

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04037

研究課題名（和文）脳萎縮抑制を介した抗老化／神経変性疾患治療の新たな試み：クレアチン誘導体を用いて

研究課題名（英文）A New Approach for Anti-Aging/Neurodegenerative Disease Therapy via Inhibition of Brain Atrophy: Using Creatine Derivatives

研究代表者

黒澤 裕子（Kurosawa, Yuko）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90623108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：クレアチントランスポーター（CRT）遺伝子ノックアウトマウスを対象に、3週間のサイクロクレアチン経口投与を行い、認知機能、運動機能に及ぼす影響を評価した。その結果、標的としたサイクロクレアチン量の投与はほぼ達成したものの、視覚認知機能に対する明らかな投与効果は認められなかった。その原因として考えられることは、投与期間が十分でなかった可能性である。本研究で設定した3週間では、投与期間が短く、マウス間で反応性にバラつきがみられたのではと考えられる。今後、投与期間を延長すると同時に、各群のサンプル数を増やして、サイクロクレアチンの投与効果をさらに検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口の高齢化に伴い患者が増加し続けているパーキンソン病、ハンチントン病等の致死性神経変性疾患は、アポトーシスによる神経脱落により発症することがわかっているものの、効果的な治療法は未だ確立されていない。そこで、今回、脳細胞内に移行しやすく、かつ生体で高い反応性を有するサイクロクレアチンを標的物質とし、その有効性を検証する動物実験を行った。しかしながら、視覚認知機能に対する投与効果を認めることはできなかった。今後、対象動物モデルや投与方法などを改善し、ヒト患者の治療法確立につながるデータ採取を目指す。

研究成果の概要（英文）：Cyclocreatine was orally administered to creatine transporter (CRT) gene knockout mice for 3 weeks and the effects on cognitive and motor functions were evaluated. The results showed that although the targeted dose of cyclocreatine was almost achieved, there was no clear effect of the administration on visual cognitive function. One possible reason for this is that the duration of administration may not have been sufficient. The 3-week treatment period set in this study was too short, which may have resulted in a variation in responsiveness among the mice. In the future, it is necessary to extend the administration period and increase the samples size in each group to further examine the effects of cyclocreatine administration.

研究分野：予防医学

キーワード：Cyclocreatine mouse

1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめ先進諸国では、高齢者人口の増加に伴う健康問題は深刻化している。老化制御機構の全容は未だ解明されていないものの、老化組織では、分子・細胞レベルでの機能低下と同時にアポトーシスによる萎縮が起こっている事実から、逆説的に、細胞の機能低下の抑制と、アポトーシス抑制を介した正常組織の萎縮抑制が実現できれば、老化はある程度まで予防可能といえる。さらに、高齢化に伴い患者が増加し続けているパーキンソン病、ハンチントン病等の致死性神経変性疾患もまた、アポトーシスによる神経脱落により発症することがわかっている。

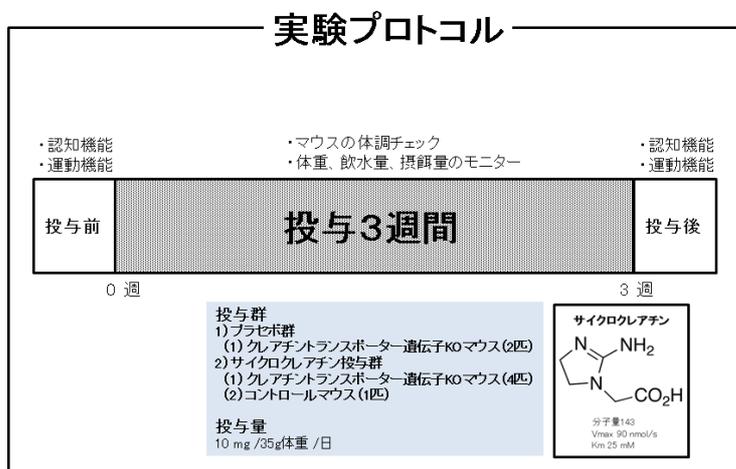
クレアチンから合成されるリン酸化クレアチンは、生体での全活動の直接的エネルギー源であるアデノシン三リン酸(ATP)の即時的供給源である。中枢神経系に高濃度に存在するクレアチンは、膜電位の維持やシグナル伝達など、正常な脳機能発揮に必須のエネルギー供給源であると同時に、ミトコンドリア膜透過性遷移孔の開口抑制を介した抗アポトーシス作用を有することが明らかになっている。実際、パーキンソン病やハンチントン病のモデル動物にクレアチンを経口投与すると、神経脱落のほぼ完全な阻止とともに、生存率向上に成功している。しかしながら、ヒト患者を対象とした治験では、モデル動物のような明らかな効果は得られていない。

