

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00915

研究課題名（和文）記憶再生障害に起因する徘徊を予防する食品成分の解明

研究課題名（英文）Analysis of functional food to prevent wandering caused by impairment of memory recall

研究代表者

中川 敏幸（Nakagawa, Toshiyuki）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00271502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：認知症の7割を占めるアルツハイマー病（AD）は認知記憶障害が中核症状である。一方、1万人を超える行方不明者や踏切事故に繋がるのはADの周辺症状（BPSD）である徘徊が主な原因である。徘徊は、新しい記憶の再生が障害され、過去と現在の自分と重なることが要因であると理解されている。本研究では、ケルセチンを長期間摂取したアルツハイマー病（AD）モデルマウス脳のConnectivity Map解析を行い、記憶再生障害の改善が期待できる食品成分であるルテオリンを同定した。さらに、この成分のリン酸化eIF2 - ATF4シグナルへの抑制作用とBPSDに対する効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、記憶再生障害の改善効果について、食品成分による統合的ストレス応答経路の制御に着目した点である。特に、統合的ストレス応答経路は認知機能障害に関連することが世界的に注目されてきている。また、1万人を超える行方不明者や踏切事故に繋がるのは認知症の周辺症状（BPSD）の徘徊を記憶再生障害に基づく目的のある行動と捉え、記憶再生障害に改善効果が期待できる機能性食品成分を同定したことは、BPSDに対して食品成分から新たにアプローチが可能であることを示唆する。さらに、認知症の発症を遅らせ（一次予防）、発症後の進行を緩やかにする（三次予防）可能性から社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study is to explore the novel functional food molecule to act like quercetin for suppression of amyloid-beta (A $\beta$ ) production and prevention of memory impairment and Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD) in Alzheimer's disease (AD) model mice. In this study, DNA microarray was performed using AD model mice brains and the expression levels of genes were compared between mice fed 0.5% quercetin containing food and mice fed food for fifteen months. One of functional food molecule, luteolin, was identified by connectivity Map analysis. A $\beta$  production and the integrated stress response were suppressed by luteolin treatment in culture cells. After luteolin injected intraperitoneally into AD model mice, memory impairment was partly prevented and immobility time was decreased assessed by fear conditioning test and forced swimming test, respectively. These results suggest that luteolin may be promising functional food molecule to prevent BPSD in AD.

研究分野：神経内科学

キーワード：機能性食品成分 ポリフェノール アルツハイマー病 認知症 行動・心理症状 統合的ストレス応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症の7割を占めるアルツハイマー病(AD)は認知記憶障害が中核症状である。一方、1万人を超える行方不明者や踏切事故に繋がるのはADの周辺症状(BPSD)である徘徊が主な原因である。最近では、徘徊は目的のある行動(出勤/買物; 帰宅願望)であり、新しい記憶の再生が障害され、過去と現在の自分と重なることが要因であると理解されている。応募者等はヒト介入試験にて、記憶再生障害に対するケルセチンの改善効果を証明した。しかし、効果を持続させるためには、連日1個相当のケルセチン高含有玉葱を摂取する必要がある。この問題は、新たな食品成分の同定とこれらの食品を組合せた摂取により解決出来るのではないかと考えた。そこで、新たな食品成分を探索するため、ケルセチンを長期間摂取したADモデルマウス脳のConnectivity Map解析を行った。低分子化合物で処理した培養細胞の遺伝子発現データベースから食品成分を5種類選択した。

一方、野菜や果物の摂取によるAD発症リスクの低下作用、ADモデルマウスにおけるフラボノイドの効果、さらに、自閉症児の行動に対するルテオリンとケルセチンを組合せた効果の報告がある。しかし、脳内での作用機構(抗酸化作用や標的分子)は不明のままである。応募者等は培養細胞とADモデルマウスを用い、アミロイド-(A)産生と記憶に対するレスベラトロールとケルセチンの効果を示した。また、この効果は小胞体ストレス経路の制御によることを証明した。さらに、発症早期のAD患者への介入試験にて、記憶再生障害に対するケルセチンの改善効果を示した。また、ADの記憶障害は記憶の再生障害であることがマウスで示された。さらに、低分子化合物ISRIBは、転写因子ATF4発現を抑制し記憶力を強化することが示された。これらの報告は応募者の研究課題の達成目標を支持する結果である。

