

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11108

研究課題名(和文) アミロイドの沈着に關与する脳インスリン抵抗性と概日時計の分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of circadian clock and cerebral insulin resistance involving in beta-amyloid deposition

研究代表者

丸山 弘子 (MARUYAMA, Hiroko)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：50129269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の発症に高脂肪食と摂食時間が影響するかを、ADマウスを用いて研究した。脳の糖代謝機能はFD-glucoseを用いて解析し、ADマウスでは糖取り込みが低下した。Tau蛋白質(Tau)のリン酸化増強による神経細胞変性とアポトーシスでの数的減少が一因と考えられた。摂食時間による概日リズムの変化を時計遺伝子と活動量で調べた結果、明暗反応に反応性を高めた。正常マウスではTauのリン酸化は摂食時間の変更により増強したが、高脂肪食の影響は小さい結果であった。ADマウスは高脂肪食により、Tauのリン酸化増強とアミロイドの増加が認められたが、摂食時間変更の影響は小さいことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食習慣、概日時計とアルツハイマー病(AD)発症の関連性を明らかにした。脳での糖代謝機能は、FD-glucoseを用いた糖の取り込みで調べた。ADの発症により脳での糖代謝が低下したが、Tau蛋白質(Tau)のリン酸化による神経細胞変性とアポトーシスによる細胞傷害によることが示唆された。摂食時間の変更は概日リズムの崩壊を惹起し、Tauのリン酸化を増強した。高脂肪食の摂食ではTauのリン酸化を増強し、アミロイド沈着の増強が認められた。この研究から食生活リズムと食事の質は、ADの発症に関わることを見出すことができた。これは食事時間や内容を整えることでAD予防の可能性を示し、意義のある結果である。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether high-fat diet and feeding time affect the onset of Alzheimer's disease (AD) by using AD transgenic mice. Results from examination of cerebral glucose metabolism with FD-glucose showed glucose uptake was decreased in AD mice. It is considered to be caused by increased phosphorylation of Tau protein (Tau) and in decreased number of nerve cells due to apoptosis. As a result of investigating changes in circadian rhythm due to changes in feeding time by clock gene expression and activity changes, changes in eating time increased responsiveness to light. Relationship between Tau phosphorylation induction and β -amyloid deposition in high-fat feeding was investigated. In normal mice, the effect of high-fat diet was less but Tau phosphorylation was enhanced by changing the feeding time. In AD mouse, we found that high-fat diets increased microglia and enhanced Tau phosphorylation, but the effect of feeding time was low.

研究分野：実験病理学

 キーワード：概日リズム 摂食時間変更 運動変化 時計遺伝子 BMAL-1 Tauタンパク質リン酸化 アミロイド
アルツハイマー病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

概日リズムは摂食時間、光、運動、睡眠と覚醒等の因子によって調節される。また、インスリン抵抗性(糖代謝異常)と食事リズムの変動により概日時計は変動することが報告されている¹⁾。近年ではアルツハイマー病(AD)発症は脳のインスリン抵抗性が一因とされている²⁾。しかし、AD発症にインスリン抵抗性と概日時計がどのように関わっているかのメカニズムは不明である^{3,4)}。

2. 研究の目的

本課題は、食事(高脂肪食)により誘導される糖代謝異常と概日時計の変動がAD発症に関与しているかを解明することを目的として計画した。ADの発症にはTau蛋白質(Tau)のリン酸化と老人斑の構成成分である β -アミロイドの蓄積による神経細胞死の関与が示唆されている。また、遺伝子要因として、アミロイド前駆体蛋白質(APP)、プレセニン1(PS1)遺伝子の異常が知られている。本研究では、APP/PS1遺伝子導入ADモデルマウスを作出し、食習慣、概日時計とアルツハイマー病(AD)発症の3因子の関連性を明らかにすることを目的として研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と計画: B6SJL-Tg6799 (The Jackson Lab. PA, USA) をマウスを用い、APP/PS1遺伝子導入雌マウスADマウスとして作出した。同遺伝子陰性のマウスを正常対照群として実験に用いた。生後5週齢で正常マウスとADマウスに分けて、さらに標準食(N: AIN-93G)と高脂肪食(HFD: AIN-93Gに60%脂肪添加)を与え、飼育条件は明期8:00~20:00、暗期20:00~8:00の12時間サイクルで設定した。明期開始は動物の主観的時間の開始と考えZT0と表す。マウスは2群に分け、3ヶ月間通常飼育で標準食或いは高脂肪食を与え、生後5ヶ月目から、2群に分け通常飼育群は24時間自由摂食させ、概日飼育群はZT0~12までの給餌をとした。全8群(5匹/群)をもうけ、実験は生後9ヶ月目まで行ない、期間中は体重と摂食量を計測した。

