

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15465

研究課題名（和文）新規エステル型オキシリピンの機能性評価による神経変性疾患の予防

研究課題名（英文）Detail analysis of esterified oxylipin; Exploring involvement in neurodegenerative disorders

研究代表者

乙木 百合香 (Otoki, Yurika)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：90812834

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず各脂質のエステル型オキシリピン（OXL）を網羅的に解析できる方法を構築した。本法を用いてアルツハイマー病（AD）者やモデルマウスの脳の解析を行なった。その結果、AD後期の脳において中性脂質に結合したDHA由来のOXLが健常者と比較して優位に減少していることが明らかになった。一方で、AD初期の脳ではいくつかのリン脂質に結合したOXLが、認知機能低下に影響を与えていることが分かった。これらのことから、エステル型OXLがAD発症及び、その病態変化に重要であることが分かった。そこで、いくつかのエステル型OXLの標準品を有機合成し、さらにその分析法を構築し、実際の脳での分析を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会が進む現在、アルツハイマー病などの神経変性疾患の予防は喫緊の課題であり、食品機能性成分による予防が国内外で盛んに検討されている。本研究では、DHAやEPA摂取による神経変性疾患発症予防メカニズムの解明を最終目的に、これらの実際の脳における代謝物であるOXLの存在形態および疾患への関与を明らかにした。本研究結果により、闇雲にn-3系多価不飽和脂肪酸を摂取するのではなく、より効率的な摂取方法を講じることができると期待される。食品からのn-3系多価不飽和脂肪酸の摂取による神経変性疾患予防への期待は大きく、本研究の社会的意義と波及性は大きい。

研究成果の概要（英文）：First, we developed the method that can comprehensively analyze the esterified oxylipin (OXL) of each lipid including neutral lipid and phospholipid. Using this method, esterified OXL in brains from Alzheimer's disease (AD) patients and model mice was analyzed. As a result, phospholipid-derived esterified OXL may be involved in cognitive decline in the onset of AD. Furthermore, esterified OXL (particularly epoxide) derived from neutral lipid was significantly reduced in the late AD brain as compared with the healthy brain. Therefore, it was suggested that esterified OXL be closely related to the AD onset and its pathological change. Then, we organically synthesized several esterified OXL standards, developed those direct analysis method, and confirmed that esterified OXLs certainly exist in the brain.

研究分野：食品科学

キーワード：オキシリピン アルツハイマー病 中性脂質 リン脂質 n-3系多価不飽和脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む現在、認知症などの神経変性疾患の予防は喫緊の課題であり、食品機能性成分による予防法の開発が国内外で盛んに検討されている。アルツハイマー病 (AD) などの神経変性疾患の予防に有効と考えられる食品機能性成分として、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの n-3 系多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が挙げられるが、摂取されたこれらの一部はオキシリピン (OXL; 酸化 PUFA) へと代謝され、脳内で神経保護作用を発揮すると考えられている。従来 OXL は遊離型として存在し、種々の機能性を発揮していると考えられてきたが、我々はこれまで脳中 OXL の大半 (~90%) がエステル型 OXL (脂質に結合した OXL) として存在している可能性を見出した。さらに虚血状態 (認知症患者の脳は虚血状態にあると言われている) のラット脳では、DHA 由来のエステル型 OXL が特異的に減少していることを明らかにし、DHA の神経保護作用メカニズムの解明には、新たな代謝物であるエステル型 OXL が関与していると考えられた。また我々独自の極めて重要な知見として、実際にヒト脳を扱った試験でも、アルツハイマー病においてエステル型 OXL が減少している可能性を見出した。こういった背景から、神経変性疾患におけるエステル型 OXL の存在 (変動) 量の精密な把握と機能解明は、DHA や EPA などの PUFA の生体内での活性本体とその機能を解明に極めて重要であると考えられる (図 1)。現在、神経変性疾患の治療は薬剤をもってしてもなお難しい状態である。食品からの DHA 摂取による神経変性疾患予防への期待は大きく、本研究の社会的意義と波及性は大きい。

