

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：47118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K00894

研究課題名(和文)高コレステロール食慢性投与によるアルツハイマー型脳機能障害の解明と予防食の探索

研究課題名(英文) Insight into the pathophysiology of the cognitive dysfunction by the diet-induced hypercholesterolemia of mice, looking for a preventive diet therapy of Alzheimer's disease.

研究代表者

森脇 千夏 (Moriwaki, Chinatsu)

中村学園大学短期大学部・食物栄養学科・教授

研究者番号：90280289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウスへの高コレステロール食慢性経口投与が、高コレステロール血症を来とし、視床下部コレステロール合成抑制、ヒスタミン機能障害、アミロイド蓄積、脳神経細胞萎縮と行動障害を引き起こす可能性を見出した。本研究はこれらの行動障害およびその病態生理学的機序の解明を目的として研究を行った。高コレステロール食の慢性摂取は、1)細胞内微小骨格系の生合成を抑制し、2)広範に細胞内代謝調節を抑制させ、3)細胞内微小骨格の抑制からアミロイド蛋白の排出が滞り視床下部ヒスタミン神経系など中枢神経細胞に蓄積して機能障害を引き起こし、結果として4)遅発性肥満症、5)高次脳機能障害を惹起させうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで「不健康なコレステロールパターンがアルツハイマー病に影響するアミロイドの上昇を直接的に引き起こしている可能性がある」との報告(JAMA Neurology, 2014; 71(2):195-200)があるが、これらの明確な機序は不明であった。本研究により過剰なコレステロールの習慣的摂取が高コレステロール血症、脳機能障害を引き起こす機序が明らかになった。食事摂取基準(2020年版)では科学的根拠が不十分であるとし、食事性コレステロールの指標策定は見送られた。生活習慣病の予防および重症化予防の観点から血中コレステロールの管理および食事性コレステロールの基準値設定が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We chronically orally administered a high cholesterol diet to mice. It was found that this results in the hypercholesterolemia, an inhibition of hypothalamic cholesterol synthesis, the histamine dysfunction, the amyloid accumulation, and the collapse of the hypothalamic nerve cells, which may cause behavioral disorders in mice. The purpose of this study was to clarify these behavioral disorders and their pathophysiological mechanisms. Chronic intake of a high-cholesterol diet 1) suppresses intracellular microskeletal biosynthesis, 2) suppresses intracellular metabolic regulation extensively, and 3) delays amyloid protein excretion. These results suggest that the dysfunction of the hypothalamic histaminergic nervous system with amyloid protein accumulation might provoke 4) late-onset obesity and 5) cognitive dysfunction.

研究分野：栄養学

キーワード：高コレステロール負荷食 脳機能 アルツハイマー 遺伝子解析 メタボローム解析 高コレステロール血症

1. 研究開始当初の背景

国内の認知症患者は約 462 万人といわれその 6 割以上が Alzheimer(AD 病)であり、高齢化社会を迎えた我が国にとってその予防対策は最重要課題である。AD の病態生理の全体は依然不明であるが、アミロイド β 蛋白(AB)の産生及び脳内異常蓄積が疾病成立の中心であり、AB 蓄積とコレステロール代謝・高コレステロール血症との関連を示唆する報告が蓄積されている。さらに AD 病では、視床下部ヒスタミン(HA)含有量の低下が認められることから、AD 病発症と視床下部 HA 機能が深く関与していることが示唆されている。ところが、アメリカ食生活ガイドラインでは「十分な科学的根拠がない」として食事性コレステロールの摂取基準値を撤廃、日本においてもコレステロールは、体内で合成できる脂質であり、食事性コレステロールは体内で作られるコレステロールの 1/3~1/7 を占めるに過ぎず、コレステロールの摂取量は低めに抑えることが好ましいと考えるものの、同様に「十分な科学的根拠が得られない」として目標量の算定を控えた。一方、アルツハイマー病の 66%に生活習慣に関連する 9 因子が寄与すること(Wei Xu, J Neurol Neurosurg psychiatry, doi:10.1136/2015) や脳内プラークは発症の数十年前に生じること(Rik Ossenkoppele, JAMA, 2015; 313(19):1939-1950)が報告された。さらに高コレステロール血症がアルツハイマーのような痴呆の発症の一因となることが報告されている(認知症疾患診療ガイドライン 2017)。つまり、疫学研究において LDL コレステロールが AD 発症率と相関すること、AD トランスジェニックマウスで食餌誘発性高コレステロール血症が脳アミロイド β 蓄積を強化すること、コレステロールが直接アミロイド前駆体タンパク質(APP)の処理を調整することから、末梢および中枢のコレステロール動態が AD 病を発症させる可能性が示唆されている。しかし、高コレステロール食を慢性的に摂取するとアルツハイマー病になる可能性について検討した研究はまれである(Aytan N et al, Biofactors. 2008;33(3):225-36)。

