

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430055

研究課題名(和文) 果糖過剰摂取による認知症に対する影響について

研究課題名(英文) Effects of overdose of fructose on dementia

研究代表者

上野 正樹 (UENO, Masaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：30322267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織学的検討結果からは、果糖の輸送体の中でGLUT5とGLUT8が脈絡叢の上皮細胞と上皮細胞に存在する事、GLUT8が脳室周囲領域のグリアの細胞質に存在する事、高血糖状態のマウスでは糖を含む血管内物質の脳室周囲領域への移行が示唆される事が判明し、血管内の果糖が脳室周囲領域に直接移行することが示唆された。一方、短期および長期の高フルクトース環境において、培養神経細胞の生存率や活性酸素種産生量や突起伸長に対する影響を検討し、また、培養ミクログリアの生存率や活性酸素種産生量の測定を行った。その結果、長期培養下での神経細胞の生存率が軽度低下していたが、それ以外のパラメータに明らかな差はなかった。

研究成果の概要(英文)：Immunoreactivity of GLUT5 and GLUT8 was located in epithelial cells of the choroid plexus and ependymal cells. Immunoreactivity of GLUT8 was located in the cytoplasm of astrocytes and microglia. It is likely that intravascular substance including sugars was transported to periventricular areas. These findings suggest that intravascular fructose migrates to periventricular areas. Culture experiments under high concentration of fructose for short and long periods were conducted by evaluating not only survival rates, production of reactive oxygen species (ROS), and effects on the outgrowth of cultured neurons, but also survival rates and ROS production of cultured microglia. Although the survival rate of cultured neurons for a long period had decreased slightly, other parameters were significantly changed.

研究分野：神経病理学

キーワード：果糖 脈絡叢 グルコース輸送体 認知症

1. 研究開始当初の背景

果糖の蛋白や脂質に対する強い糖化作用や脂質変換作用に基づき、果糖の過剰摂取が、高血圧(*J Am Soc Nephrol* 2010, 21, 1543-9)^(a)、インスリン抵抗性やメタボリック症候群(*J Clin Invest* 2009, 119, 1322-34; *Int J Obes* 2010, 34, 454-61)^(b,c)、脂肪肝(*Metabolism* 2011, 60, 1259-70)^(d)の増悪に繋がることが明らかになりだしている。また、認知症との関係については、疫学的データからは果糖の過剰摂取が認知症の危険因子になりうることを指摘している Stephan らの記述(*J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010, 65, 809-14)^(e)がある一方で、認知症増悪と果糖摂取との関係は説得力に欠けるという White のコメント(*J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011, 66, 537-538)^(f)もあり、果糖過剰摂取と認知症との関係についての結論は出ていない。このように、当初、ダイエット食物と考えられた果糖が、その強い蛋白糖化作用や脂質変換作用から、その過剰摂取が様々な成人病を引き起こすのみならず、認知症をも増悪させる可能性が指摘されてきている。また、我々は、予備実験として、ラジオリベルされたフルクトースをマウス尾静脈から投与する実験を行い、それが脳内に入りうることを示唆する所見を見出していた (*unpublished observation*)。さらに、ヒト髄液中におけるグルコースの濃度に対するフルクトースの濃度の比は、血中と比較し相対的に高いことも報告されている(*J Chromatogr* 1989, 497, 39-48)^(g)。それ故、我々は、ヒトでも血中のフルクトースは代謝されずに脳内移行しうるのではないかと考えた。しかしながら、果糖過剰摂取と認知機能障害との因果関係を示す科学的根拠は確立しておらず、さらに、果糖が脳内に移行するのであれば、どの経路で脳内に移行するのか、具体的にその輸送体は脳血管などに局在するのか、また、神経細胞等にどのような影響を

直接及ぼしうるのか、など不明であった。

2. 研究の目的

“果糖の過剰摂取により認知機能に影響を及ぼしうる”との仮説を検証するためには、果糖が直接的に脳内に入るのであれば、果糖の輸送体が脳内のどこに局在するのか、さらに、果糖の投与により神経細胞やグリア細胞は具体的にどのような影響を受けるのかを明らかにすることが必要であり、その解明がこの研究の目的である。

