

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658103

研究課題名（和文） プラズマローゲンによる脳神経細胞死抑制作用の分子機構

研究課題名（英文） The apoptosis suppression effect on brain neuron of plasmalogen

研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20157639

研究成果の概要（和文）：

本研究はプラズマローゲン(P1s)の脳神経細胞死抑制作用について、細胞実験、機器分析、動物実験を用いて解明することを目的として実施した。細胞実験により P1s の脳神経細胞アポトーシス抑制作用の証明を行うとともに、LC-MS/MS による P1s 分子種の生体組織と食品中の分析法を検討し、最も抗アポトーシス効果の強い DHA 含有 P1s のスクリーニングを行った。また、アルツハイマーモデルラットを作成し、海産物由来 P1s の投与試験を行い記憶学習能維持効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：

The apoptosis suppression effect on brain neuron of plasmalogen was studied by using quantitative analysis, the functional assessment with cell culture study and animal study. The cell culture study was proved the apoptosis suppression effect of plasmalogen. The quantitative analysis of plasmalogen molecular species in foods and biosamples using LC-MS/MS was developed. Food substances were screened for DHA-rich-plasmalogen. DHA-rich-plasmalogen from sea-pineapple was administrated on Alzheimer model rat on the aim to elucidate its neuron protection effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：プラズマローゲン、認知症、LC-MS/MS、動物実験、細胞実験

1. 研究開始当初の背景

プラズマローゲンはグリセロール骨格の 1 位に長鎖アルコールがビニルエーテル結合した、アルケニルアシル構造を持つリン脂質であり、エタノールアミン型のプラズマローゲン(PE プラズマローゲン, P1s, 「3. 研究の方法」図 1) は神経細胞に特徴的に局在する。

我々は認知症の発症に脳脂質の過酸化や代謝異常が関わるのかを検証する目的でアルツハイマー病患者の脳脂質を研究する過程

で、健常な成人脳に比べアルツハイマー病など認知症脳では P1s 濃度が有意に低く、健康脳の 20%から 30%も低値であることを発見した。P1s は通常のジアシル型リン脂質よりヘキサゴナルの非二重層構造をとりやすく、膜融合が活発な神経細胞シナプス膜の流動柔軟性に関与し、脳内の旺盛な情報交換と伝達を可能にしている。したがって、脳内でのプラズマローゲンの欠乏は脳の極めて高次の情報処理能力の維持に致命的な結果をもたらす可能性があり、認知症の発症と悪化に

関与すると考えられる。そこで、脳神経系における PIs の生理機能解明が期待されている。

2. 研究の目的

我が国を含め先進諸国の寿命の伸びに伴い、老化性の健康障害の克服が大きな課題になっている。なかでもアルツハイマー (AD) 病に代表される認知症予防への社会からの要請は極めて大きい。申請者は約 10 年前に健常者の脳と AD 者の脳の脂質分析を行い、AD 脳は健常脳よりプラズマローゲン (PIs、エタノールアミン型) 濃度が有意に低いことを発見し、その後、PIs は脳神経細胞のアポトーシスを効果的に防止する成分であることを明らかにした。そこで本研究では、PIs による脳神経細胞死の抑制分子機構を解明し、食品からの PIs 摂取が脳認知機能に与える影響を評価して、食品による認知症予防の学術的突破口の開拓に挑戦しようとした。

3. 研究の方法

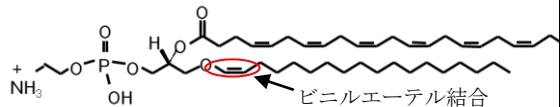


図 1. PE プラズマローゲン

(アルケニルアシル型ホスファチジルエタノールアミン)

本研究はプラズマローゲン (PIs) の脳神経細胞死抑制作用の分子機構を明らかにするため、細胞実験による PIs のアポトーシス抑制作用の証明、LC-MS/MS による PIs 分子種の生体組織と食品の分析法の開発および DHA 含有 PIs のスクリーニング、in vitro 試験による PIs のアミロイド β の凝集阻害および分解の証明を行うとともに、アルツハイマーモデルラットへの PIs 投与試験を実施した。