以上のことから我々は、習慣的な高コレステロール食摂取の疾病リスクについて本研究課題を提案し、脳機能特に AD 病との関連について解析を始めた。

2. 研究の目的

我々の先行研究によって、マウスへの高コレステロール食慢性経口投与が、末梢では高コレステロール血症を来し、視床下部においてはコレステロール合成抑制、ヒスタミン機能障害、社会性・短期記憶能低下などの行動障害を来すことを確認している。さらに追加的研究として、高コレステロール食慢性経口投与によって実験動物に脳内アミロイド β が蓄積し脳神経細胞が萎縮する可能性を見出している。しかし、高濃度コレステロール経口慢性摂取による脳障害の病態生理学的な機序は不明である。そこで本研究では、高コレステロール食慢性経口投与による行動障害の再現性およびその病態生理学的機序の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) モデル動物作成

C57b16 雄性 10 週齢マウスに高コレステロール含有食(HC 食(2%, 0.2%, 0.02%))および対照食(AIN93G)を経口慢性投与し、高コレステロール血症マウスを作成した。

(2) 体重変化

電子天秤(METTLER TOLEDO PB3002 DELTA RANGE)を用い、7 日毎に体重を測定した。

(3) 血液生化学的検査

BioLis15ineo(東京貿易メディカルシステム)を用い、マウス血清を定量評価した。

(4) 脳内コレステロール含有量評価

マウス脳組織中のコレステロール含有量をガスクロマトグラフィーマススペクトロメトリー(GCMS-TQ8030、島津社製)を用いて測定し、HC 食(2%, 0.2%, 0.02%)飼育群および対照食飼育群とで比較した。

(5) 行動解析

食行動および一般活動量は、遠隔自動連続行動測定装置(MFD-100、シンファクトリー社製)を用いて評価した。協調運動機能は、回転棒装置(ROTA ROD TREADMILLS 7700; Ugo Basile 社)を用いて評価した。探索行動は、100cm 四方の open field および hole-board 装置(Hole-Board 6650; Ugo Basile 社)を用いて評価した。短期記憶は object-recognition 行動について、社会行動は social interaction 行動について、それぞれ撮影し記録した行動動画を動画専用行動解析ソフト(SMART; PanLab 社製)を用いて評価した。

(6) 視床下部ヒスタミン解析

視床下部ヒスタミン含有量はヒスタミン(HA)およびその代謝産物テレメチルヒスタミン(tMH)について、高速液クロマトグラフィー(HPLC-EHA-505; Eicom 社製)を用いて評価した。

(7) 視床下部組織画像解析

視床下部ヒスタミン神経はヒスタミン生合成酵素 HDC およびアミロイド β タンパク質について、それぞれの抗体を用いて免疫組織化学的に染色し、その切片について画像的に評価した。

(8) 視床下部タンパク質含有量解析

ヒスタミン生合成酵素 HDC、細胞内骨格タンパク質(β アクチン、 β チューブリン、Activity

regulated cytoskeleton associated protein(arc))、遺伝子制御蛋白質(ヒストン H3)、コレステロール合成酵素(HMGCR)、HMGCoA 合成酵素(HMGCS)、糖代謝活性化酵素(AMPK α 1)、解糖系酵素(GAPDH)、脳由来神経栄養因子(BDNF)の視床下部発現量について、それぞれの蛋白質への抗体を用い、western blot 解析で定量評価した。