本研究では、小胞体ストレス経路を制御する食品成分とその標的分子を中心に、記憶の再生に対する作用を解明するという点で、従来の食品成分によるアルツハイマー病研究とは全く異なる位置づけとなる。

### 2. 研究の目的

認知症の有病者数は2025年には700万人になると推計されており、認知記憶障害及び周辺症状の徘徊[記憶再生(想起)障害が主要因]への治療と予防法の確立は喫緊の課題である。先行研究にて、ケルセチンを摂取したアルツハイマー病(AD)モデルマウスとケルセチン高含有玉葱粉末を摂取したAD患者は記憶再生障害が改善すること、ケルセチンは転写因子ATF4の発現を抑制することを明らかにした。そこで、ケルセチンを長期間摂取したADモデルマウス脳のConnectivity Map解析を行い、記憶再生障害の改善が期待できる食品成分を選択した。

本研究では、この成分のリン酸化eIF2-ATF4シグナルへの作用と記憶再生障害に対する効果を明らかにし、同定した成分とケルセチンとの効果的な組合せの解明を到達目標とする。

### 3. 研究の方法

(1)アルツハイマー病モデル(AD)マウスに0.5%のケルセチンを含む餌を長期に与え、脳の全転写産物発現解析を実施した。発現の変化に基づいたConnectivity Map解析にて、ケルセチンと同様な遺伝子群発現パターンを示す食品成分を探索した。

(2)探索した食品成分を培養細胞に添加し、ATF4及びプレセニン-1の発現とA産生を低下させる食品成分を同定した。タンパク質発現はウェスタンブロット法にて解析し、培養液中のA産生量はELISA法にて測定した。

(3)同定した食品成分をADモデルマウスに摂取させ、食品成分による脳内ATF4の発現抑制効果と行動解析から、記憶及びBPSDへの作用を検討した。

### 4. 研究成果

(1)2カ月齢から0.5%のケルセチン含有基礎餌または基礎餌のみを1年3ヶ月間与えたADモデルマウス(APP23)の脳を用い、全転写産物発現解析を実施した(図1)

発現の変化に基づいたConnectivity Map解析を行った。ケルセチンと同様な遺伝子群発現パターンを示す食品成分を探索し、ルテオリンを同定した(図2)。

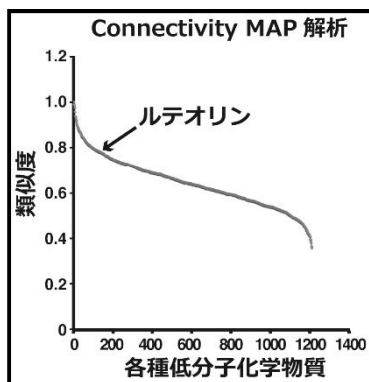


図2 遺伝子増加及び低下群を用いたConnectivity Map解析

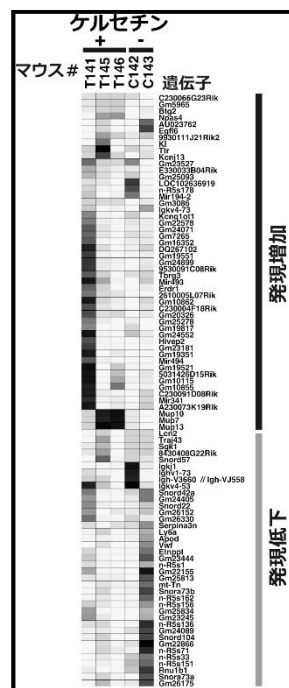


図1 ケルセチン摂取により発現が増加及び低下した遺伝子群(ヒートマップ)

(2) アミロイド- $\beta$  産生が亢進したオートファジー機能低下細胞を用い、25  $\mu$ M ルテオリン処理を行った。ルテオリン処理により、A $\beta$  産生は有意に抑制された(図3)。

