

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500955

研究課題名(和文)多価不飽和脂肪酸による認知症予防効果の多角的検証

研究課題名(英文)Multilateral verification of preventive effects of polyunsaturated fatty acids on dementia

研究代表者

橋本 道男 (Hashimoto, Michio)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：70112133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：2008～2010年に行った認知症予防に関するヒト介入試験のサブ解析の結果、ドコサヘキサエン酸(DHA)強化食品により認知機能の低下が遅延した高齢者をレスポナー、しなかったヒトをノンレスポナーとした場合、前者は後者に比べて血漿総コレステロールなどが高値を示し、高齢者の栄養摂取状態が認知症予防効果に反映することが示唆された。しかし、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素の遺伝子多型による差は両者間で認められなかった。四重極型質量分析法により、DHAによる加齢ラットの認知機能亢進作用とDHAとその代謝産物の増加が関連することを見出し、ナノ微粒子質量分析法によるラット海馬でのPUFAの可視化を確立した。

研究成果の概要(英文)：From the sub-analysis of human interventional studies on dementia prevention, both the groups were subdivided according to the mean changes in the total MMSE (dMMSE) scores over 12 months as following: responders, total dMMSE change > 0; nonresponders, total dMMSE score change < 0. The levels of plasma LDL-cholesterol and erythrocyte eicosapentaenoic acid were significant higher in the responders than those in the nonresponders, suggesting that the nutrition status of the elderly is reflected in dementia preventive effect by DHA-enriched food. The differences of genetic polymorphisms of delta 5 desaturase were, however, not observed between two groups. Using a TSQ quantum mass spectrometer, the positive correlation between the improvement of spatial cognitive learning ability in DHA-administrated aged rats and the brain levels of DHA-derived metabolites was found. Visualization of decreased DHA in the hippocampus of rats by imaging mass spectrometry was established.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：多価不飽和脂肪酸 認知症予防 リピドミクス 多価不飽和脂肪酸メディエーター ヒト介入試験 Madecassoside 天然物由来アルツハイ 遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景：我が国では、65歳以上の高齢者の約15%は認知症であり、高齢者人口の増加に伴い急増する認知症を克服することは急務である。最近、脳機能改善物質として、魚油成分であるドコサヘキサエン酸(DHA)やアラキドン酸(AA)などの多価不飽和脂肪酸(PUFA)が注目され、市場に出回っているにもかかわらず、これらPUFA、とくにAAの機能性は明らかではなく、さらなる科学的エビデンスの蓄積と評価法の構築が必要である。

(2) 学術的背景：DHAに関しては、欧米での大規模な疫学調査、アルツハイマー病(AD)モデル動物での介入試験、さらには高齢者・AD患者を対象としたヒト介入試験などから、DHAがヒトの脳機能維持と神経精神疾患への予防効果を有することは明らかになりつつある。申請者らも島根県の在宅健常高齢者を対象として、「認知機能と食事栄養」に関する4年間のコホート疫学調査、さらにはDHA強化食品によるヒト介入試験を行い、DHAを多く摂取している人は加齢に伴う認知機能の低下が遅延されることを見出した。しかし、DHAの認知症予防効果の詳細なメカニズムは不明のままである。AAに至ってはほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

脂肪酸とその代謝物の体内・脳内での局在定量・解析法を構築し、多価不飽和脂肪酸による認知症予防効果の作用機序を分子レベルで明らかにし、医療応用を試みる。さらにはDHA以外の天然物由来の認知症予防物質の探索を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 新規な定量・解析法の確立：プロテオミクス解析(MALDI-TOF MS, LC/MS/MS)、ナノ微粒子質量分析装置(Nano-PALDI)などを駆使して、PUFAとその代謝物の脳内局在化と定

量化を試みた。また一分子蛍光分析システムによるアミロイド蛋白(A $_{1-42}$ )の凝集・解離作用の解析法を確立し、PUFAによるA $_{1-42}$ の凝集・解離作用の有無とその作用機序を解明した。

(2) 培養系：胎児脳由来神経幹細胞を抽出・培養し、PUFAによる神経新生能への影響とその作用機序を検討した。

(3) 動物実験系：若・加齢ラットやA $_{1-42}$ 誘発性空間認知機能障害ラット(ADモデルラット)を用いて、放射状迷路法によりラットの空間認知機能の評価し、PUFAや天然物由来物質のAD予防・改善効果の有無とその機序を検証した。さらにはLC/MS/MSを用いて、空間認知機能とPUFAとその代謝物との関連性を検討した。