一方、クレアチン誘導体的一种であるサイクロクレアチンは、機序は不明ながら、クレアチンより脳細胞内に移行しやすく、かつ生体で高い反応性を有することから、脳萎縮の進行を抑制できる可能性が高い。アポトーシスによる神経死滅が主因であり、かつクレアチントランスポーター非発現部位であるカテコラミン作動性神経等が発症の標的部位となっている神経変性疾患に対し、抗アポトーシス効果が期待できるサイクロクレアチンの投与は、治療につながる可能性がある。さらに、現在詳細が明らかになっていないヒト高齢者の、加齢に伴う脳萎縮とクレアチン濃度変化、および認知機能との関係を明らかにすることは、ヒト老化に伴う脳機能低下の抑制法確立のための基礎的データとなりうる。しかしながら、本申請研究期間は、新型コロナウイルス感染症の猛威と時を同じくしており、ヒトを対象としたデータ採取は難しい状況にあった。そこで、本研究では、まずは、クレアチントランスポーター遺伝子変異マウスを対象にサイクロクレアチン経口投与を3週間実施し、クレアチントランスポーター遺伝子発現が著しく低下したマウスの認知機能や運動機能に及ぼすサイクロクレアチン投与効果を検証することで、クレアチントランスポーター非発現部位であるカテコラミン作動性神経等が発症の標的部位となっている神経変性疾患動物へのサイクロクレアチン応用の可能性を予測しうるデータ採取を行った。

2. 研究の目的

クレアチントランスポーターを介さずに脳細胞内に取り込まれ、ATP産生能を有するクレアチン誘導体“サイクロクレアチン”の経口投与により、クレアチン欠損マウスの認知機能は改善するのか、また運動機能には影響を及ぼすのか、検証すること。

3. 研究の方法



実験プロトコルは左記のとおり。

モデル動物導入

細胞内クレアチン濃度が著しい低値を示す、クレアチントランスポーター (slc6a8, CRT) ノックアウトマウスを対象とした。

サイクロクレアチン投与

先行研究において、ヒト脳機能改善およびマウス脳萎縮抑制・脳機能改善効果を認めている投与量である、10 mg/35 g 体重/日のサイクロクレアチン

(Sigma-Aldrich)およびプラセボ(マルトデキストリン, 松谷工業株)を飲水経路でマウスに経口投与し、認知機能および運動機能に及ぼす投与効果を評価した。

