

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08321

研究課題名（和文）ベタインによる認知症発症予防に向けた基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental research for the prevention of dementia using glycine betaine

研究代表者

平松 正行（Hiramatsu, Masayuki）

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：10189863

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）：アミロイド（A₂₅₋₃₅）タンパク質の活性フラグメント、A₂₅₋₃₅投与による認知機能障害はトリメチルグリシン（ベタイン）の前処置により抑制されること、また、Neuro2A細胞にA₂₅₋₃₅または過酸化水素水を処置すると細胞生存率が低下し、ベタインはこの細胞生存率の低下を抑制することを明らかにした。GABAトランスポーター2（GAT2）の発現とベタインの細胞内への取り込み量には正の相関があり、A₂₅₋₃₅を脳室内に投与したマウスの海馬では、NeuN陽性神経細胞においてGAT2の蛍光シグナルが強く認められたことから、ベタインは神経細胞に取り込まれ、神経保護効果を示す可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症（AD）の認知機能低下により、社会生活が困難となり、患者本人や周囲の家族を苦しめる。しかし、AD発症後の治療は極めて難しく、予防薬開発が求められている。これまでに我々はAD様認知機能障害に対して、ベタインが予防効果を示すことを報告している。ベタインは、既に消化促進を目的とするサプリメントとして市販され、さらに、ホモシスチン尿症の治療薬として国内で承認されていることから、導入は容易と考えられる。以上から、ベタインの認知症予防効果が証明され、さらにベタインのトランスポーターGAT2の病態生理学的機能が解明されれば、学術的および社会的意義は大変大きなものになると予想できる。

研究成果の概要（英文）：We reported that cognitive dysfunction after intraventricular injection of A₂₅₋₃₅, an active fragment of amyloid (A) protein, in mice is suppressed by pretreatment with trimethylglycine (betaine), and in Neuro2A cells treated with A₂₅₋₃₅ or hydrogen peroxide solution, cell viability decreased, and betaine suppresses this decrease in cell viability. Furthermore, there was a positive correlation between the expression of GABA transporter 2 (GAT2) and the amount of betaine taken up into cells, and in the hippocampus of mice treated with A₂₅₋₃₅ intraventricularly the fluorescence signal of GAT2 is emitted in NeuN-positive neurons. These results suggest that betaine may be taken up in nerve cells and exhibit a neuroprotective effect.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ベタイン（トリメチルグリシン） GAT2 アルツハイマー病治療薬 ベタイン-GABAトランスポーター 神経保護作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本国内の認知症患者数は2013年発表で460万人以上にのぼり、その半数以上がアルツハイマー型認知症(AD)だといわれている。AD患者の脳内では、アミロイド β ($A\beta$) タンパク質の凝集・沈着による老人斑および過剰なリン酸化tauタンパクの蓄積による神経原線維変化などが観察され、それらにより神経細胞障害が引き起こされる。しかし、現在、ADの根本的治療薬はなく、AD発症後の治療は極めて難しいと考えられる。そのため、AD発症を遅らせる、または抑制するような予防的対策を講じる必要がある。

ベタインは、哺乳動物の細胞内でメチル基供与体として、ホモシステイン(Hcy)をメチオニンに転換する酵素(BHMT)の基質としてメチオニンサイクルの中で重要な役割を担っている(Kempson et al., *Front Physiol*, 2014)。最近の臨床報告から、ADを含む認知症患者や統合失調症などの精神疾患患者の血液中Hcy量が健常者よりも高いこと、さらに、それら患者の血中Hcy量の増加と認知機能障害との間には相関関係があることが明らかとなった(Faux et al., *J Alzheimers Dis*, 2011; Moustafa et al., *Front Behav Neurosci*, 2014)。脳内の過剰なHcyは、酸化ストレス、ミトコンドリア障害および神経細胞死などを引き起こすことが報告されている(Moustafa et al., *Front Behav Neurosci*, 2014)。以上の報告に基づき、我々は、過剰量のHcyをマウスに末梢投与したところ認知機能が障害され、ベタインがその障害を改善することを既に証明している(Kunisawa et al., *Behav Brain Res*, 2015)。

2. 研究の目的

ベタインを事前に処置することで、 $A\beta$ や過酸化水素水による神経細胞障害を予防できるかどうかを調査する。さらに、ベタインを効率よく作用させるために、GAT2の病態生理学的な機能を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス由来神経株化細胞のNeuro2A細胞に、 $A\beta$ の活性フラグメントである $A\beta_{25-35}$ 、または過酸化水素水を処置し、細胞死を確認するためにMTT解析を行った。さらに、GAT2タンパク質の発現レベルを調べる目的で、ウェスタンブロット法を用いた。ベタインの細胞内への取り込みは、蛍光色素であるFAMをベタインに標識したFAM-ベタインをNeuro2A細胞に処置し、抗フルオロセイン抗体を用いて、免疫細胞化学法によりFAM-ベタインを検出した。GAT2タンパク質の過剰発現には、野生型GAT2プラスミドを制限酵素により線状にし、

