

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580168

研究課題名(和文) トコトリエノールによるパーキンソン病モデル細胞の保護作用機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on cytoprotective effects of tocotorienol in a cellular Parkinson's disease model

研究代表者

松浦 達也 (MATSURA, Tatsuya)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00199746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トコトリエノール(T3)のパーキンソン病(PD)モデル細胞およびPDモデルマウスに対する保護効果とその作用機序を検討した。

PDモデル細胞では各T3同族体が細胞保護効果を示した。T3の細胞保護機序として、PI3K/Akt経路の活性化が認められた。さらに、上流分子としてエストロゲン受容体(ER)を同定し、T3のERへの結合を確認した。また、PDモデルマウスを用いてT3がPD関連症状を軽減することを明らかにした。

以上の結果から、T3はPDモデル細胞およびPDモデルマウスにおいてER/PI3K/Aktシグナル伝達経路を介した細胞保護機能を有していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the cytoprotective effects of tocotrienol (T3) in cellular and murine Parkinson's disease (PD) models. All T3 homologues exerted cytoprotective effects via activation of PI3K/Akt signaling pathway in a cellular PD model. We also identified estrogen receptor (ER) beta as an upstream mediator of PI3K/Akt signaling and demonstrated the direct binding of T3 to ER beta in vitro. Furthermore, we revealed that T3 treatment relieved PD-related symptoms in PD model mice. Our data have demonstrated that T3 elicits the cytoprotective effects via ER beta/PI3K/Akt signaling pathway in cellular and murine PD models.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸科学・食品科学

キーワード：トコトリエノール パーキンソン病 シヌクレイン 非抗酸化作用 シグナル伝達 カベオリン

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は振戦、無動、筋強剛などの運動症状を伴う神経変性疾患の一つで、中年以降の発症が多い。治療としては主にドーパミン補充療法が行われているが、少子高齢化社会を迎え、PD 患者が増加することが予測され、PD 発症をいかに予防するかが重要な課題となっている。

PD の病態には酸化ストレスが関与することが報告されており、PD 患者の食事栄養成分の疫学調査によると、ビタミン E 欠乏は PD 発症リスクを高めることが分かっている。しかしながら、各種抗酸化剤やαトコフェロール (T) による PD 発症予防や治療の試みは、必ずしも一定の効果が得られていない。このことより、T 以外のビタミン E による抗酸化作用以外のメカニズムが重要である可能性が示唆される。そこで、本研究では神経保護作用が報告されている (Khanna S, et al., J Neurochem 98:1474-1486, 2006) ビタミン E 同族体のトコトリエノール (T3) に注目した。

2. 研究の目的

本研究は、PD モデル細胞系を用いて、T3 の抗 PD 作用機序を解明し、ビタミン E (特に T3) 摂取による PD 発症予防の可能性を検討することを目的とする。上述したように T3 の神経保護作用は報告されているが、T3 の抗 PD 作用を含めた神経保護作用の標的分子は同定されていない。そこで、T3 による細胞保護効果が MAPKs (Erk, p38, JNK) や PI3K などの細胞内シグナル伝達系を介するかどうかを検討する。関与するシグナル伝達系が推定された場合、この経路のどこに T3 が作用するかを詳細に解析し、T3 の標的分子を明らかにする。さらに、細胞レベルにとどまらず、PD モデルマウスにおける個体レベルでの T3 保護効果を検討する。

本研究により、T3 の標的分子を同定することが出来れば、食品成分に限らず、より効果的な化学物質を合成することも可能となり、本研究の成果は予防医学に貢献できるものとする。