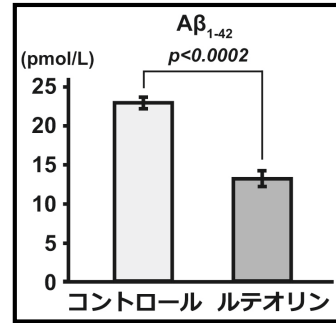


図3 ルテオリン処理によりA $\beta_{1-42}$ 産生は有意に低下した

リン酸化 eIF2 発現により一般的なタンパク質の翻訳は抑制されるが、転写因子 ATF4 の翻訳は亢進する。そこで、ルテオリンの eIF2 -ATF4 シグナル系への作用を検討した。ウェスタンブロット法にて ATF4 の発現を検討すると、ルテオリン濃度依存的に ATF4 の発現が低下することが明らかとなった(図4)。統合的ストレス応答が抑制されていることから、ルテオリン処理による A $\beta$  産生抑制がタンパク質合成阻害によるものではないことがわかった。

次に、A $\beta$  産生に関与する  $\gamma$ -セクレターゼ活性中心のタンパク質であるプレセニリン-1 タンパク質の発現量を検討した。ルテオリン濃度依存的にプレセニリン-1 C末断片の発現が抑制されていた(図5)。さらに、ルテオリンを投与したマウスの海馬において、プレセニリン-1 C末断片の発現が有意に抑制され、プレセニリン-1 N末断片の発現も減少傾向にあった。以上のことから、統合的ストレス応答時、転写因子 ATF4 がプレセニリン-1 プロモーターに結合し、その発現を増加させることから<sup>1-3</sup>、ルテオリンの A $\beta$  産生抑制作用として、統合的ストレス応答を抑制し、ATF4 とプレセニリンの発現を抑制する機構が示唆された。

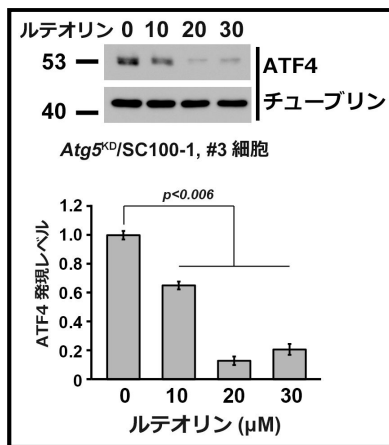


図4 ルテオリン濃度依存的な転写因子 ATF4 の発現抑制 (上図)ウェスタンブロット、(下図)発現レベル(ATF4 とチューブリンの比)

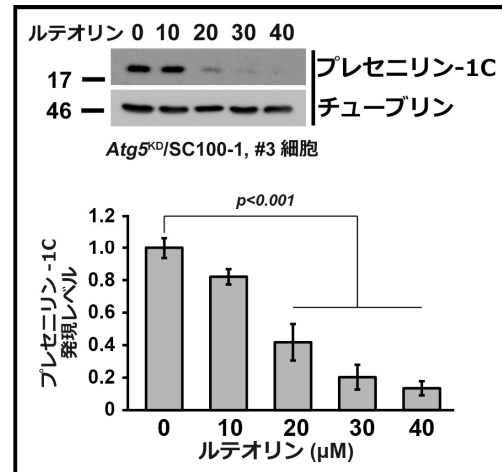


図5 ルテオリン濃度依存的なプレセニリン-1 C末断片の発現抑制 (上図)ウェスタンブロット、(下図)発現レベル(プレセニリン-1 とチューブリンの比)

(3) AD モデルマウスの腹腔内に、70 日間連日ルテオリン(20 mg/Kg/日)を注射し、56 週齢時に恐怖条件付け試験を開始した。方法として、3 日間 2 種類のチャンパー(A と B)の慣らしを 4 時間の間隔を空けて行った。第 4 日目にチャンパー A で刺激(85dB 30 秒の音刺激、その 29 秒目に電気刺激 0.35mA 1 秒間)を行い、60 秒後にチャンパーから取り出し、ホームケージに戻した。刺激後第 1、8、13、20 日目に 300 秒間チャンパー A に入れ、静止時間により文脈的記憶を検討した。ルテオリンを投与したマウスにおいて、文脈的記憶が増強し、時間経過時にも記憶の再生が改善していることが示唆された(図6)。

