

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500320

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療の開発：食物由来の β -アミロイド蛋白抑制物質と環境療法の探索

研究課題名(英文)Development of a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease: Exploration of amyloid-beta inhibitors derived from foods and environment enrichment therapy.

研究代表者

森 隆 (MORI, TAKASHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60239605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の臨床試験では、designer drugによる副作用・症状の悪化が問題視されている。我々は、secretaseに作用する多様な活性を持った植物/食物由来のnutraceuticalsに着目した。Tannic acid (TA)/ferulic acid (FA) の様なフェノール化合物を、脳血管アミロイド症の遺伝子改変PSAPPマウスモデルに経口投与し、認知機能とAD様の病態を評価した。TA/FAの投与は、1)行動学的障害、2)脳アミロイド症、3)脳炎症反応を抑制・遅延させた。さらに、これらの化合物が β -secretaseの蛋白発現と活性を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the clinical trials for Alzheimer's disease (AD), designer drug approaches have serious negative side effects and adverse events. Thus, we focused on a class of plant or food-derived nutraceuticals with pleiotropic activities as secretase modulators. We orally administered the phenol compounds such as tannic acid (TA) or ferulic acid (FA) to the transgenic PSAPP mouse model of cerebral amyloidosis (bearing mutant human APP and presenilin-1 transgenes), and evaluated cognitive function and AD-like pathology. Principle findings were that TA or FA could prevent or delay 1) behavioral impairment, 2) cerebral amyloidosis, and 3) neuroinflammation. Moreover, in vitro and cell-free assays showed that the compounds effectively inhibit beta-secretase protein expression and its activity. If results in these pre-clinical mouse models translate to human AD, these findings suggest that dietary supplementation with TA or FA may prevent or delay AD evolution by modulating beta-secretase activity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 蛋白 神経病理学 フェノール化合物 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、認知機能障害を呈する進行性の神経変性疾患である。近年、脳内に異常蓄積された β -アミロイド蛋白によりニューロンネットワークが損傷し、病態発症に至る仕組みが解明されつつある。その結果、アルツハイマー病の成因に基づく治療法が射程圏内に入る時代を迎え、治療に結びつく研究が社会から強く望まれている。

アミロイド前駆体蛋白 (APP) から酵素的切断で産生される β -アミロイド蛋白は、病態の発症・進行における有力な原因蛋白の一つとされ精力的な研究が行われている。治療法に向けた有力な方向性は、1) APPを切断する各酵素の阻害作用を有する物質の探索、2) 脳内から β -アミロイド蛋白を除去する研究 (免疫療法) に向けられている。我々は、脳内 β -アミロイド蛋白の産生・沈着に影響する食物要因に関する報告に着眼し、1) の研究の方向性に向けて、食物由来 (植物由来を含む) 物質の新たな有効性・安全性を探索する着想に至った。

以下に、我々の研究も含めた脳内 β -アミロイド蛋白の産生・沈着に影響する食物由来 (植物由来を含む) 物質の有効性に関する疫学調査を含めた報告を記載する。

1) 豊かな飼育環境: 遊具を置いた広い飼育環境で飼育すると β -アミロイド蛋白の脳内沈着が抑制され、同時に空間認知障害も軽減する。2) オメガ3不飽和脂肪酸 (DHA) ・カロリー制限食餌: DHAを含む食餌あるいはカロリー制限した食餌で飼育すると、 β -アミロイド蛋白の脳内沈着が抑制される。3) ポリフェノール類を含む食餌: 緑茶成分カテキンの Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が非 β -アミロイド蛋白産生系を亢進させ、 β -アミロイド蛋白産生と脳内沈着を減少させる効果があることを報告している。4) コーヒーに含まれるカフェイン、5) フルーツに含まれるルーテオリン、6) カレー色素に含まれるクルクミンが β -アミロイド蛋白産生と脳内沈着を減少させ、同時に空間認知障害も軽減することを報告している。7) フリーラジカルストレスの軽減: 脳内の持続的なフリーラジカルストレスが、アルツハイマー病の発症・進展の一因になっており、ビタミンE・C、各種抗酸化剤の摂取は罹患リスクを軽減する。8) 疫学調査: 肉より魚の食事、赤ワイン、肥満・糖尿病の予防が、アルツハイマー病の罹患リスクを軽減させる可能性が高いことが示された。脂質に関しては、魚に多く含まれるオメガ3不飽和脂肪酸 (DHA) の摂取が罹患リスクを軽減することが示されている。