3. 研究の方法

PD 細胞として、実際の PD 時に見られるようにシヌクレイン (α-syn) 過剰発現によって内因性カテコールアミン依存性に緩徐に細胞死を誘導することができる臨床病態に即したモデル細胞系 (PC12-α-syn-TetOFF) あるいは従来から用いられている SH-SY5Y 細胞における MPP+ 投与モデルを用いた。PD モデル細胞を用い、α-, β-, γ-, δ-T3 の細胞保護効果を検討した。また、DNA アレイ、抗体アレイの結果を参考にして、細胞内シグナル伝達を中心とした T3 の細胞保護機序を検討した。また、マウスに MPTP を投与する PD 動物モデルを用い、T3 の抗 PD 効果を行動的に検討した。

4. 研究成果

PC12-α-syn-TetOFF細胞において、100 pM ~ 1 μM 程度の T3 が有意に細胞保護効果を示した (データ未提示)。SH-SY5Y 細胞モデルでは、10 nM ~ 1 μM の各 T3 が細胞保護効果を示したが、α-, β-, γ-, δ-T3 の細胞保護効果が相対的に優れていた (図 1)。

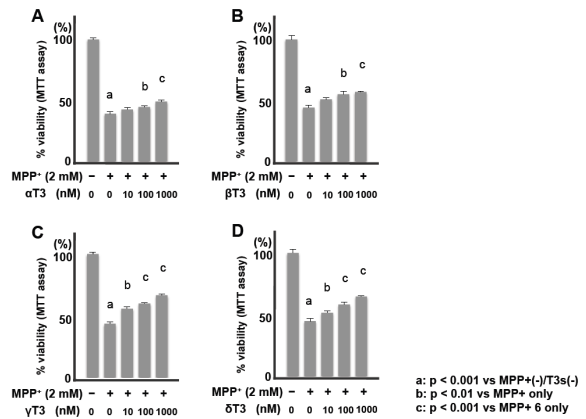


図 1. SH-SY5Y 細胞 MPP+ 毒性に対する T3 の保護効果

また、いずれの T3 同族体も使用した濃度においては PD モデル細胞に認められた過酸化脂質の増加を抑制しなかった (データ未提示)。DNA アレイ、抗体アレイを行い、その結果から T3 による PI3K/Akt 経路の活性化が示唆された。T3 投与により Akt のリン酸化が確認され (図 2)、T3 による細胞保護効果は PI3K 阻害剤の前投与により阻害された (図 3)。

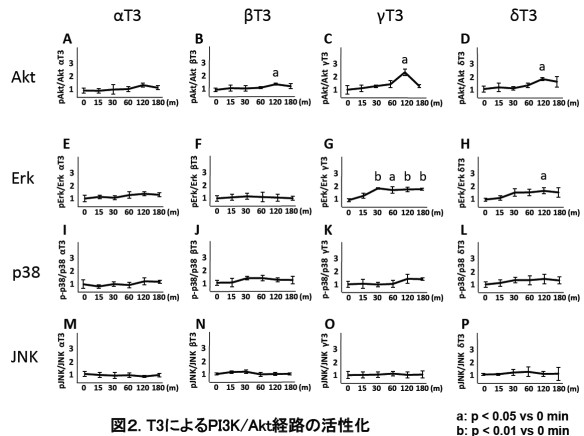


図 2. T3 による PI3K/Akt 経路の活性化

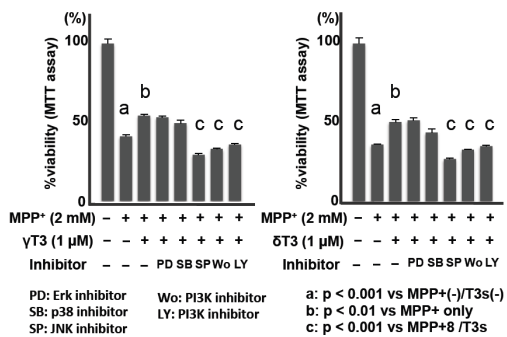


図 3. PI3K/Akt シグナルの阻害により T3 による保護効果が抑制される

またエストロゲン受容体阻害により T3 による細胞保護効果が抑制されたことから、PI3K/Akt 関連シグナルの上流分子としてエストロゲン受容体 (ER) の関与が考えられた