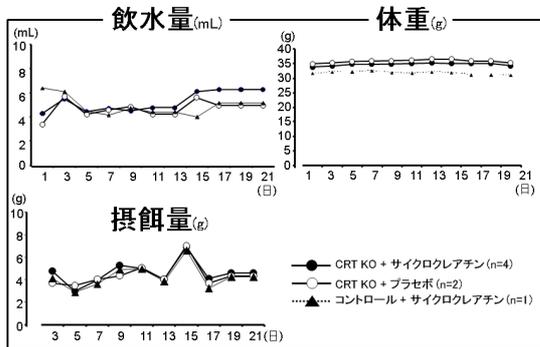
新奇物質探索試験（認知機能）

新奇性を好むマウスの習性を利用した視覚認知記憶の評価テストである“新奇物質探索試験”を行った。まず初めに、オープンフィールド装置（60cm×50cm×高さ21cm）内に、1日5分ずつ連続3日間マウスを放し、装置に馴化させた。4日目、2つの同一物体（50ml フアルコンチューブ、高さ11cm、直径3.5cm）を壁から12cm離れた場所に、左右対称になるように置いた。その後、マウスを両物体から等距離の壁際に放し、装置内でのマウスの自由行動を5分間観察した。1時間後および3時間後に2回目の5分間トライアルを行い、同時に、2つの見慣れた物体のうち、一方を新しい物体（バインダークリップ）に置き換えた。物体の周囲には探索ゾーン（直径10cm）を設定し、ゾーン内での滞在時間を物体探索の指標とした。識別指標は、新しい物体と見慣れた物体の探索時間の差を両ゾーンに滞在した総時間で割ることで算出した（新しい物体の探索時間が長いほど、記憶力が良いと評価した）。

ビームテスト（運動機能）

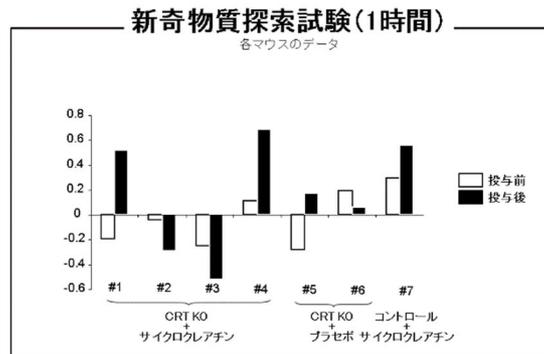
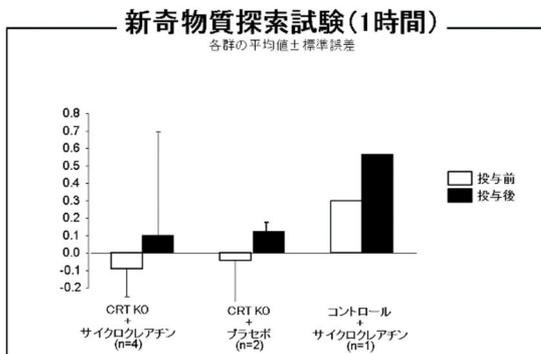
ビームテストは、複雑な運動協調性のテストである。投与3週間の前後7日間、ビーム（長さ1m、直径9mmの木製梁）の上を歩いてプラットフォーム（面積14cm²）まで歩行できるよう、マウスを訓練した。8日目、マウスをプラットフォームから50cm離れたビーム上にそっと置き、プラットフォームに到達するまでの時間を測定し、評価指標とした（到達時間が短ければ短いほど、運動協調能力が高いと判定した）。

4. 研究成果

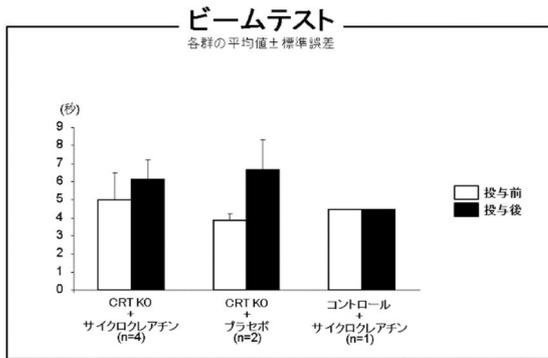
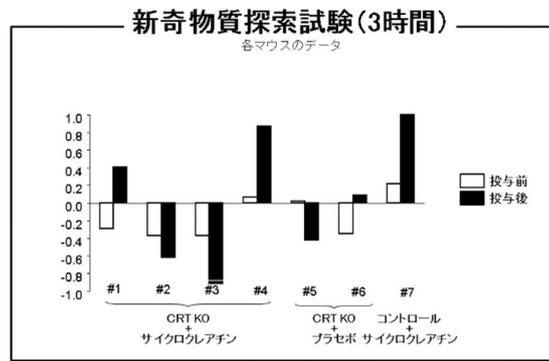
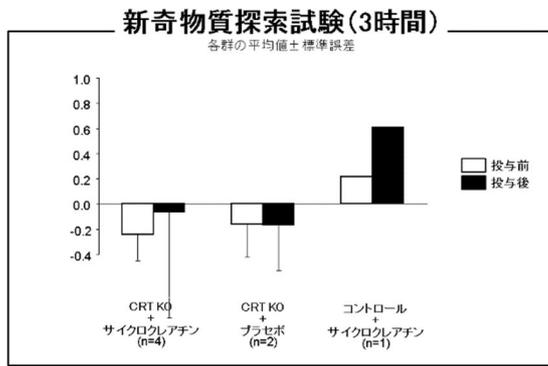