(9) 視床下部 mRNA 解析

視床下部に発現する mRNA 網羅的解析について、マイクロアレイ(Whole Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイ、Agilent 社製)を用いて解析した。

(10) 視床下部メタボロームおよびパスウェイ解析

視床下部の代謝産物について、ガスクロマトグラフィーマススペクトメトリー(GCMS-TQ8030、島津社製)およびパスウェイ解析(IPA, パウェイ解析ツールアカデミックリミテッドネームユーザー25 データセットおよびMetraBoAnalyst 4.0)を用いて、網羅的に解析した。

(11) 統計解析

正規分布に従う数値は分散分析を、従わない数値は Wilcoxon 解析を、専用統計解析ソフト(JMP、SAS 社製)を用いて行った。有意水準 0.05 未満を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) モデル動物の評価

高コレステロール食(HC)飼育マウスにおいて投与開始 3 日目から全ての投与期間を通じて対照食飼育マウス血清コレステロール濃度より有意な増加が認められた。以上より本モデル動物を高コレステロール血症であると判定した。特に 2%-HC 群において投与開始 4 週以降で一日摂食量の増加を伴わない有意な体重増加が認められた(図 1)。脳内コレステロール含有量は血清コレステロール濃度とは逆に、HC 群において有意な低下が認められた(図 2)。以上より、高コレステロール食飼育マウスのコレステロール濃度において、循環血中で高く、脳内で逆に低下することが判明した。さらに高コレステロール食飼育マウスにおいて、短期記憶(object-recognition test)および社会性行動(social interaction test)に有意な低下が認められた(図 3)。一般活動量、協調運動、探索行動には対照群と有意が認められなかったことから、高コレステロール食飼育マウスは高次脳機能が選択的に障害されることが判明した。