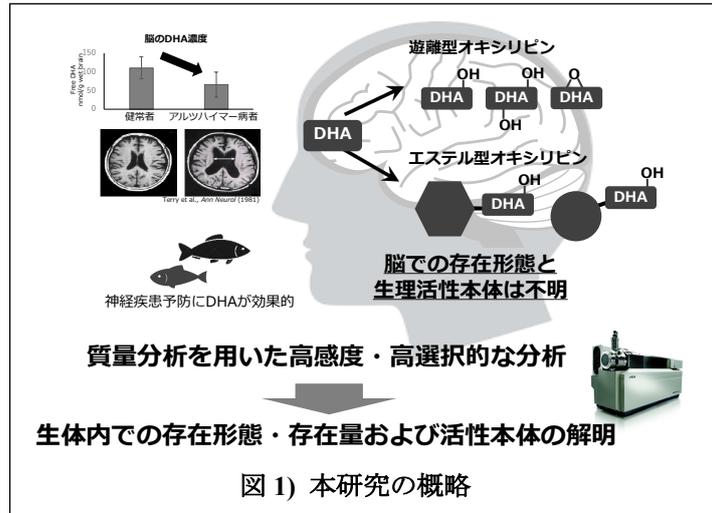


図 1) 本研究の概略

2. 研究の目的

これまででエステル型 OXL の精密な分析法は構築されておらず、その存在形態 (どういった脂質にエステル結合しているか) や、疾患との関わりはほとんど解明されていない。そこで、本研究では、エステル型 OXL の存在形態と神経変性疾患への関与を明らかにすることを目指した。本研究成果は、神経変性疾患の発症メカニズムの解明や DHA や EPA 摂取による疾患発症の予防に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) エステル型 OXL の網羅的定量法の構築

エステル型 OXL の研究が進んでいなかった理由の一つとして、その分析の困難さが挙げられる。エステル型 OXL は分子種 (異性体含め百種類以上) および、結合する脂質クラスを考慮すると、その種類は膨大になり高精度な分析は難しい。そこで、まず本研究では、エステル型 OXL の網羅的解析法の構築を行った。エステル型 OXL として、リン脂質 (PL) または中性脂質 (NL; トリグリセリドとコレステロールエステルを含む) に結合した OXL (それぞれ PL-OXL、NL-OXL) を対象とした。まず、Folch 法により脳の総脂質を抽出し、PL-OXL、NL-OXL および遊離型 OXL を分画できる条件を決定した (図 2)。PL-OXL および NL-OXL を含む画分をアルカリ加水分解処理し、得られた OXL を LC-MS/MS で測定することで、PL-OXL、NL-OXL を定量した。また、遊離型 OXL を含む画分も同様に OXL を LC-MS/MS で測定した。

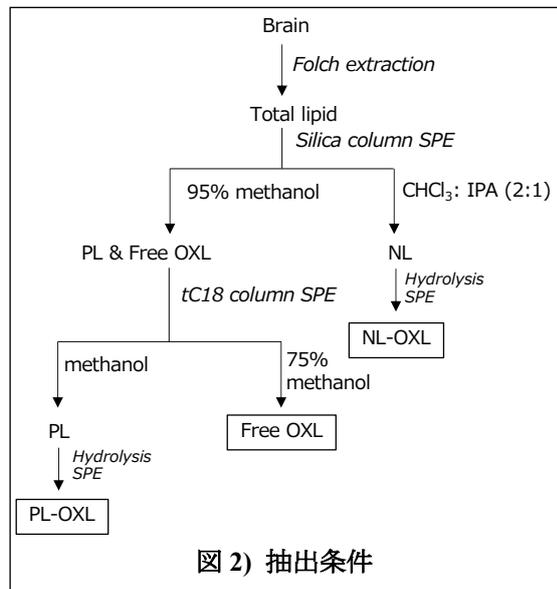


図 2) 抽出条件

## (2) ヒトAD者およびADモデルマウスの脳中エステル型OXLの解明

(1) で構築された方法を用いて各種生体サンプル（ヒトAD者やADモデルマウスの脳）の解析を行なった。ヒトサンプルに関しては、ヒトAD者と健常者の前頭葉を用いた。モデルマウスに関しては7ヶ月齢のADモデルマウスおよび野生型（C57BL/6J, n=17）マウスをY字迷路試験にて認知機能を評価した後、脳を回収し、分析に用いた。

