

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H04029

研究課題名(和文) 食用油由来するヒドロキシノネナルが生活習慣病を惹起する機序

研究課題名(英文) Cooking oil-derived hydroxynonenal and lifestyle-related diseases

研究代表者

山嶋 哲盛 (Yamashima, Tetsumori)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60135077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：食用油はリノール酸を主成分とするが、料理時の加熱によって酸化されると、ヒドロキシノネナル(HNE)を生じる。日本人の4割はHNEを解毒するアルデヒド脱水素酵素の酵素活性が弱いため、加齢と共にHNEの血中濃度が増加する。本研究では、HNEの細胞毒性に関し以下の結果を得た。1) シャペロン機能とリソソーム膜安定化作用を持つHsp70.1がHNEによってカルボニル化されると、Hsp70.1は $\mu$ カルパインによって切断される。その結果、2) リソソーム膜の安定性が崩れるためカテプシンが放出され、脳や肝臓・膵臓に細胞死が生じる。3) これがアルツハイマー病や2型糖尿病・非アルコール性脂肪肝炎を発症させる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では世界で千万人単位の人が罹患している生活習慣病であるアルツハイマー病・2型糖尿病・非アルコール性脂肪肝炎に共通する原因物質が、サラダ油の加熱時に発生するヒドロキシノネナル(HNE)である可能性が高いことを明らかにした。ヒトの病態を忠実に再現するために、げっ歯類に比べて臓器の類似性が高く、遺伝子・アミノ酸配列がヒトと94%もの相同性を示すニホンザルを用い、HNEがもたらすHsp70.1の異常と2次的に脳・膵・肝に生じる細胞死の機序および臓器間の分子連関について検索し、生活習慣病の根本原因を究明した。本研究は揚げ物に含まれるHNEが有害であることを立証したもので、社会的貢献度が誠に高い。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of lifestyle-related diseases, I focused on the implication of the lipid-peroxidation product 'hydroxynonenal (HNE)' for the cell degeneration/death of brain, pancreas, and liver. Since Hsp70.1 has dual role as chaperone and lysosomal membrane stabilizer, HNE-mediated oxidative injury (carbonylation) of Hsp70.1 was highlighted. As HNE is amphiphilic, it can diffuse within the cells and react with targets like senile and/or atheromatous plaques. HNE can expand lysosomal membrane injuries by facilitating 'calpain-mediated cleavage of the carbonylated Hsp70.1'. I found implications of HNE-mediated Hsp70.1 carbonylation for both the lysosomal membrane permeabilization/rupture and the resultant cathepsin leakage for inducing cell degeneration/death. Considering the huge number of patients suffering lifestyle-related diseases, it is valuable to consider how  $n-6$  polyunsaturated fatty acid-rich vegetable oils is implicated for the organ disorder.

研究分野：神経科学、栄養化学

キーワード：生活習慣病 アルツハイマー病 細胞死 ヒドロキシノネナル リソソーム Hsp70.1 カルパイン  
カテプシン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界の認知症患者は2018年には約5,000万人で、2050年にはその3倍の15,200万人にも達すると推計されている。アルツハイマー病の原因物質としては、食用油由来のヒドロキシノネナル(HNE)という一種の細胞毒が最も疑わしいというのが従来の我々のグループの研究成果である(Yamashima, Age. Res. Rev, 2016; Yamashima, J. Alz. Dis. Park, 2017; Yamashima, Front. Mol. Biosci, 2023; Yamashima, Front. Aging Neurosci, 2023)。一方、揚げ物の摂取が増えた現代社会においては、2型糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎などの生活習慣病に罹患する患者も世界中で激増している。アルツハイマー病と2型糖尿病はコインの表と裏とをなす密接な関係にあり同時発生が多いとされているが、いずれの病気も原因が不明である。

体内の水分が電磁波や紫外線、放射線、虚血などの酸化ストレスを受けると、スーパーオキシドやヒドロキシラジカル等の活性酸素を生成し、これらは生体膜を構成する脂肪酸の炭素の2重結合から電子を奪い、HNEを産生する。HNEの細胞毒性に関しては、従来、培養細胞やマウスを用いた実験で検討されてきたが、霊長類でリソソームやミトコンドリアなどの細胞内小器官の異常に着目し検索した研究はされていない。