3週間の投与期間中、サイクロクレアチンおよびプラセボを溶解した水の飲水量を2日毎にモニターした。その結果、1日当たり4~7 mLと飲水量は正常範囲内にあり、また3群間に大きな差は認められなかった。同時に、標的とした投与量の摂取は、投与期間中ほぼ達成されていた。投与期間中の摂餌量も、3群間に差はみられなかった。体重は、1匹のみのコントロールマウスは、3週間の投与期間を通して30g前後、CRT ノックアウトマウスは、35g前後であった。

新奇性を好むマウスの習性を利用した“視覚認知記憶”の評価ツールである新奇物質探索試験を用いて、1時間後のマウスの認知記憶を評価した。その結果、投与前では、コントロールマウスに比べ、CRT ノックアウトマウスでは、記憶力が低い傾向がみられた。また、3週間投与後の、サイクロクレアチン投与へのCRT ノックアウトマウスの反応性は、個体差が大きかった。



同じく新奇物質探索試験を用いて、3時間後のマウスの認知記憶を評価した。その結果、1時間後の記憶と同様の傾向を示し、投与前では、コントロールマウスと比較し、CRT ノックアウトマウスでは、記憶力は低値傾向にあり、また投与3週間後では、コントロールマウスとCRT ノックアウトマウスの記憶力の差は、より拡大する傾向を示した。また、サイクロクレアチン投与への反応性は、1時間後の認知記憶と同様、CRT ノックアウトマウスの個体差が大きかった。



運動機能の一種である協調運動・平衡感覚の評価ツールであるビームテストを、投与3週間前後に実施した。その結果、コントロールマウスとCRT ノックアウトマウスの間には、特に大きな差は見られなかった。また、3週間の投与による大きな変化も認められなかった。

【結果まとめ】

- 1) 飲水量：3週間の投与期間中2日に1回モニターした飲水量は、1日当たり4~7 mLであり、3群間に大きな差は認められなかった。また、標的とした投与量の摂取は、投与期間中ほぼ達成されていた。
- 2) 摂餌量：3群間に差はなかった。
- 3) 体重：コントロールマウス (N=1) は3週間の投与期間を通して30g前後、CRT ノックアウトマウスは35g前後であった。
- 4) 視覚認知記憶：投与前後ともに、コントロールマウスに比べ、CRT ノックアウトマウスでは、記憶力の低値傾向がみられた。また、CRT ノックアウトマウスは、サイクロクレアチン投与に対する反応性に個体差が認められた。
- 5) 協調運動・バランス機能：コントロールマウスとCRT ノックアウトマウスの間には、特に差は見られず、3週間の投与による変化も認められなかった。

【結論】

3週間の投与期間中、標的としたサイクロクレアチン量の投与はほぼ達成した。しかしながら、視覚認知機能への投与効果は、CRT ノックアウトマウスでは個体差が大きく、平均値を群間で比較した場合、コントロールマウスと比べ、CRT ノックアウトマウスは低値傾向を示した。