(図4)

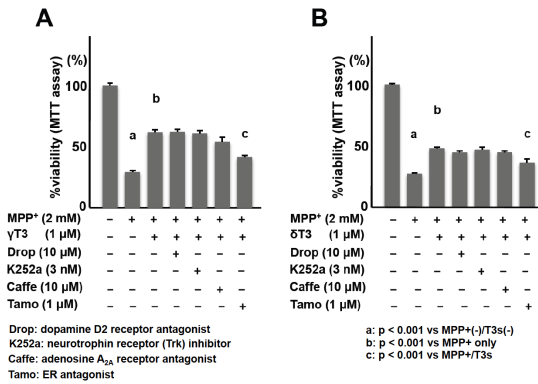


図4. ER阻害剤はT3による細胞保護効果を抑制する

siRNAを用いた検討から上流分子としてERを同定した(図5)

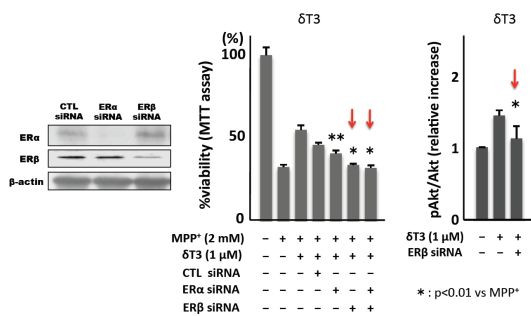


図5. ERβのノックダウンはT3による細胞保護効果およびPI3K/Aktシグナル活性化を抑制する

T3およびトリチウムラベルしたエストロジオールのERへの結合競合実験により、T3のERへの結合が確認された(データ未提示)。ERを介したシグナルはカベオラ形成と深く関連していることが示唆されている。カベオラ形成がT3/ERβを介した細胞保護効果にどのように影響するのかを検討した。カベオリンをノックダウンすることによりT3/ERによる細胞保護効果が減弱したことから、ERが細胞内に刺激を伝達する際にカベオラ形成が重要な役割を果たしていることが示唆された(データ未提示)。さらにMPTP誘発PDモデルマウスを用いてT3を中心とするビタミンEの効果を検討した結果、T<sub>1</sub>やT<sub>2</sub>に比べてT<sub>3</sub>がPD関連症状をより軽減することが示された。また、ER阻害剤であるタモキシフェンの共投与によりT<sub>3</sub>のPD抑制効果が減弱した(図6)

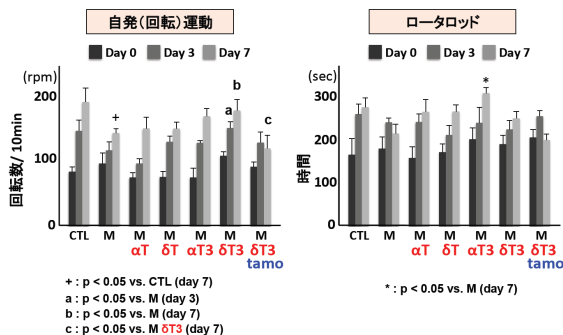


図6. エストロゲン受容体に関連したT3の抗PD効果

以上の結果から、T3はPDモデル細胞およびPDモデルマウスにおいて抗酸化能以外にER/PI3K/Aktシグナル伝達経路を介した細胞保護機能を有していると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Teraoka M, Nakaso K, Kusumoto C, Katano S, Tajima N, Yamashita A, Zushi T, Ito S and Matsura T. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against α-synuclein-related toxicity in catecholaminergic PC12 cells. J. Clin. Biochem. Nutr. 査読有, Vol.51, 2012, 122-127. DOI:10.3164/jcbn.D-11-00030.

