

令和 2 年 2 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12718

研究課題名(和文) 血液1滴で診断可能なポリフェノールによるアルツハイマー病予防治療マーカーの探索

研究課題名(英文) Search for markers for the prevention and treatment of Alzheimer's disease by polyphenols that can diagnose with one drop of blood

研究代表者

小林 彰子 (Kobayashi, Shoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：90348144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ロスマリン酸(RA)は、*in vitro*および*in vivo*試験においてアルツハイマー病の主病態であるアミロイド $\beta$ に対する高い凝集抑制能を有する。本研究では、アルツハイマー病(AD)モデルマウスにRAを摂食させ、認知行動および脳内表現型を確認すると共に、血中のAD発症遅延反応性マーカーを探索することを目的とした。

ADモデルマウスにロスマリン酸(RA)を摂食させると普通食群と比較し認知機能低下が抑制された。血漿中の成分を網羅的に解析したところ、普通食群とRA食群の化合物の中に逆相関を示すものが存在し、これらの化合物がAD発症遅延反応性マーカー候補となることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)は、症状が現れる約20年前から脳内A $\beta$ 蓄積などの脳内変化が始まっていること、また認知症の病態が進行してしまうと、治療が困難であることから、発症前や初期段階での診断、および予防・治療が重要かつ効果的である。本研究では侵襲性の低い血漿中から、ロスマリン酸摂食によるAD予防効果に伴い変動する、AD発症遅延反応性マーカー候補を見出した。

研究成果の概要(英文)：A study of rosmarinic acid (RA) that highly inhibit the aggregation of amyloid $\beta$  (A $\beta$ ) both *in vitro* and *in vivo*. In this study, after feeding RA to AD model mice (RA group), cognitive function and aggregation of A $\beta$  was checked, and therapeutic reactive bio-markers in their blood. RA group had more suppression, decreasing cognitive function was more than the control group. Some compound of RA group showed an inverse correlation with C group by comprehensive analysis. These compounds might be therapeutic reactive bio-markers of AD.

研究分野：食品機能学

キーワード：アルツハイマー病 バイオマーカー ロスマリン酸

## 1. 研究開始当初の背景

2013年、厚生労働省調査によると65歳以上の4人に1人は認知症とその予備軍と報告されている。認知症の約半数がアルツハイマー病(AD)であり、この対策は急務である。

現在のAD治療薬はADの進行を遅らせることしかできないことから、日々摂取する食品による予防効果に期待がもたれている。ポリフェノールにはADを予防する疫学的知見が報告されている。共同研究先である金沢大学山田正仁先生らのグループは、ADの主病態である脳内アミロイドβ(Aβ)の沈着に着目し、*in vitro* および *in vivo* 両方の系において脳内Aβ凝集を抑制するポリフェノールとしてロスマリン酸(RA、図1.)を独自に見出している。

一方ADは、症状が現れる約20年前から脳内Aβ蓄積などの脳内変化が始まっていること、また認知症の病態が進行してしまうと、治療が困難であることから、発症前や初期段階での診断、および予防・発症遅延が重要かつ効果的である。現在ADの発症前診断は、PETによる、Aβやリン酸化タウの画像診断、および脳脊髄液中のAβやリン酸化タウの測定等により総合的に判断されるが、これらは高額かつ侵襲性が高く、患者への負担も大きい。

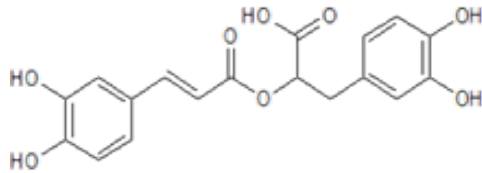


図1. ロスマリン酸(RA)の構造式

## 2. 研究の目的

本研究ではADモデルマウスに発症前からRAを摂食させ、認知行動試験と脳内表現型を確認するとともに、血中成分を網羅的に解析することにより、AD発症遅延反応性の指標となる新たなマーカー分子を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 動物の飼育

ADモデルマウス(Tg2576)(20匹)および野生型マウス(14匹)を、それぞれコントロール食(C)群および0.5% RA食(RA)群に分けて12か月間飼育した。