多価不飽和脂肪酸(PUFA)は細胞膜の流動性を高め、リン脂質の間に膜タンパク質が介在し得る分子間スペースを提供する。魚類などに多く含まれているDHAやEPAなど3系のPUFAは酸化されても細胞毒性は少ない。しかし、リノール酸など6系のPUFAが酸化されるとHNEを産生し、細胞死の原因物質となる。HNEは大豆油や菜種油などリノール酸を主成分とする食用油の加熱によって発生し、アルツハイマー病患者の脳組織や脳脊髄液には高濃度に含有されている。最近では食用油の加熱によって生じるHNEが生活習慣病の根本的な原因物質ではないかと疑われているが、食用油の毒性に関して体系化された研究は世界的に少なく、霊長類を対象とした研究となると皆無である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、世界で千万人単位の人が苦しむ生活習慣病であるアルツハイマー病・2型糖尿病・非アルコール性脂肪肝炎に共通する原因物質を同定することである。サルを用いて食用油由来の脂質過酸化物質であるHNEが上記の生活習慣病に共通する原因物質であることを証明することを目標とした。

従来から行った予備的研究において、ニホンザルを対象として総量120mgのHNE投与を半年間行い脳と肝臓、膵臓を摘出し組織学的に調べると、全例において対照群にはみられない海馬の神経細胞死や肝細胞の壊死および細胞の空胞変性がみられた。電顕による観察では、いずれの細胞においてもミトコンドリアの変性が顕著で、クリスタの脱落と2重膜の断裂がみられた。採血では、AST・ALT・GTPの上昇がみられた。しかも、肝臓の脂肪変性や壊死が激しく起きており、肝細胞の異常が脳や膵臓に悪影響を与えた可能性がある。また、電顕的観察では膵臓細胞でインスリン顆粒が激減しており、インスリンシグナルに異常が起きただけでなく、臓器間における細胞死の分子連関の存在が推定された。

そこで、本研究においては、HNEがもたらすHsp70.1の異常と2次的に脳・肝・膵に生じる細胞死の発生機序および臓器間の分子連関についても検索し、生活習慣病の根本原因を究明した。

### 3. 研究の方法

アルツハイマー病患者の血清中のHNE濃度は平均20 $\mu$ mol/Lと報告(McGrath et al, QJM, 2001)されているので、これを再現するため申請者は毎週1回5mgのHNEを若年サル5頭に6ヶ月間にわたり、総量120mg静脈内注射し、以下の検索を行った。

- 1) HNEによるリソソーム膜の損傷と細胞障害の証明：HNE投与後の経時的な生細胞率を各臓器において測定するとともに、電子顕微鏡やライソトラッカー、LAMP2とカテプシンに対する抗体を用いてリソソームの形態変化を解析した。
- 2) HNEによるHsp70.1のカルボニル化とカルパインによる切断の証明：HNE投与ザルの脳・

肝臓・膵臓よりタンパク質を抽出し、活性型  $\mu$  カルパインとHsp70.1 に対する抗体を用いて、カルパインによるカルボニル化Hsp70.1切断の分子機序を解明した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 脳と膵臓における Hsp70.1 とカルパインの動態

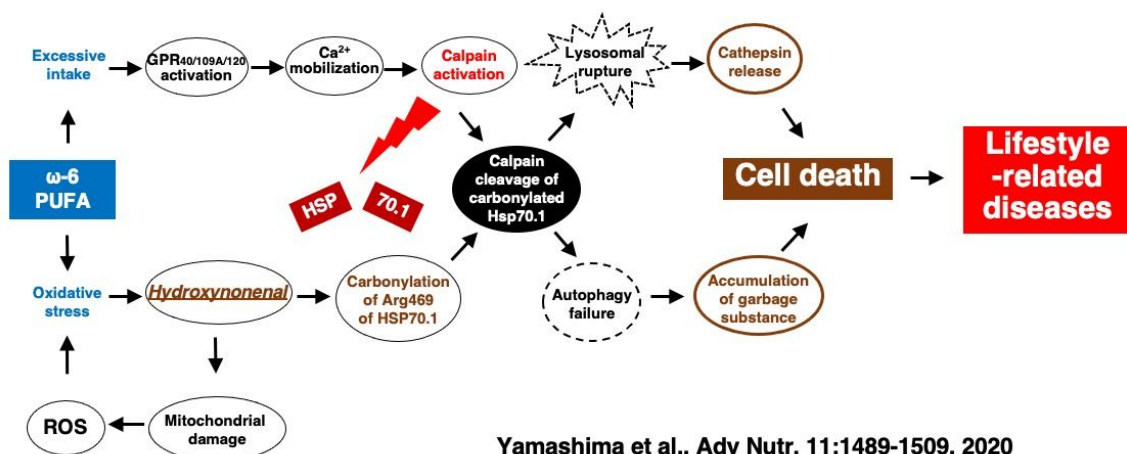
申請者らは既に、脳虚血後に  $Ca^{2+}$ 依存性の  $\mu$  カルパインがカルボニル化された Hsp70.1 を切断した結果リソソームを破綻させ、神経細胞死を誘導することを明らかにした (Yamashima & Oikawa, Prog. Neurobiol, 2009)。HNE 投与後には膵臓でも同じことが起きていた (Boontem & Yamashima, PlosONE, 2021)。すなわち、膵臓では HNE 投与後、 $\mu$  カルパインの活性化がみられ、活性型  $\mu$  カルパインは Hsp70.1 と局在が一致していた。HNE によってカルボニル化された Hsp70.1 の切断が、対照群に比べ増えていた。その結果、リソソームは破裂し、カテプシンは HNE 投与後、胞体内に散逸していた。つまり、脳と膵臓にはリソソームの破裂という共通現象がみられた。そこで、Hsp70.1 の動態を見るためプロテオミクス解析を行った。

