

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19655

研究課題名（和文）サルナシ果汁によるパーキンソン病の新規予防法の開発

研究課題名（英文）The preventive effect of *Actinidia arguta* against MPTP-induced Parkinson's disease model mice.

研究代表者

北村 祐貴 (Kitamura, Yuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80802553

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）：パーキンソン病の発症原因は未だ解明されていないが、酸化ストレスが発症や進行に深く関与していることが知られている。本研究では、毛の無い小ぶりのキウイフルーツに似た果実であるサルナシ (*Actinidia arguta*) の経口摂取が、パーキンソン病モデルマウスにおいて認められる運動機能障害およびドパミン作動性神経細胞の減少を抑制できるかを検討した。その結果、サルナシ果汁の摂取がパーキンソン病の発症予防に効果がある可能性を明らかにした。さらに、細胞傷害性の抑制に効果を示す天然物をサルナシ果汁から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会に突入した我が国において、パーキンソン病患者の増加が危惧されている。しかしながら、パーキンソン病の根本的治療法は未だ確立されていないため、発症を予防することは社会的要求度が高い重要な研究課題である。近年、我が国では健康寿命への意識が高まり、パーキンソン病を含めた様々な疾病の一次予防の必要性がより強調されるようになってきている。食を通じた疾病の予防は我々が日常生活で最も取り組みやすい手段である。本研究によって、サルナシ果汁の経口摂取がパーキンソン病の発症予防効果や増悪抑制に寄与する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Oxidative stress-induced neuronal death has been identified as one of the major causes of nigrostriatal degeneration in PD. The fruit of *Actinidia arguta* (*A. arguta*), known as sarunashi in Japan, has been reported to show beneficial health effects such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-mutagenic, and anticholinergic effects. In this study, we investigated the neuroprotective effects of *A. arguta* in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD model mice. In addition, we identified the compounds contained in *A. arguta* juice that inhibit cytotoxicity. In conclusion, we suggested that *A. arguta* juice may contribute to preventing the onset and suppressing the progression of Parkinson's disease.

研究分野：衛生薬学

キーワード：サルナシ パーキンソン病 プロテオミクス解析 天然化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病の次に多い進行性の神経変性疾患であり、我が国では10万人以上の患者がいるといわれている。パーキンソン病の発症率は高齢になるに連れて上昇するため、超高齢社会に突入した我が国において、パーキンソン病患者の増加が危惧されている。パーキンソン病は中脳黒質部でのドパミン作動性神経細胞の減少・消失による振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害といった運動機能障害が長年にわたり進行する。発症原因は未だ解明されていないが、酸化ストレスが発症や進行に関与することが知られている。活性酸素種によって中脳黒質部におけるドパミン作動性神経細胞中のタンパク質やDNAが酸化損傷を受け、機能不全を起こし、神経細胞死を引き起こすことが、パーキンソン病の発症機序の一つとして考えられている。

サルナシは無毛にした小ぶりのキウイフルーツに似た果実であり、ビタミンC、ビタミンEやポリフェノールといった抗酸化物質が豊富に含まれている。サルナシ果汁には活性酸素種の除去作用に基づく抗酸化効果があることや細胞死の抑制効果やマウスでの記憶改善効果があることが報告されている。本研究では、サルナシ果汁の摂取がパーキンソン病の発症に対して予防効果を示すかどうかをモデルマウスを用いて検討する。また、モデルマウスでの中脳黒質組織におけるタンパク質の網羅的発現量解析を行い、発症予防に関与しているタンパク質を明らかにする。さらに、神経細胞傷害性を抑制する有効物質をサルナシ果汁から精製・同定する。

2. 研究の目的

本研究では、サルナシ果汁の経口投与がパーキンソン病の発症予防に効果があることをモデルマウスを用いて明らかにする。また、モデルマウスの中脳黒質組織からタンパク質を抽出し、プロテオーム解析により、パーキンソン病発症予防に関与するタンパク質を同定することで予防メカニズムを解明する。さらに、サルナシ果汁に含まれている有効成分を同定することでパーキンソン病の発症予防法の確立に貢献する。

