

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05895

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能制御を指標とした新規生活習慣病予防食品の探索

研究課題名(英文) Exploration of new functional foods for prevention of lifestyle-related diseases, based on improvement of mitochondrial function

研究代表者

永井 竜児 (Nagai, Ryoji)

東海大学・農学部・教授

研究者番号：20315295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果として、まずリンゴの果皮抽出物からS-(2-succinyl)cysteineの生成抑制化合物の単離に成功しNMR解析で構造も同定された。

次に、細胞実験で2SC生成評価系モデル、及び生体試料中2SC測定系を確立し、動物実験さらにヒト検体中2SCの定量を可能にした。動物実験では、マウスの脳において週齢に依存し2SC量が増加することが確認され、脳機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が示された。また、ヒト血清中2SCと病態の関連性を検討した結果、腎機能の悪化に伴い、血清中2SC値が上昇し、さらに腎移植に伴って低下したことから、腎機能の悪化にミトコンドリア異常が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体における2SCの存在については徐々にその認識が広まりつつあるが、その測定についてはほとんど行われてこなかった。今回の研究により動物・ヒト由来の試料中2SCの測定が可能となり、内部標準物質を用いた質量分析装置での定量技術においては本研究の代表者グループの技術は突出していると自負している。また今回、加齢や加齢によりその機能が低下する腎機能との関連も明らかとなり、その測定の意義は今後より大きくなると確信しており、加齢性疾患の予防・進展にも役立つと考えられる。また、2SCはミトコンドリア機能異常からその生成量が増加するため、2SC測定が加齢性関連疾患の発症メカニズム解明に役立つ可能性も示された。

研究成果の概要(英文)：As the first outcome, a substance that has inhibitory effect of S-(2-succinyl)cysteine formation was purified from apple pericarp, and its structure was identified by NMR analysis. In the next step, a cell culture model and LS-MS/MS analysis were established to evaluate 2SC level, and they enabled quantitative analysis of 2SC in samples from animal and human. Animal experiment demonstrated that the 2SC level in brain is increased in accordance with age, indicating that 2SC may have some effect on brain function. We also examined the concentration of 2SC level in the serum of chronic kidney disease patients. The results showed that 2SC was significantly increased in accordance with the rising chronic kidney disease severity, and they were significantly decreased after transplantation. This study demonstrates that mitochondrial metabolic disorders contribute to impaired kidney function,

研究分野：病態生化学

キーワード：S-(2-succinyl)cysteine ミトコンドリア 翻訳後修飾 フマル酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な研究により、脂肪細胞は脂肪貯蔵の役割のみならず、様々な生理活性物質の分泌能を有し、生活習慣病の進展にも脂肪細胞の機能異常が重要な役割を果たしていることがわかってきた。研究代表者グループは TCA 回路の停滞によって過剰に蓄積したフマル酸が、システインのチオール基と反応して S-(2-succinyl)cysteine (2SC) が生成することで、脂肪細胞の機能異常をもたらす現象をはじめて報告した。また、研究代表者は生体試料中の測定が困難であった 2SC の、測定前処理法を検討し、液体クロマトグラフィー質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた組織や血清 2SC 濃度の正確な測定を可能とした。

2. 研究の目的

研究代表者は生活習慣病こそ正に「予防は治療に勝る」病であると考え、これまでの研究において 2SC の分析技術を生かし、脂肪細胞の培養系において、リンゴの果皮抽出物が 2SC の生成を抑制し、さらにアディポネクチンの分泌を改善することを確認した。本研究では、(1) 2SC の生成を抑制するリンゴ果皮中の化合物を同定し、(2) 2SC を抑制するメカニズムの解明、(3) 自然発症糖尿病マウスに同定化合物を摂取させた後の血中 2SC の低下、およびアディポネクチンの上昇効果を検証する、ことを主な目的とした。特に、2SC の生成メカニズムを解明することは (2)、(3) の解明にも深く関わるため上記以外に 2SC 生成メカニズムを明らかにすることを含め研究を行った。

3. 研究の方法

2020 年度

リンゴ果皮抽出物中の有効成分の同定

リンゴ果実の果皮を剥き、凍結乾燥後に破碎してクロロホルムと混和し、常温で 2 日間静置した。その後、濾過、減圧濃縮、凍結乾燥を行い粗抽出物とした。逆相カラムを備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて OD. 215 nm で測定した結果、いくつかの成分を検出することができた。そこで各画分を分取カラムで単離を行った。その後、NMR を用い単離された化合物の同定をした。

培養細胞を用いた新たな 2SC 生成評価モデルの探索

既に 3T3-L1 脂肪前駆細胞を培養すると、培養期間に応じて細胞内 S-(2-succinyl)cysteine (2SC) が増加することが確認されている。今回、2SC 生成評価モデルの確立において、脂肪細胞とマクロファージを共培養し、回収した細胞を塩酸加水分解して液体クロマトグラフィー質量分析装置で 2SC を測定した。

2021 年度

今後の 2SC 生成阻害効果の評価のため、加齢に伴って如何なる組織に 2SC が蓄積するかを検討するため、組織中 2SC 測定法の検討を行った。2SC 測定は脂質の影響を受けるため質量分析器での組織中 2SC の測定は困難であったが、前処理工程の改善を行い脱脂操作後に内部標準を添加して塩酸加水分解を行い質量分析装置によりマウス組織中 2SC および 2SC 生成にも深く関与している終末糖化産物 (AGEs) の測定を行った。

細胞培養系においては、これまでに生体環境を真似て、3T3-L1 線維芽細胞を脂肪細胞に分化し、RAW264 マクロファージと共培養を行った結果、2SC 量が増加することを確認している。この結果を受け、本培養系にて、2SC 生成機序解明を目的に、2SC 前駆体であるフマル酸量、及び 2SC 生成に関連すると予測されるサイトカインについての検討を行った

