

神経変性疾患の予防法開発に向けたプラズマローゲンの機能解明



東北大学大学院農学研究科 乙木 百合香

はじめに

高齢化社会が進む現在、認知症などの神経変性疾患の予防は喫緊の課題であり、食品機能性成分による予防が国内外で盛んに検討されている。機能性脂質として知られるプラズマローゲンは、アルツハイマー病 (AD) などの神経疾患や、動脈硬化症などの酸化ストレス関連疾患の血中や病変部位において減少が報告されている¹⁾。プラズマローゲンの減少は、抗酸化能の低下、炎症惹起、膜の流動性の変化、シグナル伝達の攪乱などが生じると推察されているものの、病態への影響および、摂取による予防機構の詳細は不明である。その理由の一つとして、プラズマローゲンは、脂肪酸の違いによる分子種が多様であること、一般的な他のリン脂質との区別が困難であることから、プラズマローゲンの高選択的な分析は達成されておらず、本研究領域の足枷となっていたためである。こうした背景から申請者は、プラズマローゲンの精密分析法を構築し、確かな分析技術を基盤に種々の神経変性疾患におけるプラズマローゲンの減少による影響やその原因、および吸収代謝の解明を目指し、研究を行ってきた。本講演では、特に分析法の構築と AD におけるプラズマローゲンの減少に焦点を絞り、我々の取り組みについて発表する。

1. プラズマローゲンの精密定量法の構築

これまで、プラズマローゲンの質量分析 (MS/MS) には主にプロトン存在下において生じるリン酸基由来のプロダクトイオンが用いられてきた。例えば、コリン型のプラズマローゲン (PlsCho) であればホスホコリンのプロダクトイオンによりプラズマローゲンを検出していたが、この方法では、プラズマローゲンと多量に存在する他のジアシル型やアルキル型のホスファチジルコリンとの区別は困難である。こうした背景の中、我々は、MS/MS分析にナトリウムイオンなどのアルカリ金属イオンを用いると、プラズマローゲンから特異的なプロダクトイオンが生じることを見出した (図1)²⁾。MS/MS/MS解析により、本プロダクトイオンはナトリウムイオンがLewis酸とし

て働き、電子を奪った結果、プラズマローゲンに特徴的なビニルエーテル基を有するプロダクトイオンがカチオンとして検出されたためと考えられた (図1)。また、本プロダクトイオンは、PlsChoのみならずエタノールアミン型プラズマローゲン PlsEtn から生じることが分かり、プラズマローゲンを特異的に検出できると期待された。

LC-MS/MS法による精密な定量には、目的化合物に特異的なプロダクトイオンのみならず、種々のバリデーション評価 (マトリックス効果、抽出効率) が必要である。特に、マトリックス効果は質量分析に特有な現象であり、イオンソースに分析対象化合物とともにイオン化阻害 (促進) 化合物が同時に流れ込んだ際に生じる。こうしたマトリックス効果は対象化合物の分析感度を~100%損なう可能性もあるため、精密定量には対策が必須であるが、プラズマローゲンの分析には必ずしもその評価が十分に行われてこなかった。そこで、マトリックス効果を回避した LC 条件の最適化の他、ヒト血漿や脳などの生体サンプルからの抽出法の検討や種々のバリデーションを行ったところ、ヒト血漿および脳中においてもプラズマローゲン分子種を高感度・高精度に定量できる LC-MS/MS分析法を構築することができた (図2)^{3,4)}。本分析法は、いずれのプラズマローゲン分子種も fmol レベルで検出が可能であった。

