

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第 10 号

令和3年6月

甲子園大学

## は し が き

本号は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号 平成25年4月1日一部改正）第8条の規定によるインターネットの利用による公表を目的として、令和2年度に本学において博士の学位を授与した者の論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位記番号に付した甲は学位規則第4条第1項（いわゆる課程博士）によるものであることを示す。

# 目 次

<u>掲 載 順</u>	<u>学位記番号</u>	<u>氏 名</u>	<u>論 文 題 目</u>	<u>(頁)</u>
<b>(課程博士)</b>				
<栄養学>				
<b>【20】</b>	博甲栄第10号	伊藤 <sup>いとう</sup> 章悟 <sup>しょうご</sup>	食品由来成分によるミトコンドリア増強作用を介した神経細胞保護効果	1

【 1 8 】

氏名（本籍）	伊藤 章悟（大阪府）
学位の種類	博士（栄養学）
学位記番号	博甲栄第10号
学位授与年月日	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文名	食品由来成分によるミトコンドリア増強作用を介した 神経細胞保護効果
論文審査委員	主査 准教授 瀬尾 誠 副査 教授 盛本 浩二 副査 准教授 高橋 延行 副査 教授 佐々木 裕子

論 文 内 容 の 要 旨

神経変性疾患は中枢神経系内の神経細胞群が何らかの障害により脱落することで、認知機能や運動機能が低下する疾患である。現在のところ、疾患発症後の根本的な治療は確立していない。また、高齢者で発症しやすい傾向にあることから、現在、超高齢社会を迎えた我が国において、その患者数の増加が問題視されている。代表的なものとしてアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）等が知られているが、これらの発症には酸化ストレスによる神経細胞死が関与していると考えられている。このことから酸化ストレスの抑制を標的とした、神経変性疾患に対する予防・治療を目指した研究は数多くなされている。しかし、予防効果の作用機構の詳細については明らかにされていないものも多い。細胞への酸化ストレスにより障害を受ける代表的な細胞小器官にミトコンドリアがあるが、酸化ストレスの障害作用により損傷したミトコンドリアはアポトーシスを誘導することが知られている。アルツハイマー病をはじめ、いくつかの神経変性疾患においては、神経細胞内のミトコンドリア機能障害によるアポトーシス誘導が疾患発症の原因の一つとなっていること、脳内ミトコンドリア量が減少していることが既に報告されている。このことから、ミトコンドリアの保護あるいは増強は、酸化ストレスによって誘導される神経細胞死を抑制し、ひいては神経変性疾患の発症リスク低減につながると考えられている。多くの神経変性疾患は潜伏期間が非常に長く、20年以上の場合もある。発症前の診断は困難であるが、発症前の潜伏期間中においても酸化ストレスによる神経細胞死は

着々と進行している。従って、発症よりかなり前からの予防が重要であると考えられる。その方策の一つとして、食品由来の有効成分を日常的に摂取することが考えられる。そこで本研究では、食品由来成分のミトコンドリアに關与する神経系細胞内シグナルへの作用に着目し、酸化ストレスに対する食品由来成分の神経細胞保護作用及びミトコンドリアへの影響、さらに、それらの分子機構について検討した。つまり、本研究は、食品摂取によるミトコンドリア増強作用を介した神経変性疾患の発症リスク低減作用について明らかにしようとするものである。

食品成分として、ブロッコリーやキャベツ、アボカドに含まれているニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) に注目した。これは、動物モデルや神経変性モデルも含めた細胞レベルにおいて、酸化ストレスが關与する疾患に対して改善効果を示すことが報告されている。NMN は構造上、還元基を持たず、直接的に活性酸素を除去しているとは考えにくい為、何らかの細胞内シグナルに作用することで、酸化ストレスに対して神経保護作用を示していると考えられる。しかし、これまでの疾患改善効果に関する研究において、その作用機序についてはほとんど明らかにされていない。NMN は寿命調節因子である SIRT1 を活性化することから注目されているが、SIRT1 は生体内で様々なタンパク質と相互作用し、生理機能を制御していると考えられている。相互作用が報告されている PGC1 $\alpha$  はミトコンドリア生合成の誘導因子であり、SIRT1 により活性が上昇することが報告されている。このことから、酸化ストレスに対する NMN の細胞保護作用は、SIRT1 活性化とそれに続く PGC1 $\alpha$  活性化を介したミトコンドリアの増強、機能亢進に基づいているという仮説を立て、解析を試みた。

ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞を神経細胞モデルとし、パーキンソン病誘導神経毒である 6-OHDA 及び活性酸素種である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化ストレスに対する NMN の保護効果を解析したところ、有意な細胞保護効果が観察された。この細胞保護作用について、SIRT1 と PGC1 $\alpha$  が關与しているか否かについて検討を行った。まず、サーチェイン阻害剤である Sirtinol の存在下において解析を行ったところ、NMN の細胞保護効果が抑制されることが分かった。さらに、siRNA 導入によって PGC1 $\alpha$  発現を抑制した細胞においても、同様に細胞保護効果が抑制された。これらの結果から、酸化ストレスからの細胞保護効果は SIRT1 活性化とそれに続く PGC1 $\alpha$  活性化に依存していると考えられる。さらに、NMN 処理細胞では SIRT1 及び PGC1 $\alpha$  のタンパク質発現量が増加していることも見出された。