2022 年度

前年度の成果を受け、ヒト試料中 2SC 測定が可能と判断し、ヒトの血清試料を用いた実験を行った。動物実験と同様、質量分析装置を用いヒト血清の前処理方法を検討した後、2SC 及び AGEs を測定した。また、本結果と病態との関連を検討した。

4. 研究成果

2020 年度の研究では、脂肪細胞の培養系にマクロファージを共存させると 2SC の生成が増加すること、さらに既に 2SC 生成抑制機能が明らかとなっていたリンゴの果皮抽出物添加により本培養系においても 2SC 生成が抑制されることが確認でき、2SC 生成評価系モデルとした。これ以降の 2SC 生成評価には本実験系を用いた。

2021 年度は動物実験を行い、2SC 測定法確立及び加齢に伴う各組織中 2SC 蓄積の比較検討を行った。2SC 測定は脂質の影響を受けるため質量分析器での組織中 2SC の測定は困難であったが、前処理工程の改善を行い脱脂操作後に内部標準を添加して塩酸加水分解を行ったことで脂質量の高い脳中 2SC 測定も可能となった

組織中 2SC 量においては、肝臓、腎臓では変化が認められないが、脳ではマウスの週齢に依存して 2SC が蓄積することが確認された。また酸化依存的 AGEs である N⁻-(carboxymethyl)lysine は 2SC に比較してその含量は脳で 1/4、腎臓で 1/2 程度であるものの、加齢に伴って増加することが確認された。本結果より、2SC は脂肪組織のみならず、加齢に伴って脳に蓄積し、脳機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が高い。

2022 年度にはヒトにおける 2SC 変動を評価する目的で、ヒト血清を用いた質量分析装置での前処理・測定系を確立した。その後、腎機能と 2SC 値との横断研究を行った結果、腎機能の悪化に伴い、血清中 2SC 値の上昇が認められた。次に腎移植前後の縦断研究を行った結果では、高値であった 2SC は腎移植後、腎機能の改善に伴い有意に低下した。今回の研究からマウスのみならずヒトにおいても 2SC 測定が可能となり、加齢や病態の進行で増加が確認できたことから、2SC 生成の抑制は、加齢関連疾患の発症を低減できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Katsuta Nana, Takahashi Himeno, Nagai Mime, Sugawa Hikari, Nagai Ryoji	4. 巻 Apr;54(4)
2. 論文標題 Changes in S-(2-succinyl)cysteine and advanced glycation end-products levels in mouse tissues associated with aging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Amino Acid	6. 最初と最後の頁 653-661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-022-03130-y	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 Katsuta N, Nagai M, Saruwatari K, Nakamura M, Nagai R	4. 巻 2023 Mar;72(2)
2. 論文標題 Mitochondrial stress and glycooxidation increase with decreased kidney function.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 147-156.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.22-101	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 勝田奈那、高橋姫乃、永井美芽、須川日加里、永井竜児
2. 発表標題 加齢に伴うマウス組織中AGEsの変化
3. 学会等名 第23回糖化ストレス学会講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝田奈那、猿渡海史、永井美芽、中村道郎、永井竜児
2. 発表標題 ミトコンドリア機能障害に伴い生成される2SCと慢性腎臓病との関連
3. 学会等名 第32回腎とフリーラジカル研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝田奈那, 猿渡海史, 永井美芽, 中村道郎, 永井竜児
2. 発表標題 ミトコンドリアストレスに伴い生成する2SCと腎機能の関連性
3. 学会等名 第5回日本Uremic Toxin研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝田奈那, 高橋姫乃, 須川日加里, 永井美芽, 永井竜児
2. 発表標題 加齢に伴いマウス脳に蓄積する新規翻訳後修飾産物
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsuta N, Saruwatari K, Nagai M, Nakamura M, Nagai R
2. 発表標題 The evaluation of S-(2-succinyl)cysteine, a marker for mitochondrial dysfunction, in chronic kidney disease
3. 学会等名 The Society for Redox Biology and Medicine's 29th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋姫乃, 勝田奈那, 須川日加里, 永井竜児
2. 発表標題 炎症反応モデルにおける2SC生成メカニズムの解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋姫乃, 猿渡海史, 佐藤優, 栗林慎太郎, 勝田奈那, 須川日加里, 永井竜児
2. 発表標題 炎症因子による脂肪細胞中のフマル酸産生の変化
3. 学会等名 第32回日本メイラード学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagai R, Sugawa H, Yamaguchi H, Katsuta N, Tominaga Y, Kato S, Hiraoka Y, Kuribayashi S, Sato Y, Takahashi H, Nagai M
2. 発表標題 Detection of several AGEs for evaluation of oxidative stress and metabolic disorders in viv
3. 学会等名 The Society for Redox Biology and Medicine's 29th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 勝田奈那、永井竜児	4. 発行年 2022年
2. 出版社 (株)メディカルレビュー社	5. 総ページ数 74
3. 書名 アンチ・エイジング医学日本抗加齢医学会雑誌, Vol.18 No.2	

1. 著者名 白河潤一、勝田奈那、山中幹宏、大野礼一、須川日加里、永井竜児	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 379
3. 書名 グリケーションの制御とメイラード反応の利用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

食品生体調節学研究室
<http://www2.kuma.u-tokai.ac.jp/nagai2/>

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	山中 幹宏 (Yamanaka Mikihiro) (70767946)	東海大学・農学部・特任准教授 (32644)	2021年3月削除

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
---------	---------