

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19380073

研究課題名（和文）機能性ポリフェノール類による脳内老化抑制機構の解明

研究課題名（英文）Study on mechanism of regulation of brain aging by functional polyphenols

研究代表者

大澤俊彦（OSAWA TOSHIHIKO）

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：00115536

研究成果の概要：

神経変性疾患であるアルツハイマー症やパーキンソン病の発症における酸化ストレスの関与の解明のために、脳内の主要な多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（DHA）やアラキドン酸（ARA）由来の脂質ヒドロペルオキシドに特異的なモノクローナル抗体の作製と LC-MS/MS による有機化学的な解析法の確立を行った。さらに、炎症反応に特異的なバイオマーカーの検索とモノクローナル抗体の作製を行うと共に、「抗酸化ポリフェノール」による抑制機構の解明を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：アルツハイマー症、パーキンソン症、脳内老化、酸化ストレス、ドパミン神経細胞、抗酸化ポリフェノール、ゴマリグナン、セサミノールカテコール

1. 研究開始当初の背景

最近、日本でも急増している認知症などの発症の原因解明は、世界的にも最も解明が急がれている研究分野である。特に、研究の焦点は、パーキンソン病（PD）における α -synuclein（ α -SYN）やアルツハイマー病（AD）における amyloid- β -protein（A β タンパク）は、フリーラジカルや酸化脂質により高次構造変

化が引き起こされ、タンパク質異常凝集と細胞死の原因となっている可能性がある。しかしながら、どのような組織や器官で酸化ストレスの過剰発現が起き、その結果として脳内老化が促進されるのか、不明の点も多い。特に、腸管神経免疫系を介したネットワークによる老化制御機構についての研究は、立ち遅れているのが現状である。なかでも、摂取さ

れた食品が、消化管系で吸収・代謝された後に、直接的な脳内老化制御を発現するためには脳血液関門の通過が重要な過程となるが、その機構は今までほとんど手をつけられていないというのが実情である。このような背景で、免疫分子生物学的アプローチを中心に、有機化学、免疫化学的な手法を含めて解析し、ポリフェノール類の代謝機構とともに、脳関門通過後の代謝物の化学構造の解明を行い、食生活で老化抑制を行うことができるかどうかの基盤的研究を行い、特に、酸化ストレスの関与のメカニズムを中心に、老化制御機構の解明を行うことが求められている。

2. 研究の目的

脳内老化制御、特に、パーキンソン病(PD)やアルツハイマー病(AD)の発症に関連すると推定される α -synuclein (α -SYN) や amyloid- β -protein (A β タンパク)の酸化変性に、脂質過酸化反応が関与しているか、免疫化学的手法を中心に LC/MS/MS などを駆使した有機化学的アプローチで解明を行うことを目的として、まず、研究をスタートする。さらに、好中球やマクロファージなどの免疫担当細胞の過剰発現による直接的な酸化修飾物、例えば、クロル化やブロム化などのようなハロゲン化修飾物を生成するのか、*in vitro* 系での解析を中心に新規疾病マーカーの発見を目指す。我々は、神経変性疾患であるパーキンソン病の病理像は黒質ドパミン神経細胞の選択的な細胞死であり、その発症頻度はやはり加齢とともに増加するが、パーキンソン病あるいは加齢に伴うドパミン神経傷害の機序には酸化的ストレス、内在性神経毒等が関与することが示唆する結果を得ている (*J. Neural Trans.*, **113**(5), 633-644, 2006)。最近、新規な化学構造を持つ酸化修飾ドパミンを見出し、神経細胞のアポトーシ

ス誘導に重要な役割を果たしているとの観点から研究を展開しさらに、世界的に見ても、我々の研究グループが最も最先端の研究を進めているゴマリグナンやクルクミノイドなどの機能性ポリフェノール類を対象として、脳内老化抑制作用のメカニズム解析の検討を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳内老化バイオマーカーの生成機構の

解明: 記憶増進や網膜反射能向上機能に必須で脳内の主要な多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)由来の脂質ヒドロペルオキシドに特異的なモノクローナル抗体の作製を目的に、リジンとの酸化修飾物としてプロパノイルリジン (Propanoyl-lisine: PRL) の LC-MS/MS による有機化学的解析法の確立と、PRL に特異的なモノクローナル抗体の作製を行った。