(1) Neuro-2A 細胞の PIs によるアポトーシス抑制分子機構の解明

マウスの脳由来神経芽細胞腫である Neuro-2A を低栄養状態や、酸素ストレス条件にさらし、再現性のよいアポトーシス誘発モデル系を作成した。アポトーシス誘導は WST-1 法による生細胞数の測定、アネキシン染色、断片化 DNA のアガロース電気泳動、核凝集の蛍光分析で検証し、神経細胞のアポトーシス誘発モデルに、段階的に希釈した PIs を添加し PIs のアポトーシス抑制作用を調べた。

(2) 4000QTRAP LC-MS/MS による PIs 分子種の生体組織と食品の分析法開発

プリカーサーイオンスキャンによるプラズマローゲンの定性分析条件を検討し、続いて 18:0p/oleoyl (18:1) PE、18:0p/arachidonyl (20:4) PE、18:0p/docosahexaenoyl (22:6) PE の 3 分子種

について、MRM (Multiple reaction monitoring) モードでの、PIs 分子種の測定条件を検討し、食品 (海産物および畜肉) 中について PIs 含量を測定した。

(3) PIs 分子種によるアミロイド β ($A\beta$) の凝集阻害および分解作用の相違の検証
各種の PIs 分子種による $A\beta$ 分解促進作用と $A\beta$ 凝集抑制作用の効果を in vitro 試験で検証した。 $A\beta$ の分解促進および凝集抑制作用はチオフラビン T 法 (J. Neurosci. Res 2006:84, 427-433) で行い、 $A\beta$ 42 とチオフラビン T の蛍光分析から効果を評価した。

(4) $A\beta$ 脳室注入アルツハイマーモデルラットへの活性型 DHA-PIs 給与による学習・記憶・行動への影響についての評価研究
ラットでアルツハイマーモデル動物を作成し、これに PIs を経口給与した時の影響を調べた。すなわち Paxinos と Watson のブレインマップに従い、ラットの脳室にアミロイド β を浸透圧ポンプで連続的に注入するものとして作成した (J. Neurochem., 2008:107, 1634-1646)。ほや由来の DHA 含有 PIs をラットへ経口投与し、アルツハイマーモデルラットでの空間認知力抑制に対する PIs の改善作用について検証した。さらに、ラットの血漿と赤血球膜の DHA 含有 PIs 濃度を非投与ラットと比較した。

4. 研究成果

(1) Neuro-2A 細胞の PIs によるアポトーシス抑制分子機構の解明

マウスの脳由来神経芽細胞腫である Neuro-2A を低栄養状態や、酸素ストレス条件で培養し、再現性のよいアポトーシス誘発モデル系を検討し、無血清培地による低栄養条件がよいアポトーシスモデルであるとの結果を得た。この培地にプラズマローゲンを加えると、濃度依存的に細胞増殖能が回復され (図 2) アポトーシスにより生ずる DNA 断片化も抑制されることが示された (図 3)。特に脳に豊富に含まれる DHA 含有プラズマローゲンが最もアポトーシスの誘発が防止できることを明らかにした (図 4)。