Neuro2A 細胞に遺伝子導入した。その後、GM418 添加により GAT2 導入細胞をセレクションし、GAT2 過剰発現安定細胞株を樹立した。マウス海馬の神経細胞におけるベタインの取り込みを調べるために、FAM-ベタインをマウス脳室内に直接的に投与し、海馬を薄切後、抗フルオロセイン抗体を用いて FAM-ベタインを検出した。神経細胞は、成熟神経細胞マーカーの抗 NeuN 抗体を用いて同定した。

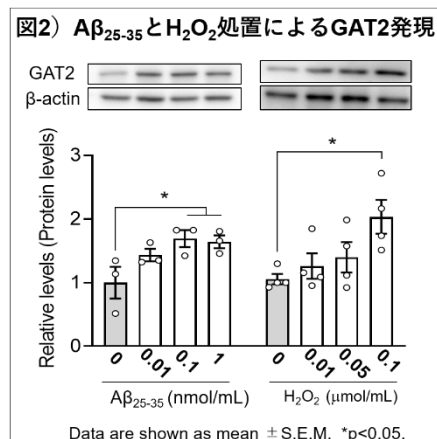
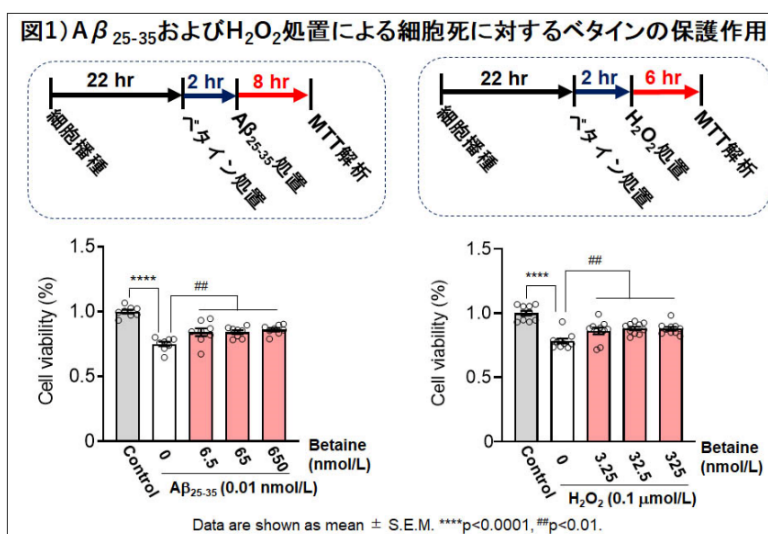
4. 研究成果

我々は、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞に $A\beta_{25-35}$ 、または酸化ストレスを引き起こす過酸化水素水 (H_2O_2) を処置したところ、 $A\beta_{25-35}$ および過酸化水素水は、細胞生存率を低下させたが、ベタインを事前処置しておくこと、 $A\beta_{25-35}$ や H_2O_2 による細胞生存率の低下が抑制された (図 1)。

以上から、ベタインによる神経保護効果が示唆された。

次に、ベタインのトランスポーターである GAT2 タンパク質の発現レベルを調べたところ、 $A\beta_{25-35}$ 、および H_2O_2 処置は、濃度依存的に GAT2 の発現を増加させた (図 2)。GAT2 の病態生理学的意義を明らかにするために GAT2 過剰発現安定細胞株を作製した。コントロールとしては、eYFP 過剰発現安定細胞株を用いた。

コントロール eYFP 過剰発現細胞に $A\beta_{25-35}$ 、または過酸化水素水を処置すると、図 1 の結果と同様に顕著な細胞生存率の低下が認められたが、GAT2 過剰発現安定細胞株に $A\beta_{25-35}$ 、または過酸化水素水を処置すると細胞生存率低下の抑制が認められた (図 3)。このことは、GAT2 が神経保護的な役割を担っていることを示しており、図 2 の $A\beta_{25-35}$ 、および過酸化水素水処置により誘導された GAT2 も細胞を保護するための現象と考えられる。



最後に、GAT2 過剰発現安定細胞株に FAM-ベタインを処置し、GAT2 発現レベルとベタインの細胞内取り込み量を調べたところ、両者の間には正の相関関係が認められた (図 4)。マウス海馬の神経細胞におけるベタ