3. 研究の方法

(1) パーキンソン病モデルマウスを使用したサルナシ果汁による発症予防の評価

パーキンソン病モデル動物として1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)誘導型モデルマウスを作製した。MPTPは脳内でMPP⁺に代謝されるとドパミン作動性神経細胞に取り込まれ、ミトコンドリアの電子伝達系複合体の働きを阻害し、ATP産生を阻害するとともに、脳内の黒質線条体における活性酸素種が増加し、投与後21日までにパーキンソン病様症状が認められる。本研究では、6週齢の雄性C57/BL6Jマウスを1週間馴化後、コントロール群、MPTP群、MPTP+サルナシ果汁投与群に分けた。MPTP+果汁投与群には飲み水の代わりにサルナシ果汁を解剖日まで継続して自由飲水させた。果汁投与10日後に、MPTP群とMPTP+果汁投与群にMPTP(30mg/kg)を1日1回、5日間連続して腹腔内投与した。MPTP最終投与21日後にポールテスト、カタレプシーテスト、ビームウォークテストによる運動機能試験を行うことで、サルナシ果汁による運動機能への効果を評価した。続いて脳組織を摘出し、パラフィン切片の作製と黒質周辺組織部のタンパク質を抽出した。黒質組織におけるドパミン作動性神経細胞数をドパミン作動性神経細胞のマーカーとして知られているtyrosine hydroxylase (TH)の抗体を用いた免疫組織化学染色法とウェスタンブロットング法によって評価した。

(2) 二次元電気泳動法を用いたタンパク質の発現量解析

(1)で摘出した脳組織から黒質を含む周辺組織を用いてタンパク質を抽出した。蛍光色素(Cy2, Cy3, Cy5)を用いた蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)を行い、タンパク質の網羅的発現変動量解析を行った。サルナシ果汁によって発現量が変動したタンパク質スポットゲルを切り出し、質量分析装置(MALDI-TOF-MS/MS)を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法にてタンパク質の同定を行った。さらに同定したタンパク質の抗体を用いたウェスタンブロットング法を行った。

(3) ドパミン作動性神経細胞死を抑制できる有効物質の精製と同定

サルナシ果汁をヘキサン、酢酸エチル、メタノールを用いて有機溶媒抽出を行い、各抽出画分に分画した。それぞれの抽出画分をドパミン作動性神経細胞であるN27細胞に24時間曝露した。その後、0.1mM過酸化水素を4時間曝露したのちに、細胞増殖アッセイ試験により、どの抽出画分に細胞傷害性の抑制効果がみられるかを評価した。効果がみられた抽出画分について、アセトニトリル/水を移動相とした高速液体クロマトグラフ(HPLC)により、さらなる分離とピークの分取を行った。分取したピーク画分を液体クロマトグラフ質量計(LC-MS/MS)を用いることで解析し、データベースと比較することで化合物の同定を行った。

4. 研究成果

(1) パーキンソン病モデルマウスを使用したサルナシ果汁による発症予防の評価

MPTP 群では、コントロール群と比較して、ポールテスト、カタレプシーテスト、ビームウォークテストにおいて試験を完了するまでの時間が延長し、運動機能障害が見られた。一方でサルナシ果汁投与群では、MPTP 群と比較して有意に試験時間の延長が短縮され、コントロール群と同程度になったことから運動機能の改善が認められた。また、TH 抗体を用いた免疫組織化学染色法では、MPTP によって黒質組織における TH 陽性の細胞数が減少したが、サルナシ果汁の投与によって、MPTP 群と比較して TH 陽性細胞数が増加した。さらにウェスタンブロッティング法でも TH の発現量は MPTP 群で減少し、MPTP+果汁投与群では、MPTP 群と比較して TH の発現量が増加した。以上の結果より、サルナシを摂取することが MPTP が誘導する運動機能障害およびドパミン作動性神経細胞の減少を軽減し、パーキンソン病の発症予防に効果を示す可能性が示唆された。

(2) 二次元電気泳動法を用いたタンパク質の発現量解析

コントロール群、MPTP 群、MPTP+サルナシ果汁投与群のマウスの脳組織から抽出したタンパク質を 2D-DIGE 法によりタンパク質をスポットとして分離し網羅的発現量解析を行った結果、コントロール群と比較して MPTP 群で有意に発現量が変動したタンパク質スポットが 17 個あった。このスポットのうちサルナシ果汁投与により発現量がコントロール群と同程度に改善されたスポットから 3 種類のタンパク質を同定した。同定されたタンパク質は、translation factor Guf1, mitochondrial (GUF1)、transcriptional activator protein Pur-alpha (PURA)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) であった。さらに、これらのタンパク質の抗体を用いたウェスタンブロッティング法での発現量変動解析においても、二次元電気泳動の結果と同じ発現量変動の挙動を示したため、これらのタンパク質がパーキンソン病の発症予防効果に関与する可能性が示唆された。