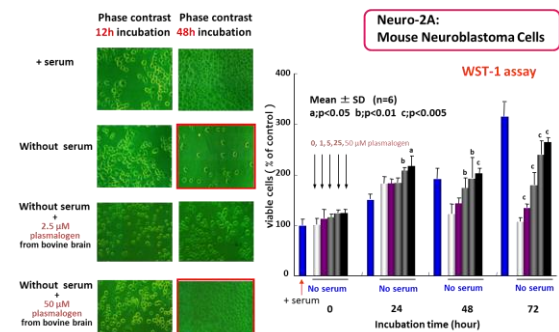


図 2. プラズマローゲンは無血清培地細胞培養による Neuro-2A の細胞増殖抑制を緩和する

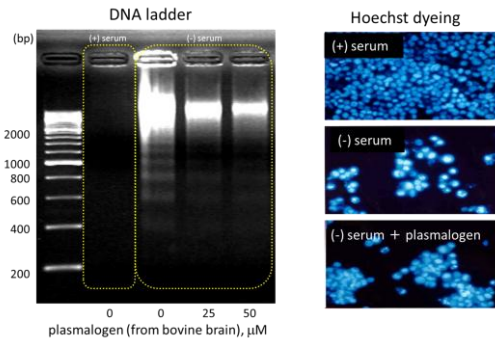


図 3. プラズマローゲンは無血清培地細胞培養による Neuro-2A のアポトーシスを抑制する

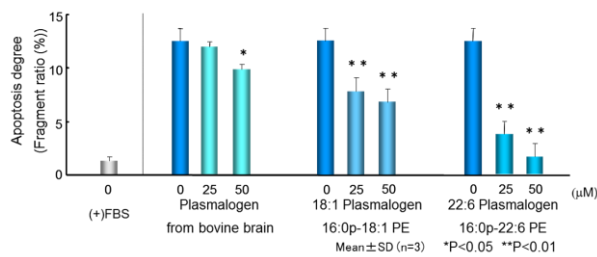


図 4. DHA 含有プラズマローゲンが Neuro-2A のアポトーシスを強く抑制する。

(2) 4000QTRAP LC-MS/MS による PIs 分子種の生体組織と食品の分析法開発
細胞試験により DHA 含有プラズマローゲンに高い脳神経保護作用があることが示唆されたため、動物試験で使用する食品由来 DHA 高含有プラズマローゲンのスクリーニングの実施を目的として、プラズマローゲンの定量分析法の開発を行った。まず、4000QTRAP LC-MS/MS のプリカーサーイオンスキャンによる食品の定性分析条件を確立した(図 5)。

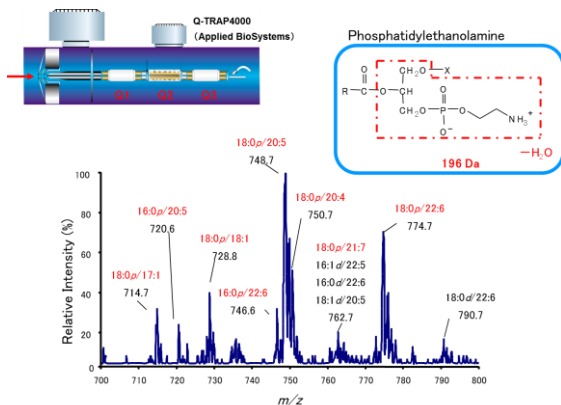


図 5. プリカーサーイオンスキャンによる食品プラズマローゲンの定性分析

この条件を参考に、MRM モードでの食品中の

3 種の PIs 分子種(18:0p/18:1 PE、18:0p/20:4 PE、18:0p/22:6 PE)の測定条件を決定し、食品における PIs の分布を明らかにした。その結果、ホヤに DHA 含有 PIs が豊富に含まれていることを明らかにした(図 6)。

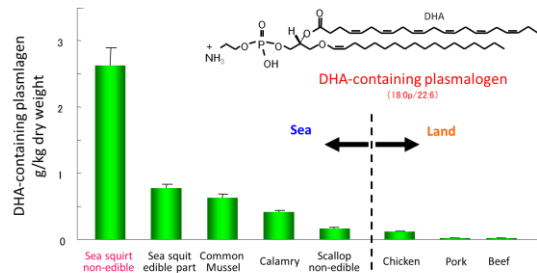


図 6. DHA 高含有プラズマローゲンのスクリーニング

(3) PIs 分子種によるアミロイドβ (Aβ) の凝集阻害および分解作用の相違の検証
脳におけるアミロイドβ (Aβ) の蓄積は神経細胞死を誘発する(Nature, 1987: 325: 733-736)。そこで各種の PIs 分子種による Aβ 分解促進作用と Aβ 凝集抑制作用の効果を in vitro 試験で検証し、PIs に凝集阻害作用があることを確認した(図 7)。

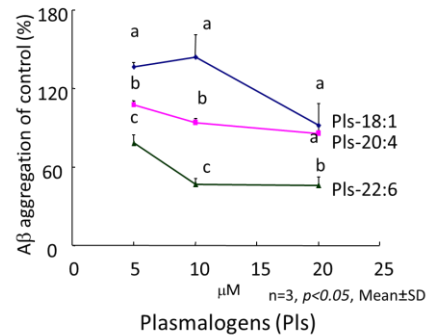


図 7. 多価不飽和型のプラズマローゲンはβアミロイドの凝集を阻害する

(4) Aβ 脳室注入アルツハイマーモデルラットへの活性型 DHA-PIs 給与による学習・記憶・行動への影響についての評価研究
Paxinos と Watson のブレインマップに従い、ラットの脳室にアミロイドβ を浸透圧ポンプで連続的に注入し、アルツハイマーモデルラットを作成した。このアルツハイマーモデルラットを用い、アミロイドβ によって引き起こされるモデルラットの空間認知力の低下が有意に抑制されることを確認した。すなわち、ホヤ PIs に特に多く含まれている DHA 含有 PIs 分子種のラットへの経口投与実験を行い、アルツハイマーモデルラットでの空間認知力抑制に対する PIs の改善作用について調べたところ、PIs の経口投与がアルツハイマーモデルラットの空間認知力を向上させることを明らかにした(図 8)。さらに、アルツハイマーモデルラットの脳中の PIs 含量お

