

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14735

研究課題名(和文) 食事性高コレステロール血症ラットは認知症モデル動物になりうるか？

研究課題名(英文) Possibility of diet induced hypercholesterolemic rats as a dementia model

研究代表者

佐藤 匡央 (Sato, Masao)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：90294909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：認知症は、糖尿病の合併症と考えられている。しかし、適切な自然発症型モデル動物がおらず、認知症の治療法は確立されていない。一方で、外因性高コレステロール血症(ExHC)ラットは糖代謝異常を呈し、学習能力が低いことが明らかとなっている。本研究ではExHCラットが認知症のモデル動物となるか起源系統であるSDラットとの比較実験を行った。

高齢ラットは2型糖尿病を発症し、高齢ExHCラットの大脳皮質中A $\beta$ (1-42)濃度は有意な高値を示した。これより高齢ExHCラットはインスリン分泌不足による糖代謝異常を呈し、脳内でA $\beta$ (1-42)が蓄積したことから認知症を発症していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dementia is a neurodegenerative disorder in later life. Type 2 Diabetes (T2D) has been reported as a risk factor of dementia. Exogenously hypercholesterolemic (ExHC) rats, a model of diet-induced hypercholesterolemia, have lower learning ability than other strains. Our previous study showed that Smek2 is a responsible gene for the ExHC rat's phenotypes. ExHC rats showed T2D-like glucose metabolic disorders, such as insulin resistance and hyperglycemia. Therefore, we hypothesized that ExHC rat is a model for AD related to T2D. In this study, we researched cerebral lipid and glucose metabolism. We researched cerebral metabolism in 22-week-old male ExHC and SD rats with no cholesterol diet for 2 weeks (old-exp). The cerebral cortical b-amiroid levels were significantly higher in ExHC rats than SD rats. These data suggest that ExHC rats have a risk of developing dementia.

研究分野：栄養化学

キーワード：認知症 糖尿病 モデル動物 酸化コレステロール

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の認知症の中でも 40%程度を占めるアルツハイマー病は生活習慣によっても惹起されることがわかってきた。九州大学の大规模コホート研究である久山町研究の報告では認知症全体で糖尿病に罹患していると相対危険度は 1.74 倍、アルツハイマー病は 2.05 倍、血管性認知症は 1.82 倍に上昇する。さらに同研究(後ろ向きコホート研究)で、脳内に老人斑(アミロイド $\beta$ の蓄積)の確認できる罹患者では、糖負荷後 2 時間血糖が高くなると 3 倍、高インスリン血症で 6 倍に相対危険度が上昇する。これらの研究から、アルツハイマー病の発症は II 型糖尿病で、高インスリン血症が老人斑形成を引き起こし発症すると考えられる。このような疫学研究は諸外国でも行われており同様な結論である。アルツハイマー病は、高度精神活動における疾患であるため、疫学研究による解析が多く報告されている。食品の効果は食事摂取のアンケートに基づく横断研究および介入研究の臨床試験が報告されている。現在、動物実験での再現は困難とされている。しかし、予防に関する創薬および創食には副作用の解明を含む発症機構を解明することが重要である。アルツハイマー病研究における実験動物を用いた研究において、当然のことながら脳の生化学的解析に集中し、報告が偏在する。他の臓器との関係の報告は少なく、例えば、上述の Dai らの報告において引用数 37 のうち動物実験の引用は 7 報で、その他は疫学調査である。そのうち 5 報は肝臓と脳の関係である。このように疫学研究はヒトの個体・集団研究であり、動物実験との関係は他臓器との関連について論じられることが多い。しかし、モデル動物の開発はアルツハイマー発症メカニズムから推測される脳内のアミロイドの代謝に関わる遺伝子の過発現したマウスがほとんどである。つまりアミロイド $\beta$ の高蓄積システムを用いており、糖尿病とアルツハイマー病との関連について適切なモデル動物はいない。

### 2. 研究の目的

一部のアルツハイマー病は糖尿病の合併症であるという仮説が提唱されている。実験動物ではアミロイド $\beta$ の蓄積を指標として研究が行われている。本研究はアルツハイマー病の食事による予防効果を検証するために、高インスリン血症を発症する外因性高コレステロール血症(ExHC)ラットを、アルツハイマー病のモデル動物として確立する。そして、改善する食品の検索を、糖尿病を考慮して行うために糖尿病にかかわるアミロイド $\beta$ 蓄積の仮説(グルコース取り込み悪化仮説、グルコース取り込み悪化仮説、ケトン体改善仮説脳内コレステロール代謝遅延仮説)について検証する。