(2) ドパミンに対する酸化傷害バイオマーカーの検索: DHA やアラキドン酸(ARA)のヒドロペルオキシド類による酸化修飾ドパミンの有機化学的解析を進め、これらの酸化修飾ドパミンの単離・精製、構造解析を行った。また、これらの酸化修飾ドパミンを対象に、脳内神経細胞や細胞に対する毒性発現機構やアポトーシス誘導機構の検討も行った。

(3) 炎症反応に特異的なバイオマーカーの確立: 世界に先駆けて我々の研究グループが開発したミエロペルオキシダーゼ(MPO)の過剰発現により生成するハロゲン化チロシン、特に、ブロム化チロシンの構造解析、LC/MS/MS による微量分析法の確立、さらに、ブロム化チロシンを特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。

(4) 「抗体チップ」の応用による分子疫学研究への応用: 酸化ストレスを受けやすいド

コサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸 (ARA) などの多価不飽和脂肪酸の作用機構の解明を目的に、PRL や SUL、GLL などのような酸化修飾チロシンに特異的なバイオマーカーに特異的なモノクローナル抗体を搭載した「抗体チップ」を作製した。

(5) 抗酸化ポリフェノール類による脳内老化予防作用の解明: 我々の研究グループが世界的にも独自の研究アプローチを進めているアントシアニンやクルクミン、ゴマリグナン類などの抗酸化ポリフェノールに関して、腸管での消化・吸収や肝臓での薬物代謝系などの段階で代謝・変換された抗酸化ポリフェノールの代謝物のうち、実際に脳関門を通過して脳内老化の抑制に関与する代謝物を単離・精製し、高分解能 NMR や MS などの機器分析法を駆使して化学構造を明らかにした。さらに、脳内老化抑制作用のスクリーニングのために、ドパミンの酸化修飾抑制効果の測定を行った。具体的には、ARA ヒドロペルオキシドである 15-HPETE とドパミンの反応により生成するヘキサノイルドパミン (HED) に対するポリフェノール類の生成抑制効果を LC/MS/MS を用いて、定量的な測定を行った。

4. 研究成果

(1) 脳内老化バイオマーカーの生成機構の解明: 免疫化学的アプローチや LC/MS-MS などを駆使することにより、記憶増進や網膜反射能向上機能に必須で脳内の主要な多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) やアラキドン酸 (ARA) 由来の脂質ヒドロペルオキシドにより酸化修飾されたチロシンを免疫することで、新たに、DHA ヒドロペルオキシドからはプロパノイルリジン (Propanoyl-lisine: PRL)、ARA ヒドロペルオキシド由来のグルタロイルリジン (GLL) に

特異的なモノクローナル抗体を作製することができた。そこで、これらのモノクローナル抗体の特異性解析を行うとともに、LC-MS/MS による有機化学的な解析も併用して、有機化学的、免疫化学的立場から、応用・開発の基盤的な解析を行った。さらに、これらのモノクローナル抗体を用いて、SYN に対する DHA 酸化修飾機構の解析を行った (図-1)。

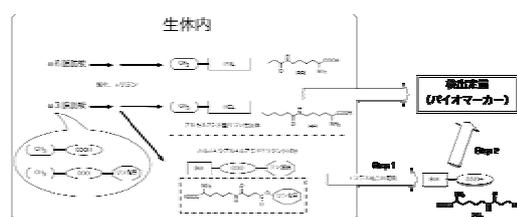


図-1 3 及び 6 系脂質ヒドロペルオキシドに由来するアミド型リジン付加体とその検出定量

(2) ドパミンに対する酸化傷害バイオマーカーの検索: DHA やアラキドン酸 (ARA) のヒドロペルオキシド類による酸化修飾ドパミンの有機化学的な解析を進め、これらの酸化修飾ドパミンを対象に、脳内神経細胞や細胞に対する毒性発現機構やアポトーシス誘導機構の解明を行った。また、LC-MS/MS による脳内での存在量の定量を行ったところ、3 系の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) のメチル基末端側がドパミンのアミノ基に修飾付加したプロパノイルドパミン (PRD)、DHA のカルボキシル基末端側がドパミンのアミノ基に修飾付加したスクシニルドパミン (SUD)、6 系の PUFA のメチル基末端側がドパミンのアミノ基に修飾付加したヘキサノイルドパミン (HED)、アラキドン酸 (AA) および EPA のカルボキシル基末端側がドパ

