

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19673

研究課題名（和文）過酸化脂質によるアルツハイマー病発症機構の解明

研究課題名（英文）A possible mechanism of Alzheimer's disease caused by lipid peroxidation

研究代表者

及川 伸二（OIKAWA, Shinji）

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10277006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の発症には多くの要因が関係すると考えられているが、近年脂質類のアルツハイマー病への関与を示す報告が多数なされている。脂質は、加熱などにより酸化され過酸化脂質を生じ、この過酸化脂質がさらに生体に酸化ストレスをもたらすことがよく知られている。本研究では、過酸化脂質などにより酸化ストレスを暴露したサルを用いて、細胞死誘導と酸化損傷タンパク質の変動について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

-6系の食用油が加熱されることにより生じる過酸化脂質が、アルツハイマー病や2型糖尿病、非アルコール性脂肪肝などの生活習慣病に関与することが最近明らかになりつつある。過酸化脂質は、生体内で酸化ストレスを引き起こし細胞死を誘導する。本研究により、過酸化脂質などにより誘導される酸化ストレスが細胞死を引き起こすメカニズムの一端が明らかになり、生活習慣病の予防法の開発にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease is the most common type of dementia and progressive neurodegenerative disease. The recent findings suggest that lipid peroxidation plays an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. It is well known that lipids are oxidized by heating to produce lipid peroxides, which further cause oxidative stress in the body. In the present study, we investigated the induction of cell death and changes in oxidative damage proteins in monkeys exposed to oxidative stress.

研究分野：予防医学

キーワード：アルツハイマー病 プロテオミクス解析 過酸化脂質 酸化ストレス バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の認知症患者はここ数年 500 万人近くまで増加しているが、アルツハイマー病はその約 2/3 を占めると報告されている。アルツハイマー病が発見されてから 1 世紀以上過ぎた今日でも未だ有効な根本的治療法は無い。アルツハイマー病の発症機構もアミロイド 仮説をはじめ数多くの要因の関与が報告されているが、詳細な発症機構についても未だ明らかにされていない。その中でも、アルツハイマー病の発症に酸化ストレスが関与していることが多数報告されている。最近、脂質（脂肪酸）が酸化された 4-ヒドロキシノネナル（HNE）などの過酸化脂質やトランス脂肪酸が酸化ストレスを介して神経細胞死をひき起こすことが明らかになった。また、高脂血症治療薬であるスタチンがアルツハイマー病の発症率を低下させるという報告もあることから、脂質ないしその代謝産物も認知症の発症に関与している可能性が非常に高い。

多価不飽和脂肪酸（PUFA）は、細胞膜において流動性を高め、リン脂質間に膜タンパク質が介在するスペースを提供している。魚類などに多く含まれているドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）など 3 系の PUFA は脳や目の発達と機能維持などに必須であり、酸化されても細胞毒性は少ない。しかし、植物油のリノール酸やアラキドン酸など 6 系の PUFA は酸化されると、過酸化脂質である HNE を産生し、細胞死を引き起こす。HNE は、リノール酸を含むサラダ油の加熱により多量に生成し、アルツハイマー病患者の海馬など記憶に関わる部位に高濃度に含有されることが報告されている。

我々は現在までに、酸化ストレス暴露サルの海馬において、分子シャペロンであると同時にリソソーム膜の安定化作用も持つ Hsp70.1 の 469 番目のアルギニンに酸化損傷が起きていることを初めて見つけた (Oikawa S, Yamashima, T, 他, *Free Radic Biol Med.* 46, 1472-1477, 2009; Yamashima, T, Oikawa, S. *Prog Neurobiol.* 89, 343-358, 2009)。さらに、Ca<sup>2+</sup>依存性のカルパインがカルボニル化という酸化損傷を受けた Hsp70.1 を切断しリソソームを破綻させ、神経細胞死を誘導するメカニズムを明らかにしている (Sahara S, Yamashima T. *Biochem Biophys Res Commun.* 393, 806-811, 2010)。