##### 2) 脳・膵臓・肝臓における Hsp70.1 動態

海馬を用いたプロテオミクス解析では、カルボニル化された Hsp70.1 は 10 倍以上に増えていたが、肝臓では増えていなかった。しかしウエスタンブロットでは、脳と同様に肝臓でも膵臓でも HNE 投与後には Hsp70.1 の切断が著明に増加していた。一方、脳と異なり肝臓においてはカルボニル化された Hsp70.1 は激減していた。つまり、脳と膵臓では活性型  $\mu$  カルパインが切断するものはカルボニル化 Hsp70.1 のみであるが、肝臓では Hsp70.1 以外のものも切断されている可能性があった。そこで、HNE 投与前後の肝組織を用いて、プロテオミクスを行った処、肝細胞ではメチオニン合成するベタイン-ホモシステイン-S-メチルトランスフェラーゼ(BHMT)という酵素が、酸化損傷され切断されているという世界初の発見に至った (Yamashima et al, nutrients, 2023)。BHMT は肝臓から中性脂肪を排出するのに必要な酵素で、この発見は肝臓における脂肪沈着機序の解明に役立つ。

以上より、脳・肝臓・膵臓それぞれの解剖学的・生理学的・生化学的特徴は互いに異なるものの、HNE によって惹起される細胞の変性・死には共通のカスケード (下図) があることが明らかになった。すなわち、(1)シャペロン機能とリソソーム膜の安定化作用を持つ Hsp70.1 が HNE によってカルボニル化という特殊な酸化損傷を受けると、酸化型 Hsp70.1 は活性型  $\mu$  カルパインによって切断される。その結果、(2)リソソーム膜の安定性が崩れるため、リソソームから胞体内にカテプシンが放出され、これが脳だけではなく肝臓・膵臓に細胞死をもたらす。最終的に、(3)この細胞死が、アルツハイマー病をはじめ 2 型糖尿病や非アルコール性脂肪肝炎などの生活習慣病を発症させるものと推定される。

### $\omega$ -6 PUFA can induce calpain-cathepsin cascade for diseases



我々の研究成果は、アルツハイマー病と2型糖尿病との密接な関係についてレビューした Lemche 博士らの最近の総説論文 (Molecular mechanisms linking type 2 diabetes mellitus and late-onset Alzheimer's disease: A systematic review and qualitative meta-analysis, *Neurobiology of Disease*, 196 (2024) 106485) においても大きく取り上げられている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Tetsumori Yamashima, Piyakarn Boontem, Hidenori Kido, Masahiro Yanagi, Takuya Seike, Daisuke Yamamiya, Shihui Li, Tatsuya Yamashita, Mitsuru Kikuchi, Eishiro Mizukoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Hydroxynonenal Causes Lysosomal and Autophagic Failure in the Monkey POMC Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimers Disease & Parkinsonism	6. 最初と最後の頁 1-12
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takuya Seike, Piyakarn Boontem, Masahiro Yanagi, Shihui Li, Hidenori Kido, Daisuke Yamamiya, Hidetoshi Nakagawa, Hikari Okada, Tatsuya Yamashita, Kenichi Harada, Mitsuru Kikuchi, Yoshitake Shiraishi, Noriyuki Ozaki, Shuichi Kaneko, Tetsumori Yamashima, Eishiro Mizukosh	4. 巻 14
2. 論文標題 Hydroxynonenal Causes Hepatocyte Death by Disrupting Lysosomal Integrity in Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 925-944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.06.008	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 Dimo S. Stoyanov, Martin N. Ivanov, Tetsumori Yamashima, Anton B. Tonchev	4. 巻 13
2. 論文標題 Expression of Transcription Factor ZBTB20 in the Ault Primate Neurogenic Niche under Physiological Conditions or after Ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 genes	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13091559	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 Tetsumori Yamashima, Takuya Seike, Shinji Oikawa, Hatasu Kobayashi, Hidenori Kido, Masahiro Yanagi, Daisuke Yamamiya, Shihui Li, Piyakarn Boontem, Eishiro Mizukoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Hsp70.1 carbonylation induces lysosomal cell death for lifestyle-related diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.1063632	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 Tetsumori Yamashima	4. 巻 15
2. 論文標題 Implication of Vegetable Oil-Derived Hydroxynonenal in the Lysosomal Cell Death for Lifestyle-Related Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 nutrients	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15030609	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 Piyakarn Boontem, Tetsumori Yamashima	4. 巻 16
2. 論文標題 Hydroxynonenal causes Langerhans cell degeneration in the pancreas of Japanese macaque monkeys	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245702	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