## (3) エステル型OXLの直接定量法の構築

PL-OXLとして、Phosphatidylcholine (PC) に結合したDHA由来のヒドロペルオキシド (hydroperoxyl docosahexaenoic acid; HpDHE) を対象とし、マウス脳の解析を行なった。なお、PC-HpDHEのMS/MSには、ヒドロペルオキシ基の位置に特異的に生じるプロダクトイオンを用いた仮想Multiple Reaction Monitoring (MRM) モードを用いた。NL-OXLに関しては、コレステロール(Chl)にエステル結合したDHA由来のエポキシド(epoxydocosapentaenoic acid; EpDPE)を対象に直接分析法を構築した。まず、DHAをm-chloroperbenzoic acid存在下で反応し、合成したEpDPEを、コレステロールにエステル化し標準品を得、順相カラムを用いてLC-MS/MSにて分析した。

## 4. 研究成果

### (1) エステル型OXLの網羅的定量法の構築

本研究では、まず各脂質のエステル型OXL (NL-OXL, PL-OXL) を網羅的に解析できる方法を構築した。固相抽出を用いて、精製されたそれぞれのPLおよびNLを含む画分を精製できる条件を決定し(図2)、それぞれの画分を加水分解することでNL-OXL、PL-OXLを得た。なお、図3に示すようにそれぞれのNL、PL画分に遊離型OXLがコンタミネーションしていないことが確認された。また、塩基条件下で分解するプロスタグランジン類を除いた62分子種(エポキシド類、ヒドロキシ類、ロイコトリエン類を含む)のエステル型OXLを高精度に分析できることが確認された。以って、エステル型OXLの網羅的解析法が構築された。

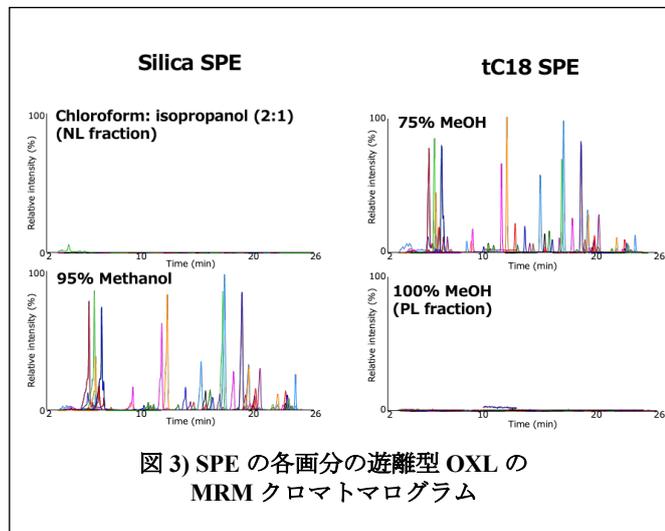


図3) SPEの各画分の遊離型OXLのMRMクロマトグラム

## (2) ヒトAD者およびADモデルマウスの脳中エステル型OXLの解明

AD(後期)者の脳においてPL-OXLおよび遊離型OXLは健常者と比較していずれのOXLも差がなかったのに対し、NLに結合したEpDPEが健常者と比較して優位に減少していることが明らかになった。なお、我々は虚血状態(認知症患者の脳は虚血状態にあると言われている)のラット脳において、エステル型EpDPEが特異的に減少していることを明らかにしている。遊離型EpDPEは、炎症収束作用を有することや、脳においてニューロンの発達に関与することが知られている。そのため、AD者の脳においてEpDPEのターンオーバーにNLが関与していることや、EpDPEがNLにエステル結合し、生理活性が変化することでAD病態に影響を与えている可能性が考えられた。

次いでAD病態初期のADモデルマウスの脳中OXLを解析し、エステル型OXLまたは遊離型OXLをそれぞれ説明変数に部分最小二乗法(PLS)回帰を行ったところ、PL-OXLを説明変数とすると、認知機能を予測できるモデルが得られた(図4)。PL-OXLのPLS回帰モデルの回帰係数を比較したところ、リポキシゲナーゼ由来の多くのOXL分子種が正、シトクロムP450(CYP)由来のものが負の値となり、それぞれが認知機能に対して正と負に影響すると考えられた。一般的に、LOX由来OXLは炎症性作用、CYP由来OXLは抗炎症作用や神経細胞の発達促進作用が知られていることから、これらがPLにエステル結合することで活性が変化し、認知機能に影響を与えている可能性が考えられた。

