

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350915

研究課題名(和文) 生死を分けるリスクファクターの加齢による変化

研究課題名(英文) Age-dependent changes of risk factors determining the survival of patients

研究代表者

山本 順寛 (YAMAMOTO, Yorihiro)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：60134475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生死を分けるリスクファクターを見極めるために、死亡率の高い疾患としてALS、心肺停止救急患者を取り上げた。血漿を解析するとコエンザイムQ10の酸化型の割合(%CoQ10)や遊離脂肪酸量とその組成は健常人に比べ有意に変化しており、酸化ストレスの亢進が確認された。経時変化をみると、1週間で退院できた患者では%CoQ10が順調に減少したのに対し、死亡例では減少しなかった。コエンザイムQ10の結合輸送タンパク質であるプロサポシンは有意に上昇しており、緊急時にはコエンザイムQ10を必要とすることが明らかになった。また興味深いことに、健常人では加齢による有意な増加も認められた。

研究成果の概要(英文)：In order to find out risk factors determining the survival of patients, we measured plasma levels of oxidized form of coenzyme Q10 (%CoQ10) and free fatty acids and their compositions in patients with ALS and PCAS. These levels were significantly different from those in healthy controls, indicating a significant increase of oxidative stress in these patients. Time course changes indicated that %CoQ10 decreased in patients who discharged in a week but remained unchanged in patients who died. Plasma level of prosaposin, a coenzyme Q10 binding and transfer protein, increased significantly, suggesting that coenzyme Q10 is necessary in a critical condition. It is interesting plasma levels of prosaposin in normal people increase with age.

研究分野：医化学

キーワード：酸化ストレス コエンザイムQ10 遊離脂肪酸 尿酸 プロサポシン 心肺停止救急患者 ALS 敗血症

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生死を分けるリスクファクターとして酸化ストレスの亢進が考えられてきたが、これを客観的に示す証拠は十分ではない。そこで、生死の分岐点にある救急救命患者に注目し、経時的に血液を採取し、その酸化ストレスを評価することとした。

救急搬送の原因には心筋梗塞、脳梗塞、敗血症、外傷、薬物中毒など様々な要因が考えられるが、いずれの場合にも活性酸素・フリーラジカルが細胞の生死、ひいては個体の生死に関連して重要な働きをすることが予想される。脳梗塞治療にフリーラジカル消去剤エダラボン投与が広く普及していること、新生児救急治療においては脳低温療法の有効性が認められていることは、上記推論が妥当であろうことを示唆している。

2. 研究の目的

21 世紀の重要課題である健康長寿を実現するために、人の生死を分けるリスクファクターが何であるかを知り、その対策を講じることが有用と考えられる。そこで、心肺停止患者血液の経時変化を測定したところ、コエンザイム Q10 の酸化還元状態、遊離脂肪酸量とその組成が重要である可能性を見いだした。本研究では、この仮説をさらに例数を増やして検証すること、またこれらのリスクファクターが加齢によりどう変化するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

敗血症・虚血再還流障害が原因で救急搬送された患者の血液を経時的に採血し、血漿中の総遊離脂肪酸中のパルミトリン酸の割合 (%16:1)、総遊離脂肪酸中のオレイン酸の割合 (%18:1)、総遊離脂肪酸 (Total FFA)、総コエンザイム Q10 中の酸化型の割合 (%CoQ10) を測定する。分析は研究代表者らが開発した方法を用いた。患者の転帰結果との相関を調べる。さらにはこれらのパラメータの加齢による変動を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) における生死を分けるリスクファクター

本研究の目的は生死を分けるリスクファクターの見極めと、その加齢による変化をあきらかにすることである。リスクファクターとして血管内の酸化ストレスマーカーである血漿コエンザイム Q10 の酸化型の割合 (%CoQ10) と細胞組織の酸化傷害マーカーである遊離脂肪酸量 (FFA)、遊離脂肪酸中のパルミトリン酸やオレイン酸の割合 (それぞれ %16:1 と %18:1) に注目している。死に直面している疾患として筋萎縮性側索硬化症 (ALS) がある。ALS 患者に対しフリーラジカル消去薬エダラボンを投与しその効果を吉野英医師と共同で検証した。投与により 6 ヶ月間病状の進行が抑制された患者は 13 人中 6

