

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500989

研究課題名(和文)スクアレン及びスクアランのパーキンソン病モデルマウスに対する影響に関する研究

研究課題名(英文)Effects of squalene and squalane on the Parkinson's disease mouse model

研究代表者

加太 英明(Kabuto, Hideaki)

香川県立保健医療大学・教養部・教授

研究者番号：00321266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)モデルマウスにおける脳内ドーパミン(DA)減少に対してスクアレン(SQE)は予防効果を示したが、スクアラン(SQA)は低下促進作用を示し酸化障害が増加していた。次に、PD病態改善薬であるL-DOPAの副作用であるPDの進行促進に対するSQEの効果について検討したところ、PD発症後においてもSQEはDA低下を抑制し、L-DOPAによるさらなる低下も抑制した。しかしながら活性酸素種消去活性に変化はなかった。以上の結果は、SQEはPDに対して予防効果ばかりでなく病態進行抑制効果も期待できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of squalene (SQE) and squalane (SQA) on a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson's diseases (PD) mouse model. SQE administration 7 days before 6-OHDA injection prevented a reduction in striatal dopamine (DA) levels, while the administration of SQA enhanced the levels. SQA increased a marker of lipid peroxidation. These results suggest that SQA increases oxidative damage in the striatum and exacerbates the toxicity of 6-OHDA, while SQE prevents it. Then, we examined the effects of administration of SQE and L-DOPA, the most popular therapeutic medicine for treating PD, for 4 weeks following a single 6-OHDA injection. SQE inhibited 6-OHDA induced DA depression and further depression by L-DOPA with 6-OHDA. SQE and/or L-DOPA had no effect on antioxidants levels and enzyme activities. The effects of pre- and post-treatment SQE suggest its possible uses in the treatment of PD. More studies are needed to understand the mechanisms of these SQE effects.

研究分野：神経化学

キーワード：パーキンソン病 6-ヒドロキシドーパミン L-DOPA スクアレン スクアラン ドーパミン 酸化障害

1. 研究開始当初の背景

近年酸化的障害に対する予防食の開発が注目されている。すなわち抗酸化物質を含む食品の摂取により、脂質や核酸の過酸化が抑制され、動脈硬化や神経変性疾患などの発症や進行の予防効果が期待されている。スクアレン(SQE)はカロチンやビタミンEなどと似た構造をしている(Gregory. *Altem Med Rev*, 1999, 4:29-36)。サメの肝油やオリーブオイル、米糠油等に含まれている。SQEには抗がん作用(Newmark. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1997, 6:1101-1103)、免疫増強作用などが報告され(Reddy and Couvreur. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61:1412-1426)、それらの生理活性は、抗酸化活性が関与が考えられている(Zih-Rou et al, *Molecules*, 2009, 14: 540-554)。スクアラン(SQA)は、SQEの二重結合をすべて単結合にした物質であり、皮膚の保湿剤、脂溶性薬物の溶剤などに使われている(Christopher. *Molecules*, 2009, 14: 3286-3312)が、薬理効果や抗酸化活性は報告されていない。

パーキンソン病(PD)は、脳線条体中のドーパミン(DA)神経細胞の脱落を伴う神経変性疾患であり、その細胞死に活性酸素種が関与していると考えられている(Kondo, *Ann NY Acad Sci*, 1996, 786:206-216)。PDモデル動物を用いた実験では、抗酸化物質の投与や活性酸素種処理酵素の増強が予防的に働く事が示されている(Cadet et al, *Brain Res*, 1989, 476:10-15)。また、6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を投与したラットやマウスは、よいPDモデル動物と考えられている(Tolwani et al, *Lab Anim Sci*, 1999, 49:363-371)。我々は、すでに6-OHDA投与によるPDモデルマウスに生姜の成分であるジンゲロンや丁子の成分オイゲノールを投与すると、SOD活性や抗酸化物質が増加し、線条体内DAの低下が抑制されることを明らかにしている(Kabuto et al, *Neurochem Res*,

2005, 30:325-332, Kabuto et al, *Biol Pharm Bull*, 2007, 30:423-427)。以上の結果は、活性酸素種消去活性を持つ物質が神経細胞保護作用をもつこと、活性酸素種処理酵素や内在性抗酸化物質の誘導に影響をおよぼすことを示している。