2. 研究の目的

日常のライフスタイル (食事・環境など) の改善により、アルツハイマー病の発症・進展を遅らせることが可能となる報告がなされてきた。本研究課題では、この内の有望なものについてアルツハイマー病の病態モデル動物 [ヒト APP の突然変異遺伝子・プレシネリン 1 (PS1) の突然変異遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (PSAPP マウス: APP^{sw}, PSEN1dE9 マウス)] を用いた動物実験を行い、新たな有効性と安全性のエビデンスを集積することを目的として立案し、本研究課題を遂行した。具体的には、食物・植物由来のフェノール化合物の経口投与実験を実施した。さらに、有効性を明らかにしてきた食物由来フェノール化合物の内、1) A 蛋白産生系を抑制する化合物そして2) 非 A 蛋白産生系を亢進する化合物の併用投与による認知機能障害の改善・軽減効果への相乗効果の研究にも着手した。

3. 研究の方法

平成 22-25 年度、アルツハイマー病の病態モデルマウスの入手と長期飼育管理体制の構築を行った。動物実験には、アルツハイマー病の病態モデルマウス (PSAPP マウス) を使用した。脳内に β -アミロイド蛋白が過剰に産生され、加齢に従い β -アミロイド蛋白沈着 (斑) を形成すると共に学習記憶障害など行動学的異常を呈する。PSAPP マウス (雌・雄) は、The Jackson Laboratory Inc. より約 3 ヶ月齢にて購入し、その後約 9 ヶ月間飼育した。比較のために必要な各系統の wild-type littermate マウスも購入し、4 年間の研究期間内に、動物実験に供する全ての遺伝子改変マウスのコロニーを自家動物施設内に確立した。

平成 22-23 年度は、タンニン酸 (植物由来のポリフェノール) を脳アミロイド症の病態モデルマウス (PSAPP マウス) に経口投与し、認知機能障害とアルツハイマー様病態 (脳アミロイド症・グリオシス) に対する有効性を検討した。胃ゾンデを用いた経口投与は、6 ヶ月齢より開始し 6 ヶ月間行った。投与前・投与終了後の時点で行動学的障害 (過活動、物体認識能の低下、空間認知機能障害) の各テストを行った。さらに、病理組織学的・生化学的・蛋白・mRNA 解析を行った。

平成 24 年度は、フェルラ酸 (植物種子由来フェノール化合物) を PSAPP マウスに経口投与し、認知機能障害とアルツハイマー様病態 (脳アミロイド症・グリオシス) に対する有効性を検討した。胃ゾンデを用いた経口投与は、6 ヶ月齢より開始し 6 ヶ月間行っ

た。投与前・投与終了後の時点で行動学的障害（過活動、物体認識能の低下、空間認知機能障害）の各テストを行った。さらに、病理組織学的・生化学的・蛋白・mRNA 解析を行った。

平成 25 年度は、これまでに有効性を明らかにしてきた食物・植物由来フェノール化合物のコンビネーション投与による認知機能障害の改善・軽減効果への相乗効果の研究を行った。即ち、1) A β 蛋白産生系を抑制する化合物であるフェルラ酸 (β -secretase modulator) として 2) 非 A β 蛋白産生系を亢進する化合物オクチルガラート (β -secretase modulator) の各化合物を脳アミロイド症の PSAPP マウスに経口併用投与し、認知機能障害に対する相乗効果を検討した。胃ゾンデを用いた経口投与は、12 ヶ月齢より開始し 3 ヶ月間行った。投与前・投与終了後の時点で行動学的障害（過活動、物体認識能の低下、空間認知機能障害）の各テストを行った。

4. 研究成果

平成 22-25 年度の 4 年間にわたり、アルツハイマー病の病態モデルマウスの入手と長期飼育管理体制の構築を行い、研究期間内に必要十分数の PSAPP マウスのコロニーを自家動物施設内に確立して、4 年間に実施した全ての動物実験に供した。