1. 著者名 Tetsumori Yamashima	4. 巻 11
2. 論文標題 Hydroxynonenal makes Alzheimer Pathology without Amyloid : Which is a Real Culprit?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis Parkinsonism	6. 最初と最後の頁 1-9
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tetsumori Yamashima, Eishiro Mizukoshi, Hiroyuki Nakamura, Yasuhiko Yamamoto, Mitsuru Kikuchi, Tatsuya Yamashita, Shuichi Kaneko	4. 巻 11
2. 論文標題 Intake of -6 Polyunsaturated Fatty Acid-Rich Vegetable Oils and Risk of Lifestyle Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Nutrition	6. 最初と最後の頁 1489-1509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/advances/nmaa072.	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 Yurie Mori, Shinji Oikawa, Shota Kurimoto, Yuki Kitamura, Saeko Tada-Oikawa, Hatasu Kobayashi, Tetsumori Yamashima, Mariko Murata	4. 巻 67
2. 論文標題 Proteomic analysis of the monkey hippocampus for elucidating ischemic resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 167-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-78	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 Monika Chongtham, Haifang Wang, Christina Thaller, Nai-Hua Hsiao, Ivan Vachkov, Stoyan Pavlov, Lorenz Williamson, Tetsumori Yamashima, Anastassia Stoykova, Jun Yan, Gregor Eichele, Anton B. Tonchev	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcriptome Response and Spatial Pattern of Gene Expression in the Primate Subventricular Zone Neurogenic Niche After Cerebral Ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.584314	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

1. 著者名 山嶋哲盛	4. 巻 15
2. 論文標題 アルツハイマー病を予防し得る酢酸菌サプリ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 食と医療	6. 最初と最後の頁 53-61
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 Zsolt Balog, Gabrielle Multhoff, Thomas Kirkegaard Jensen, Emyr Lloyd-Evans, Tetsumori Yamashima, Marja Jaattela, John L. Harwood, Laszlo Vigh	4. 巻 74
2. 論文標題 Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Progress in Lipid Research	6. 最初と最後の頁 18-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plipres.2019.01.004	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

1. 著者名 Tetsumori Yamashita, Piyakarn Boontem, Hiroki Shimizu, Tsuguhito Ota, Mitsuru Kikuchi, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko	4. 巻 10.1
2. 論文標題 Vegetable Oil-derived 'Hydroxynonenal' Causes Diverse Cell Death Possibly Leading to Alzheimer's and Related Lifestyle Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism	6. 最初と最後の頁 1-8
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yurie Mori, Shinji Oikawa, Shota Kurimoto, Yuki Kitamura, Saeko Tada-oikawa, Hatasu Kobayashi, Tetsumori Yamashita, Mariko Murata	4. 巻 66
2. 論文標題 Proteomic analysis of the monkey hippocampus for elucidating ischemic resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.19-78	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 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tetsumori Yamashita
2. 発表標題 -6 oil-derived 'Hydroxynonenal' causes diverse cell death for lifestyle diseases
3. 学会等名 International ALDH symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山嶋哲盛
2. 発表標題 サラダ油は生活習慣病を惹起する
3. 学会等名 第28回海馬と高次脳機能学会
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 分担者	及川 伸二  (Oikawa Shinji)  (10277006)	三重大学・医学系研究科・准教授   (14101)	
研究 分担者	山下 竜也  (Yamashita Tatsuya)  (30334783)	金沢大学・先進予防医学研究センター・准教授   (13301)	

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