(2) 摂食時間の変更による活動量の変化: 摂食時間の変更により概日リズムが変化することをWestern blot法を用いて時計遺伝子(BMAL-1)の発現で確認した。概日時計の変化による活動の変化については、給餌時間変更から3ヶ月後にUSB地震計(GID-SSS/U10x, 数理設計研究所, 太田)を改良した震度計を用いて3軸加速度を測定し24時間の継時的に活動量として計測を行った。

(3) 糖代謝機能: 実験終了時にグルコース(2g/kg体重)を投与してFAD-GDH酵素電極法(グルテストNeoアルファGT-1830, 三和科学研究所, 名古屋)を使用し耐糖能試験を行いインスリン抵抗性について解析した。また、アルツハイマー病(AD)に特徴的な脳内の糖代謝低下に基づく画像診断法としてFDG-PETが汎用されていることから、 $[^{18}\text{F}]$ FD-glucose (FUJIFILM 富士化学, 東京)を用いた*ex vivo*イメージング(バイオラジオグラフィ)法を行った。脳組織生スライス(300 μm)を用い、代謝賦活時(50mMカリウム濃度 Krebs-Ringer液)と静穏時(5mMカリウム濃度)でのFDG取り込みをラジオルミノグラフィ装置(BAS-1800, FUJIFILM Co., 東京)で測定し、取り込み率は単位時間当たりの輝尽発光増加率(PSL/ mm^2/min)とした。

(4) Western blot法(時計遺伝子とTau S404リン酸化): 肝臓、大脳皮質部分をホモジナイズし、タンパク質濃度を測定した。各5 $\mu\text{g}/\text{well}$ のタンパク質量を4-20%ポリアクリルアミドゲル(BIO-RAD)にアプライした。SDS-PAGEにより分離後PVDF膜に転写し、PVDFブロッキング液で

ロッキングした。TBS-Tで洗浄後、希釈した1次抗体 BMAL1 Antibody (Novus Biologicals, CO.USA) 或いは Tau S404 Antibody (abcam Inc., KY, USA) を反応させた。TBS-Tで洗浄し、2次抗体として Peroxidase AffiniPure Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Lab. Inc., PA, USA) を暗所、室温の条件下で反応させた。イメージングシステム (LI-COR, Inc., NE, USA) を用いて可視化し、定量した。過酸化水素と TBS-T の混合溶液により HRP の不活性化を行い、2次抗体を β -Actin(13E5) Rabbit mAb(HRP Conjugate, Cell signaling Tech. Inc., MA, USA) を用いて定量を行った。

(5) 免疫組織化学染色法 (Tau リン酸化陽性細胞、アミロイド染色、ミクログリア細胞染色) : 脳組織は 4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定後、パラフィン包埋して、厚さ 2 μ m の薄切切片を作成して染色を行った。オートクレーブ (121 $^{\circ}$ C、2 気圧、15 分間) で抗原賦活化後、0.3%過酸化水素による内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。その後、正常ヤギ血清で室温、30 分間ブロッキング後、1次抗体 (リン酸化 Tau : Rb mAb to Tau S404) (abcam) あるいは Amyloid42 Rabbit Polyclonal Antibody (SIG-39131, SIGNET Lab. Inc., MA, USA) を 4 μ g/ml、一晩反応させた。その後、シンプルステインマウス MAX-P0(R) を滴下し、室温にて 30 分間反応させ、発色は DAB を用いて行った。大脳皮質部分の 5 カ所の領域を光学顕微鏡 (FSX100 (OLYMPUS, 東京)) で撮影して Tau リン酸化陽性細胞数の算定と Image J にてアミロイドの面積を解析した。