本研究において、サイクロクレアチンの投与効果が明らかに認められなかった原因として考えられることは、投与期間が十分でなかった可能性である。本研究で設定した3週間では、投与効果が十分に得られる期間に達していなかったため、サイクロクレアチン投与の反応性にマウス間でバラつきがみられたのではと考えられる。今後、効果が十分に得られる可能性の高い投与期間に延長すると同時に、各群のサンプル数を増やし、更なる検討を実施することで、サイクロクレアチンの投与効果を精度および正度高く検証できると考えられる。

【参考文献】

1. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1107–1213.
2. Boehm EA, Radda GK, Tomlin H, Clark JF. The utilisation of creatine and its analogues by cytosolic and mitochondrial creatine kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1274(3):119–128.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kinoshita Misato, Kurosawa Yuko, Fuse Sayuri, Tanaka Riki, Tano Nobuko, Kobayashi Ryota, Kime Ryotaro, Hamaoka Takafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Compression Stockings Suppressed Reduced Muscle Blood Volume and Oxygenation Levels Induced by Persistent Sitting	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 1800 ~ 1800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9091800	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 Kuroiwa Miyuki, Fuse Sayuri, Amagasa Shiho, Kime Ryotaro, Endo Tasuki, Kurosawa Yuko, Hamaoka Takafumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship of Total Hemoglobin in Subcutaneous Adipose Tissue with Whole-Body and Visceral Adiposity in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 2442 ~ 2442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9122442	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 Nirengi Shinsuke, Fuse Sayuri, Amagasa Shiho, Homma Toshiyuki, Kime Ryotaro, Kuroiwa Miyuki, Endo Tasuki, Sakane Naoki, Matsushita Mami, Saito Masayuki, Kurosawa Yuko, Hamaoka Takafumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Applicability of Supraclavicular Oxygenated and Total Hemoglobin Evaluated by Near-Infrared Time-Resolved Spectroscopy as Indicators of Brown Adipose Tissue Density in Humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2214 ~ 2214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20092214	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 Goto Masahiro, Maeda Chikako, Hirayama Tomoko, Terada Shigeru, Nirengi Shinsuke, Kurosawa Yuko, Nagano Akinori, Hamaoka Takafumi	4. 巻 33
2. 論文標題 Partial Range of Motion Exercise Is Effective for Facilitating Muscle Hypertrophy and Function Through Sustained Intramuscular Hypoxia in Young Trained Men	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Strength and Conditioning Research	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1519/JSC.0000000000002051	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 Kasai Nobukazu, Mizuno Sahiro, Ishimoto Sayuri, Sakamoto Etsuko, Maruta Misato, Kurihara Toshiyuki, Kurosawa Yuko, Goto Kazushige	4. 巻 33
2. 論文標題 Impact of Six Consecutive Days of Sprint Training in Hypoxia on Performance in Competitive Sprint Runners	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Strength and Conditioning Research	6. 最初と最後の頁 36 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1519/JSC.0000000000001954	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 Fuse Sayuri, Sugimoto Masahiro, Kurosawa Yuko, Kuroiwa Miyuki, Aita Yasuko, Tomita Atsumi, Yamaguchi Eri, Tanaka Riki, Endo Tasuki, Kime Ryotaro, Hamaoka Takafumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Relationships between plasma lipidomic profiles and brown adipose tissue density in humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Obesity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41366-020-0558-y	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 黒澤裕子、黒岩美幸、永田幹子、木目綾佳、布施沙由理、木目良太郎、浜岡隆文	4. 巻 47
2. 論文標題 ナットウキナーゼの単回経口摂取は健常成人のNK細胞活性を上昇させる	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬理と治療	6. 最初と最後の頁 1463-1469
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 Endo T, Kime R, Watanabe T, Fuse S, Murase N, Kurosawa Y, Hamaoka T	4. 巻 1232
2. 論文標題 Reduced Optical Path Length in the Vastus Lateralis During Ramp Cycling Exercise	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 239-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-34461-0_30	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 Riki Tanaka, Sayuri Fuse, Miyuki Kuroiwa, Shiho Amagasa, Tasuki Endo, Akira Ando, Ryotaro Kime, Yuko Kurosawa and Takafumi Hamaoka	4. 巻 17