### 3. 研究の方法

脳組織の生化学的および解剖学的な検証を経

て、ExHC ラットのアミロイド $\beta$ 蓄積病態モデルラットとしての確立を行う。アミロイド $\beta$ の蓄積が確認できなくても、高インスリン血症であるラットの脳の糖代謝と高インスリン血症との解明はアルツハイマー病予防に意義がある。

ExHC ラットにおけるアミロイド $\beta$ の蓄積(生化学的検証)

アルツハイマー病の症状の一つとしてアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )の蓄積による老人斑の形成がある。現在のほとんどの報告は、記憶などの行動評価よりもこのアミロイド $\beta$ の蓄積を評価する傾向にある。本研究でもアミロイド $\beta$ の蓄積をアルツハイマー病の指標として行う。しかし、予備実験としてラットの脳におけるアミロイド $\beta$ は重合しているので定量法は多様にあり、ラット脳において定量を試みた結果、再現性のとれない論文が多く存在した。現在のところ S-allyl-L-cysteine (SAC) というニンニクに含まれる食品成分で A $\beta$ を単量体に分離する方法(V. B. Gupta, et al., Anti-amyloidogenic activity of S-allyl-L-cysteine and its activity to destabilize Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils in vitro, Neurosci. Lett., 2007, 429, 75-80)が最良である結論を得た。まず ExHC ラットの加齢によるアミロイド $\beta$ の蓄積進行を確認する。対照群は糖尿病ラットである GK ラット、起源系統である SD 系ラット、学習成績のよい BN ラット(9.9 秒、20 位/229 系統中)を考えている。

### 4. 研究成果

下記の結果より ExHC ラットでは自然発症的に A $\beta$ 42 の蓄積症状は進行していることが加齢ラットにより確認された。これにより、自然発症型の A $\beta$ 42 の蓄積モデル動物として使用可能である。遺伝子操作を行っていない系統なので、あらゆる施設で使用が可能である。しかし、このモデルでは、24 週齢とかなりの時間がかかる。さらに発症機構の解明のためには、A $\beta$ 42 が蓄積する前症状を確認し、マーカーとして設定し、脳内で蓄積する A $\beta$ 42 と連動するマーカーを見つけ出す必要がある。

従って、若齢ラットで検証した結果、既に、脳内でインスリン抵抗性を示していた。この状態で、A $\beta$ 42 の蓄積機構の検証を行うことができる。脳内の酸化コレステロール量バランスという新しいマーカーにより、A $\beta$ 42 の蓄積を阻止する物質探索にモデル動物として使用できる。今後は、食品成分について検討する予定である。

以下加齢ラット、若齢ラットそれぞれの実験結果を述べる。

#### (1) 加齢ラット

##### ① A $\beta$ 42 の蓄積

A $\beta$ には 40 と 42 と同タンパク質から切り出された、違う分子量のタンパク質が損座する。A $\beta$ 42 が老人斑蓄積の下人であると考えられている。従って、アルツハイマー病のモ

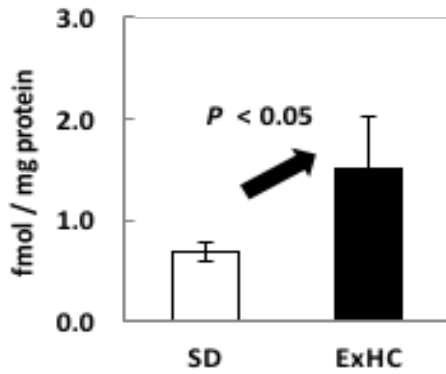


図 1. 大脳皮質中 Aβ42

デルとして成立するのかを証明する最も重要な evidence として 24 週齢の ExHC ラットの脳内の Aβ42 の蓄積状態を検討した。対照群として 24 週齢の SD 系ラットとした。その結果、図 1 に示したように、SD 系ラットの 2 倍の量が蓄積していた。

② 酸化コレステロール

図 2 にあるような仮説が提唱されている、

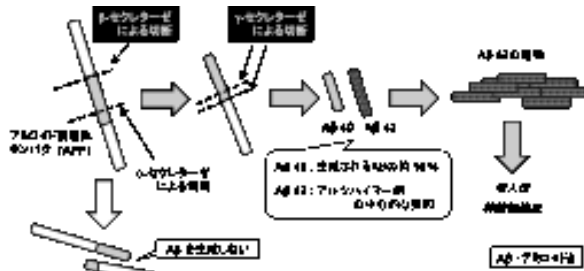


図 2. 酸化コレステロールと Aβ42

酸化コレステロール (24s-hydroxycholesterol と 27-hydroxycholesterol) を測定した結果、図 3 のように、その比が低下し、Aβ42 蓄積を促進し