PDの治療薬としては一般にL-DOPAが使われるが、L-DOPA投与により病状は改善するものの行動異常、病態の進行亢進等の副作用があることが知られている(Ogawa et al, *Neurosci Lett*, 1994, 171:55-58)。すなわちL-DOPA投与によりDA代謝が亢進し病状は改善されるものの、その際発生する活性酸素種がDA神経に対して酸化的障害を与えている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

SQEおよびSQAをあらかじめ1週間投与したマウスに6-OHDAを投与し、その線条体内DA濃度低下に対する効果と、活性酸素種処理機構への影響について観察する。また、6-OHDA投与によりマウスをPDとした後に、L-DOPAと共にSQEを投与し、病態進行および神経系への酸化的障害に対する効果を観察する。

以上の結果を検討することにより、SQEもしくはSQAのPDに対する予防効果、および病態進行抑制効果について検討する。

3. 研究の方法

ICR 雄性マウス(30g, 株チャールズリバー)を使用した。動物実験は「香川県立保健医療大学動物実験に関する指針」に従った。

(2)動物への処置

SQE, SQAの6-OHDA毒性に対する予防効果SQEもしくはSQAを0.1及び1.0mg/kgとなるよう1日1回経口投与した。7日間投与後6-OHDAを60µg脳室内投与し、さらに7日間SQEもしくはSQAを投与した後ペントバルビタール麻酔下に線条体を分離し測定用の試

料とした。対照群には、SQE, SQA, 6-OHDA の代わりにそれぞれの溶媒を投与した。

SQE, SQA の線条体中の活性酸素種処理酵素活性、チオバルビツール酸反応生成物(TBARS, 脂質過酸化の指標)、脂肪酸組成への影響
SQE 又は SQA を 1 日 1 回 7 日間 1.0mg/kg 投与した後、ペントバルビツール酸麻醉下に線条体を分離した。対照群には、SQE, SQA, 6-OHDA の代わりにそれぞれの溶媒を投与した。

6-OHDA 投与マウスの線条体中 DA 濃度に対する L-DOPA の影響
マウスを 3 群に分けた。第 1 群は、直ちにペントバルビツール酸麻醉下に線条体を取り出した。第 2 群は 6-OHDA 60 µg を投与した後 1 日 1 回生理食塩水を腹腔内投与した。第 3 群は 6-OHDA 60 µg を投与した後 1 日 1 回 L-DOPA を 200mg/kg 腹腔内投与した。第 2 群、第 3 群ともに 6-OHDA 投与 1, 2, 4 週間後に線条体を取り出し、DA 測定用の試料とした。

6-OHDA 毒性に対する L-DOPA および SQE の影響

予防効果が認められた SQE の効果のみ実験を行った。マウスを 6 群に分けた。第 1 群(対照群)、第 3 群(SQE 投与群)に対しては、生理食塩水 2 µL を脳室内投与した。第 2 群(6-OHDA 投与群)、第 4 群(6-OHDA+SQE 投与群)、第 5 群(6-OHDA+L-DOPA 投与群)、第 6 群(6-OHDA+L-DOPA-SQE 投与群)に対しては 6-OHDA 60 µg を脳室内投与した。投与 24 時間後より、第 1 および第 2 群に対しては生理食塩水、第 3, 第 4 群および第 6 群に対しては SQE を 100mg/kg、第 5, 第 6 群に対しては L-DOPA を 200 mg/kg となるように 1 日 1 回、腹腔内投与した。4 週間投与後、最終投与 24 時間後にペントバルビツール酸麻醉下にマウスを断頭し線条体を分離した。

(3)DA およびその代謝産物(ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)、ホモバニリン酸(HVA))の測定

マウス線条体に、氷冷した 10mM EDTA を含

む 200 mM 過塩素酸溶液を加えホモジナイズ、遠心分離後得られた上清を孔径 0.45 µm のフィルターに通し、電気化学検出器(ECD; 株式会社エイコム)付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC; 株式会社島津)に注入して測定した。