## 2. 研究の目的

1990 年代に G 蛋白質共役型オーファン受容体（GPCR）のリガンド探索によって、FFA 受容体（FFAR）ファミリーの存在が明らかになった。その中で、GPR40（別名 FFAR1）は食事由来の中・長鎖の遊離脂肪酸に対して高親和性を示す 7 回膜貫通型の GPCR である。GPR40 は、脳の海馬・視床下部や膵臓の細胞に高発現し、脂肪酸のシグナルを受けてニューロン新生やインスリン分泌を調節している。一方で、GPR40 はトランス脂肪酸などの遊離脂肪酸と結合することで活性が上昇し過剰の Ca<sup>2+</sup>を細胞内に流入させ神経細胞死を引き起こすとされるが、そのメカニズムは十分明らかにされていない。

本研究では、酸化ストレスを暴露したサルを用いて、アルツハイマー病の発症に重要な役割を果たしている海馬の神経細胞死誘導機構を、海馬の各領域中の酸化損傷タンパク質の変動に注目し解析を行った。また、酸化ストレスによるカルパインの活性化と Hsp70.1 のカルボニル化を介した細胞死に過剰の Ca<sup>2+</sup>動員がトリガーとして関与している可能性があることから、GPR40 の発現についても解析した。

## 3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス暴露：トランス脂肪酸添加飼料で飼育したニホンザル 6 匹に HNE を静脈内投与、また対照として同数の非投与群を設定した。アルツハイマー病患者の血清 HNE 濃度は平均 20 $\mu$ mol/L と報告されており、この濃度を再現する HNE 5mg/20mL を毎週 1 回、6 ヶ月間にわたり若年サルに静脈内注射した。その後、海馬などの組織を摘出し液体窒素で凍結、-80 にて保存した。同様に、サルに一過性全脳虚血による酸化ストレス暴露も行った。一過性全脳虚血は、体重 5-10kg のサルを用い、全身麻酔下で無名動脈と左鎖骨下動脈とを確保し、両血管をブルドッグクランプにて 20 分間血流遮断した後、血流を再開した。レーザードップラー脳血流計を用いて、クランプ中の脳血流が 0.5ml/100g brain/min 以下であることを確認した。正常サルと虚血再灌流サルから経時的に海馬などの組織を摘出し、直ちに液体窒素で凍結後、-80 にて保存した。

## (2) 海馬における細胞死と GPR40 の解析方法

組織標本は、4%パラホルムアルデヒドで固定した後パラフィンに包埋し、5 $\mu$ mの切片を作成した。次いで、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) で染色し顕微鏡で観察を行い、錐体神経細胞の好酸性の凝固壊死、消失を指標に細胞死の評価を行った。また、GRP40 については、切片を 5%ヤギ血清でブロッキングした後、抗 GRP40 抗体および蛍光色素結合二次抗体と反応させ、レーザー共焦点顕微鏡で発現を解析した。

## (3) 酸化損傷タンパク質の解析

### 2D-DIGE 法

本研究ではプロテオミクスを用いたタンパク質の定量解析法として、蛍光標識二次元ディフュージョン電気泳動法 (2D-DIGE 法) を用いた。2D-DIGE 法は、蛍光色素で標識したサンプルと内部標準を同一のゲルで二次元電気泳動を行うことにより、内部標準を用いたゲル間でのマッチングが可能となり、各タンパク質の発現量を正確に定量することができる。酸化ストレス暴露サル及びコントロールの組織からタンパク質を精製し、比較する両群を Cy3 と Cy5 の蛍光色素で標識した。同時に、各サンプルを等量ずつ混合した後、Cy2 の蛍光色素で標識し内部標準とした。Cy3、Cy5 で標識した両群 1 サンプルずつと内部標準を 1 枚のゲルサンプルとして混合し、等電点電気泳動次いで二次元電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、各タンパク質を各スポットとして分離した。各ゲルイメージを画像解析装置 Typhoon FLA9500 で取得後、統計解析ソフト DeCyder を用いて内部標準を基準に各スポットの発現量を定量解析した。