2. 論文標題 Vigorous-Intensity Physical Activities are Associated with High Brown Adipose Tissue Density in Humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 2796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph17082796	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 Sayuri Fuse, Tasuki Endo, Riki Tanaka, Miyuki Kuroiwa, Akira Ando, Ayami Kume, Akiko Yamamoto, Kanna Kuribayashi, Shinji Somekawa, Masamichi Takeshita, Masaki Hashimoto, Ryotaro Kime, Yuko Kurosawa and Takafumi Hamaoka	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of Capsinoid Intake on Brown Adipose Tissue Vascular Density and Resting Energy Expenditure in Healthy, Middle Aged Adults: A Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092676	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 Tsubasa Watanabe, Norio Murase, Ryotaro Kime, Yuko Kurosawa, Sayuri Fuse and Takafumi Hamaoka	4. 巻 1269
2. 論文標題 Effects of Exercise Training on Cardiac and Skeletal Muscle Functions in Patients with Chronic Heart Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 101-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-48238-1_16	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 Tasuki Endo, Ryotaro Kime, Sayuri Fuse, Norio Murase, Yuko Kurosawa and Takafumi Hamaoka	4. 巻 1269
2. 論文標題 Reduced Scattering Coefficient During Incremental Exercise is Constant Without Being Affected by Changes in Muscle Oxygenation or Hemodynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 107-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-48238-1_17	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 Endo T, Kime R, Fuse S, Murase N, Kurosawa Y, Hamaoka T	4. 巻 53
2. 論文標題 Changes in Optical Path Length Reveal Significant Potential Errors of Muscle Oxygenation Evaluation during Exercise in Humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med Sci Sports Exerc	6. 最初と最後の頁 853-859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1249/MSS.0000000000002530	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 Kuroiwa M, Hamaoka-Fuse S, Sugimoto M, Kurosawa Y, Aita Y, Tomita A, Anjo M, Tanaka R, Endo T, Kime R, Hamaoka T	4. 巻 27
2. 論文標題 Correlation of Plasma Amino Acid and Anthropometric Profiles with Brown Adipose Tissue Density in Humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 2339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10112339.	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 Miyuki Kuroiwa, Sayuri Hamaoka-Fuse, Shiho Amagasa, Ryotaro Kime, Tasuki Endo, Riki Tanaka, Yuko Kurosawa, Takafumi Hamaoka	4. 巻 8
2. 論文標題 Impact of brown adipose tissue vascular density on body adiposity in healthy Japanese infants and children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Obes Sci Pract	6. 最初と最後の頁 190-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osp4.559	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 Yuko Kurosawa, Shinsuke Nirengi, Izumi Tabata, Tadao Isaka, Joseph F. Clark, and Takafumi Hamaoka	4. 巻 54
2. 論文標題 Effects of Prolonged Sitting With or Without Elastic Garments on Limb Volume, Arterial Blood Flow, and Muscle Oxygenation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Med Sci Sports Exerc	6. 最初と最後の頁 399-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1249/MSS.0000000000002822	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 該当する

1. 著者名 Tanaka R, Fuse-Hamaoka S, Kuroiwa M, Kurosawa Y, Endo T, Kime R, Yoneshiro T, Hamaoka T	4. 巻 19
2. 論文標題 The Effects of 10-Week Strength Training in the Winter on Brown-like Adipose Tissue Vascular Density	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 10375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph191610375	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0件

〔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	浜岡 隆文 (Hamaoka Takafumi) (70266518)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	大黒 多希子 (Daikoku Takiko) (30767249)	金沢大学・疾患モデル総合研究センター・教授 (13301)	
研究分担者	涌井 佐和子 (Wakui Sawako) (00360959)	順天堂大学・スポーツ健康科学部・先任准教授 (32620)	
研究分担者	篠原 広志 (Shinohara Hiroshi) (10455793)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	石 龍徳 (Seki Tatsunori) (20175417)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	削除：2021年9月8日

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