

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07076

研究課題名（和文）グリシンベタインのGAT2を介する認知症予防効果の検証

研究課題名（英文）Verification of GAT2-mediated dementia preventing effects of 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー型認知症（AD）では、脳内の神経細胞が長期間かけて変性し、認知機能が障害される。最大のリスクファクターは加齢と言われているが、加齢の原因である酸化ストレス、神経炎症の予防が重要と考えられる。我々はADモデル動物で認められる認知機能障害および海馬におけるGABAトランスポーター2（GAT2）の発現増加がベタインにより抑制されることを明らかとした。GAT2は、酸化ストレスなどを抑制するために発現が増加し、ベタインは、このトランスポーターを介して、認知機能障害の発症を抑制している可能性を示唆した。

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）患者の脳内では、アミロイド タンパク質（A β ）の蓄積やタウタンパク質の異常なリン酸化が起こり、長期間かけて脳内の神経細胞が変性し、認知機能が障害される。超高齢社会において、AD患者が増加し、その予防薬や治療薬の開発は喫緊の課題である。今回、天然成分であり、ホモシスチン尿症の治療薬としても使われているベタインに、AD患者の認知機能障害の予防効果がある可能性が示されたこと、また、その作用機序の一端が明らかになったことは、高齢者のQOLの向上に繋がり、またA β の蓄積を抑制する抗体薬品とは異なり、安価で予防効果が出る可能性もあり、医療経済的にも大きなインパクトがある。

研究成果の概要（英文）：In Alzheimer's disease (AD), nerve cells in the brain degenerate over a long period, leading to impaired cognitive function. The most significant risk factor is aging, but prevention of oxidative stress and neuroinflammation, which are causes of aging, is considered necessary. We found that betaine suppressed the cognitive dysfunction observed in AD model animals and increased GABA transporter 2 (GAT2) expression in the hippocampus. Expression of GAT2 increases to suppress oxidative stress, suggesting that betaine may suppress the onset of cognitive dysfunction via this transporter.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ベタイン GABAトランスポーター2（GAT2） アルツハイマー型認知症 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

人口の高齢化が進む日本国内の認知症患者数は、厚労省の認知症将来推計によると、2025年には700万人を超えると考えられており、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タンパク質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。そのため、認知症と診断される前から、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)。また、ベタインは浸透圧調整作用を有し、その作用には、細胞内へのベタイン移行に関わるベタイン-GABAトランスポーター2(GAT2)が関与していることも報告されている(Ibi et al., *Eur J Pharmacol*, 2019; Bhatt et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2023)。また、我々は、培養細胞を用いた研究において、 $A\beta$ (25-35)または、酸化ストレスを引き起こす過酸化水素水をマウス神経芽細胞腫Neuro2A細胞に処置すると細胞生存率が低下するが、ベタインを前処置しておくこと、これら細胞生存率の低下が抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、ベタインのトランスポーターとして知られているGAT2の発現とベタインの取り込み量の関係をより効率よく調べるため、GAT2過剰発現Neuro2A安定細胞株に蛍光標識されたベタイン(FAM-ベタイン)を処置し、GAT2の病態生理学的な機能を明らかにする。また、糖鎖修飾の1つであるグリコシル化は、翻訳後修飾の一種であり、細胞外マトリックスでの細胞接着や細胞内のタンパク質-リガンド相互作用など、重要な生物学的役割を果たしている。アルツハイマー病の病態にタンパク質のN-グリコシル化が様々な形で関与していることが示唆されていることから、GAT2の細胞保護作用におけるN-グリコシル化の関与を検討した。

3. 研究の方法

マウス神経芽細胞腫由来のNeuro2A細胞に、 $A\beta$ の活性フラグメントである $A\beta$ (25-35)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 (HA-WT GAT2) を樹立した。

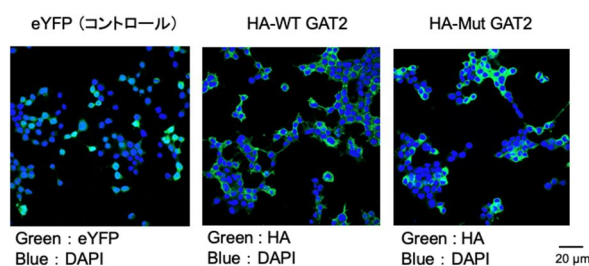
GAT2 における N-グリコシル化の部位は、GenomeNet の配列解析ツールを用いて推定し、GAT2 のアミノ酸配列の 185、197 および 609 番目のアスパラギン酸をアラニンまたはバリンに置換した変異型 GAT2 プラスミド (HA-Mut GAT2) を設計し、上記と同様に HA-Mut GAT2 過剰発現安定細胞株を用いて実験を行なった。

