

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07430

研究課題名(和文) 神経老化に伴う膜脂質過酸化はパーキンソン病発症に関与する

研究課題名(英文) Membrane lipid peroxidation is involved in the pathogenesis of Parkinson disease

研究代表者

丸山 和佳子 (Maruyama, Wakako)

愛知学院大学・心身科学部・教授

研究者番号：20333396

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)：パーキンソン病(PD)の病因について、神経老化の観点で研究を行った。PDにおける神経細胞死の原因は不明であるが、構造異常をきたしたalpha-synuclein (aS)タンパク質が毒性を持つと考えられている。近年となり、消化管に分布する自律神経終末において構造異常aSが生成され、中枢神経へと軸索輸送された結果、毒性をもつaSのseed(種)が形成されるとの仮説が脚光を浴びている。申請者は膜脂質由来の脂質ラジカルを消去する役割をaSが果たしていること、その結果に毒性を持つ構造異常のaSが生成され、autophagy-lysosome系を傷害することをin vitroの実験で明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「老化」は生物に普遍的な生理現象であり、生体内のノイズやゴミが徐々に蓄積されていく経過と考えられる。今回の研究課題では生命活動に伴うノイズである「酸化ストレス」の結果、酸化修飾タンパク質、特に膜脂質由来の脂質ラジカルによるタンパク付加体(ゴミ)が生成され、毒性を発現するメカニズムについてパーキンソン病を中心に検討を行い、成果を得た。本研究成果を発展させ、神経老化のバイオマーカーとしての酸化脂質修飾タンパク質の有用性、及び老化、神経変性疾患に対する栄養学的介入による老化予防法の開発に結びつけることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, the production and the occurrence of abnormal alpha-synuclein (aS) protein is suggested to play a central role in the neurodegeneration in Parkinson disease (PD).

aS is known to occur in the neurons interacting with membrane lipid bilayer, but its function is not clear. In human neuroblastoma SH-SY5Y cells overexpressing aS, lysosome activity was found to be reduced and macroautophagy activity was compensatory increased. aS overexpression protected cells from oxidative stress by membrane-composing docosahexaenoic acid (DHA) and aggregated aS was found to be modified by lipid hydroperoxide derived from DHA. aS may function as a scavenger of lipid radicals by adduct formation and as a result, toxic modified aS is continuously produced in the neurons. Decreased activity of macroautophagy in ageing and PD may be responsible for neuronal death by reduced degradation of toxic aS oligomer modified by lipid radicals.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 酸化ストレス alpha-synuclein オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病における運動障害の責任病巣は中脳黒質ドパミン神経細胞変性であり、診断の hallmark は Lewy 小体とよばれる細胞内凝集タンパク質である。しかし、近年の病理学的、臨床的研究によりパーキンソン病は中枢神経に局限した疾患ではないこと、消化管や心筋の自律神経終末に α -synuclein(aS) の凝集体が症状の発症前より認められるとのコンセンサスが得られている。さらに、胃潰瘍患者に対する迷走神経切断によりパーキンソン病の発症率が低下するとの報告(引用文献 1)より、パーキンソン病を主体とする synucleinopathy 発症には、消化管に分布する自律神経終末で蓄積された毒性をもつ構造異常 aS の中枢神経への移行が関与するとの仮説が脚光を浴びている。一方、神経変性疾患発症最大のリスクファクターは老化である。老化の進行には酸化ストレス傷害が中心的役割を果たしていると考えられるが、その本体は不明である。中枢神経細胞は分裂による再生能力が限られていること、好氣的呼吸への依存性が高いこと、脂質ラジカルを生成する多価不飽和脂肪酸が細胞膜に多量に含まれることが酸化ストレス傷害の蓄積の原因となっていると考えられる。申請者は「酸化修飾を受けた構造異常タンパク質の蓄積」が老化の原因である可能性について研究を行ってきた。過酸化脂質由来のアルデヒドである acrolein により修飾された aS がパーキンソン病患者脳で増加していること、acrolein 修飾によりユビキチン-プロテアソーム系が阻害されることを報告した。タンパク質としての aS の生理学的機能は未だ不明であるが、aS はシナプス終末に豊富に存在し、膜脂質、特に DHA などの多価不飽和脂肪酸に緩やかに結合することでその高次構造を保っていることが知られている。aS の膜脂質過酸化による修飾とその分解系について検討し、パーキンソン病への関与について考察を行なった。