3. 研究の方法

果糖の輸送体である Glucose Transporter 5 (GLUT 5), GLUT2, GLUT7, GLUT8, GLUT11, GLUT12 の脳内での局在については未だ解明されていないので、我々は、まず、ヒト剖検脳とマウス脳を用いてその局在を免疫組織学的に検討した。次いで、培養神経細胞やグリア細胞に果糖を添加し、AGE を含む神経細胞内蛋白の糖化度、酸化ストレスの定量、そして、培養細胞の形態学的変化を含む種々の変化を指標に、その影響を評価した。

4. 研究成果

果糖の脳内移行に必要な輸送体の脳内局在を検討した結果、代表的な果糖の輸送体である GLUT5 は脳血管には局在しなかったが、脈絡叢上皮細胞と上衣細胞の細胞膜に局在していた(*Neuroscience* 2014, 160, 149-157)⁽¹⁾。また、同じく果糖の輸送体である GLUT8 も同様に、脳血管には局在しなかったが、脈絡叢の上皮細胞と上衣細胞の細胞質に局在していた(*Histochem Cell Biol* 2016, 146, 231-236)⁽²⁾。一方、GLUT7, GLUT11, GLUT12 の脳内局在も検討したが、その脳血管や脈絡叢での局在は明らかでなかった(*Histochem Cell Biol* 2016, 146, 231-236)⁽²⁾。尚、GLUT2 が神経細胞だけでなく上衣細胞に局在することはすでに報告されている(*J Chem*

Neuroanat, 2004,28, 117-136)^(h)。さらに、アミロイドベータ蛋白の脳外へのクリアランスに関係することが指摘されているいくつかの輸送体も脈絡叢上皮細胞に存在することが明らかになった(*Histochem Cell Biol* 2015,144, 597-611)⁽³⁾。これらのことから、血中の物質の脳への影響を評価するに際し、脳血管における血液脳関門を介する輸送だけでなく脈絡叢における血液脳脊髄液関門を介する物質の移行の重要性が示唆される(*Neuropathol* 2016,36,115-124; *Brain Tumor Pathol* 2016,33, 89-96)^(4,5)。また、糖尿病のモデルマウスでは、脳室周囲領域のバリア機能が脆弱で糖化などの影響を受けやすいことを示唆する所見が得られており(*Microsc Res Tech* 2016,79, 833-837)⁽⁶⁾、高血糖状態における脳室周囲に存在する脈絡叢の役割の重要性がここでも示唆される。さらに、GLUT8が脳室周囲のグリオーシス部位のアストロサイトやミクログリアに局在することが判明した(*Neurosci Lett* 2017,636, 90-94)⁽⁷⁾。このことは、脳室周囲のグリオーシス部位では、果糖はアストロサイトやミクログリアに取り込まれて神経細胞に何らかの影響を与えているものと推測され、脳室周囲のグリオーシス部位での果糖の何がしかの需要を示唆しているのかもしれない。

一方、*in vitro* 実験として、高フルクトース環境が神経系細胞に及ぼす影響の解析を行った。神経細胞の初期分化時の生存や突起伸長に対して高フルクトース環境がどのような影響を与えるかを調べるため、ラット胎仔より調整した初代培養神経細胞に、播種24時間後より培地中にD-フルクトースを0.1 mMまたは1 mM加えて48時間培養し、生存率、活性酸素種産生量を比較したが、フルクトース負荷によりこれらのパラメータには明らかな差は見られなかった。突起伸長に対する影響についても検討をおこなったが、違いは有意ではなかった。一方、ある程度成熟した

