

平成22年 4月 5日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500324
 研究課題名（和文） 内在性神経幹細胞の分化誘導に及ぼす脂肪酸の効果と認知症予防・改善への応用
 研究課題名（英文） Effects of fatty acids on differentiation of neuronal stem cells and the protective and ameliorative effects 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

研究成果の概要（和文）：

- 1) n-3 系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（DHA）とエイコサペンタエン酸（EPA）はラット胎児脳あるいは成体脳の海馬由来の神経幹細胞からニューロンへの分化（Neurogenesis）を促進することを見出し、その作用機序として、これら脂肪酸は神経幹細胞の細胞増殖を抑制しニューロンへの分化を促進することを明らかにした。
- 2) 超軽度認知症の健常高齢者を対象としたヒト介入試験を行い、DHA は加齢に伴う認知機能の低下を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

- 1) Docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, promoted neurogenesis of neuronal stem cells (NSCs) isolated from rat embryos and also adult hippocampus. These n-3 fatty acids induce differentiation by causing cell cycle arrest in NSCs.
- 2) In randomized, double-blind and placebo-controlled trial, preventive effect of DHA supplement for 12 months on cognitive decline rate in elderly people with very mild dementia was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学、脂質栄養学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療、神経幹細胞、n-3系多価不飽和脂肪酸、神経新生、ヒト介入試験

1. 研究開始当初の背景

1) 社会的背景:

我が国では、超高齢化社会の到来に向け認知症の克服は急務であるが、認知症にしろアルツハイマー型認知症の割合は急増しつつあり、その予防・改善物質の探索が国内外で盛んに行なわれている。

魚油成分のドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、アラキドン酸などが認知機能改善物質として市販されているが、アラキドン酸にいたっては、いまだ明確な科学的根拠がないままに、その宣伝効果のみで販路を拡大している。アラキドン酸は生体内炎症反応誘発物質、さらには腫瘍化促進物質としてよく知られているにもかかわらず、脳機能改善物質として認知されようとしている現実がある。そのため、脂肪酸と脳機能に関する早急な科学的実証が必要である。

2) 学術的背景:

ヒト脳は主に脂質とタンパク質からなり、うち脂肪酸の50%はDHAとアラキドン酸で占められる。DHAに関しては、アルツハイマー病患者の脳内量が低下すること、その摂取量とうつ病の発症率や敵意性が負の相関を示す事が明らかにされている。いまや、DHAがヒトの脳機能に深く関与することは明らかになりつつある。

我々は、島根県高齢者を対象とした「認知機能と食事栄養」に関する疫学調査 (横断的調査) をおこない、魚油摂取は認知機能を改善することを見出し、動物実験では、ラットへDHAを投与すると、大脳皮質・海馬のDHA量が増加し空間認知機能が向上することを明らかにしている (Neuroscience 1999など)。脳疾患への応用としては、DHAはアルツハイマー型モデルラットの空間認知機能障害を予防 (J. Neurochemistry 2002) ・改善 (J. Nutrition 2005) することを報告し、その予防・改善効果の機序として、DHAによる脳内抗酸化増強作用 (J. Neurochemistry 2002, 2005) や脳内βアミロイド蛋白の減衰作用 (BBA-Mol. Cell. Lipids 2005) などによる関与を明らかにしている。しかし、その脳内メカニズムはほとんど明らかにされていない。

最近、空間学習能力の向上因子の一つとして、成体海馬の内在性神経幹細胞による神経新生が急速に注目を集めている。海馬は空間学習能力の獲得に必須の部位であることはよく知られている。また胎生期にDHAが不足した動物では、中枢神経の形成不全を起し、生後に学習障害が見られることから、DHAは胎生期における中枢神経の分化に不可欠と考えられる。我々は最近DHAやEPAなどのn-3系多価不

飽和脂肪酸は、1) 胎児神経幹細胞から生じるニューロンへの分化を促進させ、2) 胎児神経幹細胞から分化したニューロンの神経突起伸長を促進させることを見出した。このことは、神経細胞からの神経新生に対してn-3系多価不飽和脂肪酸が強く影響を及ぼすと推察される。

2. 研究の目的

培養系および動物実験系の両面から脂肪酸の神経誘導能力について明らかにし、さらには、これら脂肪酸によるアルツハイマー病の予防・改善物質としての可能性を探ることである。

3. 研究の方法

1) 培養系

1-1) 組織化学による検討

神経幹細胞はラット胎児 (15日齢) 脳内より単離・培養し、培養神経幹細胞の分化は増殖因子を除いた培養液中に各種脂肪酸を添加しその影響を検討した。

本実験系は、主にEriksson (1998) の方法に準じて行った。すなわち免疫組織染色法によって多細胞群よりニューロンを選別し、軸索や樹状突起の長さ、側枝数などの形態的情報を得、一方では未成熟ニューロンマーカーであるTuj1や成熟ニューロンマーカーのMAP2abなどを組み合わせて使用して成熟ニューロンの割合を計測し、解析には画像解析ソフトを使用した。