4. 研究成果

実験期間中の摂食量は通常飼育と概日飼育、標準食と高脂肪食では差は認められなかった。また、食事を取ると腸管で分泌されるグルカゴン様ペプチド 1 (GLP-1) が分泌されるので分泌量を比較した結果、各群で差は認められなかったことから、腸管の働きに差はないのではないかと考えられた。時計遺伝子の変化は BMAL-1 遺伝子発現を指標として調べた結果、概日飼育と通常飼育では BMAL-1 遺伝子の発現量に差が見られた。これは概日リズムの変化を示しているのではないかと考えられた。動物の行動については正常マウスと AD マウスでの差と概日飼育と高脂肪食の影響について解析した。まず、正常マウスと AD マウスでは同様の行動パターンを示した。高脂肪食群でも同様の傾向を示すことがわかった。概日飼育の影響については、通常飼育では行動に周期的な動きが認められ、ZT0~12 が静寂状態で ZT12~24 で活動的になったが、概日飼育マウスでは明暗切り替え時 ZT10~12 と ZT22~0 で 2 層性に活動が高まることが分かった。

実験終了前の耐糖試験でインスリン抵抗性について曲線下面積で解析した結果は、正常マウスでは通常食群に比べ高脂肪食群で有意に高いことがわかった。AD マウスにおいては高脂肪食群で曲線下面積の増加が認められた。概日飼育群では正常マウスと AD マウスにおいては高脂肪食群で曲線下面積の増加傾向が認められた (Fig.1)。インスリン分泌量については正常マウスの通常飼育では標準食に比べ高脂肪食群で分泌量が有意に増加したが、概日飼育では標準

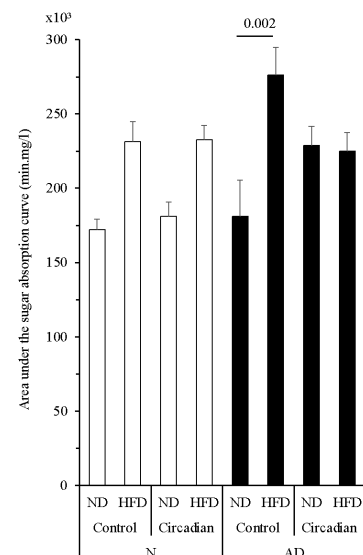


Fig. 1 One-way ANOVA Tukey's test

食と高脂肪食群に差が認められなかった。AD マウスでは通常飼育と概日飼育、標準食と高脂肪食群で差は認められなかった。

正常マウスと AD マウス共に高脂肪食による糖の取り込み低下が認められたことから、脳での糖代謝を確認するために、2-¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)の脳への取り込みについて正常マウスと AD マウスで調べたところ、AD マウス

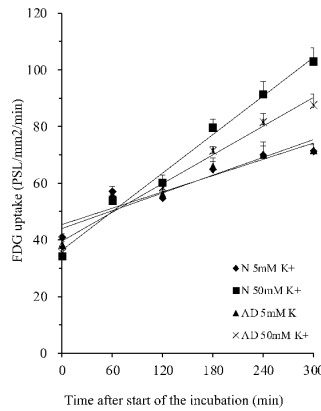
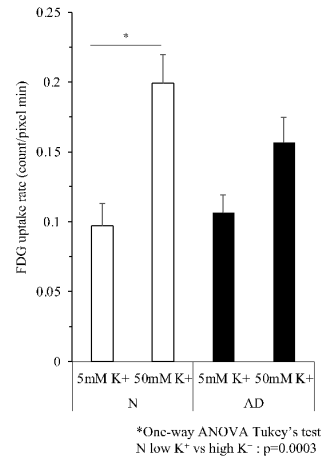


Fig. 2



*One-way ANOVA Tukey's test N low K⁺ vs high K⁺: p=0.0003

の脳で FDG の取り込みが低下している結果が得られた (Fig.2)。概日飼育と高脂肪食の影響については明確にできなかった。正常マウスより AD マウスでアポトーシス誘導細胞が増加していたことから、脳での糖取り込みが減少したと考えられる。