### 2D-Oxyblot 法

タンパク質のカルボニル化量を解析するため、組織からタンパク質を抽出・精製・濃縮し、固定化 pH 勾配ゲル (Immobiline DryStrip) を用いた等電点電気泳動にて等電点で分離した後にカルボニル基と結合する 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) と反応させることにより酸化損傷を受けているタンパク質を 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (DNP) で標識した。次に、12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により、タンパク質を分子量で分離しゲル上に 2 次元展開後、PVDF 膜に転写、抗 DNP 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。検出は化学発光試薬を用い、X 線フィルムに感光させた。それぞれのサンプルから得られたウェスタンブロットの結果を元に、画像解析ソフト PDQuest を用い各タンパク質のカルボニル化量を定量解析した。各タンパク質スポットについて発現量 (3-(3)- .2D-DIGE 法の定量解析結果) で補正した後、酸化損傷が有意に認められたタンパク質スポットについては、酸化損傷タンパク質としてペプチドマスフィンガープリンティング法にて解析、同定した。

## (4) ペプチドマスフィンガープリンティング法

タンパク質の同定は、CBB 染色によって得られた各スポットをゲルから切り出し、トリプシン処理によるゲル内消化を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型タンデム質量分析装置 MALDI-TOF/TOF-MS とデータベースを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 海馬における細胞死と GPR40 の発現

酸化ストレスによる海馬への影響は、海馬組織内の部位によって異なることが知られており、アンモン角 (CA1) は酸化ストレスによる神経細胞死に対して脆弱だが、歯状回 (DG) は比較的抵抗性を示すとされている。本研究において、酸化ストレス暴露サルの海馬について検討を行った結果、CA1 領域では顕著に細胞死が認められたが、DG 領域における細胞死は CA1 領域に比べ少なかった。従って、サル海馬領域では、酸化ストレスに対し CA1 領域では脆弱性を DG 領域では抵抗性を示すことが示唆された。GPR40 の発現は、ヒトおよびサルの中樞神経系の様々な領域で検出されている。本研究において、酸化ストレス暴露サルの海馬において GRP40 の発現が認められ現在詳細な解析を続けている。現在までに、ヒトやサル脳において、大脳皮質、海馬、扁桃体、視床下部、小脳、脊髄などの幅広い神経細胞で GPR40 の発現が報告された。

## (2) 酸化損傷タンパク質の解析結果

本研究では、海馬における酸化ストレスによる神経細胞死への感受性を明らかにすることを目的とし、酸化ストレス暴露後のサル CA1 と DG においてプロテオミクス解析を行い、タンパク質の酸化損傷度を比較することによりそのメカニズムを検討した。その結果、Heat shock 70kDa protein 1 (Hsp70.1) の酸化損傷度は CA1 では顕著に増加したが、DG での増加はわずかしか認められなかった(図1)。一方で、Dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) 及び L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB) の酸化損傷度は DG では顕著に増加したが、CA1 での増加はほとんど認められなかった。

## (3) タンパク質の発現量解析

さらに、タンパク質の発現量についても比較を行った結果、Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent protein deacetylase, sirtuin-2 (SIRT2) のタンパク質発現量は DG において有意に増加したが、CA1 では減少した(図2)。これらのことから、CA1 の酸化ストレスに対する脆弱性は、顕著な HSP70.1 の酸化損傷が重要な働きをしていることが示唆された。一方、DRP-2 のカルボニル化、Hsp70.1 の機能維持、SIRT2 の発現上昇は DG における神経細胞の保護作用に関与する可能性がある。従って、過酸化脂質などによる酸化ストレスの暴露は、海馬における CA1 領域の Hsp70.1 の酸化損傷および SIRT2 発現低下を介した神経細胞死を誘導して、アルツハイマー病の発症に関与している可能性が示唆された。