保護効果が PGC1 $\alpha$  に依存していることから、次に NMN のミトコンドリアに対する作用について検討を行った。まず、NMN 処理後の細胞内ミトコンドリア量について、ミトコンドリア膜電位感受性色素 JC-1 で染色した細胞のサイトメトリー解析を行ったところ、顕著なミトコンドリア量の増加が観察された。このミトコンドリア増加作用は酸化ストレス条件下においても観察された。また、Sirtinol によってこのミトコンドリア増加作用は抑制された。つまり、NMN のミトコンドリア増加作用はサーチェイン活性化に依存的であることが分かった。さらに、ミトコンドリアタンパク質の発現量からも解析したところ、NMN 処理によってミトコンドリア局在サーチェインである Sirt3 およびミトコンドリアに局在する活性酸素除去酵素 SOD2 の増加が観察された。

以上の結果から、NMN による酸化ストレスからの神経系細胞保護作用は SIRT1 活性化とそれに続く PGC1 $\alpha$  活性化を介することが分かった。また、NMN による細胞内ミトコンドリア増加作用も同様にサーチュイン活性化に依存的であった。つまり、ミトコンドリア増加作用は細胞保護に寄与していることが強く示唆された。NMN はミトコンドリア増加作用と同時に SIRT3 の発現量も増加させたこと、サーチュインの一種である SIRT3 はその脱アセチル化作用により SOD2 を活性化することが報告されていることから、SIRT3-SOD2 シグナルの増強が抗酸化能をさらに亢進している可能性が考えられる。つまり、NMN は SIRT1-PGC1 $\alpha$  シグナル活性化を介したミトコンドリア量の増加作用、およびミトコンドリア増加に伴う SIRT3-SOD2 シグナル増強によってミトコンドリア内における抗酸化能を亢進させ、酸化ストレス誘導細胞死を抑制していることが示唆された。

本研究により NMN がミトコンドリアを増加させることにより酸化ストレスから神経細胞を保護する作用を有することを明らかにした。本研究成果は、ポリフェノール類等の NMN と類似作用を示す成分を含有する食品の摂取についても神経変性疾患発症リスクの低減につながることを示唆しており、さらには本機構に注目した新たな神経変性疾患の予防・治療法の開発につながることも期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、ブロッコリーやアボカドに含まれているニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) が、先行研究で酸化ストレスの関連する *in vitro* ならびに *in vivo* 神経変性疾患モデルで改善効果を示したことに着目し、酸化ストレス条件下での神経細胞モデルにおいて、NMN が細胞内ミトコンドリア増加作用ならびに活性酸素除去能亢進作用により神経細胞保護効果を有することを示したものである。

序論では、本研究の背景と目的を述べている。超高齢化社会を迎えているわが国において増加しているアルツハイマー病、パーキンソン病や筋委縮性側索硬化症などの神経変性疾患が、酸化ストレスによるミトコンドリア機能障害による神経細胞死に起因することが知られている。しかし、これらの神経変性疾患は現在の医療技術では根治が困難であるため、発症前からの予防が重要であり、食品由来の有効成分の摂取による神経細胞の保護が神経変性疾患発症予防に寄与するとの着想に至った。そこで、ブロッコリーやアボカドなどに含まれる NMN が種々の神経変性疾患モデルに対する改善効果を報告した先行研究を基に、NMN の酸化ストレスに対する神経細胞保護効果およびその詳細な分子作用機構の解明を目指した。

ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 を神経細胞モデルとし、酸化ストレス条件下での細胞死に対する NMN の影響を検討したところ、NMN は有意な細胞保護効果を示した。こ

の細胞保護効果は、NMN が長寿遺伝子 sirtuin (SIRT) 1 とその下流にあるミトコンドリア遺伝子調節作用をもつ転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator1-alpha (PGC1 $\alpha$ ) のたんぱく質発現量を増加させ、細胞内ミトコンドリア量を増加させることによることを明らかにした。

さらに、NMN がミトコンドリア特異的に局在する SIRT3 と活性酸素除去酵素 superoxide dismutase 2 (SOD2) のたんぱく質発現量を増加させ、細胞内での活性酸素除去能を亢進させることで酸化ストレス誘導細胞死から神経細胞を保護することを明らかにした。

総括として、酸化ストレスによるミトコンドリア機能障害による神経細胞死に対し、NMN 自身が細胞内の SIRT1 と PGC1 $\alpha$  発現量を上昇させ、SIRT1-PGC1 $\alpha$  シグナル活性化を介して細胞内ミトコンドリア量を増加させること、さらに NMN は SIRT3 と SOD2 発現量も上昇させ、SIRT3-SOD2 シグナル活性化を介して活性酸素除去能を亢進することを示した。NMN はこれら複数の分子作用機構を介して、酸化ストレス誘導細胞死から神経細胞保護効果を示すことを述べている。

以上、本論文は、NMN が酸化ストレスに対し、ミトコンドリアの増強ならびに機能亢進作用により神経細胞保護効果を示すことを明らかにした。また、本研究において着目した SIRT シグナル活性化を介したミトコンドリア増強作用による神経細胞保護効果は、今後神経変性疾患に対する新たな予防・治療法の開発の足掛かりとなる可能性を秘めている。

以上より、本論文の成果で得られた知見の意義は高く、博士論文の要件を十分に満たすものであると認める。

# 博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第 10 号

令和 3 年 6 月 1 日

発行 甲子園大学

編集 甲子園大学

〒665-0006 兵庫県宝塚市紅葉ガ丘 10 番 1 号  
電話(0797)87-5111 (代表)