神経細胞に対して高フルクトース環境がどのような影響を及ぼすかを調べるため、播種後7日を経過した初代培養ラット神経細胞に対し、培地中にD-フルクトースを0.1 mMまたは1 mM加え、3週間以上培養を継続し、細胞の生存率、活性酸素種産生量を測定した。細胞生存率については、コントロールに比べ、1 mMフルクトースを長期負荷した状態では10%程度生存率が低下することが明らかになった($p < 0.05$)。また、CellRox Green染色で評価した活性酸素種産生量については、フルクトース長期負荷群とコントロール群との間に明らかな差はなかった。さらに、フルクトース輸送体のGLUT5を発現しているミクログリアにフルクトースを負荷する実験も行った。ラット新生仔由来の混合グリア培養よりミクログリアを単離し、24時間後よりD-フルクトースを48時間負荷後生存率及び活性酸素種産生量を測定したが、これらのパラメータにおけるフルクトース負荷による影響は明らかではなかった。以上の結果からは、高フルクトース単独の培養環境では、神経細胞に軽度の傷害をもたらす可能性を示唆するも、活性酸素種産生に影響がみられず、影響は限定的と考えられた。今後、高フルクトース環境だけでなく複合的な要因から成る環境による神経細胞やグリア細胞への影響を評価することが必要と考えられる。

(引用文献)

- (a) Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1543-1549.
- (b) Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. Consuming fructose-sweetened, not

glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1322-1334.

(c) Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Johnson RJ, Lillo JL. Excess fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes* 2010; 34: 454-461.

(d) Roncal-Jimenez CA, Lanaspá MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andres-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY, Johnson RJ. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism* 2011; 60: 1259-1270.

(e) Stephan BCM, Wells JCK, Brayne C, Albanese E, Siervo M. Increased fructose intake as a risk factor for dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65: 809-814.

(f) White JS. Proposed link between fructose intake and dementia risk is not persuasive. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 537-538.

(g) Kusmierz J, DeGeorge JJ, Sweeney D, May C, Rapoport SI. Quantitative analysis of polyols in human plasma and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr* 1989; 497: 39-48.

(h) Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain-- an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 2004; 28: 117-136.

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 7 件)

(1) Ueno M, Nishi N, Nakagawa T, Chiba Y, Tsukamoto I, Kusaka T, Miki T, Sakamoto H, Yamaguchi F, Tokuda M. Immunoreactivity of glucose transporter 5 is located in epithelial cells of the choroid plexus and ependymal cells. *Neuroscience* 2014; 260: 149-157. 査読有り

(2) Murakami R, Chiba Y, Tsuboi K, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R, Mashima M, Kanenishi K, Yamamoto T, Ueno M. Immunoreactivity of glucose transporter 8 is localized in the epithelial cells of the choroid plexus and in ependymal cells. *Histochem Cell Biol* 2016; 146: 231-236. 査読有り

(3) Matsumoto K, Chiba Y, Fujihara R, Kubo H, Sakamoto H, Ueno M. Immunohistochemical analysis of transporters related to clearance of amyloid- β peptides through blood-cerebrospinal fluid barrier in human brain. *Histochem Cell Biol* 2015; 144: 597-611. 査読有り

(4) Ueno M, Chiba Y, Matsumoto K, Murakami R, Kawauchi M, Fujihara R, Miyataka H, Nakagawa T. Blood-brain barrier damage in vascular dementia. *Neuropathol* 2016; 36: 115-124. 査読有り

(5) Ueno M, Chiba Y, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Fujihara R. Blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. *Brain Tumor Pathol* 2016; 33: 89-96. 査読有り

(6) Fujihara R, Chiba Y, Nakagawa T, Nishi N, Murakami R, Matsumoto K, Kawauchi M, Yamamoto T, Ueno M. Albumin microvascular leakage in brains with diabetes mellitus. *Microsc Res Tech* 2016; 79: 833-837. 査読有り

(7) Mashima M, Chiba Y, Murakami R, Uemura N, Matsumoto K, Kawauchi M, Kanenishi K, Hata T, Ueno M. Glucose transporter 8 immunoreactivity in astrocytic and microglial cells in subependymal areas of human brains. *Neurosci Lett* 2017; 636: 90-94. 査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

上野正樹、脳病理組織の解析方法について
血液脳関門障害の機序解明を例にして、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 (長野県茅野市)(平成 28年 9月)

〔図書〕(計 0件)

〔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

上野正樹 (UENO Masaki)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 30322267

(2) 研究分担者

千葉陽一 (CHIBA Yoichi)

香川大学・医学部・講師

研究者番号: 30372113

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()