

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：34439

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05542

研究課題名(和文) 食品成分によるミトコンドリア増強を介した神経変性疾患予防効果に関する基礎的解析

研究課題名(英文) Study of the neuroprotective function of nutritional molecules via mitochondrial enhancement

研究代表者

長井 薫 (Nagai, Kaoru)

千里金蘭大学・生活科学部・教授

研究者番号：20340953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、食品由来成分によるミトコンドリア増強作用と神経系の細胞保護作用の解析から、食品摂取による神経変性疾患の予防を目指そうとするものである。本研究全体を通して、ニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)、リン脂質であるジリノレオイルホスファチジルコリン(DLPC)、ヒストン脱アセチル化酵素(Hdac)阻害作用の知られる短鎖脂肪酸である酪酸について、ミトコンドリア増強作用と酸化ストレスからの神経保護作用を有することを見出した。また分子メカニズムの解析により、NMNはサーチュインを、DLPCはPPAR のを、酪酸はHdac3阻害を介して神経細胞に対する効果を発現していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症に代表される神経変性疾患は、超高齢社会を迎えている我が国において深刻な社会問題となってきた。これらの疾患は、潜伏期間が長く、発症前の診断は困難であり、さらに発症後の完治はほぼ不可能であることから、発症のかなり前から予防することが重要である。その方策の一つが食品摂取による予防である。本研究では、3種の成分について神経細胞を保護し、ミトコンドリアを増やすという若返りとも言える効果があることとその分子機構を見出した。これは、神経変性疾患の予防法開発という学術的意義が大きいことに加え、将来の認知症患者数の減少につながるとも考えられ、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied functions of nutritional molecules on mitochondrial enhancement and neuronal cell protection against oxidative stress, which are expected to contribute developing methods to reduce risks of neurodegenerative diseases. We found that nicotinamide-mono nucleotide (NMN), a phospholipid dilynoleoylphosphatidylcholine (DLPC), and a short chain fatty acid sodium butylate which is known as a histone deacetylase (Hdac) inhibitor showed mitochondrial enhancement and neuronal cell protection against oxidative stress. Regarding molecular mechanisms, we found that NMN functions via sirtuin activation, DLPC protects cells via PPAR activation, and butylate protects cells via Hdac3 inhibition, respectively.

研究分野：食品科学、神経科学

キーワード：食品機能 神経変性疾患 ニコチンアミドモノヌクレオチド ホスファチジルコリン 酪酸 Hdac

1. 研究開始当初の背景

- (1) 超高齢社会を迎えている我が国において、認知症に代表される神経変性疾患の患者数の増加は深刻な社会問題になってきているが、神経変性疾患を完治するような治療法は未だ確立されていない。
- (2) 神経変性疾患の疾患としての特徴から、発症後の治療法の新開発を目指すだけでなく、発症のかなり前の段階において日常生活レベルで予防する方法の確立も重要であると考えられる。その方法の一つとして有力だと考えられるのが、有効な成分を含む食品の摂取による予防法の確立である。
- (3) 多くの神経変性疾患では、脳内における炎症反応などを起因とする酸化ストレスが神経細胞死につながるものが原因の一つとなると考えられている。このことから、酸化ストレスからの神経細胞の保護効果が、神経変性疾患予防の一つの指標となると考えられる。
- (4) 脳の情報伝達において非常に重要である生体のエネルギー物質 ATP は、主にミトコンドリアで合成される。脳内のミトコンドリア量は加齢に伴って減少するが、認知症の患者では特に減少していることが知られている。ミトコンドリアは酸化ストレスによっても傷害され、減少することが知られていることから、食品成分によるミトコンドリア増強作用も神経変性疾患予防につながることを期待される。