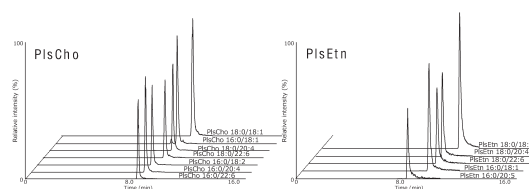


図2. プラズマローゲンのMRMクロマトグラム

2. 神経変性疾患におけるプラズマローゲン

1990年代にAD者の脳において、健常者と比較してプラズマローゲンの有意な減少が確認され⁵⁾、プラズマローゲンとADの関連について注目されるようになった。しかし、これまでのヒトAD者の脳を用いた研究においては、プラズマローゲンの減少する報告が多いものの^{6,7)}、全く変化しない、または増加するといった報告もあり⁸⁾、一貫した見解に至っていない。そこで我々は、1で構築した分析法を用いてヒトAD者 (n=21)、および健常者の脳 (n=20) 中のプラズマローゲンおよびその関連リン脂質の定量解析を行った。その結果、多くのプラズマローゲン分子種では健常者と差がなく、PlsCho 18:0/22:6のみが健常者と比較して有意に低値となり、PlsEtn 18:0/20:4においては低値となる傾向が見られた (図3)⁹⁾。PlsCho 18:0/22:6は、PlsEtn 18:0/22:6からホスホリパーゼCとホスホトランスフェラーゼにより合成されるが、ごく最近、

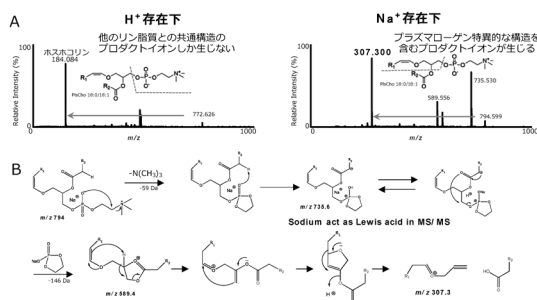


図1. プラズマローゲンのMS/MSスペクトル (A) とナトリウム存在下でのプロダクトイオン生成過程 (B)

軽度認知症者の脳においてこれらの活性低下が報告されている¹⁰⁾。また、PlsChoは、PlsEtnよりもターンオーバーが速いことが知られており¹¹⁾、PlsCho 18:0/22:6減少のため、AD者の脳において、抗炎症作用を發揮する遊離ドコサヘキサエン酸およびその代謝産物の供給源の減少が示唆された。

また、AD者の脳においてホスホリパーゼA2が発現していること、アラキドン酸およびその代謝産物が増え、炎症惹起に関与していることが知られている。本研究で見られたPlsEtn 18:0/20:4の低下は、他のリン脂質(ジアシル型やアルキル型)では見られなかったことから、PlsEtnがアラキドン酸の主な供給源になっていることが示唆された。以上のように、多価不飽和脂肪酸を有するプラズマローゲンが脳のターンオーバーに重要な役割を担っていると考えられた。

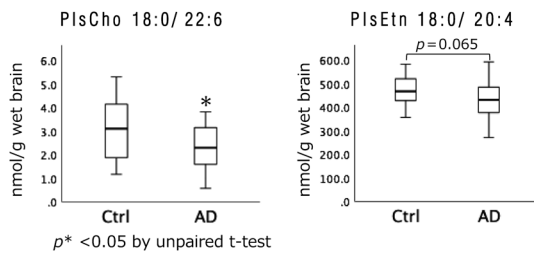


図3. アルツハイマー病 (AD) 者の脳中プラズマローゲン濃度

おわりに

リポミクスに代表されるオミクス解析へのLC-MS/MS技術の活用が進むにつれ、その感度や精度、選択性の高さは益々進化している。ただし、選択性の向上は、マトリックスの影響やノイズが見えにくくなることを意味する。なおざりにされがちなこのことを十分に考慮しつつ、プラズマローゲンを分子種レベルで精密に定量することが重要である。こうした方法の活用によって、ADをはじめとする多くの疾患との関わりが深まり、さらにはプラズマローゲンの摂取による認知機能の改善といった機能性食品への展開がより一層進展するものと期待される。実際に、我々はいく最近本分析法を活用してプラズマローゲンの吸収代謝を調べたところ、プラズマローゲンの一部が腸管粘膜内で構造変換 (*sn*-2位へのアラキドン酸の選択的な再エステル化、PlsEtnからPlsChoへの塩基変換)を受け、その後リンパ液へと吸収されることを胸管リンパカニューレーション法および反転腸管法により証明した¹²⁾。上述のように、長鎖多価不飽和脂肪酸を有するプラズマローゲンは、脳において特に重要な役割を果たすと考えられるため、こうした腸管での構造変換が、食事由来プラズマローゲンの機能性を調節する重要な役割を担うと考えられる。今後、機能性食品などとしてプラズマローゲンを活用していくためには、分子種レベルで腸管吸収メカニズムを評価することが重要になるであろう。