(3) ドパミン作動性神経細胞死を抑制できる有効物質の精製と同定

サルナシ果汁を有機溶媒によって抽出した画分を N27 細胞に投与し、過酸化水素による細胞傷害性への抑制効果を評価した結果、酢酸エチル抽出、メタノール抽出、メタノール水抽出の画分において、細胞死抑制効果が示された。このうち酢酸エチル抽出画分では、低濃度でも有効な抑制効果がみられたため、HPLC にてさらなる分離・精製を行った。分離したピークを分取し、濃縮後、細胞死抑制効果を検討したところ、複数のピーク画分で活性が認められた。これらのピーク画分を LC-MS/MS にて解析した結果、ポリフェノール類であることが明らかになった。さらに、同定されたポリフェノール類の標準物質でも同様に細胞死抑制効果が示されたことから、これらの物質が、パーキンソン病の発症予防効果に関与する可能性が示唆された。以上の結果から本研究によって、サルナシ果汁の経口摂取がパーキンソン病の発症予防効果や増悪抑制に寄与する可能性を見出し、その有効成分となりうる物質が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitamura Yuki, Oikawa Shinji, Chang Jie, Mori Yurie, Ichihara Gaku, Ichihara Sahoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Carbonylated Proteins as Key Regulators in the Progression of Metabolic Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 844 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12040844	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 Suzuki Mizuho, Takeshita Kyosuke, Kitamura Yuki, Kuribayashi Marie, Huang Zhenlie, Ichihara Gaku, Oikawa Shinji, Ichihara Sahoko	4. 巻 11
2. 論文標題 In Vitro Exposure to Glucose Alters the Expression of Phosphorylated Proteins in Platelets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 543 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11020543	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 北村祐貴	4. 巻 14
2. 論文標題 パーキンソン病発症に対するサルナシ果汁による予防効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1338-1341
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 -
1. 著者名 Kitamura Yuki, Sakanashi Mayuko, Ozawa Azuki, Saeki Yuri, Nakamura Ayano, Hara Yuiho, Saeki Ken-ichi, Arimoto-Kobayashi Sakae	4. 巻 555
2. 論文標題 Protective effect of Actinidia arguta in MPTP-induced Parkinson's disease model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 154 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.116	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 Kitamura Yuki, Mise Nathan, Mori Yurie, Suzuki Yuka, Ohashi Tomoki, Tada-Oikawa Saeko, Tokisu Masaki, Zong Cai, Oikawa Shinji, Ichihara Sahoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomic identification of the proteins related to cigarette smoke-induced cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75429-3	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 Kitamura Yuki, Saeki Ken-ichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Phenotypic analysis of human CYP2C9 polymorphisms using fluorine-substituted tolbutamide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 204 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5582/ddt.2020.03060	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 Kitamura Yuki, Suzuki Takayoshi, Kohara Arihiro, Saeki Ken-ichi	4. 巻 821
2. 論文標題 Hepatocarcinogen 4-methylquinoline induced G:C to C:G transversions in the cII gene in the liver of lambda/lacZ transgenic mice (MutaMouse)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 111709 ~ 111709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrfmmm.2020.111709	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 Mori Yurie, Oikawa Shinji, Kurimoto Shota, Kitamura Yuki, Tada-Oikawa Saeko, Kobayashi Hatasu, Yamashima Tetsumori, Murata Mariko	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村祐貴
2. 発表標題 岡山県産サルナシ果汁によるパーキンソン病モデルマウスに対する発症予防効果
3. 学会等名 第94回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北村祐貴、坂梨まゆ子、鶴飼優貴乃、岡本海佑、小林果、及川伸二、村田真理子、市原佐保子
2. 発表標題 サルナシ果汁によるパーキンソン病の発症予防効果に関するタンパク質の同定
3. 学会等名 第93回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村祐貴、坂梨まゆ子、鶴飼優貴乃、岡本海佑、佐伯憲一、小林果、及川伸二、村田真理子、市原佐保子
2. 発表標題 MPTP誘導型パーキンソン病に対するサルナシ果汁の発症予防効果における比較プロテオミクス解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村祐貴、鶴飼優貴乃、岡本海佑、佐伯憲一、坂梨まゆ子
2. 発表標題 サルナシ果汁の抗酸化作用によるパーキンソン病の発症予防への影響
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部 第10回記念学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴飼優貴乃、北村祐貴、岡本海佑、長谷川瑞歩、福石華果、原那帆、坂梨まゆ子
2. 発表標題 サルナシ果汁の抗酸化作用を介したパーキンソン病予防効果
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村祐貴、等浩太郎、福石華果、坂梨まゆ子、矢田健一郎
2. 発表標題 頸動脈狭窄症の血液バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第92回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北村祐貴、尾澤梓喜、佐伯友里、中村彩乃、原有萌、佐伯憲一、坂梨まゆ子
2. 発表標題 サルナシ果汁によるパーキンソン病の発症予防効果の検証
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部 第9回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北村祐貴、尾澤梓喜、佐伯友里、中村彩乃、原有萌、佐伯憲一、坂梨まゆ子
2. 発表標題 岡山県産サルナシ果汁の経口摂取によるパーキンソン病の発症予防効果の検証
3. 学会等名 第91回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------