Tau のリン酸化(Ser404)について Western blot 法と免疫組織法にて解析した。Western blot 法の解析では AD マウスでは正常マウスに比べ Tau のリン酸化は増強し、さらにリン酸化陽性細胞数も増加が認められた。概日飼育により正常マウスでは Tau のリン酸化の増強が認められたが、AD マウスでは概日飼育の影響は認められなかった。AD マウスの通常飼育で高脂肪食により Tau のリン酸化が増強して、Tau のリン酸化陽性細胞数の増加も認められた (Fig.3)。AD マウスにおける アミロイドの沈着の個数は概日飼育と HFD 群で増加傾向が認められた。通常飼育と概日飼育共に高脂肪食では標準食に比べ アミロイドの沈着面積値が高いことが分かった (Fig.4)。

以上、今回の研究で明らかになったことは、正常マウスは概日飼育と高脂肪食の影響を受けやすく、Tau タンパク質のリン酸化が増強することが分かった。AD マウスでは概日飼育と高脂肪食の影響は正常マウスより小さいことが分かった。AD マウスのアミロイド沈着の個数は概日飼育と高脂肪食で増加傾向が認められた。また、面積では通常飼育と概日飼育との差が認められなかったが、高脂肪食で増加が認められた。

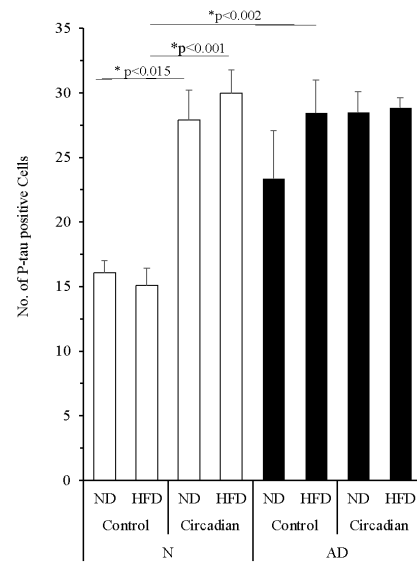


Fig.3

*One-way ANOVA Tukey's test

< 引用文献 >

1. Musiek ES, Holtzman DM. Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration Science 2016.354(6315), 1004-100. DOI: 10.1126/science. Aah 4968
2. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, Wijesekara N, Martins RN, Fraser PE, Newsholme P. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. Mediators Inflamm. 2015; 2015: 105828. Doi:10.1155/2015/105828.

3. Wijesekara N, Ahrens R, Sabale M, Wu L, Ha K, Verdile G, Fraser PE. Amyloid- β and islet amyloid pathologies link Alzheimer's disease and type 2 diabetes in a transgenic model. *FASEB J* 2017 31(12): 5409-5418. Doi: 10.1096/fj.201700431R.
4. Blancas-Velazquez A, la Fleur SE, Mendoza J. Effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on brain PER2 and BMAL1 protein expression in mice *Appetite* 2017. 117, 263-269. doi:10.1016/j.appet. 2017.07.002.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五味未早希、川上文貴、ティティルイン、高橋博之、丸山弘子
2. 発表標題 摂食時間の変更が脳内の炎症に及ぼす影響
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五味未早希、丸山弘子、佐々木徹
2. 発表標題 FDG-バイオラジオグラフィを用いたアルツハイマーモデルマウス脳における糖代謝の解析
3. 学会等名 第58回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五味未早希、丸山弘子
2. 発表標題 概日リズムの変化が時計遺伝子転写因子BMAL1の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第20回日本抗加齢学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五味未早希、伊藤英美佳、井上任平、大屋瑞穂、寺尾沙季、鴫田智里、丸山弘子
2. 発表標題 食事時間の変化と高脂肪食が運動時間や時計遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野拓、五味未早希、今井基貴、西川裕美、宮内麻織、丸山弘子
2. 発表標題 ワカメ添加高脂肪食がTau蛋白質のリン酸化および アミロイドの蓄積に及ぼす影響
3. 学会等名 第18日本応用藻類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山弘子、平野拓、今井基貴
2. 発表標題 ワカメ添加高脂肪摂食マウスのTau蛋白質のリン酸化に及ぼす分子病態的解析
3. 学会等名 第40日本肥満学会
4. 発表年 2019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	佐々木 徹 (Sasaki Toru) (30158927)	北里大学・医療衛生学部・准教授 (32607)	
研究 分担者	川上 文貴 (Kawakami Fumitaka) (50511896)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	

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
---------	---------