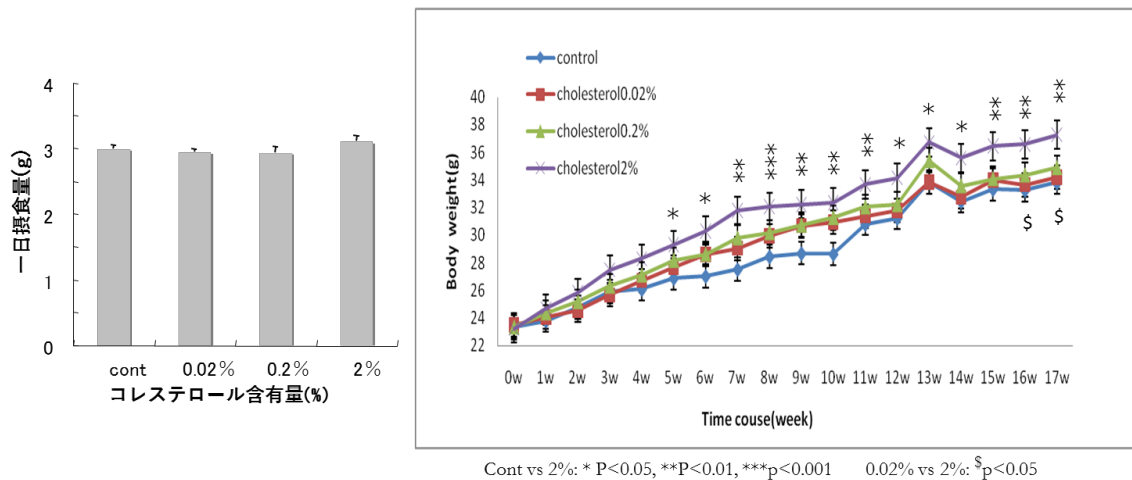


図 1 : 一日摂食量と体重変化

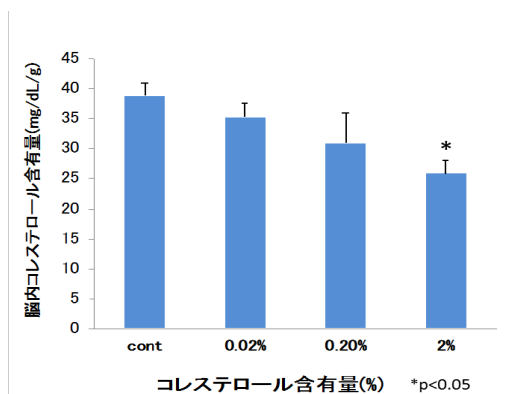


図 2 : 脳内コレステロール含有量の変化

(2) 視床下部神経ヒスタミンと視床下部アミロイド β 蛋白質の共発現

高コレステロール食(HC)飼育マウスにおいて視床下部ヒスタミン(HA)およびヒスタミン代謝産物(tMH)の有意な低下が認められた(図 4)。免疫組織化学的に解析すると、高コレステロール食(HC)飼育マウスのヒスタミン神経系の退縮は第三脳室周囲(E3, E4 領域)に特に顕著に認められ、これらヒスタミン合成細胞にアミロイド β 蛋白質の共発現が認められた(図 5)。以上より高コレステロール食(HC)飼育マウスの高次脳機能障害には細胞内アミロイド β 蛋白質蓄積を伴うヒスタミン神経系の退縮が寄与する可能性が示唆された。