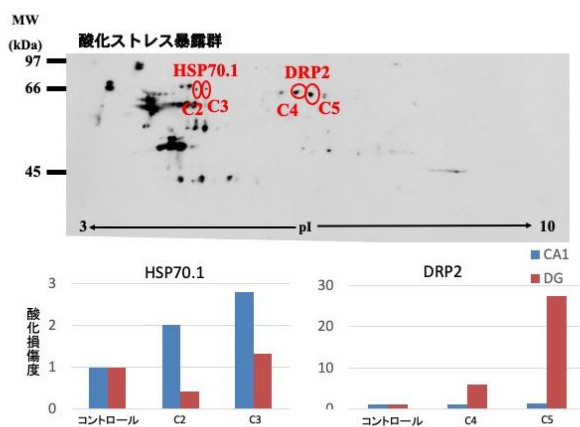


図1. 酸化損傷タンパク質の解析

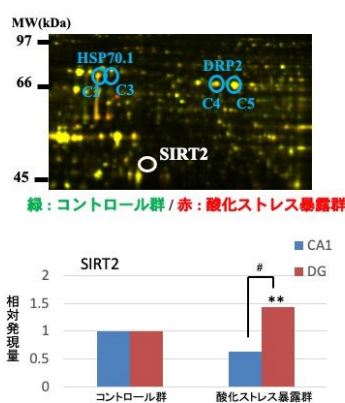


図2. タンパク質の変動解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 12件）

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 10(1):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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mori Yurie, Oikawa Shinji, Kurimoto Shota, Kitamura Yuki, Tada-Oikawa Saeko, Kobayashi Hatasu, Yamashita 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/jcbn.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 -
1. 著者名 Zhang Xiao, Morikawa Kota, Mori Yurie, Zong Cai, Zhang Lingyi, Garner Edwin, Huang Chinyen, Wu Wenting, Chang Jie, Nagashima Daichi, Sakurai Toshihiro, Ichihara Sahoko, Oikawa Shinji, Ichihara Gaku	4. 巻 94
2. 論文標題 Proteomic analysis of liver proteins of mice exposed to 1,2-dichloropropane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 2691 ~ 2705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-020-02785-4	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 Kobayashi Hatasu, Murata Mariko, Kawanishi Shosuke, Oikawa Shinji	4. 巻 21
2. 論文標題 Polyphenols with Anti-Amyloid Aggregation Show Potential Risk of Toxicity Via Pro-Oxidant Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3561 ~ 3561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103561	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 Mori Yurie, Kato Shinya, Fujisawa Yutaka, Ohnishi Shiho, Hiraku Yusuke, Kawanishi Shosuke, Murata Mariko, Oikawa Shinji	4. 巻 53
2. 論文標題 Mechanisms of DNA damage induced by morin, an inhibitor of amyloid -peptide aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 115-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2018.1562179	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 Nagashima D, Zhang L, Kitamura Y, Ichihara S, Watanabe E, Zong C, Yamano Y, Sakurai T, Oikawa S, Ichihara G.	4. 巻 93
2. 論文標題 Proteomic analysis of hippocampal proteins in acrylamide-exposed Wistar rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1993-2006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-019-02484-9	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 Kitamura Yuki, Kojima Midori, Kurosawa Toshihito, Sasaki Ryogen, Ichihara Sahoko, Hiraku Yusuke, Tomimoto Hidekazu, Murata Mariko, Oikawa Shinji	4. 巻 392
2. 論文標題 Proteomic Profiling of Exosomal Proteins for Blood-based Biomarkers in Parkinson's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 121 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2018.09.017	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 Yamashita Tetsumori, Ota Tsuguhito, Mizukoshi Eishiro, Nakamura Hiroyuki, Yamamoto Yasuhiko, Kikuchi Mitsuru, Yamashita Tatsuya, Kaneko Shuichi	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 -