インの取り込みについて調べるために、マウスの脳室内に FAM-ベタインを微量投与後、凍結切片を作成し、薄切後に免疫組織化学染色を行った。その結果、対照群の未標識 FAM を投与したマウス海馬と比較して、FAM-ベタインを投与したマウス海馬における蛍光シグナル陽性細胞数は顕著に多く、さらに NeuN 陽性神経細胞における割合で比較しても、FAM-ベタイン投与マウスでより多くの蛍光シグナルが確認できた (図 5)。

以上より、神経細胞における GAT2 タンパク質の発現レベルが高いほど内因性ベタインの取り込み量が増え、神経保護効果を発揮する可能性が考えられた。

図3) GAT2過剰発現がAβ₂₅₋₃₅とH₂O₂曝露による細胞毒性への影響

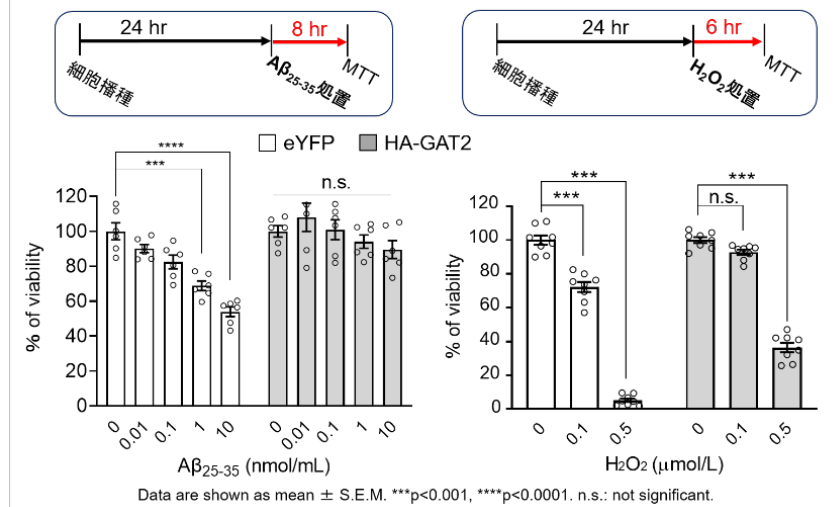


図4) GAT2とベタインの細胞内取り込み量

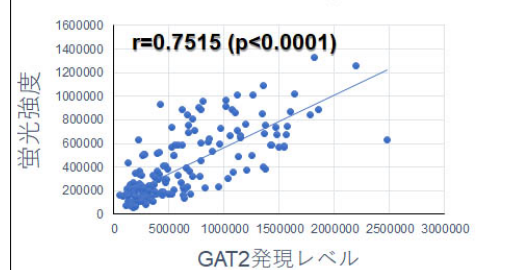
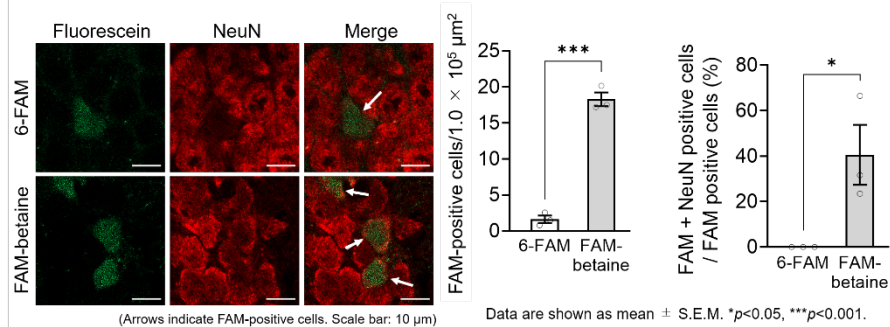


