

関西学院大学 研究成果報告

2022年 5月 20日

関西学院大学 学長殿

所属：生命環境学部（旧理工学部）

職名：教授

氏名：今岡 進

以下のとおり、報告いたします。

| | |
|--------|---|
| 研究制度 | <input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> V大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。 |
| 研究課題 | 酸化ストレスが脳神経変性疾患に及ぼす影響の解析 |
| 研究実施場所 | 関西学院大学生命環境学部（旧理工学部IV号館4階今岡研究室） |
| 研究期間 | 2018年 4月 1日 ~ 2022年 3月 31日（48ヶ月） |

◆ 研究成果概要 （2,500字程度）

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

【研究の背景】

現代高齢化社会において、認知症は介護や医療費の増大など重要な問題となっている。Alzheimer病やParkinson病はいわゆる脳神経変性疾患で、認知症のみならず身体の機能障害を引き起こす病態で不可逆的に進行する。これらの病気に対する根本的治療法は未だ開発されておらず、早期発見によって、病状の進行を薬剤によって抑制する方法のみである。よって現在は根本的治療法の開発のため、病態の本質の解明やモデル動物を作成して治療薬のスクリーニングをする研究が進められている。一方で、日頃の食生活やサプリメントの摂取によって病気になりにくい体を作るのも重要と考えられている。

【研究の目的】

ヒトや哺乳動物において、酸化ストレスで働く鍵因子はNrf2である。細胞に活性酸素などが発生し、酸化ストレスがかかるとNrf2が増加して、酸化ストレスの元である活性酸素の分解に働く。Nrf2のノックアウトマウスでは酸化ストレスに対して脆弱になり、Nrf2が細胞の酸化ストレスにおいては重要であると考えられている。活性酸素は老化を促進する物質であり、活性酸素の分解を促進することが老化防止につながり、後に述べるように神経変性疾患においても活性酸素の消去は重要であると思われる。申請者は最

近がんの診断や寿命検定に利用され、注目されている線虫 (*C. elegans*) を利用して、酸化ストレスが寿命に与える影響を検討しており、*skn-1* (ヒトの *Nrf2* に相当) 欠損体では寿命が低下することを見出した。そこで本研究では *Nrf2*, *PDI* といった細胞の酸化ストレス制御には重要と考えられる因子に注目して、神経変性疾患の進行や神経突起形成におけるこれらの因子の関わりを解明し、神経変性疾患の病気や予防さらには治療につながる知見を得ることを目的とする。

【結果】

1. アラキドン酸代謝物が胎児神経細胞突起伸長及び胎児海馬神経細胞に及ぼす効果
アラキドン酸はロイコトリエンやプロスタグランジンなどの原料となる重要な不飽和脂肪酸である。これらとは異なる生理活性物質として、チトクローム P450 (P450) によるアラキドン酸代謝産物がある。ラット肝臓から精製した 12 種類の P450 を用いてアラキドン酸代謝を検討した。その結果 CYP2C11, 2C13, 2C23 によって顕著な代謝物が生成された。その中でも、アラキドン酸のエポキシ体 11, 12-EET, 14, 15-EET が主たる代謝物であった。一方ラットの神経細胞のモデルとして利用される PC12 細胞にこれらの P450 が存在することを明らかにした。(業績 1)

2. DHA 代謝物が胎児神経細胞突起伸長に及ぼす効果

Docosahexanoic acid (DHA) はいわゆる ω -3 不飽和脂肪酸であり、記憶や神経発達など様々な神経活動に重要とされ、サプリメントとして広く活用されている。本研究では DHA がどのような酵素により活性化され、その代謝物がどのように神経細胞に作用するのかを検討した。通常アラキドン酸などの不飽和脂肪酸はチトクローム P450 (以下 P450) によって、エポキシ体 (DHA の場合 EDP) に代謝されることが明らかになっている。本研究ではラット肝臓から精製した 12 種類の P450 について、DHA の代謝活性を LC-MS で調べた。顕著な代謝活性が検出されたのは CYP2A1, 2C11, 2C13, 2C23, 2E1, 4F1 で、エポキシ体、水酸化が検出された。この中で CYP2C23 は 19, 20-EDP を CYP4F1 は 22-hydroxy-DHA を顕著に生成した。さらに DHA をラットに投与すると脳において、DHA が加水分解されたと考えられるジオール 19, 20-DHDP の増加が見られた。一方、DHA はラットにロテノン投与して作成したパーキンソン病モデルラットの抗酸化因子 SOD, カタラーゼ、*Nrf2* を増加させるとともにパーキンソン病による運動機能低下を改善した。この結果は DHA が P450 によって代謝されてできた 19, 20-EDP を可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) によって代謝された 19, 20-DHDP がパーキンソン病において、抗酸化作用を示すことで、その病態を改善していることを示している。この成果は以下の査読付き欧文誌に採択されている。(業績 3)