### 3-2. 行動試験

飼育開始12か月後に、オープンフィールド試験および新奇物体認識試験等の行動試験により認知機能を評価した。

#### 3-2-1. 新奇物体認識試験

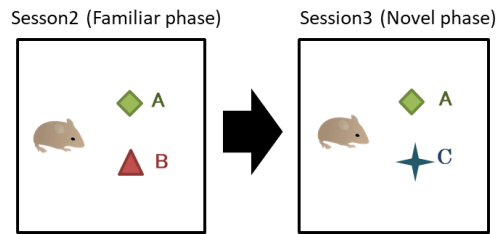


図2. 新奇物体認識試験の概略図

マウス試験用フィールドを用いて、3つのセッションに分けて試験を行った(図2)。まず、マウスを試験用フィールド内で自由に行動させ、新奇環境に馴化させた(Session1)。その後、物体A及び物体Bを配置し、マウスをフィールド内で10分間自由に行動させた(Session2: Familiar phase)。10分経過後にマウスをフィールド外に出し、さらに10分経過した後、物体Bを新たな物体Cに変更し、Session2と同様に物体を配置した。その後、マウスをフィールド内で5分間自由に行動させた(Session3: Novel phase)。

解析では、Session2及びSession3の試験時間中に、各物体(物体A・B・C)に対してマウスが探索行動を取る時間を計測した。計測結果は、TA = 物体Aへの反応時間、TB = 物体Bへの反応時間、TC = 物体Cへの反応時間とし、例えば物体Bに対する興味の度合いを表すときには、Exploratory preference =  $TB / (TA + TB)$  のように値を算出した。一般的に正常マウスは、新奇の物体に対する反応時間が長くなることを期待されるため、Session2における物体A及び物体Bに対するExploratory preferenceは0.5、Session3における物体Cに対するExploratory preferenceは0.6~0.8となることが理想とされる。なお予備検討により、各物体に対するマウスの嗜好性が同程度であることを確認した。

#### 3-2-2. オープンフィールド試験

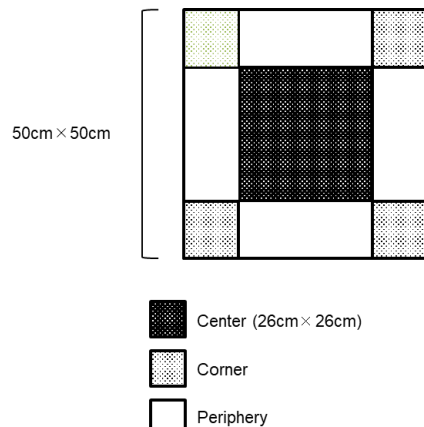


図3. オープンフィールド試験解析図

オープンフィールド試験では、試験用フィールド内でマウスを10分間自由に行動させ、

その行動をビデオカメラで観察、記録した。解析では、フィールドを Center, Corner, Periphery の3つの領域に分け(図3)、各領域での移動距離・進入回数・滞在時間を計測した。

### 3 - 3 . 脳組織染色

Tg2576 マウスについては免疫組織染色を行い、脳内 A $\beta$  沈着を評価した。解剖により摘出した Tg2576 マウスの左脳前半球を、10% 中性緩衝ホルマリン液にて 4°C で一晚固定した。固定後、100% PBS から Ethanol 濃度を 25% ~ 70% の間で段階的に洗浄した。洗浄後、70% Ethanol で 4°C 保管した。保管後、Ethanol 濃度を 80 ~ 99.5% の間で段階的に増やしながらか浸透させ、脱水処理を行った。その後キシレンを浸透させて透徹を行い、パラフィンに包埋した。包埋後、滑走式マイクロームを用いて、5  $\mu$ m 厚の切片を作製した。

作製した切片を、キシレン及び 100% Ethanol にそれぞれ浸透させた後、流水で洗浄した。その後、3% 過酸化水素による内在性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った後、Histo VT One を用いて抗原の賦活化処理を行った。賦活化後再度洗浄し、タンパク質系ブロッキング試薬を用いて特異性ブロッキングを行い、一次抗体を浸透させた。一晚静置した後、0.03% Tween/PBS で洗浄し、二次抗体を 30 分間浸透させた。発色基質を標識し、ヘマトキシリン液で洗浄した。洗浄後は 100% Ethanol 及びキシレンにそれぞれ浸透させて脱水し、乾燥させた後にマウントクイックチューブを用いて封入した。