人で、非投与では 19 人中 0 人なので明らかに投与効果が認められた。%CoQ10 は健常人よりも有意に高いが、FFA 量、%16:1、%18:1 は大差なかった。%CoQ10 の低下は認められなかったが、経過良好群では一過性の FFA 量、%16:1、%18:1 の上昇は抑制された。さらに注目すべきは血漿尿酸レベルである。健常人よりも有意に低いばかりでなく、エダラボン投与でそのレベルは顕著に上昇した。エダラボン非投与では尿酸レベルが経時的に低下していくこと、エダラボン投与で脳脊髄液中の 3-ニトロチロシンが減少するとの報告から、ALS のエダラボン投与効果はエダラボンがペルオキシナイトライトを消去することと推定した (Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y, Yoshino H, Redox Report, 2016)。さらにエダラボンが尿酸よりも 30 倍速くペルオキシナイトライトと反応し、非ラジカル生成物である 4-ニトロソエダラボンを与えることを明らかにした (Fujisawa A, Yamamoto Y, Redox Report, 2016)。ALS 治療に対してエダラボンが 2015 年認可され、さらに 2017 年米国でも認可されたことは喜ばしい。

(2) 心肺停止救急患者における生死を分けるリスクファクター

ひきつづき血漿 %CoQ10、FFA 量とその組成の測定を死に直面している心肺停止救急患者に適用した。まず入院時の値を同年齢の健常人と比較すると、%CoQ10、FFA 量は有意に高く、FFA に対する高度不飽和脂肪酸の割合 (%PUFA) は有意に低かった。これらの結果から、予想通り心肺停止救急患者で酸化ストレスが亢進していることが明確になった。つぎに、これら経時変化を最終転帰別に比較した。1 週間で退院できた患者では %CoQ10 が順調に減少したのに対し、死亡例では減少しなかった。早期死亡例では FFA 量や %PUFA の急激な減少が認められた。1 週間で退院できた患者では血漿総コレステロール値は安定していたのに対し、死亡例では有意に減少していた。特にエステル型コレステロールの減少が顕著であり、その生成反応を触媒するレンチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) 活性の減少が原因と考えられた。LCAT は肝臓から分泌されるため肝機能の低下を抑制できれば救命率の上昇が期待できることが明らかになった。またコエンザイム Q10 が血中に分泌されることを見出し、その結合輸送タンパク質であるプロサポシンも増加することを認めた。以上の結果は J Clin Biochem Nutr 誌に受理され印刷中である。

(3) 生死を分けるリスクファクターの敗血症患者への応用と健常人における加齢変化

敗血症患者でも同様の検討を行ない %CoQ10、%16:1、%18:1 の有意な上昇、%PUFA の有意な減少が認められ酸化ストレスの亢進が確認された。また血漿尿酸の経時的な減

少を認めた(投稿準備中). 健常人の加齢による血漿%CoQ10 やプロサポシンレベルの増加が認められた(投稿準備中).

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 14 件)

(1) Nagase M, Sakurai A, Sugita A, Matsumoto N, Kubo A, Miyazaki Y, Kinoshita K, Yamamoto Y Oxidative Stress and Abnormal Cholesterol Metabolism in Patients with Post-cardiac Arrest Syndrome J Clin Biochem Nutr, in press. 査読有

(2) Sugimura N, Furuya A, Yatsu T, Igarashi Y, Aoyama R, Izutani C, Yamamoto Y, Shibu T Observed adducts on positive mode direct analysis in real time mass spectrometry: Proton/ammonium adduct selectivities of 600-sample in-house chemical library Eur J Mass Spectrom, **21**, 725-730 (2017). DOI: 10.1177/1469066717693851 査読有

(3) Mitsui J, Koguchi K, Momose T, Takahashi M, Matsukawa T, Yasuda T, Tokushige S, Ishiura H, Goto J, Nakazaki S, Kondo Tlto H, Yamamoto Y, Tsuji S Three-year follow-up of high-dose ubiquinol supplementation in a case of familial multiple system atrophy with compound heterozygous COQ2 mutations Cerebellum, DOI 10.1007/s12311-017-0846-9 (2017) 査読有

(4) Kashiba M, Terashima M, Sagawa S, Yoshimura S, Yamamoto Y Prosaposin knockdown in Caco-2 cells decreases cellular levels of coenzyme Q10 and ATP, and results in the loss of tight junction barriers J Clin Biochem Nutr, **60**, 81-85 (2017). doi: 10.3164/jcbrn.16-32. Epub 2016 Dec 6. 査読有

(5) Nakajima H, Terazawa S, Niwano T, Yamamoto Y, Imokawa G The Inhibitory Effects of Anti-Oxidants on Ultraviolet-Induced Up-Regulation of the Wrinkling-Inducing Enzyme Neutral Endopeptidase in Human Fibroblasts PLoS One **11**:1-29 (2016) doi: 10.1371/journal.pone.0161580 査読有

(6) Ishii T, Takanashi Y, Sugita K, Miyazawa M, Yanagihara R, Yasuda K, Onouchi H, Kawabe N, Nakata M, Yamamoto Y, Hartman PS, Ishii N Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain Aging Cell **15**:1-13 (2016) doi: 10.1111/ace1.12523 査読有

(7) Nagase M, Yamamoto Y, Miyazaki Y,

Yoshino H Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration Redox Report, **21**, 104-112 (2016). 10.1179/1351000215Y.0000000026. 査読有