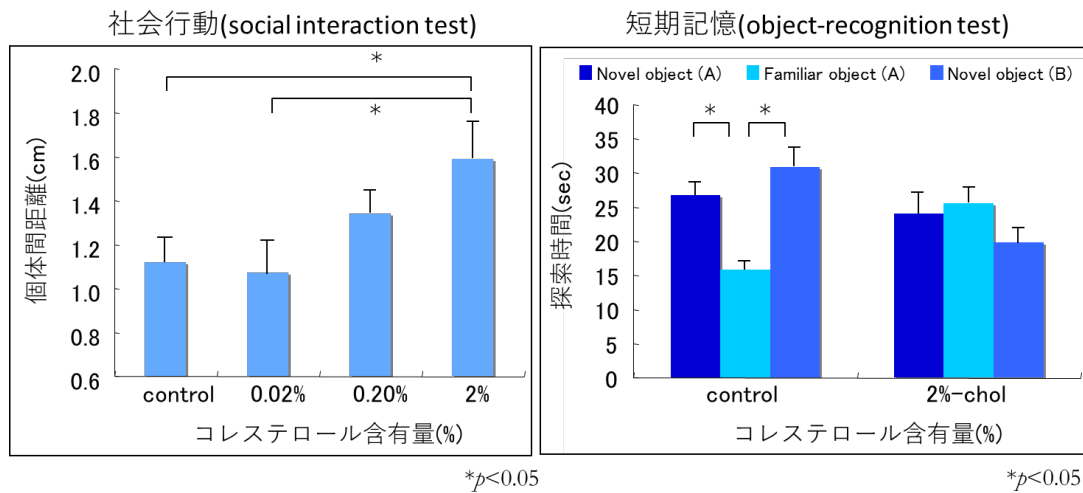


図3：社会行動と短期記憶

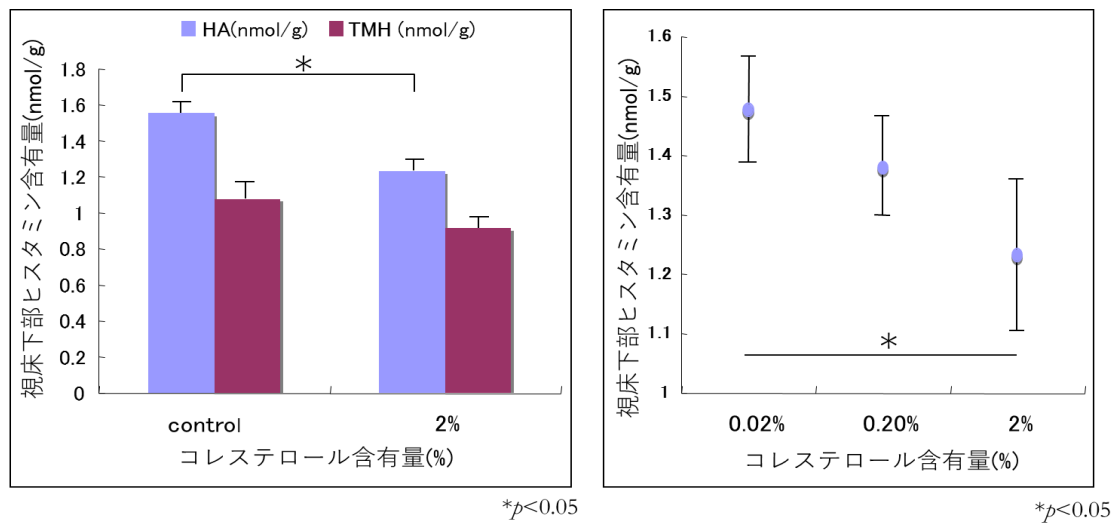


図4：視床下部ヒスタミン含有量の変化

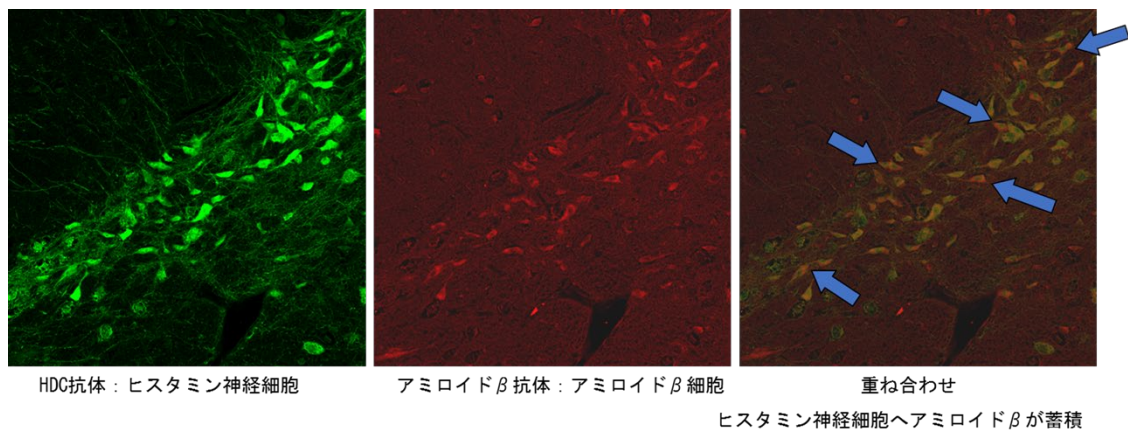


図5：ヒスタミン神経へのアミロイドβ蛋白の共発現

※4ヶ月飼育2%コレステロール投与、マウス視床下部、蛍光免疫二重染色(×40)

(3) 視床下部タンパク質含有量

高コレステロール食(HC)飼育マウスにおいて、ヒスタミン合成酵素HDC、細胞内骨格タンパク質(β アクチン、 β チューブリン)、コレステロール合成酵素(HMGCR)、糖代謝活性化酵素($AMPK \alpha 1$)、解糖系酵素(GAPDH)、脳由来神経栄養因子(BDNF)の有意な低下が認められた。一方でHMGCoA合成酵素(HMGCS)には有意な増加が認められた(一部を図6に示す)。以上より高コレステロール食(HC)飼育マウスの視床下部ヒスタミン合成能低下において、微細な細胞内骨格群・コレステロール生合成機能・糖代謝・神経栄養因子の有意な抑制が伴うことが判明した。HMGCoA合成酵素(HMGCS)の有意な増加は糖代謝抑制に伴う二次性的な変化だと考えられた。