(4)SOD 活性

SOD テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いて測定した。

(5)カタラーゼ活性

Aebi の方法に従って行った(Aebi, 1984, Method in Enzymology, 105:121-126)。

(6)グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)活性

バイオテック GPx-340 キット(株式会社OXIS インターナショナル)を用いて行った。

(7)GSH および L-アスコルビン酸濃度

組織を 10 倍量の 20 mM デフロキサミンメシレートを含む 5%メタリン酸溶液でホモジナイズ、遠心分離後、上清を ECD(株式会社エイコム)付き HPLC (株式会社島津)に注入して測定した。

(8)コレステロール濃度

組織を 10 倍量のクロロホルム/メタノール(2/1)でホモジナイズ、遠心分離後上清を窒素ガスにて乾固させた後 2-プロパノールにて溶解し、コレステロール測定キット(コレステロール E テストワコー)にて測定した。

(9)脂肪酸の測定

ホルヒ法(Folch and Sloane, J Biol Chem, 1957, 226:497)にて脂質を抽出、脂肪酸メチル化キット、精製キット(株式会社ナカライテスク)にてメチル化後精製をおこない、GC/MS (GCMS-QP5050A; 株式会社島津製)にて測定した。

(10)タンパク質定量

Lowry らの方法(Lowry et al, 1951, J. Biol. Chem., 193:265-275)に従って測定した。

(11)統計計算

データは、平均 ± SEM で表した。有意差検定は、一元配置分散分析により F 値が有意であったものに対して、Scheffe の F テストを用い、 $p < 0.05$ であったものを有意と判定した。

4. 研究成果

(1)SQE および SQA の PD 予防効果

線条体内 DA 及びその代謝産物(DOPAC ,HVA) への影響

線条体内 DA および DOPAC 濃度は, 6-OHDA 投与により有意に低下した. SQE 投与によりその低下は投与量依存的に緩和された(Fig. 1). しかしながら SQA 投与により増強された(Fig. 2).

線条体内 TBARS 濃度への影響

SQE 投与では, 線条体内 TBARS 濃度に影響はなかったが, SQA 投与により, 対照群と比べ有意な増加が見られた(Fig. 3).

線条体内活性酸素種処理酵素活性に及ぼす影響

SQE ,SQA 投与いずれも ,SOD ,カタラーゼ , GPx 活性に対して有意な変化は示さなかった (Table.1).

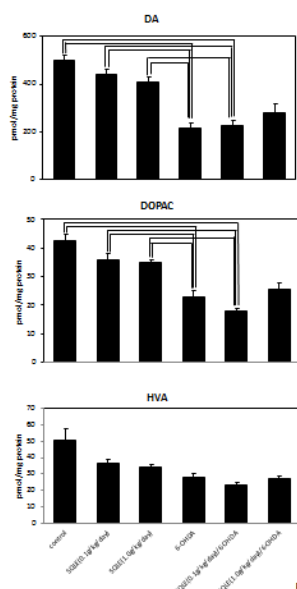


Fig. 1

Fig. 1. Effects of oral administration of squalene for the 7 days before and 7 days after the injection of 6-OHDA on DA, DOPAC, and HVA levels in the mouse striatum. Data are expressed as means \pm SEM of 6-8 mice in each group. ^a $p < 0.05$, compared with the control (one-way ANOVA followed by Scheffe's F test).

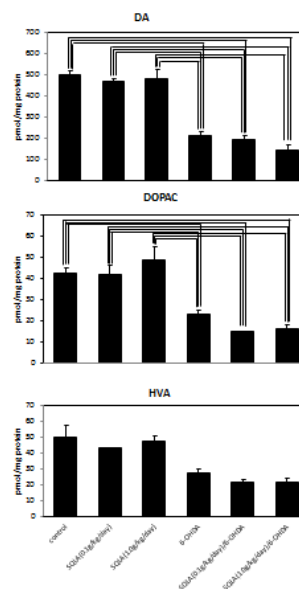


Fig. 2

Fig. 2. Effects of oral administration of squalane for the 7 days before and 7 days after i.c.v. injection of 6-OHDA on DA, DOPAC, and HVA levels in the mouse striatum. Symbols are as described for Fig. 1.