図5) FAM-ベタインのマウス海馬内投与におけるベタインの分布



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Daisuke Ibi, Kazuki Hirashima, Yuya Kojima, Kahori Sumiya, Sari Kondo, Mirai Yamamoto, Toshihiro Ando, Masayuki Hiramatsu	4. 巻 79
2. 論文標題 Preventive effects of continuous betaine intake on cognitive impairment and aberrant gene expression in hippocampus of 3xTg mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 639-652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-200972	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 Daisuke Ibi, Azumi Tsuchihashi, Tomohiro Nomura, Masayuki Hiramatsu	4. 巻 842
2. 論文標題 Involvement of GAT2/BGT-1 in the preventive effects of betaine on cognitive impairment and brain oxidative stress in amyloid peptide-injected mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.10.037	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 Daisuke Ibi, Fumika Suzuki, Masayuki Hiramatsu	4. 巻 188
2. 論文標題 Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 291 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2018.02.024	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 Tursun Alkam, Takayoshi Mamiya, Nami Kimura, Aya Yoshida, Daisuke Kihara, Yuki Tsunoda, Yuki Aoyama, Masayuki Hiramatsu, Hyoung-Chun Kim, Toshitaka Nabeshima	4. 巻 234
2. 論文標題 Prenatal nicotine exposure decreases the release of dopamine in the medial frontal cortex and induces atomoxetine-responsive neurobehavioral deficits in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 1853 ~ 1869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-017-4591-z	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 Kazuo Kunisawa, Kiwamu Kido, Natsuki Nakashima, Takuya Matsukura, Toshitaka Nabeshima, Masayuki Hiramatsu	4. 巻 796
2. 論文標題 Betaine attenuates memory impairment after water-immersion restraint stress and is regulated by the GABAergic neuronal system in the hippocampus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 122 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2016.12.007	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中 柊、衣斐大祐、大谷駿人、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Neuro2A細胞株における -Amyloid protein 25-35の細胞毒性におけるGABAトランスポーター2の役割
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤敏浩、衣斐大祐、野田奨乃、小島侑也、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 アルツハイマー型認知症モデルマウスにおけるシナプス関連遺伝子発現に対するベタイン連続飲水摂取の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第65回東海支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田尚子、衣斐大祐、大谷駿人、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Neuro2A細胞における -amyloid peptide25-35の細胞毒性に対するGABAトランスポーター2の保護的役割
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島侑也、衣斐大祐、山本未來、落合葉子、平嶋一貴、角谷佳保里、近藤早梨、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害及び海馬における遺伝子発現に対するベタイン連続飲水取の影響
3. 学会等名 第64回（平成30年度）日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 落合葉子、衣斐大祐、山本未來、小島侑也、平嶋一貴、角谷佳保里、近藤早梨、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害及び海馬における組織学的変化に対するベタイン連続飲水摂取の影響
3. 学会等名 第64回（平成30年度）日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 落合葉子、衣斐大祐、大谷駿人、田中 柊、近藤早梨、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスの海馬におけるGABAトランスポーター2の発現解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本未來、衣斐大祐、小島侑也、岩城圭一郎、後藤彩加、間宮隆吉、今西 進、平松正行
2. 発表標題 ベタインを連続暴露したアルツハイマー型認知症モデルマウスの海馬におけるプロテオーム解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島侑也, 衣斐大祐, 山本未来, 落合葉子, 平嶋一貴, 角谷佳保里, 近藤早梨, 間宮隆吉, 平松正行
2. 発表標題 家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害に対するベタインとその代謝物ジメチルグリシンの連続飲水摂取による影響
3. 学会等名 第2回日本精神薬学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平嶋一貴, 衣斐大祐, 角谷佳保里, 間宮隆吉, 平松正行
2. 発表標題 家族性アルツハイマー病モデルマウスにおける学習・記憶障害とGABA transporter 2タンパク発現解析
3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角谷佳保里, 衣斐大祐, 平嶋一貴, 間宮隆吉, 平松正行
2. 発表標題 学習・記憶障害モデルマウスにおけるベタイン飲水摂取の効果
3. 学会等名 第131回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤早梨, 野村知弘, 衣斐大祐, 間宮隆吉, 平松正行
2. 発表標題 ベタイン連続飲水摂取によるamyloid-peptide (25-35) 誘発学習・記憶障害抑制作用におけるSIRT1遺伝子の関与
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平嶋一貴、衣斐大祐、角谷佳保里、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Effects of diet restriction on cognitive impairments and decreased hippocampal GAT2 expression in a genetic mouse model of Alzheimer's disease.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 角谷佳保里、衣斐大祐、平嶋一貴、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Effects of chronic betaine intake on learning and memory impairments and hippocampal GAT2 expression in genetic mouse model of Alzheimer's disease.
3. 学会等名 第60回日本神経化学会
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
研究分担者	衣斐 大祐 (Ibi Daisuke) (40757514)	名城大学・薬学部・准教授 (33919)	

	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
研究協力者	國澤 和生 (Kazuo Kunisawa)		
研究協力者	平嶋 一貴 (Hirashima Kazuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	野村 知弘 (Tomohiro Nomura)		
研究協力者	土橋 安純 (Azumi Tsutihashi)		
研究協力者	木戸 究 (Kiwamu Kido)		
研究協力者	中島 菜月 (Natsuki Nakashima)		
研究協力者	小島 侑也 (Kojima Yuya)		
研究協力者	角谷 佳保里 (Sumiya Kahori)		
研究協力者	近藤 早梨 (Sari Kondo)		
研究協力者	落合 葉子 (Yoko Ochiai)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	山本 未来 (Mirai Yamamoto)		
研究協力者	松倉 拓哉 (Takuya Matsukura)		
研究協力者	安藤 敏治 (Toshihiro Ando)		
研究協力者	吉田 尚子 (Naoko Yoshida)		
研究協力者	大谷 駿人 (Hayato Ohtani)		
研究協力者	田中 柊 (Shu Tanaka)		
研究協力者	野田 奨乃 (Shono Noda)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------