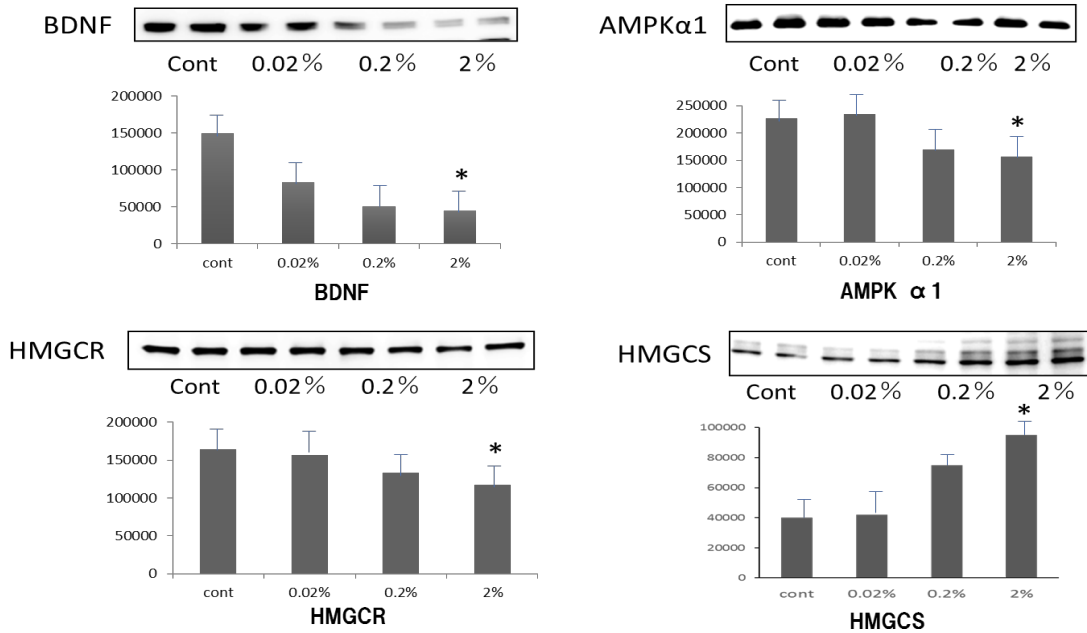


図 6：視床下部蛋白質発現量の変化 * $p < 0.05$

(4) 視床下部 mRNA 発現量(マイクロアレイ)

高コレステロール食(HC)飼育マウスにおいて、視床下部 CYP2F をはじめとする多くのシトクロム P450 群の有意な増加と視床下部糖代謝抑制をトリガーとして誘導される食欲誘発因子 AgRP の有意な増加が認められた。これらの変化はコレステロール合成抑制および糖代謝抑制に伴う細胞内代謝変化の結果だと考えられた(図 7)。

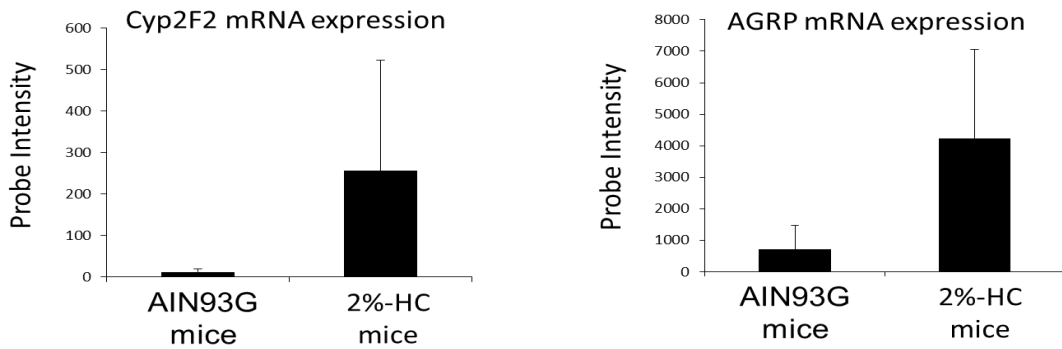


図 7：視床下部シトクロム P450 と AGRP mRNA の変化

(5) 視床下部メタボローム解析およびパスウェイ解析

高コレステロール食(HC)飼育マウスの視床下部において、非常に広範な機能抑制が解糖系・脂質合成・リン脂質合成・ケトン代謝・アミノ酸代謝・モノアミン代謝および細胞内骨格促進系に有意に認められた。これらの広範な代謝調節の抑制性障害はコレステロールの経口慢性投与によってもたらされることが判明した。