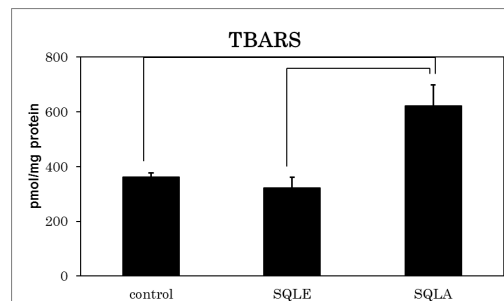


Fig. 3. Effects of oral administration of squalene and squalane for 7 days on TBARS levels in the mouse striatum. Symbols are as described for Fig. 1.

Table 1. Activities of SOD, catalase, and GPx in the mouse striatum after administration of squalene or squalane for one week

	control	SQLE	SQA
SOD	473.6 \pm 38.9	465.5 \pm 22.6	464.4 \pm 12.7
catalase	549.9 \pm 22.9	549.4 \pm 16.1	605.0 \pm 29.7
GPx	2.09 \pm 0.20	2.20 \pm 0.08	2.18 \pm 0.16

Data (U/mg protein) are expressed as the mean \pm SEM. n=5-8.

Statistical significance was determined at the $p < 0.05$ level using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. No significant difference was observed.

脳内脂肪酸組成への SQE , SQA の影響

DHA , EPA , アラキドン酸 , リノレン酸 , リノール酸およびリノレン酸を測定したが , そ

それぞれ有意な差は認められなかった。しかしながらリノール酸とリノレン酸の比を求めたところ、SQE、SQA 投与とともに有意な低下を示した (Table.2)。

Table 2. Concentration of fatty acids in mouse striatum after administration of squalene or squalane for one week

	control	SQE	SQA
Stearic Acid (C18:0)	703.7 ± 78.2	820.9 ± 127.2	656.7 ± 87.1
Linolenic Acid (C18:2n-3)	64.3 ± 7.6	78.0 ± 9.7	61.9 ± 4.6
EPA (C20:5n-3)	12.6 ± 1.5	19.5 ± 2.7	15.8 ± 2.2
DHA (C22:6n-3)	1517.1 ± 184.8	1933.4 ± 305.8	1517.1 ± 183.0
Linoleic Acid (C18:2n-6)	55.3 ± 5.5	50.7 ± 6.6	42.7 ± 2.3
Arachidonic Acid (C20:4n-6)	1256.3 ± 139.2	1542.1 ± 227.9	1106.6 ± 140.2
Linoleic Acid/Linolenic Acid	0.944 ± 0.069	0.651 ± 0.026 a	0.697 ± 0.027

Data (ng/mg wet weight and the ratio) are expressed as the mean ± SEM, n=5-8. Differences were examined using ANOVA followed by Scheffe's F test (fatty acids) and Mann-Whitney's U test (Linoleic Acid/Linolenic Acid). *p<0.05

(2) 6-OHDA 毒性に対する L-DOPA および SQE の影響

6-OHDA 投与マウスの線条体中 DA 濃度に対する L-DOPA の影響

6-OHDA 投与によりマウス脳内 DA および DOPAC 濃度は低下した。この低下は、L-DOPA を投与しなければ回復したが、L-DOPA を投与するとさらに低下した (Fig.4)。

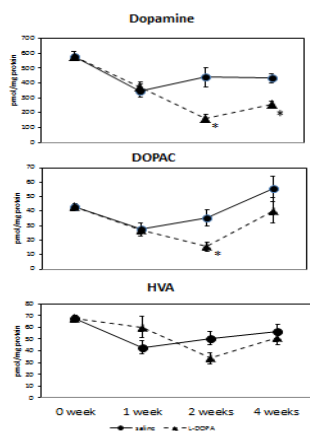


Fig. 4. Time-dependent changes of the levels of DA and its metabolites after 1, 2 and 4 weeks administration of L-DOPA following one 6-OHDA icv injection. Data are expressed as the mean ± SEM of 7-8 mice in each group. Data were compared with those before 6-OHDA injection using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. $p < 0.05$.