2. 研究の目的

本研究課題ではパーキンソン病の病因を神経老化という観点で研究する。具体的には老化と密接に関わる「酸化ストレス」の物質的基盤としての酸化修飾タンパク質、特に膜脂質由来の脂質ラジカルによるタンパク付加体の生成と、毒性発現機構について培養神経細胞モデルで検討する。本研究により神経老化のバイオマーカー開発と、それを制御する食品、食生活を中心とした介入研究の基盤となる成果を得ることが目的である。

3. 研究の方法

(1) pIRES1neo vector を用いてヒト野生型 aS を遺伝子導入した発現したヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞 (SYN 細胞) を確立した。培養細胞におけるリソソームオートファジー系の評価は Premo™ Autophagy Tandem Sensor RFG-GFP-LC3B (Thermo Fisher Scientific K.K., CA, USA)、または固定した細胞を Cyto-ID® Autophagy detection kit、LYSO-ID® Red stain kit (Enzo Life sciences, Inc., Farmingdale, NY) で染色することで行った。chloroquine は autophagosome と lysosome の fusion を阻害することにより autolysosome の形成を阻害する。血清除去を行った SH-SY5Y 細胞あるいは SYN 細胞に対し、chloroquine 添加することで、aS の macroautophagy に及ぼす影響について検討を行った。

(2) 多価不飽和脂肪酸である docosahexaenoic acid (DHA) を SH-SY5Y 細胞あるいは SYN 細胞に添加培養することで、脂質過酸化ストレスを惹起するモデルを構築した。モデル細胞における脂質過酸化を評価するマーカーとして、DHA を含む n-3 系の多価不飽和脂肪酸由来のヒドロペルオキシドに対する特異抗体である抗 propanoyl-lysine (PRL) 抗体を用いた。

4 . 研究成果

(1) SYN 細胞では血清除去による lysosome 増加が抑制されていた。さらに、chlorquine 添加により lysosome ではなく autophagosome の顕著な増加が認められた。

これらの結果を総合すると、SYN 細胞では lysosome 形成あるいは chaperon-mediated autophagy(CMA)が阻害されているが、macroautophagy は代償的に活性化されていることが示唆された。

SYN の一部は autophagosome および autolysosome に集積しており、SYN は血清除去条件で macroautophagy により分解されていると考えられた。chlorquine 添加すると、macroautophagy による SYN の分解が阻害された結果、細胞質における SYN の凝集が惹起された。

(2) SYN 細胞を血清除去条件で培養すると、PRL の陽性像が認められたが SH-SY5Y 細胞では認められなかった。SYN 細胞に chloroquine 処理を行うと、PRL 陽性像は顕著に増加した。PRL 陽性の局在については血清飢餓の時には autophagosome、chloroquin 処理をした場合は cytoplasm に存在し、a β の挙動と一致していた。

近年の論文により a β は内因性の脂質ラジカルスカベンジャーとして機能していることが報告されている(文献2)。SYN 細胞では膜脂質の酸化物を a β が恒常的にトラップされており、その結果生成された PRL 化などの脂質過酸化 a β は macroautophagy による分解を受けていることが示唆された。老化あるいは神経変性疾患において、lysosome-autophagy の機能が低下することで、毒性を持つ脂質酸化修飾 a β のオリゴマーの細胞内濃度が増加した結果、神経変性が引き起こされている可能性がある。