ミンのアミノ基に修飾付加したグルタロイルドパミン (GLD) を合成し、細胞への毒性などについて検討を行った (図-2)。

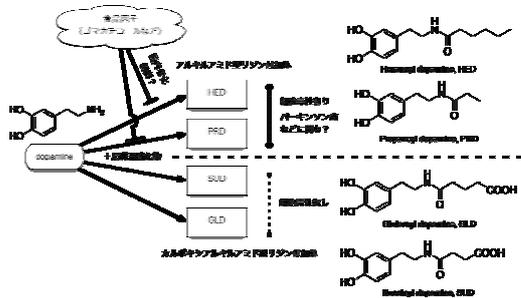


図-2 脂質過酸化に伴うドパミン修飾物の生成と細胞毒性

(3)炎症反応に特異的なバイオマーカーの確立：世界に先駆けて我々の研究グループが開発したジチロシンに特異的なモノクローナル抗体では、分子内や分子間の架橋を検出することが難しかったが、最近、抗原としての架橋構造の化学合成に成功したので、架橋構造を形成するジチロシンを認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。さらに、また、過剰な炎症反応で生成するハロゲン化修飾チロシン、プロモチロシンやクロロチロシンに特異的なモノクローナル抗体を作製したので、これらのモノクローナル抗体を用いて、A タンパクに対するハロゲン化タンパク生成機構の免疫化学的、有機化学的な解明を行った(図-3)。さらに、これらのハロゲン化修飾チロシンを用いて特異性の解析を行うとともに、今までの長寿医療センターとの共同研究で導入しているパーキンソン症モデル動物を用いた免疫組織染色による検出及びその局在性の検討のための基盤的な研究も行った。

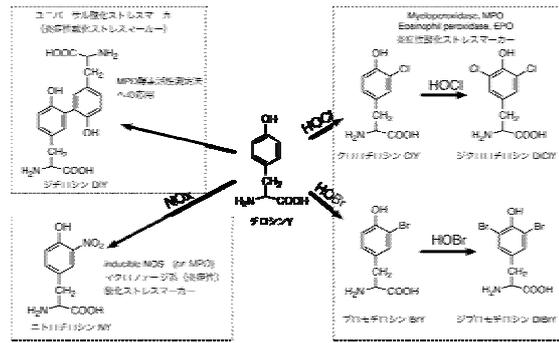


図-3 チロシン修飾物は活性酸素発生の足跡となる

(4)「抗体チップ」の応用による分子疫学研究への応用：酸化ストレスを受けやすい DHA や ARA などの多価不飽和脂肪酸、さらには、過剰な炎症反応により酸化修飾された SYN やハロゲン化修飾 A タンパクの化学構造の解明とともに、モノクローナル抗体を作製し、免疫化学的な解析を行った。さらに、これら酸化修飾タンパク質に特異的なバイオマーカーに特異的なモノクローナル抗体を搭載した「抗体チップ」を作製した。具体的には、今までもすでに検討を行った 8-OHdG や HEL 以外に、今回新たにモノクローナル抗体作製に成功した PRL や GLL に特異的なモノクローナル抗体やモノプロム、ジプロムチロシンなど、ハロゲン化チロシンを用いて、脳内老化の過程で過剰発現すると推定されている炎症反応由来の酸化ストレスの程度を測定する系の確立を進めた。その方法は、これらのバイオマーカーに特異的なモノクローナル抗体を、スライドガラス上にスピンコートされたアゾポリマーに光照射によりインプリンティングすることで「抗体チップ」を作製し、化学発光で未病診断と共に統合医療治療の評価を測定しようというものである。現在、1μl 以下の尿や血液を対象に、競合法での測