4. 研究成果

マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞に $A\beta(25-35)$ を処置したところ、 $A\beta(25-35)$ は細胞生存率が低下させたが、ベタインを事前処置しておくことで、 $A\beta(25-35)$ による細胞生存率の低下が抑制されることを見出し、神経保護効果を確認した。そこで、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、 $A\beta(25-35)$ 処置は、濃度依存的に GAT2 の発現を増加させた。

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 (図 1)。

図1 WT・Mut GAT2過剰発現安定細胞の作製

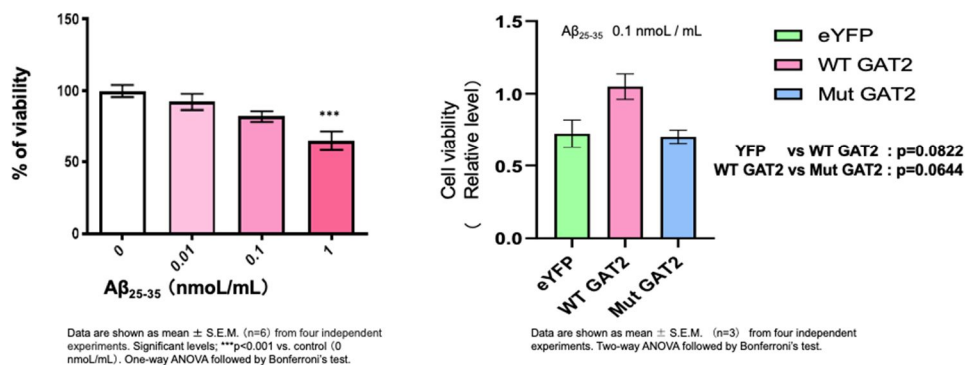


コントロール eYFP 過剰発現細胞に $A\beta(25-35)$ を処置すると、以前の結果と同様に細胞生存率が低下したが、GAT2 過剰発現安定細胞株 (HA-WT GAT2) に $A\beta(25-35)$ を処置すると細胞生存率の低下が抑制された (図 2)。このことは、GAT2 が神経保護的な役割を担っていることを示唆しており、 $A\beta(25-35)$ により誘導される GAT2 が、細胞を酸化ストレスから保護するために起こる生体恒常性維持のために発現が上昇していると考えられる。

次に、糖鎖修飾の 1 つであるグリコシル化が、アルツハイマー病の病態に関連していることが示唆されていることから、GAT2 の細胞保護作用における N-グリコシル化の関与について検討した。GAT2 発現細胞 (HA-WT GAT2) では、 $A\beta(25-35)$ (0.1 nmoL/mL) により低下する細胞生存率が抑制され、また、N-グリコシル化を受けなくした GAT2 を発現させた細胞 (HA-Mut GAT2)

では、このような保護効果が認められなくなった(図2)。この結果から、糖鎖修飾を受けた GAT2 が、神経保護に重要な役割をしている可能性が示唆された。

図2 Aβ₂₅₋₃₅処置に対する細胞生存率



昨年度までの結果と今回の結果から、ベタインは、グリア細胞に存在すると言われている GAT2 ではなく、神経細胞に選択的に取り込まれ神経保護効果を示すこと、GAT2 は N-グリコシル化を受けたのち、細胞保護効果を示していることが示唆された。また、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ibi D, Kondo S, Ohmi A, Kojima Y, Nakasai G, Takaba R, Hiramatsu M.	4. 巻 47(8)
2. 論文標題 Preventive Effect of Betaine Against Cognitive Impairments in Amyloid Peptide-Injected Mice Through Sirtuin1 in Hippocampus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochem Res .	6. 最初と最後の頁 2333-2344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-022-03622-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 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 -

〔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 小川開智、衣斐大祐、吉田尚子、落合葉子、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 マウスにおける β -amyloid peptide 25-35 脳室内投与による認知機能障害に対するGABAトランスポーター2の役割
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木真樹、衣斐大祐、吉田尚子、島田采茄、丹羽汐里、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Neuro2A 細胞におけるGABAトランスポーター2（GAT2）の糖鎖修飾の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹羽汐里、衣斐大祐、吉田尚子、鈴木真樹、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Neuro2A 細胞におけるGABAトランスポーター2 (GAT2) の糖鎖修飾がGAT2機能に与える影響
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野可楠、衣斐大祐、吉田尚子、水野沙耶香、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 Neuro2A細胞における β -amyloid peptide 25-35誘発酸化ストレスに対するベタインの効果の検証
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 織田理紗子、衣斐大祐、角谷佳保里、近藤早梨、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へのベタイン連続飲水が学習・記憶障害及びアミロイド形成シグナル経路に与える影響
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衣斐大祐、飯見凌、間宮隆吉、平松正行
2. 発表標題 -Amyloid peptide (25-35) 脳室内投与マウスの海馬で認められるアポトーシスに対するベタインの神経保護作用について
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (名古屋)
4. 発表年 2022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)	

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