(引用文献)

- 1) Braverman N.E., Moser A.B. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 1442-1452 (2012)
- 2) Otoki Y., Nakagawa K., Kato S., Miyazawa T. MS/MS and LC-MS/MS analysis of choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation. *J. Chromatogr. B* 1004, 85-92 (2015)
- 3) Otoki Y., Kato S., Kimura F., Furukawa K., Yamashita S., et

- al. Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 134, 77-85 (2017)
- 4) Otoki Y., Hennebelle M., Livitt A.J., Nakagawa K., Swardfager W., et al. Plasma phosphatidylethanolamine and triacylglycerol fatty acid concentrations are altered in major depressive disorder patients with seasonal pattern. *Lipids*, 52, 559-571 (2017)
- 5) Ginsberg L., Rafique S., Xuereb J.H., Rapoport S.I., Gershfeld, N.L. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.*, 698, 223-226 (1995)
- 6) Guan Z., Wang Y., Cairns N.J., Lantos P.L., Dallner G., et al. Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58, 740-747 (1999)
- 7) Han X., Holtzman D.M., McKeel D.W. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.*, 77, 1168-1180 (2001)
- 8) Igarashi M., Ma K., Gao F., Kim H.W., Rapoport S.I., Rao J.S. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J. Alzheimers Dis.*, 24, 607-517 (2011)
- 9) Otoki Y., Kato S., Nakagawa K., Harvey D.J., Jin L.W., Dugger B.N., et al. Lipidomic analysis of postmortem prefrontal cortex phospholipids reveals minimal changes in plasmalogen species between cases with and without Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.*, in press
- 10) Kleinedam L., Chouraki V., Prochnicki T., van der Lee S. J., Madrid-Marquez L., et al. PLCG2 protective variant p.P522R modulates tau pathology and disease progression in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol.* 139, 1025-1044 (2020)
- 11) Rosenberger T.A., Oki J., Purdon A.D., Rapoport S.I., et al. Rapid synthesis and turnover of brain microsomal ether phospholipids in the adult rat. *J. Lipid Res.*, 43, 59-68 (2002)
- 12) Takahashi T., Kamiyoshihara R., Otoki Y., Ito J., Kato S., et al. Structural changes of ethanolamine plasmalogen during intestinal absorption. *Food Funct.* 11, 8068 (2020)

謝辞 本研究は、東北大学大学院農学研究科機能分子解析分野および、カリフォルニア大学デービス校にて実施されました。東北大学の仲川清隆先生は、あらゆる面でご指導を賜るとともに、本賞にも推薦いただきました。この場を借りて心より御礼申し上げます。また、恵まれた研究環境を与えてくださり、ご指導鞭撻を賜りました東北大学の宮澤陽夫先生に深く感謝いたします。カリフォルニア大学デービス校のAmeer Taha先生には貴重な留学の機会をいただき、Marie Hennebelle先生(現ワーゲニング大学)は、海外での研究から私生活に至るまでサポートいただきました。プロダクトイオンの解析についてとことん議論して下さいました東京大学の小倉由資先生に深く感謝いたします。また、東北大学の池田郁夫先生、永塚貴弘先生、伊藤隼哉先生からもたくさんのご助言をいただきました。私が今日まで研究を続けることができたのはご支援くださった多くの先生方、当該研究に貢献してくれた多くの学生諸氏のおかげです。最後に、これまで支えてくれた両親、姉、祖母、天国にいる祖父、また、先輩研究者として公私共に支えてくれた夫の加藤俊治先生(東北大学)に心から感謝します。

*本研究の一部は農研機構生研支援センター「[知]の集積と活用による研究開発モデル事業」の支援を受けて実施しました。