よび脂肪酸組成を測定したところ、P1s の経口投与による脳中の P1s の上昇は見られなかったが、海馬と大脳の DPA (n-3) 含量が増加した(図 9)。また、正常ラットへの P1s 経口投与試験を行い、血漿と赤血球膜の DHA 含有 P1s 濃度を非投与ラットと比較したところ、P1s の経口摂取により、血中の P1s 濃度が上昇したことを明らかにした。

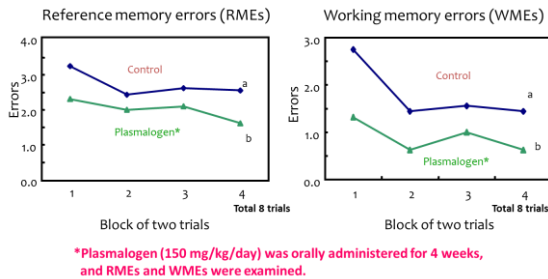


図 8. DHA 高含有プラズマローゲン摂取によるアルツハイマーモデルラットの空間認知力の向上

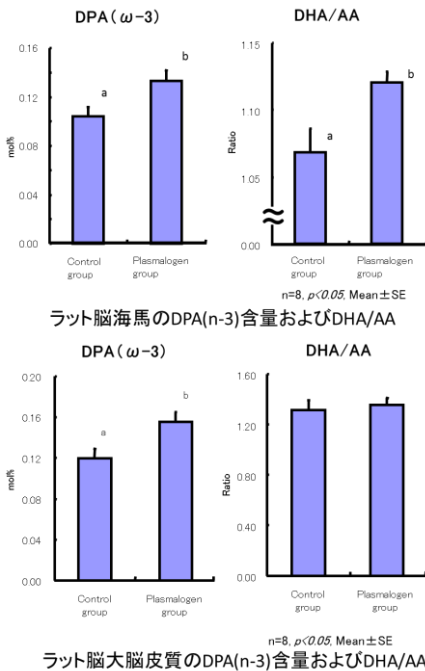


図 9. DHA 高含有プラズマローゲン摂取により脳の DPA(n-3)含量が上昇する

以上、本研究により、P1s が神経細胞の保護機能をもつことが証明され、アミロイドβ凝集阻害活性をもつのは多価不飽和脂肪酸を 2 位にもつプラズマローゲンであり、海産物、特にホヤには DHA 高含有プラズマローゲンが豊富に含まれていることを明らかにした。さらに、このホヤ由来プラズマローゲンをアルツハイマーモデルラットに経口投与し、空間認知力の向上を明らかにした。この結果より、プラズマローゲンの神経細胞保護機能が、生体でも期待できることが示唆された。

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 1 件)

1. 宮澤陽夫, ホヤ由来プラズマローゲンによる認知症予防の試み. シンポジウム記録 “アンチエイジングを目指した水産物の利用”, 日本水産学会誌, 査読有 **77**: 159 (2011)
doi.org/10.2331/suisan.77.258

[学会発表] (計 2 件)

1. 浅野 良緒, 山下 慎司, 串田 康子, 阿部 彰宏, 藤田 星子, 木村 ふみ子, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫, 天然物や食品中の PE プラズマローゲンの HPLC 定量法の比較検討. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台, 2013, 3/24-27)
2. Teruo Miyazawa, Plasmalogen prevents neuronal apoptosis. International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods (札幌, 2011, 11/14-17)

[図書] (計 3 件)

1. 宮澤陽夫, ホヤ (海鞘) 由来リン脂質プラズマローゲンによる認知症予防への取り組み. アンチエイジングを目指した水産物の利用. 恒星社厚生閣, 52-60 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/kinoubun/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 20157639

(2) 研究分担者

仲川 清隆 (NAKAGAWA KIYOTAKA)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 80361145

木村 ふみ子 (KIMURA FUMIKO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 50321980