(4) コホート疫学研究とヒト介入試験：島根疫学調査研究データを精査し、疫学調査結果から得た日本人のエビデンスとして認知機能と食事栄養との関連性を検討した。さらにはPUFA強化食品によるヒト介入試験のサブ解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 一分子蛍光分析システム(FCS)によるA $_{1-42}$ への凝集・解離に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響に関する検討

DHAとその誘導体(diDHA: DHAの二量体)、エイコサペンタエン酸(EPA)とその代謝物(レゾルビンD1)、AAを用いて、A $_{1-42}$ の凝集能への影響を検討した。DHAは濃度依存的にA $_{1-42}$ のモノマーからダイマーへの凝集過程を阻害した。AAもDHAと同様に阻害するように思われるが、diDHA、EPAとレゾルビンD1には有意な効果が認められなかった。発表学術論文(発表論文)

(2) ナノ微粒子質量分析(Nano-PALDI)によるPUFAの脳内局在性の検討

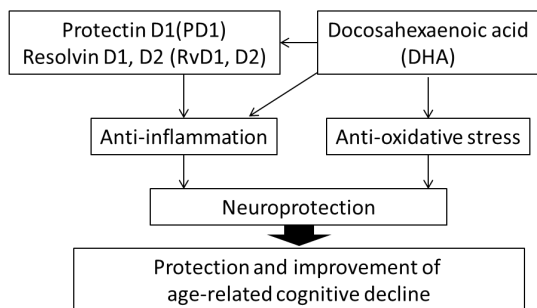
魚油含有飼料と魚油なし飼料で飼育したラットの海馬のDHA、EPAそしてAAを、

Nano-PALDI を用いて脳内局在性を可視化し、飼育飼料の差を数値化した。これらの数値とガスクロマト法による脂肪酸測定値とを比較検討したところ、両者間で得られたこれら脂肪酸の脳内局在性に関連した結果は一致した。発表学術論文（発表論文）

(3) プロテオミクス解析（MALDI-TOF MS、LC/MS/MS）による脳内 PUFA・その代謝物量と認知機能との関連性の検討

LC/MS/MSを用いて、血漿・組織中のフリーの PUFA とその代謝物を網羅的に測定する方法を確立した。発表学術論文（発表論文）

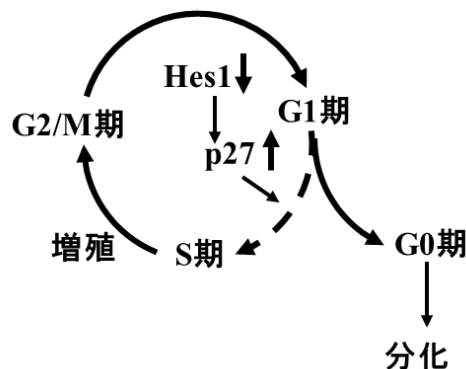
DHA・EPA 混合剤（TAK-085）と EPA 単剤のみを 17 週間にわたり長期投与した老齢ラットの脳皮質の LC/MS/MS 法により PUFA 代謝物を測定し、放射状迷路法で得られた空間認知機能との関連性を検討した。その結果、TAK-085 投与群では、DHA 代謝物の 7-, 10-, and 17-HDoHE、プロテクチン D1（PD1）、そして レゾルビン D1、D2（RvD1、RvD2）と EPA 代謝物の 5-HETE が増加し、一方、AA 代謝物の PGE<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、and PGF<sub>2</sub> は低下した。これら DHA 代謝物は長期記憶の指標である参照記憶エラー数と負の相関を示したことから、DHA 代謝物による記憶・学習能への関与が示唆された。発表学術論文は投稿中、国際学会発表（学会発表）



(4) 神経新生に及ぼす PUFA の影響

n-3PUFA の DHA、EPA は、共に神経幹細胞から神経細胞への分化を促進するが（神

経新生）、n-6PUFA の AA にはこの効果が認められなかった。DHA・EPA による神経新生促進作用の機序として、神経細胞の増殖と分化を制御している Hes1 の発現を DHA は抑制することにより、EPA は Hes6 の発現を増加させて間接的に Hes1 の作用を抑制し、神経新生を促進することが明らかになった（下図参照）。発表学術論文（発表論文）



(5) 島根県在宅健常高齢者を対象とした疫学調査結果の精査

高齢者 853 名（平均年齢約 67 歳）の赤血球膜脂肪酸を測定し、島根大学疾病予知予防研究拠点から入手したアンケート結果、うつ（SDS スコア）ならびにやる気スコアと赤血球膜脂肪酸との関連性について解析した。女性は男性よりもうつ傾向にあり、うつ傾向の女性ではオレイン酸とオレイン酸/ステアリン酸比（9 不飽和化酵素活性指数）が低下した。男性では、赤血球膜のリノレン酸または DHA が増加するに従いやる気スコアが低下した。高齢者では、うつ、やる気と赤血球膜 PUFA には負の相関があり、その関係には男女差が認められた。