2. 研究の目的

- (1) 食品由来成分として NMN、DLPC、酪酸などに注目し、酸化ストレスからの神経系細胞保護作用とミトコンドリア増強作用を指標に、神経変性疾患予防効果について明らかにする。
- (2) これらの成分が、近年注目されているエピジェネティクス機構の一つであるヒストンのアセチル化を制御する分子群への作用が知られていることから、ヒストンのアセチル化への影響の視点からそれらの作用機構を明らかにする。
- (3) ヒストンのアセチル化制御の下流、あるいはそれ以外の経路の分子機構について明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 酸化ストレスからの神経系の細胞保護効果に関する解析

神経細胞モデルとして、ラット褐色細胞腫細胞系である PC-12 細胞またはマウス神経芽細胞腫細胞系である Neuro2a 細胞を用い、各種食品由来成分で処理を行った。2 時間後、酸化ストレスとして過酸化水素 (H₂O₂)、6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA)、または NO ドナーである Sodium Nitroprusside (SNP) で処理を行うことにより、酸化ストレスによる細胞死誘導を行った。24 時間処理後細胞生存率の解析を行った。

生存率の定量評価は MTT 法による生細胞数の比色定量を行い、死細胞数の減少については、Calcein-AM / Propidiumiodide (PI)による生死細胞染色によって確認を行った。

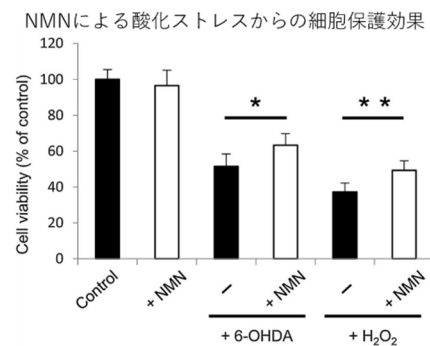
(2) ミトコンドリア増強作用の解析

神経系細胞を各種食品由来成分で処理を行い、処理を行った細胞を回収後、ミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 による染色を行った。染色細胞のサイトメトリ一解析を行うことにより、細胞中のミトコンドリア量の定量解析を行った。

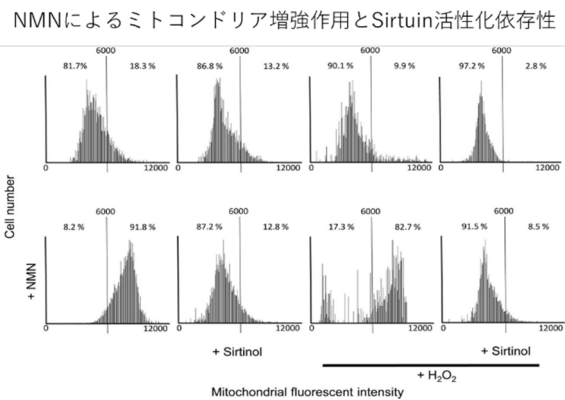
4. 研究成果

(1) NMN による神経系細胞に対する酸化ストレスからの保護効果とミトコンドリア増強効果の解析

PC-12 細胞を NMN で前処理を行い、 H_2O_2 および 6-OHDA による酸化ストレス曝露を行ったところ、NMN 前処理により有意な細胞死の抑制効果が観察された。この効果は、クラス III Hdc であるサーチュインの阻害剤であるサーチノールで抑制され、また NMN 処理によりサーチュインの発現上昇が見られたことから、サーチュインの活性化を介していると考えられた。



NMN はさらに、PC-12 細胞のミトコンドリアを増加させる作用があり、この作用についてもサーチノールにより抑制されたことから、こちらもサーチュイン活性化依存性であると考えられた。同時に、ミトコンドリア内の抗酸化酵素である SOD2 の発現も増加させたことから、ミトコンドリアによる抗酸化機能も上昇させる作用を有することがわかった。このミトコンドリア増強作用は、ミトコンドリア増加に関わる PGC-1 α を介していると考えられた。



さらに、PGC-1 α の siRNA 処理が NMN による酸化ストレスからの細胞保護効果を減少させたことから、ミトコンドリア増強作用が細胞保護作用に関与していることを見出した。