平成 22-23 年度に実施したタンニン酸の 6 ヶ月間の経口投与実験において、タンニン酸投与により、PSAPP マウスで観察される行動学的障害（過活動、物体認識能の低下、空間認知機能障害）が有意に改善した。一方、タンニン酸投与は、正常マウス (wild-type littermate マウス) の行動機能の亢進には影響しなかった。さらに、タンニン酸を投与した PSAPP マウスは、脳実質・脳血管の β -アミロイド沈着の軽減そして oligomers を含む種々の A β レベルの減少を示した。これらの効果は、 β -C-terminal APP fragment の酵素切断の低下、soluble APP- β 産生量の減少、 β -site APP cleaving enzyme 1 の蛋白発現・酵素活性の低下、そして脳炎症反応の軽減と共に起こっていた。また、mutant human APP を過剰発現する神経細胞様細胞の培養液にタンニン酸を添加すると、A β 産生が低下した。この効果は、アミロイド産生系 APP 酵素切断の抑制 (β -secretase 抑制) に関連する効果であった。以上の結果は、タンニン酸のサプリメントとしての摂取が、 β -secretase 活性そして脳炎症反応の抑制によるアルツハイマー病の治療に有効である可能性が示された。

平成 24 年度に実施したフェルラ酸の 6 ヶ

月間の経口投与実験において、フェルラ酸投与により、PSAPP マウスで観察される過活動、物体認識障害、空間認知機能障害などの行動学的障害が有意に改善した。一方、フェルラ酸投与は、正常マウスの認知機能亢進には影響しなかった。さらに、フェルラ酸を投与した PSAPP マウスでは、脳実質・脳血管のアミロイド 蛋白沈着および脳内アミロイド 蛋白レベルの有意な減少が観察された。これらの効果は、アミロイド前駆体蛋白の段階的酵素切断への干渉 (β -C-terminal APP fragment の酵素切断の低下、soluble APP- β 産生量の減少、 β -site APP cleaving enzyme 1 の蛋白発現・酵素活性の低下)、アミロイド 蛋白周囲のグリオーシスの軽減、炎症性サイトカイン (IL-1 β ・TNF- α) の mRNA 発現の低下と関連していた。また、mutant human APP を過剰発現する神経細胞様細胞の培養液にフェルラ酸を添加すると、A β 産生が低下した。この効果は、アミロイド産生系 APP 酵素切断の抑制 (β -secretase 抑制) に関連する効果であった。以上の結果は、フェルラ酸のサプリメントとしての摂取が、アルツハイマー病の治療に有効である可能性を示唆している。

平成 25 年度に実施したフェルラ酸そしてオクチルガラートの併用投与実験において、併用投与により PSAPP マウスで観察される過活動、物体認識障害、空間認知機能障害などの行動学的障害がフェルラ酸あるいはオクチルガラート単独投与群よりも有意に改善し、相乗効果が得られた。また、単独投与群でも対照投与群と比較してこれらの行動学的障害が有意に改善し、同様の投与を行った wild-type littermate マウス群と有意差がないレベルに改善した。これら化合物の投与は、正常マウスの認知機能亢進には影響しなかった。即ち、アルツハイマー病の治療にさらに有効となり得る研究データが集積できた。有効性の相乗効果の組み合わせ実験をさらに進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Johnathon Alex Grizzell, Alexandre Iarkov, Rosalee Holmes, Takashi Mori, Valentina Echeverria. Cotinine reduces depressive-like behavior, working memory deficits, and synaptic loss associated with chronic stress in mice. *Behav Brain Res*, (in press) 2014. doi:

10.1016/j.bbr.2014.03.047. (查読有)

Ahsan Habib, Juan Deng, Huayan Hou, Qiang Zou, Brian Giunta, Yan-Jiang Wang, Demian Obregon, Darrell Sawmiller, Song Li, Takashi Mori, Jun Tan. *Mycoplasma hyorhinis* markedly degrades -amyloid peptides *in vitro* and *ex vivo*: a novel biological approach for treating Alzheimer's disease? *Am J Transl Res*, 5 (6): 634-642, 2013. (查読有)

She-Qing Zhang, Darrell Sawmiller, Song Li, Kavon Rezai-Zadeh, Huayan Hou, Shufeng Zhou, Douglas Shytle, Brian Giunta, Frank Fernandez, Takashi Mori, Jun Tan. Octyl gallate markedly promotes anti-amyloidogenic processing of APP through estrogen receptor-mediated ADAM10 activation. *PLoS ONE*, 8 (8): e71913, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0071913. (查読有)

Takashi Mori, Naoki Koyama, Marie-Victoire Guillot-Sestier, Jun Tan, Terrence Town. Ferulic acid is a nutraceutical -secretase modulator that improves behavioral impairment and Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *PLoS ONE*, 8 (2): e55774, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0055774. (查読有)