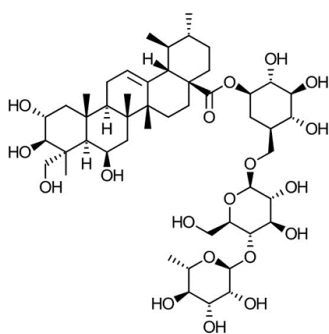
(6) DHA 強化食品による高齢者認知機能に及ぼす影響に関するヒト介入試験のサブ解析

2008 年から 2010 年の 2 年間に、DHA・EPA 強化食品による認知症予防効果に関するヒト介入試験を行った際、DHA 強化食品摂取

による加齢に伴う認知機能低下にたいする遅延効果が認められた高齢者（DHA レスポンダー）と認められなかった高齢者（DHA ノンレスポナー）が見出された。レスポナーはノンレスポナーに比べて、血漿の総コレステロールや LDL コレステロール、さらには赤血球膜 EPA が高値を示したことから、高齢者の栄養摂取状態が、認知症予防効果に反映する可能性が示唆された。発表学術論文（発表論文）

また、DHA 合成能に起因した不飽和化酵素などの遺伝子多型の関与が示唆されることから、5 不飽和化酵素の遺伝子多型を測定したところ、5 不飽和化酵素の遺伝子多型と DHA レスポナー、DHA ノンレスポナーの間には有意な関連性は見られなかった。また、参加高齢者のうつ病や生活習慣病の発症・進展と関連する代表的なリスク遺伝子多型マーカーと赤血球膜脂肪酸との関連性を検討したところ、うつ病のセロトニン輸送体多型、高血圧の AGT M235T 多型、ならびに内臓肥満の 3AR 多型と UCP-1 多型では、ある種の脂肪酸との関連性が認められた。

#### (7) 天然物由来認知症予防物質の探索



の Madecassoside (MD) (上図参照) の認知症予防物質としての可能性を検討した。アミロイド 蛋白(A)を脳室内に単回投与して作成したアルツハイマー病モデルラットを用いて、MD の予防効果とそのメカニズムについて検討した。MD は A の沈着を抑

制し、空間認知機能の障害を軽減した。さらに MD は海馬のストレスマーカーを減少させ、可塑性関連マーカーを増大させた。MD は AD の予防・治療薬になりうる可能性が示唆された。(学会発表)発表学術論文は投稿中。

#### 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 31 件)

橋本道男、3 系脂肪酸と認知機能、

日本臨床 特集:生活習慣病と認知機能、4月号、648-656、2014

M Hashimoto, M Katakura 他3名(1番目)、

Possibility of polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of neuropsychiatric illnesses. Journal of Pharmacological Science, Current Perspectives 124、294-300、2014

DOI: 10.1254/jphs.13R14CP

S Juman, M Hashimoto, M Katakura 他5名

(2番目)、Effects of long-term oral administration of arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the immune functions of young rats. Nutrients 5: 1949-1961、2013.

DOI:10.3390/nu5061949

M Hashimoto, M Katakura 他5名(1番目)、

Prescription n-3 fatty acids, but not eicosapentaenoic acid alone, improve reference memory-related learning ability by increasing brain-derived neurotrophic factor levels in SHR.Cg-Lepr<sup>cp</sup>/NDmcr rats. Neurochemical Research 38(10)、2121-2135、2013.

DOI 10.1007/s11064-013-1121-1

M Katakura, M Hashimoto, 他3名(2番目)、

Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells. Stem Cells Int.

2013:2013:490476.

DOI: 10.1155/2013/490476.

K Miwa, M Hashimoto, M Katakura 他 2 名 ( 2 番目 ) Evaluation of the inhibitory effect of docosahexaenoic acid and arachidonic acid on the initial stage of amyloid  $\beta$ 1-42 polymerization by fluorescence correlation spectroscopy. *Advances in Alzheimer's Disease*. 2(2): 66-72, 2013

DOI:10.4236/aad.2013.22009

橋本道男、ドコサヘキサエン酸、New Diet Therapy 日本臨床栄養協会誌 ミニレビュー、29(3), 45-47, 2013

橋本道男、食生活による認知症と生活習慣病の予防、MEDICINAL 2(9)、101-111、2012

M Hashimoto, 他 7 名 ( 1 番目 ) Beneficial effects of daily dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on age-related cognitive decline in elderly Japanese with very mild dementia: A 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Aging Research & Clinical Practice* 1(3): 193-201, 2012