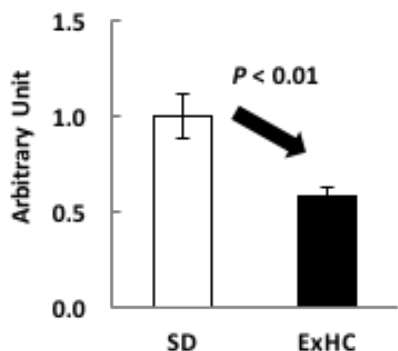


図 3. 大脳皮質 酸化コレステロール 24S-OH/27-OH 比

ている可能性があった。

- (2) 若齢ラット
- ① 脳内の糖代謝

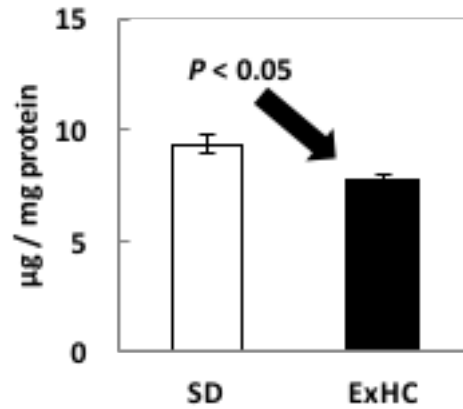


図 4. 脳内グルコース量

ExHC ラットは 2 型糖尿病を発症する。従って、糖質代謝不全による、Aβ42 の蓄積の可能性はあるが、その発症機構は世界的にも、解明されていない。仮説としては、脳内のインスリンの作用により Aβ42 が脳から血液に排出されない、「インスリン Aβ42 排泄抑制説」が考えられている。この研究は系の組み立てが難しいために、証明に至っていないが、脳内だけのインスリン省の増減ができればそれが可能であると思われる。従って、この若齢 (6 週齢) ラットを用いての仮説として、脳内のグルコースの代謝について、検証した。

図 4 のように、ExHC ラットで低い値をしめた。脳髄液ではなく、細胞内でのグルコースの濃度であるので、脳液からグルコースの取り込み不全である可能性がある。従って、インスリン抵抗性を惹起している。インスリン量を調べる必要があるが、まだ測定に至っていない。

② 加齢ラットでのマーカの若齢ラットの再現性

若齢ラットの Aβ42 は濃度が低すぎて、検出できなかった。従って、測定できたのは、図 5 の大脳皮質内の酸化コレステロールである。これは老齢ラットと同様な傾向を示した。

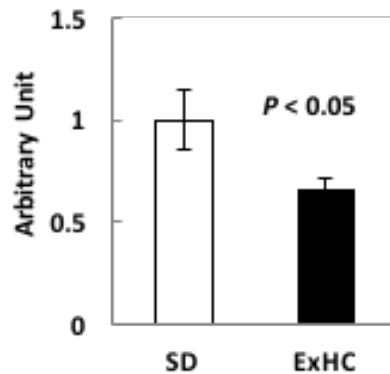


図 5. 大脳皮質 酸化コレステロール 24S-OH/27-OH 比

## 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0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 第71回日本栄養・食糧学会大会(2017年5月19-21日@沖縄コンベンションセンター)  
宮後元徳、小野雅博、鈴木隆久、田中愛健、城内文吾、佐藤匡央「認知症モデルとしての外因性高コレステロール血症ラット」
2. 第53回化学関連支部合同九州大会(2016年7月2日@北九州国際会議場)  
宮後元徳、鈴木隆久、田中愛健、城内文吾、佐藤匡央「外因性高コレステロール血症ラットの脳内コレステロール代謝」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞

第71回日本栄養・食糧学会大会にて「学生優秀発表賞」(学会発表2の発表について)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤匡央 (SATO, Masao)  
九州大学・農学研究院・教授  
研究者番号：90294909

### (2) 研究分担者

城内文吾 (Shirouchi, Bungo)  
九州大学・農学研究院・助教  
研究者番号：00548018

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

宮後元徳 (MIYAGO, Motonori)  
田中愛健 (TANAKA, Yasutake)