Demian Obregon, Huayan Hou, Juan Deng, Brian Giunta, Jun Tian, Donna Darlington, MD Shahaduzzaman, Yuyuan Zhu, Takashi Mori, Mark P. Mattson, Jun Tan. sAPP- modulates -secretase activity and amyloid- generation. *Nat Commun*, 3: 777, 2012. doi: 10.1038/ncomms1781. (查読有)

Takashi Mori, Kavon Rezai-Zadeh, Naoki Koyama, Gary W. Arendash, Haruyasu Yamaguchi, Nobuto Kakuda, Yuko Horikoshi-Sakuraba, Jun Tan, Terrence Town. Tannic acid is a natural -secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem*, 287

(9): 6912-6927, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.294025. (查読有)

Juan Deng, Huayan Hou, Brian Giunta, Takashi Mori, Yan-Jiang Wang, Frank Fernandez, Sascha Weggen, Wataru Araki, Demian Obregon, Jun Tan. Autoreactive-A antibodies promote APP -secretase processing. *J Neurochem*, 120 (5): 732-740, 2012. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07629.x. (查読有)

Valentina Echeverria, Ross Zeitlin, Sarah Burgess, Sagar Patel, Arghya Barman, Garima Thakur, Magorzota B. Mamcarz, Li Wang, David B. Sattelle, Daniel A Kirschner, Takashi Mori, Roger M. Leblanc, Rajeev Prabhakar, Gary W. Arendash. Cotinine reduces amyloid- aggregation and improves memory in Alzheimer's mice. *J Alzheimer's Dis*, 24 (4): 817-835, 2011. doi: 10.3233/JAD-2011-102136. (查読有)

Yuyan Zhu, Huayan Hou, Brian Giunta, Amanda Ruscin, Carmelina Gemma, Jingji Jin, Natasa Dragicevic, Patrick Bradshaw, Suhail Rasool, Charles Glabe, Paula Bickford, Takashi Mori, Demian F. Obregon, Terrence Town, Jun Tan. CD45 deficiency drives A oligomers and neuronal loss in Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*, 31 (4): 1355-1365, 2011. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3268-10.2011. (查読有)

Shijie Song, Vasyi Sava, Amanda Rowe, Kunyu Lia, Chuanhai Cao, Takashi Mori, Juan Sanchez-Ramos. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) enhances recovery in mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 487 (2): 153-157, 2011. doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.012. (查読有)

Yuyan Zhu, Demian F. Obregon, Huayan Hou, Brian Giunta, Jared Erhart, Frank Fernandez, Takashi Mori, William Nikolic, Yangbing Zhao, Dave Morgan,

Terrence Town, Jun Tan. Mutant presenilin-1 deregulated peripheral immunity exacerbates Alzheimer-like pathology. *J Cell Mol Med*, 15 (2), 327-338, 2011. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00962.x. (査読有)

Takashi Mori, Takao Asano, Terrence Town. Targeting S100B in cerebral ischemia and in Alzheimer's disease. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, Vol. 2010, Article ID 687067, 14 pages, 2010. (査読有)

Timothy D. Boyd, Steven P. Bennett, Takashi Mori, Nickolas Governatori, Melissa J. Runfeldt, Michelle Norden, Jaya Padmanabhan, Peter Neame, Inge Wefes, Juan Sanchez-Ramos, Gary W. Arendash, Huntington Potter. GM-CSF upregulated in rheumatoid arthritis reverses cognitive impairment and amyloidosis in Alzheimer mice. *J Alzheimer's Dis*, 21 (2): 507-518, 2010. doi: 10.3233/JAD-2010-091471. (査読有)

Shequing Zhang, Jon Salemi, Huayan Hou, Yuyan Zhu, Takashi Mori, Brian Giunta, Demian F. Obregon, Jun Tan. Rapamycin promotes β -amyloid production via ADAM-10 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 398 (3): 337-341, 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.017. (査読有)

[学会発表](計12件)

Darrell Sawmiller, She-Qing Zhang, Kavon Rezai-Zadeh, Huayan Hou, Jared Ehrhart, Douglas Shytle, Shufeng Zhou, Brian Giunta, Takashi Mori, Jun Tan. Octyl gallate promotes anti-amyloidogenic processing of APP through estrogen receptor-mediated ADAM10 activation. *Neuroscience* 13, November 12, 2013, (San Diego, U.S.A.).