<引用文献>

- 1) Svensson E et al., Ann. Neurol. 2015
- 2) De Franceschi et al., JBC 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 西口寛一朗, 小島規永, 永井雅代, 熊野弘一, 丸山和佳子, 武部 純	4. 巻 57
2. 論文標題 要介護高齢者と健常高齢者における口腔機能と全身状態の関連	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 愛知学院大学歯学会誌	6. 最初と最後の頁 259-265
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 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 Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M.	4. 巻 127
2. 論文標題 Rasagiline and selegiline modulate mitochondrial homeostasis, intervene apoptosis system and mitigate α -synuclein cytotoxicity in disease-modifying therapy for Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neural Transm	6. 最初と最後の頁 131-147
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 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 Naoi Makoto, Wu Yuqiu, Shamoto-Nagai Masayo, Maruyama Wakako	4. 巻 20
2. 論文標題 Mitochondria in Neuroprotection by Phytochemicals: Bioactive Polyphenols Modulate Mitochondrial Apoptosis System, Function and Structure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2451 ~ 2451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20102451	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 Shamoto-Nagai Masayo, Hisaka Shinsuke, Naoi Makoto, Maruyama Wakako	4. 巻 62
2. 論文標題 Modification of α -synuclein by lipid peroxidation products derived from polyunsaturated fatty acids promotes toxic oligomerization: its relevance to Parkinson disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 207 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.18-25	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 Naoi Makoto, Maruyama Wakako, Shamoto-Nagai Masayo	4. 巻 14
2. 論文標題 Neuroprotection of multifunctional phytochemicals as novel therapeutic strategy for neurodegenerative disorders: antiapoptotic and antiamyloidogenic activities by modulation of cellular signal pathways.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Future Neurol.	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Naoi Makoto, Maruyama Wakako, Shamoto-Nagai Masayo	4. 巻 125
2. 論文標題 Type A and B monoamine oxidases distinctly modulate signal transduction pathway and gene expression to regulate brain function and survival of neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1635 ~ 1650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00702-017-1832-6	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 -

1. 著者名 Shih Jean Chen, Riederer Peter, Maruyama Wakako, Naoi Makoto	4. 巻 125
2. 論文標題 Introduction to the special issue on monoamine oxidase A and B: eternally enigmatic isoenzymes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1517 ~ 1518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00702-018-1920-2	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8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山和佳子
2. 発表標題 老化を遅延させる戦略とは? : 口腔内慢性炎症制御について
3. 学会等名 神経科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井雅代、松島由来、山下桃花、直井信、丸山和佳子
2. 発表標題 Epigallocatechin gallate (EGCG)はドパミンによる神経細胞死を増強する
3. 学会等名 第70回日本ビタミン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayo Shamoto-Nagai, Keiko Inaba-Hasegawa, Wakako Maruyama, Makoto Naoi
2. 発表標題 Role of type A and B monoamine oxidase in expression of pro-survival genes in neuroblastoma SH-SY5Y and glioblastoma U118MG cells
3. 学会等名 日本神経化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口寛一朗、丸山和佳子、永井雅代、直井信、野内美邑、中村早希、小島規永、武部 純
2. 発表標題 Myeloperoxidase (MPO)は歯周病の定量的評価に有用である;老年病発症リスクとの関連
3. 学会等名 日本口腔ケア学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口寛一朗、小島規永、永井雅代、藤波和華子、田中茂生、丸山和佳子、武部純
2. 発表標題 口腔昨日低下症患者における唾液および血液中ミエロペルオキシダーゼ(MPO)の検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山和佳子
2. 発表標題 超高齢社会における認知症とオーラルフレイルに関する最新の知見
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayo Shamoto-Nagai, Kanichiro Nishiguchi, Norinaga Kojima, Jun Takebe, Makoto Naoi, Wakako Maruyama
2. 発表標題 Quantitative analysis of myeloperoxidase (MPO) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in plasma and saliva in aged
3. 学会等名 日本神経化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakako Maruyama
2. 発表標題 Accumulated oxidative injury in neuronal ageing and Parkinson disease
3. 学会等名 日本神経化学大会
4. 発表年 2018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
---------	---------