Eriksson PS., et al. (1998) Nature Med. 4, 1313-1317

単離・培養したNSCsを、bFGF非存在下で培地にドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA)、およびアラキドン酸 (ARA) を添加し (各1 μM)、添加後2、4、7日目のニューロンとアストロサイトへの分化率を算出した。

1-2) 遺伝子解析による検討

本実験では、脂肪酸による神経分化促進効果及び成熟促進効果のメカニズムの一つとして **nerve growth factor (NGF)** ファミリーの関与について解析した。

DHAとEPAを添加6、12、24、96時間後にNSCsからtotal RNAを精製し、RT-PCR法によりmRNA発現量を定量した。測定因子: NSCsの増殖・分化を調節することが知られている塩基性ヘリックスループヘリックス (bHLH) 転写因子 (**neurogenin1**、**NeuroD**、**Hes1**) と、ニューロン特異的なこれら転写因子の標的遺伝子である **MAP2** をも測定した。

1-3) 成体脳由来神経幹細胞による検討

胎児脳から神経幹細胞を単離・培養した技術を駆使して、成体ラットのSGZ領域由来の神経幹細胞の単離・培養系を確立した。

10週齢の雌性ラットを麻酔下で氷冷した生理食塩液を還流したのち脳を摘出して左右海馬を単離し、海馬を細かく刻み、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼを含むリン酸緩衝液に入れ37℃で10分間加温した。ピペッティングにより組織を懸濁後、トリプシンを加えさらに37℃で10分間加温した後、遠心により得られた沈殿をN2培地で懸濁した。懸濁後、細胞数を計数し、 1×10^5 個/mLの濃度でEGFとbFGFを添加したN2培地で培養した。

得られたニューロスフェアを分散後24ウェルプレートに各ウェル 2×10^5 個の細胞を播種した。培地には成長因子を添加せず、0.01%BSA中に懸濁したDHAを添加した。対照群には0.01%BSAを添加し7日間培養した。

2) DHA強化ソーセージによるヒト介入試験

島根県川本町在住の認知症と診断されない平均年齢 73歳の高齢者 108名を対象に、DHAとEPAが規定量 (DHA 850 mg、EPA 200 mg) 含有する魚肉ソーセージを、被験食品、オリーブ油を添加した魚肉ソーセージをプラセボとして、両品を 2つのグループに分けた対象者にそれぞれ 1年間程度摂取させる事による二重盲検並行群間比較試験を実施した。両群それぞれのソーセージは 1日 2本を摂取し、認知機能や記憶力を簡単に測定できる質問形式の MMSE(ミニメンタルステートテスト)や、6課題からなる前頭葉機能検査(FAB)を行い、高齢者の認知機能に及ぼすDHAの影響を検討した。さらには血漿・赤血球膜脂肪酸を測定した。

4. 研究成果

1) 神経幹細胞 (NSCs) の分化誘導に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響

i) NSCs からニューロンへの分化率は、DHA添加後の2日目と7日目と有意に増加し、EPAでは、7日目に有意に増加した。一方、ARA添加による影響は認められなかった。ii) アストロサイトへの分化率は、有意差は認められなかったが、DHA と EPA 添加により減少する傾向がみられた。これらの結果から DHA と EPA は NSCs の neurogenesis を促進することが見出された。

2) DHA、EPA による neurogenesis 促進機序の解明

i) DHA 添加 24、48 時間後、分化抑制性転写因子である Hes1 発現量は有意に低下し、

一方、分化促進性転写因子である NeuroD 発現量は有意に増加した。ii) EPA 添加では、96 時間後の NeuroD および MAP2 の発現量が有意に増加した。

1)、2) の結果から、DHA や EPA が bHLH 転写因子の発現量を変化させ、NSCs の neurogenesis を促進することが見出された。(図1、図2)