定ができるような測定システムの確立に成功した。この測定法は、競合法を基盤とした「抗体チップ」は動物種に影響されないので、マウス、ラット、ヒトなど、どの系でも応用できる利点があり、さらに広い応用性が期待できる。

(5) 抗酸化ポリフェノール類による疾病予防

400 種以上の抗酸化食品因子の有機化学的な検索の結果、ゴマリグナン類の P-450 系での代謝物であるカテコール類が、脳内にも存在するという予備的なデータも得ている。また、代表的なハーブ・スパイスとして知られるターメリックの黄色色素であるクルクミンの腸内代謝物であるテトラヒドロクルクミンは、様々な疾病予防効果が明らかにされてきたが、最近、脳の老化制御にも重要な役割を果たしていることを明らかにしている。クルクミンやゴマリグナン、各種フラボノイド類などの抗酸化ポリフェノールを対象に、ARA ヒドロペルオキシドである 15-HPETE とドパミンの反応によるヘキサノイルドパミン (HED) の生成抑制効果を LC/MS/MS を用いて、定量的な測定を行った。その結果、最も強い抑制効果を示したのは、ゴマリグナンのうち最も強い機能性を示したセサミノールの生体内代謝物であるセサミノールカテコールであった。現在、このセサミノールカテコールが脳関門を通過して脳内で機能性を発現しうるか、検討中である。

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7件)

Kato, Y., Dozaki, N., Nakamura, T., Kitamoto, N., Yoshida, A., Naito, M.,

Kitamura, M., Osawa, T., Quantification of Modified Tyrosines in Healthy and Diabetic Human Urine using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **44**, 67-78, (2009), refereed.

Liu, X., Shibata, T., Hisaka, S., Osawa, T., Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res.*, **1254**, 18-27, (2009), refereed.

Liu, X., Yamada, Y., Maruyama, W., Osawa, T., Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids: Mechanism for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.*, **283**, 34887-34895, (2008) refereed.

Liu, X., Shibata, T., Hisaka, S., Kawai, Y., Osawa, T., DHA hydroperoxides as a potential inducer of neuronal cell death: A mitochondrial dysfunction-mediated pathway. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 26-33, (2008), refereed.

大澤俊彦, 食品機能評価におけるバイオマーカーの重要性。日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*), **132**, 140-144, (2008), 査読無。

Kitani, K., Osawa, T., Yokozawa, T., The effects of tetrahydrocurcumin and green tea polyphenol on the survival of male C57BL/6 mice. *Biogerontology*, **8**, 567-573, (2007), refereed.

Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Hashizume, Y., Yoshida, M., Osawa, T., Riederer, P., Naoi, M., In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a

lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. *J. Neural. Transm.*, **114**, 1559-1567, (2007), refereed.

〔学会発表〕(計2件)

Osawa T. : Development of “Antibody Chip” by Application of Monoclonal Antibody Specific to Oxidative Stress Biomarkers. 14th International Conference of Society of Free Radical Research. (China) 2008.10.19.

Osawa, T. : Development of Novel Functional Materials by Fermentation of Antioxidative Phytochemicals. 2nd Verona International Meeting on Foods, Phytotherapeutic Compounds and Health. (Italy) 2007.9.30.

〔図書〕(計3件)

大澤俊彦, サプリメントの基本 4 - ポリフェノール。アンチエイジング医学の基礎と臨床 (日本抗加齢医学会、専門医・指導士認定委員会) メジカルビュー社、258-260, (2008)

大澤俊彦, 抗酸化成分の役割とフィトケミカルへの期待。アンチエイジング・ヘルスフード - 抗加齢・疾病予防・健康寿命延長への応用 - (水島裕監修、青木晃、白澤卓二、矢澤一良、米井嘉一編集)(株)サイエンスフォーラム, 39-47, (2008).

大澤俊彦, バイオマーカーの開発。抗肥満食品・素材の開発と応用展開 - メタボリックシンドロームにおけるバイオマーカーの確立と応用 - (大澤俊彦監修)シーエムシー出版, 1-10, (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 俊彦 (OSAWA TOSHIHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号 : 00115536