制効果を有する食品成分が NT5DC2 に直接影響を与えるかどうかは現時点では明確に出来ていない。



本研究においてチロシン水酸化酵素と結合するタンパク質として NT5DC2 が同定されたが、当初 NT5DC2 がどのようなタンパク質であるかが分からなかった。文献検索の結果、近年行われている精神疾患の解明に用いられているゲノムワイド関連解析(GWAS)やエピジェネティクス解析ら、NT5DC2 は統合失調症・双極性障害・境界性パーソナリティ障害等の主要な危険因子であることが報告されていた(Ripke S et al, Nat Genet, 2013; van Hulzen KJE et al, Biol Psychiatry, 2017; Prados J et al, Genes Brain Behav, 2015)。本研究の目的はキサンチン誘導体によるカテコールアミン代謝の攪乱作用とパーキンソン病の関連であるが、もう少し大きな視点、すなわちカテコールアミンの合成の異常と深く関わった精神疾患との関連性(ドーパミン産生異常という視点で)からも、NT5DC2 の解析結果は有益な情報を提供できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Nakashima A, Yamaguchi H, Kodani Y, Kaneko YS, Kawata M, Nagasaki H, Nagatsu T, Ota A.	4. 巻 516(4)
2. 論文標題 Identification by nano-LC-MS/MS of NT5DC2 as a protein binding to tyrosine hydroxylase: Down-regulation of NT5DC2 by siRNA increases catecholamine synthesis in PC12D cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1060-1065
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.156.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nagatsu T, Nakashima A	4. 巻 3
2. 論文標題 Monoamine Oxidase Inhibitor (MAO-I)-Mediated Neuroprotection for Treating Parkinson's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroPsychopharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-319-56015-1	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nagatsu T, Nakashima A, Ichinose H, Kobayashi K.	4. 巻 126(4)
2. 論文標題 Human tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and in related disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neural Transm (Vienna)	6. 最初と最後の頁 397-409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-018-1903-3	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nakashima A, Yamaguchi H, Kond M, Furumura T, Kodani Y, Kaneko YS, Kawata M, Nagasaki H, Nagatsu N, Ota A	4. 巻 127
2. 論文標題 NT5DC2 affects the phosphorylation of tyrosine hydroxylase regulating its catalytic activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neural Transm (Vienna)	6. 最初と最後の頁 1631-1640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02236-5	査読の有無 有
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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------