(2) DLPC による神経系細胞に対する酸化ストレスからの保護効果とミトコンドリア増強効果の解析

大豆レシチンの主要な成分と考えられる DLPC について、まず Neuro2a 細胞の NO による酸化ストレスに対する作用について検討を行ったところ、有意な細胞死抑制効果が観察された。この細胞保護作用についての分子機構を解析したところ、PPAR γ の活性化を介した、抗酸化に働く転写因子である Nrf2 の核移行を介しているこ

とを見出した。

また、DLPC には Neuro2a 細胞のミトコンドリアを増強させる作用があることも見出した。ミトコンドリア増強作用の分子機構と、この作用と細胞保護効果との関連性については現在検討中である。

脂肪酸類には Hdac 阻害作用を有するという報告がなされていることから、DLPC の作用と Hdac の関連についても検討を行ったが、DLPC の今回の機構における Hdac 阻害の関与については見出せなかった。

(3) 酪酸による神経系神経系細胞に対する酸化ストレスからの保護効果とミトコンドリア増強効果の解析

Hdac 阻害剤としても知られる酪酸について、まず Neuro2a 細胞の NO による酸化ストレスに対する作用について検討を行ったところ、有意な細胞死抑制効果が観察された。また、酪酸には Neuro2a 細胞のミトコンドリアを増強させる作用があることも見出した。

この分子機構の解明のため、幾つかの酪酸よりサブタイプ特異性が高い Hdac 阻害剤について、酪酸と同様の作用があるか検討を行ったところ、Hdac1, 3 を特異的に阻害する MS275 に酪酸と同様の作用が認められた。Hdac1 と 3 への IC50 の違いからどちらの Hdac を阻害することにより現れる効果であるか検討したところ、Hdac3 を阻害することで細胞保護効果を示すことがわかった。また、Hdac3 を阻害することで Nrf2 の発現が上昇することを確認し、これが細胞保護効果の分子機構であると考えられた。ミトコンドリア増強作用の分子機構と、この作用と細胞保護効果との関連性については現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Ito S, Gotow T, Suetake I, Nagai K	4. 巻 11
2. 論文標題 Protective effects of nicotinamide mononucleotide against oxidative stress-induced PC12 cell death via mitochondrial enhancement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PharmaNutrition	6. 最初と最後の頁 100175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phanu.2019.100175	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 Kobayashi S, Hamada Y, Yasumoto T, Hashino Y, Masuyama A, Nagai K	4. 巻 59
2. 論文標題 Total synthesis and endoplasmic reticulum stress suppressive activities of Hericenones A-C and their derivatives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Lett.	6. 最初と最後の頁 1733-1736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2018.03.065	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 Kobayashi S, Tamura T, Koshishiba M, Yasumoto T, Shimizu S, Kintaka T, Nagai K	4. 巻 86
2. 論文標題 Total synthesis, structure revision, and neuroprotective effect of Hericenones C-H and their derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Org. Chem	6. 最初と最後の頁 2602-2620
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.0c02681?ref=pdf	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 長井 薫、伊藤 章悟	4. 巻 15
2. 論文標題 大豆由来リン脂質による認知症予防効果の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本食品安全協会誌	6. 最初と最後の頁 212-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shogo Ito, Kaoru Nagai
2. 発表標題 Soy isoflavone daidzein but not genistein protects Neuro2a cells from oxidative stress via AMPK and mitochondrial enhancement
3. 学会等名 Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長井 薫、加留部 真紀、中嶋 新菜、八木 夏海、山内 加奈恵
2. 発表標題 ジリノレオイルホスファチジルコリン(DLPC)によるミトコンドリア増強を介したNeuro2a細胞に対する酸化ストレスからの保護効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤章吾、長井薫
2. 発表標題 酸化ストレスに対するダイゼインのAMPK活性化を介したミトコンドリア機能亢進作用による神経細胞保護効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shogo Ito, Kaoru Nagai
2. 発表標題 Protective effects of nicotinamide mononucleotide against oxidative stress induced PC12 cell death via mitochondrial enhancement
3. 学会等名 Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	伊藤 章悟 (Ito Shogo)	甲子園大学大学院・栄養学研究科・大学院生 (34505)	

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