線条体内 DA およびその代謝産物濃度への、6-OHDA 投与後 4 週間 SQE および L-DOPA 投与

の影響

SQE 投与により、6-OHDA による DA の低下は抑制された。また、L-DOPA 投与による低下増強も緩和された。SQE のみの投与では、線条体内 DA 濃度に影響はなかった。代謝産物である DOPAC, HVA 濃度には有意な変化は認められなかった (Fig.5)。

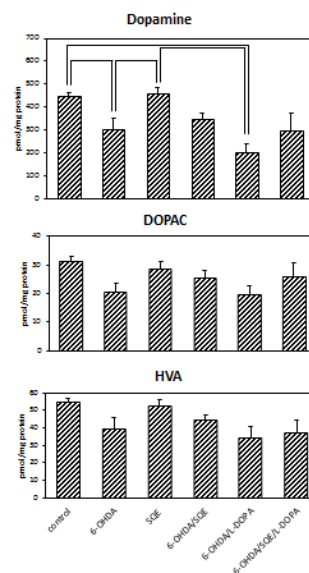


Fig. 5. The levels of DA and its metabolites after 4 weeks administration of L-DOPA and/or SQE following one 6-OHDA icv injection. Data are expressed as the mean ± SEM of 7-8 mice in each group. Data were compared with each other using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. * $p < 0.05$.

線条体内抗酸化酵素 (SOD, カタラーゼ, GPx) 活性への、6-OHDA 投与後 4 週間 SQE および L-DOPA 投与の影響

SOD, カタラーゼ, GPx いずれの活性にも有意な変化は認められなかった (Table.3)。

Table 3. Activity of SOD, catalase, and GPx in mouse striatum after 4 weeks administration of SQE and/or L-DOPA following one 6-OHDA icv injection.

	Control	6-OHDA	SQE	6-OHDA/SQE	6-OHDA/L-DOPA	6-OHDA/SQE/L-DOPA
SOD	18.8 ± 1.84	16.9 ± 1.74	16.1 ± 1.77	18.4 ± 0.95	15.8 ± 1.53	17.2 ± 1.30
Catalase	25.5 ± 1.88	25.0 ± 1.84	23.2 ± 1.47	25.0 ± 1.72	25.6 ± 1.07	24.7 ± 1.65
GPx	53.9 ± 3.06	55.1 ± 3.34	51.0 ± 3.50	49.6 ± 2.05	43.5 ± 2.60	41.1 ± 2.73

Data (U/mg protein) are expressed as the mean ± SEM, n = 6-7. Significance was determined as $p < 0.05$ using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. No significant difference was observed.

線条体内抗酸化物質 (GSH, L-アスコルビン酸) 濃度への、6-OHDA 投与後 4 週間 SQE および L-DOPA 投与の影響

全 GSH , 酸化型グルタチオン (GSSG) , 全 L-アスコルビン酸 , 酸化型 L-アスコルビン酸濃度 , いずれにも有意な変化は認められなかった (Table. 4) .

Table 4. Concentrations of total glutathione (GSH+GSSG), GSSG, total L-ascorbic acid, and oxidized L-ascorbic acid in mouse striatum after 4 weeks administration of SQE and/or L-DOPA following one 6-OHDA icv injection.

	Control	6-OHDA	SQE	6-OHDA/SQE	6-OHDA/L-DOPA	6-OHDA/SQE/L-DOPA
GSH+GSSG	10.4 ± 0.82	10.6 ± 0.91	11.0 ± 0.79	12.2 ± 0.85	11.4 ± 0.71	11.1 ± 0.62
GSSG	0.24 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.276 ± 0.10	0.26 ± 0.06	0.27 ± 0.08
Total L-ascorbic acid	3.19 ± 0.12	3.16 ± 0.10	3.02 ± 0.08	2.99 ± 0.17	2.88 ± 0.09	2.72 ± 0.09
Oxidized L-ascorbic acid	0.122 ± 0.02	0.111 ± 0.02	0.128 ± 0.01	0.150 ± 0.03	0.121 ± 0.01	0.070 ± 0.02

Data (glutathione: nmol/mg protein; L-ascorbic acid: mg/g protein) are expressed as the mean ± SEM. n = 6-7. Significance was determined as p < 0.05 using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. No significant difference was observed.