(8) Fujisawa A, Yamamoto Y Edaravone, a potent free radical scavenger, reacts with peroxyxynitrite to produce predominantly 4-N0-edaravone Redox Report, **21**, 98-103 (2016). 10.1179/1351000215Y.0000000025. 査読有

(9) Shiobara Y, Harada C, Shiota T, Sakamoto K, Kita K, Tanaka S, Tabata K, Sekie K, Yamamoto Y, Sugiyama T Knockdown of the coenzyme Q synthesis gene Smed-dlp1 affects planarian regeneration and tissue homeostasis Redox Biol, **6**, 599-606 (2015). 査読有

(10) Yoritaka A, Kawajiri S, Yamamoto Y, Nakahara T, Ando M, Hashimoto K, Nagase M, Saito Y, Hattori N Randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of reduced coenzyme Q10 for Parkinson's disease Parkinsonism Relat Disord, **21**, 911-916 (2015). 査読有

(11) Nishi K, Takasu A, Shinozaki H, Sakamoto K, Yamamoto Y, Sakamoto T Hypothermia does not hasten death during uncontrolled hemorrhagic shock presenting as the 'triad of death' in rats Acute Med Surgery, **2**, 29-34 (2015). 査読有

(12) Takekoshi S, Kitatani K, Yamamoto Y Roles of oxidized diacylglycerol for carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mouse Acta Histochem Cytochem, **47**, 185-194 (2014). 査読有

(13) Yamagishi K, Ikeda A, Moriyama Y, Chei C, Noda H, Umesawa M, Cui R, Nagao M, Kitamura A, Yamamoto Y, Asada T, Iso H Serum coenzyme Q10 and risk of disabling dementia: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS) Atherosclerosis, **237**, 400-403 (2014). 査読有

(14) Kashiba M, Oizumi M, Suzuki M, Sawamura Y, Nagashima K, Yoshimura S, Yamamoto Y Prosaposin regulates coenzyme Q10 levels in HepG2 cells, especially those in mitochondria J Clin Biochem Nutr, **55**, 85-89 (2014). 査読有

[学会発表](計 9 件)

(1) Yorihiro Yamamoto, Detection of hydrogen peroxide in the epidermis of patients with segmental vitiligo, Annual Meeting of the Society for Free Radical Research (Australia), Gold Coast, Australia, 2016. 12. 6 (Invited)

(2) Yorihiro Yamamoto, Coenzyme Q10 as a useful natural antioxidant, The Fifth

International Conference on Cofactors, 富山県黒部市宇奈月温泉, 宇奈月国際会館, Japan, 2016. 9. 4 (Invited)

(3) 山本順寛, 酸化ストレスと抗酸化物質評価の医学への応用, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術年会, 宮城県仙台市, 仙台国際センター, 2016. 8.30 (招待講演)

(4) Yorihiro Yamamoto, Efficiency of singlet oxygen production from oxidized platinum nanoparticle and hydrogen peroxide, 17th Annual Meeting of Society for Photoaging Research, 兵庫県神戸市, 神戸臨床研究情報センター, Japan, 2016. 8.20 (Invited)

(5) 山本順寛, ALS に対するエダラボンの作用機序, 臨床フリーラジカル会議, 京都府亀岡市, けぶり河温泉, 2016. 1.29 (招待講演)

(6) 山本順寛, 抗酸化物質の臨床応用に関する最近の話題, 第 30 回日本酸化ストレス学会関東支部会, 東京都渋谷区, 東海大学代々木キャンパス講堂, 2015.12.19 (招待講演)

(7) Yorihiro Yamamoto, Increased oxidative stress in patients with amyotrophic lateral sclerosis and the effect of edaravone administration, Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan, University of Otago, Christchurch, New Zealand, 2015.12. 7 (Invited)

(8) 山本順寛, 白金・パラジウムナノコロイドの白斑に対する治療効果の理論的考察, 第 1 回日本白斑研究会, 大阪府大阪市北区, グランフロント大阪タワーB, 2015. 4.15 (招待講演)

(9) 山本順寛, コエンザイム Q10 の基礎知識: 発見と物理化学的性質, 吸収と輸送, 第 12 回コエンザイム Q 研究会, 東京都八王子市, 東京工科大学, 2015. 2. 3 (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 順寛 (YAMAMOTO, Yorihiro)
東京工科大学・応用生物学部・教授
研究者番号: 60134475

(2) 研究分担者

加柴 美里 (KASHIBA, Misato)
東京工科大学・教養学環・准教授
研究者番号: 80338186

(3) 連携研究者

木下 浩作 (KINOSHITA, Kosaku)
日本大学医学部附属板橋病院・教授
研究者番号: 90260968

櫻井 淳 (SAKURAI, Atsusi)
日本大学病院・准教授

研究者番号: 40339320