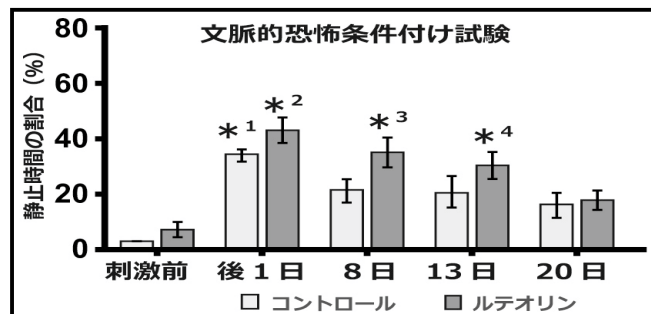


図6 文脈的恐怖条件付け試験における記憶再生の変化 ルテオリン投与マウスにおいて、記憶再生の増強を認める。ANOVA 分析後、Bonferroni 検定を行った。 $\ast^1$ : コントロール群(8 匹)の刺激前と刺激後 1 日目;  $\ast^2$ ,  $\ast^3$ ,  $\ast^4$ : ルテオリン群(10 匹)の刺激前と刺激後 1, 8, 13 日目との間に有意差 ( $p < 0.05$ ) を認めた

軽度認知障害(MCI)の32%がうつ病を発症していること<sup>4</sup>、さらに高齢期のうつ病はアルツハイマー病の危険性を高めること<sup>5,6</sup>が示唆されている。そこで、49 週齢の AD モデルマウスを

用い、16週間連日腹腔内にルテオリン（20 mg/Kg/日）を注射し、ルテオリンの抑うつへの効果を強制水泳試験（6分間）にて検討した。抑うつ行動の指標である静止時間（水面に浮いた状態）が、ルテオリン投与により有意に減少することがわかった（図7）。

ADモデルマウスであるAPP23（B6D2-TgN [Thy1-APPswe]）は、Swedish変異を持つヒトアミロイド前駆体タンパク質遺伝子のトランスジェニックマウスで、生後6ヶ月頃から脳内のアミロイド沈着が始まる。今回、行動解析を実施した56～66週齢では全てのマウスの脳において脳内アミロイド沈着を認めることから、ルテオリンは、認知症発症前後の軽度認知症からアルツハイマー病の記憶再生及び抑うつに対しての効果が期待される。