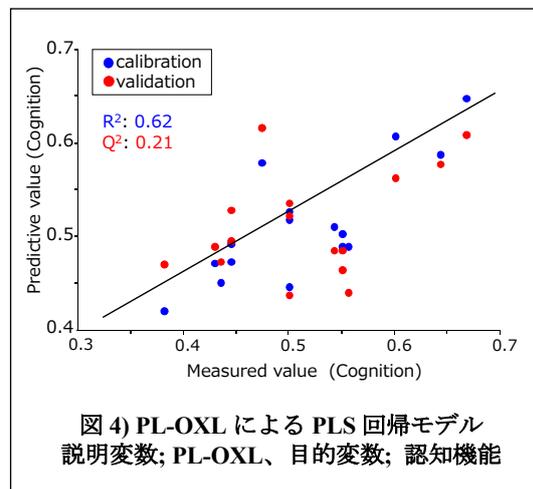
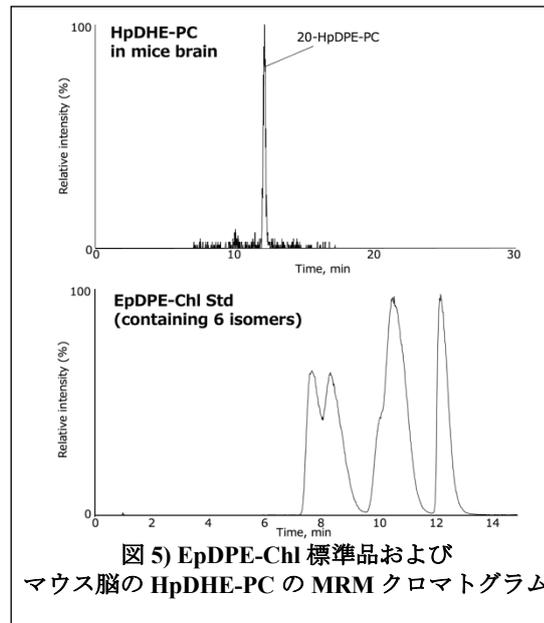


図4) PL-OXLによるPLS回帰モデル  
説明変数; PL-OXL、目的変数; 認知機能

### (3) エステル型 OXL の直接定量法の構築

図 5 に示すように脳中 PC-HpDHE を解析したところ、高感度に検出することができた。このことから確かに DHA 由来の PL-OXL が脳に確かに存在することが確認され、生理作用を担っている可能性が考えられた。Chl-EpDPE に関しては、合成した標準品の LC-MS/MS 法が構築された (図 5)。今後、本法を用いてさらに実際の脳におけるエステル型 OXL の機能解析が期待される。

研究では、DHA や EPA 摂取による神経変性疾患発症予防メカニズムの解明を最終目的に、これらの実際の脳における代謝物である OXL の存在形態および疾患への関与を明らかにした。本研究成果により、闇雲に n-3 系 PUFA を摂取するのではなく、より効率的な摂取方法 (例えば PL に結合した OXL として摂取するなど) を講じることができると期待される。



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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 J.E. Norman, H.H. Aung, Y. Otoki, Z. Zhang, A.Y. Taha, J.C. Rutledge	4. 巻 154
2. 論文標題 A single meal has the potential to alter brain oxylinpin content.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids	6. 最初と最後の頁 1020632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plefa.2020.102062	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 該当する

1. 著者名 Y. Hasegawa, Y. Otoki, S. McClorry, L.C. Coates, R.L. Lombardi, A.Y. Taha, C.M. Slupsky	4. 巻 3
2. 論文標題 Optimization of a method for the simultaneous extraction of polar and non-polar metabolites, DNA, RNA, small RNA, and protein from a single small tissue sample	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Protoc.	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mps3030061	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 乙木百合香、加藤俊治、仲川清隆、Ameer Y. Taha
2. 発表標題 脳虚血モデルラットにおけるエステル型オキシリピンの解析とその機能解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	University of California, Davis			