Nakaso K, Tajima N, Ito S, Teraoka M, Yamashita A, Horikoshi Y, Kikuchi D, Mochida S, Nakashima K and Matsura T. Dopamine-mediated oxidation of methionine 127 in α-synuclein causes cytotoxicity and oligomerization of α-synuclein. PLOS ONE. 査読有, Vol.8, 2013, e55068, DOI:10.1371/journal.pone.0055068.

Nakaso K, Tajima N, Horikoshi Y, Nakasone M, Hanaki T, Kamisaki K and Matsura T. The estrogen receptor β-PI3K/Akt pathway mediates the cytoprotective effects of tocotrienol in a cellular Parkinson's disease model. BBA in press.

[学会発表](計10件)

K. Nakaso, N. Tajima, A. Yamashita, M. Teraoka, T. Zushi, S. Ito, T. Matsura Oxidative modification of alpha-synuclein in catecholaminergic cells, SfN 41<sup>st</sup> Annual Meeting Neuroscience 2011, Washington DC, November 12-16, 2011.

中曾一裕、田島奈緒子、山下敦、関子哲平、寺岡麻梨、楠本智章、松浦達也、パーキンソン病モデル細胞における細胞内シグナル伝達を介したトコトリエノールの細胞保護効果、日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月4日~5日、広島市、安田女子大学

松浦達也、紹介講演 トコトリエノールによるパーキンソン病モデル細胞保護効果、第331回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2011年7月6日、名古屋市、名古屋学芸大学

中曾一裕、田島奈緒子、山下敦、寺岡麻梨、関子哲平、松浦達也、細胞内シグナル伝達を介したトコトリエノールの細胞保護効果—パーキンソン病モデル細胞

を用いた検討一、第 8 回日本トコトリエノール研究会、2011 年 10 月 4 日、東京、THE GRAND HALL

中曽一裕、田島奈緒子、山下 敦、寺岡麻梨、岡子哲平、松浦達也、エストロゲン受容体ノカベオラからのシグナルを介したトコトリエノールのパーキンソン病モデル細胞保護効果、第 23 回ビタミン E 研究会、2012 年 1 月 27 日～28 日、東京、ホテル JAL シティ田町

中曽一裕、田島奈緒子、寺岡麻梨、岡子哲平、山下 敦、松浦達也、エストロゲン受容体ノカベオラ形成からのシグナル伝達を介したトコトリエノールの細胞保護効果～パーキンソン病モデル細胞における検討～、日本ビタミン学会第 64 回大会、2012 年 6 月 22 日～23 日、岐阜市、長良川国際会議場

中曽一裕、松浦達也、抗酸化能とは独立したトコトリエノールの細胞保護効果～パーキンソン病モデル細胞を用いた検討～、第 15 回 Vitamin E Update Forum、2012 年 8 月 26 日、東京、如水会館

中曽一裕、田島奈緒子、堀越洋輔、仲宗根正人、小池泰介、松浦達也、トコトリエノールの抗パーキンソン病効果-モデル細胞、モデル動物を用いた検討-、日本ビタミン学会第 65 回大会、2013 年 5 月 17 日～18 日、東京、一橋大学 一橋講堂  
松浦達也、田島奈緒子、堀越洋輔、中曽一裕、トコトリエノールのシグナル伝達を介した抗パーキンソン病効果、第 340 回脂溶性ビタミン総合研究委員会、2013 年 9 月 27 日、東京、芝浦工業大学 芝浦キャンパス

中曽一裕、田島奈緒子、紙崎孝基、堀越洋輔、小池泰介、松浦達也、パーキンソン病モデルマウスに対する トコトリエノールの効果、第 25 回ビタミン E 研究会、2014 年 1 月 24 日～25 日、米子市、米子市文化ホール

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 達也 (MATSURA Tatsuya)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：00199746

(2) 研究分担者

中曽 一裕 (NAKASO Kazuhiro)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号：30379648

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：