〔学会発表〕 計43件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 八木 駿斗, 小林 果, 森 有利絵, 加藤 信哉, 川西 正祐, 村田 真理子, 及川 伸二
2. 発表標題 アミロイド 凝集阻害剤MorinおよびDatiscetinのDNA損傷能を指標とした安全性評価
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 小林 果, 森 有利絵, 加藤 信哉, 八木 駿斗, 川西 正祐, 村田 真理子, 及川 伸二
2. 発表標題 アミロイド 凝集阻害剤MorinおよびDatiscetinのDNA損傷能
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 果, 森 有利絵, 加藤 信哉, 藤澤 豊, 大西 志保, 川西 正祐, 村田 真理子, 及川 伸二
2. 発表標題 MorinとDatiscetinによる酸化的DNA損傷
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森有利絵、本城貴志、北村祐貴、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二
2. 発表標題 軽度認知障害段階におけるアルツハイマー型認知症の早期診断バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森有利絵、加藤信哉、藤澤豊、大西志保、小林果、川西正祐、村田真理子、及川伸二
2. 発表標題 アミロイド 凝集阻害剤Morinにより誘導されるDNA損傷機構の解明
3. 学会等名 日本衛生学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山路隆斗、森有利絵、森咲子、徳井麻綸佳、谷田川みなみ、小林果、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二
2. 発表標題 アルツハイマー型認知症への進展を予測する血漿バイオマーカーの探索
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部 第8回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森有利絵、加藤信哉、藤澤豊、大西志保、小林果、川西正祐、村田真理子、及川伸二
2. 発表標題 アミロイド 凝集阻害剤Morinにより誘導される酸化的DNA損傷機構
3. 学会等名 第19回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yurie Mori, Shinya Kato, Yutaka Fujisawa, Kazuaki Kawai, Shiho Ohnishi, Hatasu Kobayashi, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Shinji Oikawa
2. 発表標題 Mechanisms of oxidative DNA damage induced by morin
3. 学会等名 9th Meeting of SFRR (A+J) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Yurie Mori, Shinya Kato, Yutaka Fujisawa, Shiho Ohnishi, Hatasu Kobayashi, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata, Shinji Oikawa
2. 発表標題 Elucidation of oxidative DNA damage mechanisms induced by morin
3. 学会等名 ACEM/JEMS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森有利絵、本城貴志、北村祐貴、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二.
2. 発表標題 軽度認知障害患者を対象としたアルツハイマー病の早期診断に関する血漿プロテオミクス解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森有利絵、栗本将多、北村祐貴、及川(多田)佐枝子、村田真理子、山嶋哲盛、及川伸二.
2. 発表標題 虚血再灌流後のサル海馬CA1とDGにおけるプロテオミクス解析
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森有利絵、加藤信哉、川西正祐、村田真理子、及川伸二.
2. 発表標題 銅イオン及び鉄イオン存在下におけるフラボノイド類MorinによるDNA損傷機構
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森有利絵、本城貴志、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二.
2. 発表標題 軽度認知障害とアルツハイマー型認知症の血漿プロテオミクス解析
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森咲子、森有利絵、山路隆斗、舩山華奈子、小嶋みどり、佐藤正之、市原佐保子、埜村智之、石川雅一、村田真理子、冨本秀和、及川伸二
2. 発表標題 アルツハイマー病患者血漿エクソソーム中のタンパク質解析
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部第7回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇野菜摘、森有利絵、宇野優市、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二
2. 発表標題 軽度認知障害患者血漿における酸化損傷タンパク質の解析
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部第7回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院医学系研究科 環境分子医学  
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>  
 三重大学 大学院医学系研究科 環境分子医学  
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/eiseigaku/>

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	山嶋 哲盛  (YAMASHIMA Tetsumori)  (60135077)	金沢大学・医学系・協力研究員    (13301)	
研究分担者	小林 果  (KOBAYASHI Hatasu)  (70542091)	三重大学・医学系研究科・講師    (14101)	

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