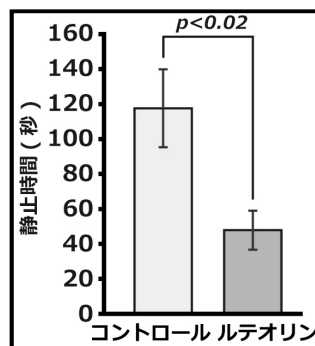


図7 強制水泳試験による静止時間 ルテオリン投与群（6匹）ではコントロール群（5匹）に比べ有意な減少を認めた

#### <引用文献>

- 1 Mitsuda, T., Hayakawa, Y., Itoh, M., Ohta, K. & Nakagawa, T. ATF4 regulates gamma-secretase activity during amino acid imbalance. *Biochemical and biophysical research communications* 352, 722-727, doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.075 (2007).
- 2 Hayakawa, M. *et al.* Quercetin reduces eIF2alpha phosphorylation by GADD34 induction. *Neurobiol Aging* 36, 2509-2518, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.006 (2015).
- 3 Nakagawa, T. & Ohta, K. Quercetin Regulates the Integrated Stress Response to Improve Memory. *Int J Mol Sci* 20, doi:10.3390/ijms20112761 (2019).
- 4 Ismail, Z. *et al.* Prevalence of Depression in Patients With Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 74, 58-67, doi:10.1001/jamapsychiatry.2016.3162 (2017).
- 5 Barnes, D. E. *et al.* Midlife vs late-life depressive symptoms and risk of dementia: differential effects for Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Gen Psychiatry* 69, 493-498, doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.1481 (2012).
- 6 Diniz, B. S., Butters, M. A., Albert, S. M., Dew, M. A. & Reynolds, C. F., 3rd. Late-life depression and risk of vascular dementia and Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of community-based cohort studies. *Br J Psychiatry* 202, 329-335, doi:10.1192/bjp.bp.112.118307 (2013).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakagawa T, Ohta K	4. 巻 20
2. 論文標題 Quercetin regulates the integrated stress response to improve memory	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Eri Ohta, Masanori Itoh, Masashi Ueda, Yoko Hida, Miao-xing Wang, Miki Hayakawa-Ogura, Shimo Li, Emika Nishida, Kazunori Ohta, Tana, Saiful Islam, Kiyomi Nakagawa, Tomomi Sunayama, Huayue Chen, So Hirata, Masashi Endo, Yoya Ohno, Toshiyuki Nakagawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Cullin-4B E3 ubiquitin ligase mediates Apaf-1 ubiquitination to regulate caspase-9 activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0219782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219782">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219782</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam S, Ueda M, Nishida E, Wang MX, Osawa M, Lee D, Itoh M, Nakagawa K, Tana, Nakagawa T.	4. 巻 1688
2. 論文標題 Odor preference and olfactory memory are impaired in Olfaxin-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 81-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.03.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobori M, Takahashi Y, Takeda H, Takahashi M, Izumi Y, Akimoto Y, Sakurai M, Oike H, Nakagawa T, Itoh M, Bamba T, Kimura T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Dietary Intake of Curcumin Improves eIF2 Signaling and Reduces Lipid Levels in the White Adipose Tissue of Obese Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27105-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 中川敏幸	4. 巻 51
2. 論文標題 記憶再生に関する食品成分の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 41-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤正徳, 太田和徳, 中川敏幸	4. 巻 第2章 8
2. 論文標題 ケルセチン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 認知症と機能性食品	6. 最初と最後の頁 69-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤正徳, 太田和徳, 中川敏幸	4. 巻 第3章 2
2. 論文標題 認知症と医農連携	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 認知症と機能性食品	6. 最初と最後の頁 172-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa K, Ueda M, Itoh M, Islam S, Tana, Nakagawa T	4. 巻 8
2. 論文標題 Dietary Quercetin Ameliorates Memory Impairment in a Murine Model of Alzheimer's Disease with Obesity and Diabetes, Suppressing ATF4 Expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol Neurosci	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21767/2171-6625.1000234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura M, Ohkawara T, Nakagawa T, Muro T, Sato Y, Satoh H, Kobori M, Nishihira J	4. 巻 7
2. 論文標題 A randomized, double-blind, placebo-controlled study evaluating the effects of quercetin-rich onions on cognitive function in elderly subjects.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Functional Foods in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 353-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Nakagawa K, Islam S, Ueda M, Nakagawa T
2. 発表標題 Activated integrated stress response in obese diabetic mice may cause impairment of adult hippocampal neurogenesis and episodic-like memory
3. 学会等名 49th ANNUAL MEETING Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田和徳、中川敏幸
2. 発表標題 アルツハイマー病発症予防を目指した玉葱由来ケルセチンの作用機構の解明
3. 学会等名 第10回 岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Islam S, Ueda M, Nishida E, Wang MX, Itoh M, Nakagawa K, Tana, Nakagawa T.
2. 発表標題 Olfactory function is impaired in Olfaxin deficient mice
3. 学会等名 48th ANNUAL MEETING Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakagawa K, Ueda M, Itoh M, Hayakawa-Ogura M, Tana, Islam S, Nakagawa T
2. 発表標題 IMPROVEMENT OF MEMORY IMPAIRMENT BY DIETARY QUERCETIN SUPPLEMENTATION THROUGH SUPPRESSING ATF4 EXPRESSION IN A MURINE MODEL OF EARLY-STAGE ALZHEIMER ' S DISEASE WITH OBESITY AND DIABETES
3. 学会等名 第23回世界神経学会議 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 他那、伊藤 正徳、中川 潔美、イスラム サイフル、上田 昌史、王 森星、中川 敏幸
2. 発表標題 アルツハイマー病予防に関する機能性食品成分の探索
3. 学会等名 第12回小胞ストレス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考