3. コーヒーポリフェノールであるクロロゲン酸 (CGA) が抗酸化因子 *Nrf2*/*SKN-1* を介して寿命に及ぼす効果の検討

クロロゲン酸 (CGA) はコーヒーに含まれるポリフェノールで、抗肥満作用や抗がん作用などの様々な生理作用を示すことが報告されている。この研究では CGA の作用部位を特定することで、抗酸化因子が寿命を延長するメカニズムを明らかにした。まず、酸化ストレスについて、酸化ストレス応答の鍵因子である *Nrf2* は通常ユビキチンリガーゼのアダプタータンパク質である Keap1 にトラップされ、ユビキチン化され、ユビキチン-プロテアゾーム系で分解されている。活性酸素などの活性ラジカルが発生し、酸化ストレスが起こると、ラジカルが Keap1 に結合し、*Nrf2* が安定化する。安定化した *Nrf2* は核内移行し、様々な抗酸化因子の発現を誘導する。これが哺乳動物の酸化ストレス応答である。一方、本研究で寿命の研究に用いられるモデル動物線虫を利用した。線虫においては酸化ストレス応答系として Keap1-*Nrf2* の代わりに WDR23-*SKN-1* が存在する。*Nrf2* の相同因子として *SKN-1* が存在するが Keap1 の相同因子は存在しない。そこでまず WDR23 が哺乳動物に存在し、*Nrf2* の発現を調節しているかどうかを明らかにした。その結果 WDR23 には二つのアイソフォーム (*iso1*, *iso2*) が存在し、*iso1* は細胞質で、*iso2* は核内で *Nrf2* を発現制御していることを明らかにした。ところで哺乳動物では CGA は *Nrf2* を増加させることで、酸化ストレスを緩和していると考えている。本研究では CGA が *Nrf2* を誘導するメカニズムも明らかにした。WDR23 ユビキチンリガーゼは WDR23, Cul4, DDB1 の複合体からなる。このうち、DDB1 の発現は FOXO によって発現調節されている。そして CGA は importin7 と結合する

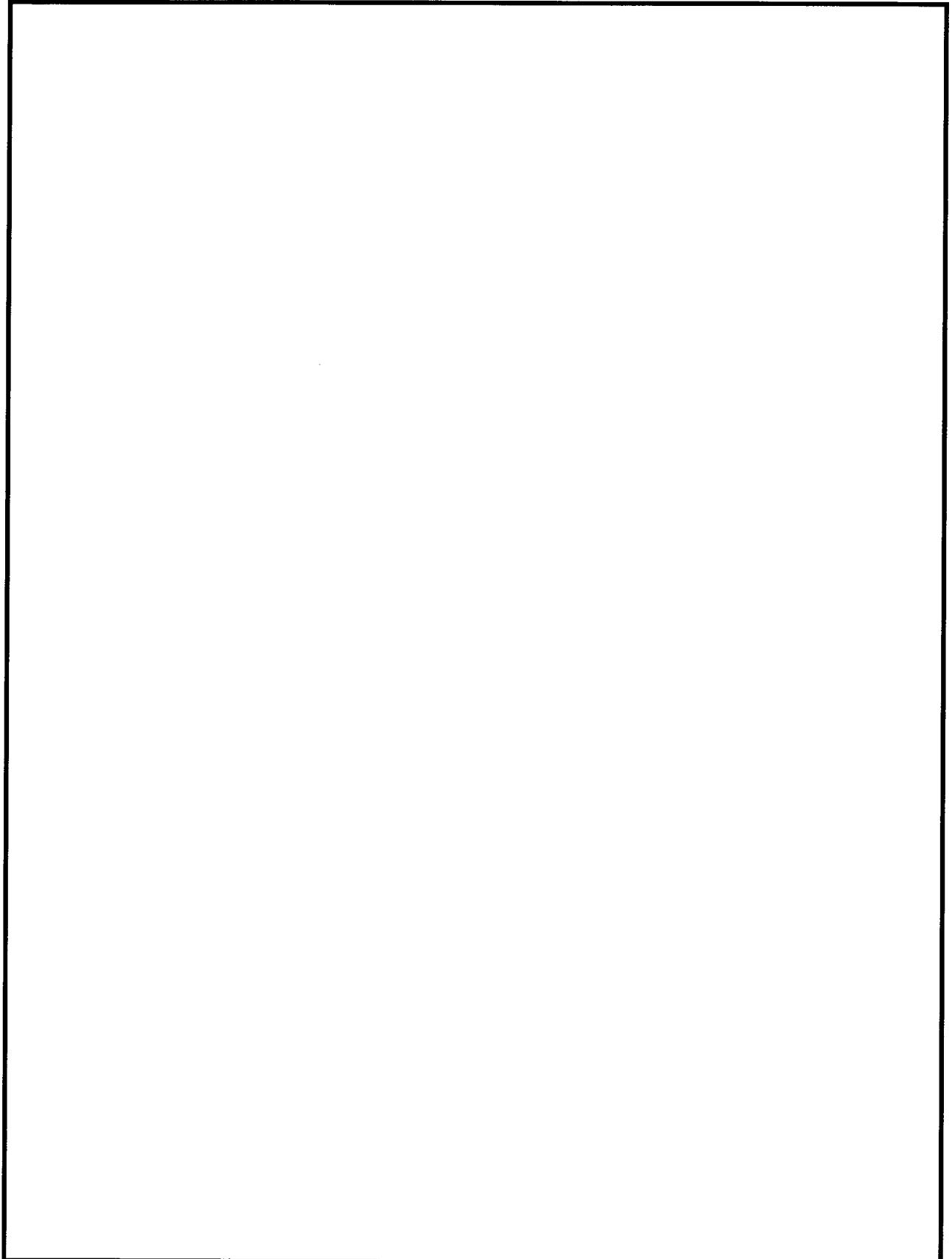
ことで、FOXOの核内移行を阻害することを明らかにした。FOXOの核内移行阻害はDDB1の発現を低下させ、結果的にWDR23の活性を低下させることで、Nrf2の発現量を増加することを明らかにした。一方、線虫においては、CGAはSKN-1を増加させることで、寿命を延長した。さらにSKN-1変異体では寿命が短縮し、CGA投与では寿命に変化がなかったが、SKN-1レスキュー実験では寿命の短縮が回復した。一方、FOXOの線虫相同体であるdaf-16変異体ではDDB1の減少に伴って、SKN-1の発現上昇が見られ、daf-16のレスキューによって寿命短縮が回復した。以上の結果は酸化ストレスが寿命に大きな影響を及ぼし、それをコントロールすることで、寿命延長効果が期待できることを示している。これらの結果は再簿に示すいくつかの論文に報告しているが、集大成として、以下の論文委報告採択されている。現在印刷中 (in press) のためゲラを添付した。(業績7)