Takashi Mori, Naoki Koyama, Tatsuya Segawa, Noriaki Kinoshita, Huayan Hou, Jun Tan, Terrence Town. Methylene blue reverses behavioral

impairment and ameliorates cerebral amyloidosis in PSAPP mice. *Neuroscience* 13, November 12, 2013, (San Diego, U.S.A.).

Demian Obregon, Huayan Hou, Juan Deng, Brian Giunta, Jun Tian, Donna Darlington, Md Shahaduzzaman, Takashi Mori, Mark P. Mattson, Jun Tan. Soluble amyloid precursor protein- modulates β -secretase activity and amyloid- generation. *Neuroscience* 13, November 9, 2013, (San Diego, U.S.A.).

Valentina Echeverria, Ross Zeitlin, Sagar Patel, Rosalynn Solomon, Cuc Hong Tran, Jonathon Alex Grizzell, Alexandre Iarkov, Takashi Mori. Posttreatment with cotinine improved working memory, reduced amyloid-plaques and decreased depressive-like behavior in the Tg6799 mice. *Neuroscience* 12, October 16, 2012, (New Orleans, U.S.A.).

Juan Deng, Huayan Hou, Brian Giunta, Takashi Mori, Yan-Jiang Wang, Frank Fernandez, Sascha Weggen, Wataru Araki, Demian Obregon, Jun Tan. Autoreactive-A antibodies promote APP β -secretase processing. *Neuroscience* 12, October 15, 2012, (New Orleans, U.S.A.).

Jonathon Alex Grizzell, Alexandre Iarkov, Rosalee Holmes, Takashi Mori, Valentina Echeverria. Cotinine prevented working memory loss in a mouse model of posttraumatic stress-induced cognitive impairment. *Neuroscience* 12, October 14, 2012, (New Orleans, U.S.A.).

Terrence Town, Marie-Victoire Guillot-Sestier, Kavon Rezai-Zadeh, Jun Tan, Takashi Mori. Naturally-occurring β -secretase inhibitors mitigate behavioral impairment, cerebral amyloidosis and neuroinflammation in Alzheimer transgenic mice. *Neuroscience* 12,

October 13, 2012, (New Orleans, U.S.A.).

Takashi Mori, Kavon Rezai-Zadeh, Naoki Koyama, Yuko Horikoshi-Sakuraba, Jun Tan, Terrence Town. The phenolic compound ferulic acid ameliorates cognitive impairment and amyloidosis in Alzheimer mice. *Neuroscience 11*, November 16, 2011, (Washington D.C., U.S.A.).

Terrence Town, Takashi Mori, Robert M. Cohen, Jun Tan, Kavon Rezai-Zadeh. Neuroinflammation as an early event and prime mover in Alzheimer's disease. (Nanosymposium) *Neuroscience 11*, November 14, 2011, (Washington D.C., U.S.A.).

Terrence Town, Takashi Mori, Robert M. Cohen, Jun Tan, Kavon Rezai-Zadeh. Neuroinflammation as an early event and prime mover in Alzheimer's pathobiology. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease*, July 18, 2011, (Paris, France).

Valentina Echeverria, Sarah Burgess, Ross Zeitlin, Arghya Barman, Garima Thakur, Hideyo Inouye, Edmundo Feris, Steven Buckingham, Daniel Kirschner, Takashi Mori, Roger Leblanc, Rajeev Prabhakar, David Sattelle, Gary W. Arendash. Cotinine: A dual action drug with multiple benefits against Alzheimer's disease. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease*, July 13, 2010, (Honolulu, U.S.A.).

Takashi Mori, Naoki Koyama, Kavon Rezai-Zadeh, Nobuto Kakuda, Haruyasu Yamaguchi, Gary W. Arendash, Jun Tan, Terrence Town. The plant-derived polyphenol tannic acid mitigates Alzheimer's disease-like pathology. *Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease*, July 13, 2010, (Honolulu, U.S.A.).

〔図書〕(計1件)

Takashi Mori, Terrence Town. A naturally-occurring -secretase modulator, tannic acid, improves behavioral impairment and mitigates Alzheimer-like pathology. *In Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*, (Martin C and Preedy V ed.), Academic Press, (London), (in press) 2014.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 隆 (TAKASHI MORI)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60239605

(2) 研究分担者

山口 晴保 (HARUYASU YAMAGUCHI)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号：00158114

(3) 連携研究者

研究者番号：