脳内コレステロールおよび脂肪酸組成への , 6-OHDA 投与後 4 週間 SQE および L-DOPA 投与の影響

6-OHDA 投与により脳内コレステロール濃度は低下したが , SQE 投与によりこの低下は抑制された . L-DOPA 投与により , 6-OHDA 投与による低下がさらに大きくなったが , SQE を投与してもこの低下は抑制できなかった . 6-OHDA , SQE , L-DOPA いずれの投与でも脳内脂肪酸組成には有意な変化は引き起こさなかった (Table. 5) .

Table 5. Concentrations of lipids in mouse striatum after 4 weeks administration of SQE and/or L-DOPA following one 6-OHDA icv injection.

	Control	6-OHDA	SQE	6-OHDA/SQE	6-OHDA/L-DOPA	6-OHDA/SQE/L-DOPA
Cholesterol	13.6 ± 0.34	11.7 ± 0.17 a	12.7 ± 0.28	13.6 ± 0.41	7.14 ± 0.60 ab,c,d	7.60 ± 0.39 ab,c,d
Palmitic acid	220 ± 10.1	193 ± 20.1	200 ± 9.64	189 ± 7.77	221 ± 18.9	215 ± 20.2
Stearic acid	393 ± 17.1	284 ± 39.0	370 ± 15.0	330 ± 15.3	392 ± 24.8	248 ± 27.9
oleic acid	310 ± 9.28	149 ± 20.3	206 ± 6.51	176 ± 7.90	219 ± 43.3	187 ± 31.3
Linoleic acid	19.6 ± 1.11	18.5 ± 1.70	21.7 ± 0.91	19.0 ± 1.39	19.4 ± 3.45	15.5 ± 1.63
Arachidonic acid	266 ± 7.65	223 ± 20.0	273 ± 10.2	243 ± 11.2	295 ± 47.8	217 ± 36.9
DHA	249 ± 13.5	183 ± 20.7	250 ± 8.71	218 ± 12.9	266 ± 51.5	170 ± 30.2

Data (cholesterol: μg/mg wet weight; fatty acids: ng/mg wet weight) are expressed as the mean ± SEM. n = 5-8. Significance was determined as p < 0.05 using one-way ANOVA followed by Scheffe's F test. p < 0.05, as compared with a: control; b: 6-OHDA; c: SQE; d: 6-OHDA/SQE. n = 6-8

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)

Kabuto H, Yamanushi TT, Janjua N, Takayama F, Mankura M. Effects of squalene/squalane on dopamine levels, antioxidant enzyme activity, and fatty acid composition in the striatum of Parkinson ' s disease model mouse. Journal of Oleo Science .62: 21-28, 2013

[学会発表] (計 4 件)

加太英明 , 山主智子 , 万倉三正 , 高山房子 . パーキンソンモデルマウス脳線条体内脂肪酸組成に及ぼすスクアレンおよびスクアランの影響 (Effects of squalene and

squalane on fatty acids composition in the striatum of Parkinson ' s disease model mouse) 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 2012 年 5 月 10-12 日 (仙台)

加太英明 , 山主智子 . 症状改善薬投与に伴うパーキンソン病モデルマウスの病態進行に及ぼすスクアレンの影響 (Effects of squalene on the pathological progress in the Parkinson ' s disease mouse model) . 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 2013 年 5 月 14-16 日 (名古屋)

加太英明 , 山主智子 , 照屋茜 , 問田真由 , 香川穂輝 , 高山房子 , 万倉三正 . 症状改善薬投与に伴うパーキンソン病モデルマウスの病態進行に及ぼすスクアレンの影響 () - 抗酸化活性への影響 - (Effects of squalene on the pathological progress in the Parkinson ' s disease mouse model (II) . -Antioxidant activity-) 第 68 回日本栄養・食糧学会大会 2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日 (札幌)

Kabuto H, Yamanushi TT, Takayama F, Mankura M. Pathological progress by L-DOPA in Parkinson ' s diseases model mouse was diminished by squalene administration. 12th Asian Congress of Nutrition. May 14-18, 2015 (Yokohama)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

加太英明 (KABUTO HIDEAKI)
香川県立保健医療大学・教養部・教授
研究者番号 : 00321266

(2) 研究分担者

山主智子 (YAMANUSHI TOMOKO)
香川県立保健医療大学・教養部・准教授
研究者番号 : 40382395