### 3 - 4 . ELISA による定量分析

定量分析には、Human  $\beta$ Amyloid (1-40) ELISA Kit wako 及び Human  $\beta$ Amyloid (1-42) ELISA Kit wako, High Sensitive を使用した。それぞれヒト A $\beta$ 40 及びヒト A $\beta$ 42 の N 末端に特定のモノクローナル抗体である BAN50 が固相化されたプレートにサンプルを一晚浸透させ、検体中のヒト A $\beta$ 40 及びヒト A $\beta$ 42 の N 末端を吸着させた。その後 HRP 標識された BA27 (F(ab')<sub>2</sub> フラグメント) 及び BC05 (Fab' フラグメント) を反応させ、固相化抗体 - 抗原 - 標識抗体のサンドイッチ複合体を形成させた。その後 TMB 溶液を加えて HRP を検出し、吸光度測定 (OD = 450nm) により濃度を測定した。

### 3 - 5 . 血漿成分の次世代シーケンス解析

同マウスより血漿を採取した後に microRNA (miRNA) を抽出・精製し、ライブラリ調整後、次世代シーケンスに供した。RA 摂食の認知機能の低下抑制効果および脳内表現型と相関して有意に上昇あるいは減少している成分を探索した。

## 4 . 研究成果

### 4 - 1 . 認知行動試験

新奇物体認識試験では、野生型マウスは C 群 RA 群共に、認知機能低下は認められなかった。一方 Tg2576 マウスにおいて C 群は、Novel phase における既知物体と新奇物体に対する Exploratory preference には差がなく、認知機能の低下が認められた。また Tg2576 マウスの RA 群では新奇物体に対する Exploratory preference が有意に高かった。以上のことから、Tg2576 マウスにおいては、C 群で認知機能(物体に対する記憶力)が低下し、RA 摂食によりその低下を予防したことが考えられた。

オープンフィールド試験では、Tg2576 マウスの中央における移動距離が、野生型マウスと比較して、C 群では上昇し、RA 群は野生型マウスと同等であった。通常マウスはフィールドの中央部に滞在することに対して不安を感じるため、正常マウスの場合、フィールド中央部よりも周縁部での活動量が多くなる。不安感知能力の低下は、認知力の低下と付随して生じると考えられている。本研究では、Tg2576 マウスの C 群において生じた不安感知能力の低下を RA 摂食により抑制されたことを示している。

### 4 - 2 . 脳切片の免疫組織染色および ELISA による A $\beta$ 蓄積の評価

免疫組織染色では、大脳皮質において C 群にのみ A $\beta$  蓄積が観察されたが、全体として顕著な蓄積は認められなかった。大脳皮質からタンパク質を抽出し、ELISA による定量を行った。A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、および A $\beta$  総量共に有意な差は認められなかったが、RA 群において低値を示す傾向がみられた。

### 4 - 3 . miRNA 解析

次世代シーケンス解析では、AD の病態により発現変動すると考えられた、発現変動率の高かった miRNA が、RA 摂食群では逆相関の変動を示したことから、これら miRNA は RA 摂食の AD 予防効果に伴い変動する miRNA である可能性が考えられた。

### 4 - 4 . まとめ

12 か月間の 0.5% RA 食摂食により、Tg2576 マウスにおいては、認知機能の低下が抑制された。一方 C 群では顕著な A $\beta$  蓄積が認められなかったものの、記憶力の低下が生じていたことから、認知症の初期段階であることが推定された。また、RA の AD 発症遅延効果と伴い変動すると考えられる miRNA を数種同定することが出来た。

## 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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

1) 長谷 知輝, 山下 玲, 宍戸 駿, 豊田 集, 平 修, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 阿部 啓子, 小林 彰子. ロスマリン酸による脳内モノアミン類変動の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018/03/16.

2) 長谷 知輝, 宍戸 駿, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 小林 彰子. ロスマリン酸による脳内モノアミン変動の解析, 日本農芸化学会関東支部 2017 年度大会, 2017/9/2 (優秀発表賞受賞).

3) 長谷 知輝, 山下 玲, 宍戸 駿, 豊田 集, 浜口 毅, 篠原 もえ子, 山田 正仁, 阿部 啓子, 小林 彰子. ロスマリン酸による脳内モノアミン変動の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/03/18.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林彰子 (SHOKO Kobayashi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授.

研究者番号: 90348144