S Taira, M Hashimoto, 他 2 名 ( 2 番目 ) Visualization of decreased docosahexaenoic acid in the hippocampus of rats fed an n-3 fatty acid-deficient diet by imaging mass spectrometry. *Journal of Biophysical Chemistry* 3(3): 221-226, 2012. DOI:10.4236/jbpc.2012.33025

[学会発表] (計 60 件)

M Hashimoto, M Katakura 他 5 名 ( 1 番目 ) Improvement of age-related cognitive decline by prescription n-3 fatty acids, but not EPA alone, is associated with increases of DHA-derived docosanoids and decreases of ARA-derived eicosanoids in rat brain. 11<sup>th</sup> Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Stockholm,

Sweden, Jun 28 – July 2, 2014.

M Hashimoto, M Katakura 他 6 名 ( 1 番目 ) Beneficial effects of dietary docosahexaenoic acid intervention on cognitive function and mental health in oldest-elderly with dementia in Japan. The 4<sup>th</sup> Mind-Body Interface International Symposium, China Medical University, Taichung, Taiwan, February 21-22, 2014.

A Al Mamun, M Hashimoto, M Katakura 他 3 名 ( 2 番目 ) Neuroprotective effect of madecassoside: Evaluated in amyloid  $\beta$ 1-42-infused Alzheimer's disease model rats. International Chemical Biology Society, 2<sup>nd</sup> Annual Conference (ICBS2013), Shirankaikan, Kyoto, Japan, October 7-9 (8), 2013

M Hashimoto 他 3 名 ( 1 番目 ) Protective effects of docosahexaenoic acid on cognitive decline with aging and dementia: From animal and human interventional studies. 第 17 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム: 神経変性疾患の治療法を求めて - アルツハイマー病とパーキンソン病を中心に、2012 年 12 月 6,7 日 ( 6 ) 武田薬品研修所 (吹田市)

M Hashimoto 他 7 名 ( 1 番目 ) Beneficial effects of dietary docosahexaenoic acid intervention on cognitive function in elderly people with very mild dementia in Japan. 2011 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), Porte de Versailles Convention Center, Paris, France, July 16-21(19), 2011.

[図書] (計 8 件)

M Hashimoto 他 2 名 ( 1 番目 ), Effects of green tea catechins on cognitive learning ability and dementia. In: *Tea in Health and Disease Prevention*, Editor: V. R. Preedy, Academic Press, Amsterdam, pp1363-1371,

2013

ISBN: 978-0-12-384937-3 全頁 1573

橋本道男、アラキドン酸、イノシトール、コンドロイチン硫酸、ドコサヘキサエン酸、ナイアシン(ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ナイアシンアミド)、フェニルアラニン、ホスファチジルセリンを担当、機能性食品の作用と安全性百科、上野川修一、清水俊雄、清水 誠、武田英二、鈴木英毅 編集、丸善出版、pp96-97, pp102, pp106, pp112, pp124-125, pp126, pp138-139, 2012、6月全頁 405,

ISBN: 978-4-621-08552-3

橋本道男、大野美穂、加藤節司、アルツハイマー病予防食品素材と加工食品の開発 - 3系脂肪酸、高齢者用食品の開発と展望、大越ひろ、渡邊 昌、白澤卓二 監修、シーエムシー出版、pp56-65、2012、7月、全頁 302、ISBN: 978-4-7813-0623-0  
S Hossain, M Hashimoto, Mechanism of neurotoxicity of amyloid-beta peptide and the protective effects of docosahexaenoic acid. In: Amyloids: Composition, Functions and Pathology, Editor: I. P. Halcheck and NR Vernon, pp. 83-102, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012. ISBN: 9781621005384  
全頁252

M Hashimoto, M Katakura 他1名(1番目)、Docosahexaenoic Acid and Cognitive Dysfunction, In: Handbook of Behavior, Diet and Nutrition, Editor: V. R. Preedy, pp. 1797-1816, Springer, New York, 2011

〔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1件)

名称：神経再生促進剤  
発明者：橋本道男、紫藤 治、川北映輔、原田 剛  
権利者：持田製薬株式会社、国立大学法人島根大学  
種類：特許  
番号：特許第 5240157  
取得年月日：平成 25 年 4 月 12 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 道男 (HASHIMOTO, Michio)  
島根大学・医学部・准教授  
研究者番号：70112133

(2) 研究分担者

片倉 賢紀 (KATAKURA, Masanori)  
島根大学・医学部・助教  
研究者番号：40383179