5. まとめと考察

以上より、高コレステロール食の慢性摂取は、1) 細胞内微小骨格系の生合成を抑制し、2) 広範に細胞内代謝調節を抑制させ、3) 細胞内微小骨格の抑制からアミロイド β 蛋白の排出が滞り視床下部ヒスタミン神経系など中枢神経細胞に蓄積して機能障害を引き起こし、結果として4) 遅発性肥満症および5) 高次脳機能障害を惹起させる可能性が示唆された。

<引用文献>

- ①Wei Xu, et al, Meta-analysis of Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease, J Neurol Neurosurg psychiatry, 2015 Dec;86(12):1299-306.
- ②Rik Ossenkoppele, et al, Prevalence of Amyloid PET Positivity in Dementia Syndromes A Meta-analysis, JAMA, 2015;313(19):1939-1950.
- ③日本神経学会, 認知症疾患診療ガイドライン 2017, 118-120
- ④Nurgül Aytan, et al, Oxidative Stress Related Changes in the Brain of Hypercholesterolemic Rabbits, Biofactors. 2008;33(3):225-36

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yan Qiong, Ina Keisuke, Chiba Seiichi, Wei Huixing, Tatsukawa Shuji, Fujikura Yoshihisa	4. 巻 23
2. 論文標題 The signal pathway for the repressive effect of dipyrindamole on myofibroblast transdifferentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1608 ~ 1612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.14006	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 Yoshida Yuichi, Gotoh Koro, Masaki Takayuki, Ozeki Yoshinori, Tokoro Masanori, Kudo Akiko, Ozaki Takashi, Okamoto Mitsuhiro, Chiba Seiichi, Watanabe Kiminori, Ohta Masayuki, Inomata Masafumi, Shibata Hirotake	4. 巻 27 (5)
2. 論文標題 Effects of Sleeve Gastrectomy on Blood Pressure and the Renal Renin?Angiotensin System in Rats with Diet Induced Obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Obesity	6. 最初と最後の頁 785 ~ 792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/oby.22443	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 Sonoda Akira, Kamiyama Naganori, Ozaka Sotaro, Gendo Yoshiko, Ozaki Takashi, Hirose Haruna, Noguchi Kaori, Saechue Benjawan, Sachi Nozomi, Sakai Kumiko, Mizukami Kazuhiro, Hidano Shinya, Murakami Kazunari, Kobayashi Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Oral administration of antibiotics results in fecal occult bleeding due to metabolic disorders and defective proliferation of the gut epithelial cell in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 1043 ~ 1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12649	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 Sun Shumin, Hanzawa Fumiaki, Kim Daeun, Umeki Miki, Nakajima Syunsuke, Sakai Kumiko, Ikeda Saiko, Mochizuki Satoshi, Oda Hiroaki	4. 巻 294
2. 論文標題 Circadian rhythm?dependent induction of hepatic lipogenic gene expression in rats fed a high-sucrose diet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15206 ~ 15217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010328	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seiichi Chiba, Chinatsu Moriwaki, Keisuke Ina, Yoshihisa Fujikura
2. 発表標題 Distribution of histaminergic neuronal cluster in the rat and mouse hypothalamus
3. 学会等名 The 39th Annal Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2016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	千葉 政一 (Chiba Seiichi) (20457633)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	酒井 久美子 (Sakai Kumiko) (60225753)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	藤倉 義久 (Fuzikura Yoshihisa) (10165368)	大分大学・医学部・教授 (17501)	
研究分担者	伊奈 啓輔 (Ina Keisuke) (20203193)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	