【考察及びまとめ】

本研究において、現在日本社会で問題になっている脳変性疾患及び健康年齢の延長についてヒントになる重要な研究結果が得られた。不飽和脂肪酸が記憶などの脳の活動において助けになることはすでにサプリメントが市販され、注目されているが、実際その働くメカニズムについては十分明らかにされていない。本研究においてP450, sEHが働いて不飽和脂肪酸を活性化していることを明らかにした。一方、がんも脳卒中もない線虫において酸化ストレス応答メカニズムが直接的に寿命に関わることを明らかにした。この3年間(実際はコロナ禍のため4年となったが)の共同研究で、多くの新しく重要な知見を得ることができた。共同研究の先生方にも感謝したい。

【2018年4月から2022年3月までの業績】

1. Oguro, A., Inoue, T., Kudoh, S. N., and Imaoka, S. 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid produced by cytochrome P450s enhances neurite outgrowth of PC12 and rat hippocampal neuronal cells. **Pharmacol. Res. Perspect.** 6(5), e00428, 2018.(結果1、添付)
2. Oguro, A., and Imaoka, S. Thioredoxin-related transmembrane protein 2 (TMX2) regulates the Ran protein gradient and importin- β -dependent nuclear cargo transport. **Sci. Rep.** 9(1), 15296, 2019.
3. Oguro, A., Ishihara, Y., Siswanto, F. M., Yamazaki, T., Ishida, A., Imaishi, H., and Imaoka, S. Contribution of DHA diols (19,20-DHDP) produced by cytochrome P450s and soluble epoxide hydrolase to the beneficial effects of DHA supplementation in the brains of rotenone-induced rat models of Parkinson's disease. **Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.** 1866, 2021, 158858.(結果2、添付)
4. Kobayashi, Y., Oguro, A., Hirata, Y., and Imaoka, S. The regulation of Hypoxia-inducible Factor-1(HIF-1 α) expression by Protein Disulfide Isomerase (PDI). **PLoS ONE** 16(2): e0246531, 2021.
5. Siswanto, F. M., Oguro, A., Imaoka, S. Sp1 is a substrate of Keap1 and regulates the activity of CRL4A^{WDR23} ubiquitin ligase toward Nrf2. **J. Biol. Chem.**, 296, 2021, 100704.
6. Siswanto, F. M., Tamura, A., Sakuma, R., and Imaoka, S. Yeast β -glucan increases etoposide sensitivity in lung cancer cell line A549 by suppressing nuclear factor erythroid 2-related factor 2 via the noncanonical nuclear factor kappa B pathway. **Mol. Pharmacol.** 101, 257-273, 2022.
7. Siswanto, F. M., Sakuma, R., Oguro, A., and Imaoka, S. Chlorogenic acid activates Nrf2/SKN-1 and prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via the Akt-FOXO3/DAF16a-DDB1 pathway and activation of DAF16f. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** 2022, in press.(結果3添付)
8. Sakuma, R., Kobayashi, M., Kobashi, R., Onishi, M., Maeda, M., Kataoka, Y., and Imaoka, S. Brain pericytes acquire stemness via the Nrf2-dependent antioxidant system. **Stem Cells**, 2022, in press.*下線は共同研究者



以 上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に

報告用紙②

支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。