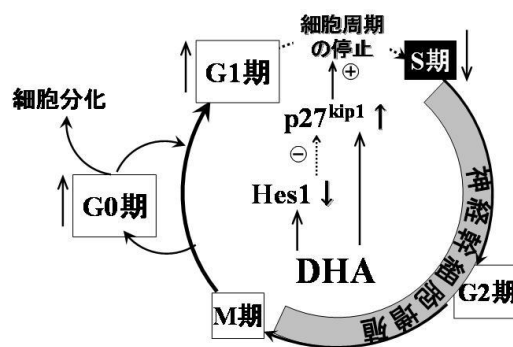


図1 神経幹細胞からニューロンへの分化誘導に対する DHA による促進作用のメカニズム

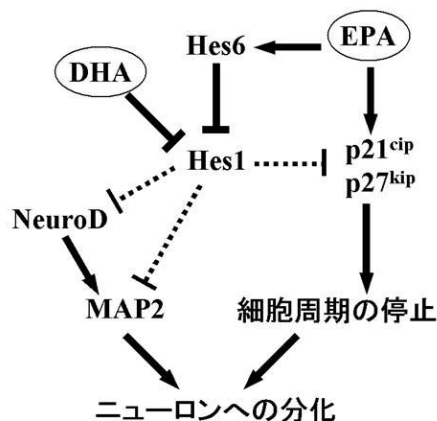


図2 神経幹細胞からニューロンへの分化誘導に対する DHA・EPA による促進作用のメカニズム

3) 成体脳由来神経幹細胞 (NSCs) の培養法の確立と分化誘導に及ぼす多価不飽和脂肪酸の影響

3)-1) 成体脳 NSCs の培養法の確立

成体脳から単離・培養した神経幹細胞を7日間培養すると、胎児脳由来 NSCs の場合と同様に、ニューロスフェアとよばれる神経幹細胞塊が得られた。得られた神経幹細胞のほとんどは、神経幹細胞マーカーの nestin および prominin 陽性細胞であった。

3)-2) NSCs の分化誘導にたいする各種脂肪酸の影響

i) DHA の添加により Tuj-1 陽性細胞が増加

した。ii) 全細胞数 (PI 数) に対する Tuj-1 (ニューロン) 陽性細胞数の割合はニューロンへの分化率し、コントロールと比較して DHA の添加により約 40% Tuj-1 陽性細胞数の割合が増加した。

i)、ii) の結果から、DHA は成体海馬由来神経幹細胞に対してもニューロンへの分化を促進する作用が明らかとなった。

4) DHA 強化ソーセージによる認知症予防効果の検討ーヒト介入試験ー

平成19～20年の基礎研究、さらには過去の我々の研究成果から、加齢に伴う認知機能低下に対するDHAの予防効果が推察されたので、65歳以上の在宅健常高齢者を対象としたヒト介入試験を行った。

DHA 強化ソーセージ摂取群の血漿・赤血球膜 DHA・EPA 量は増加した。認知機能評価として行った MMSE と FAB のうち、重なった五角形を模写させる MMSE-12 が 摂取 6 ヶ月後で改善傾向となり、12 ヶ月後では有意な改善が認められた (図 3)。

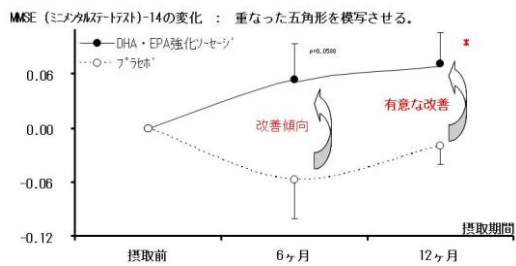


図 3 MMSE-12 の変化

また、ルールを決めて指運動をやってもらう FAB-4 は 6 ヶ月で有意に改善され、運動プログラムや短期記憶の低下が抑えられたことが示唆された。一年間の赤血球膜 DHA の変化量と FAB-4 スコアの変化値との間には有意な相関が認められた (図 4)。

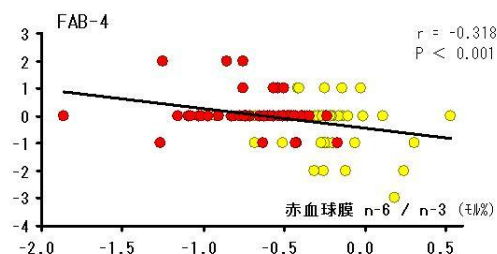


図 4 赤血球膜 DHA 変化量と FAB-4 変化値との相関

今回の解析から、短期記憶や運動能力、模写などに関連する加齢に伴う認知機能の低下が DHA・EPA 強化ソーセージの摂取によって抑制されることが明らかとなり、DHA によ

る認知症予防効果が示唆された。

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 37 件)

① Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Shahdat Hossain, Azizur Rahman, Toshio Shimada, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid withstands the A β_{25-35} -induced neurotoxicity in SH-S5Y5 cells. Journal of Nutrition Biochemistry (2010) in press. 査読あり

② Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Shuji Gamoh, Koji Miwa, Toshio Shimada, Osamu Shido. Effects of docosahexaenoic acid on in vitro amyloid β peptide $_{25-35}$ fibrillation. Biochimica et Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids. 1791: 289-296, 2009. 査読あり

③ Masanori Katakura, Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Shuji Gamoh, Toshiyuki Okui, Kentaro Matsuzaki, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid promotes neuronal differentiation by regulating basic helix-loop-helix transcription factors and cell cycle in neural stem cells. Neuroscience 160:651-60, 2009. 査読あり

④ Shahdat Hossain, Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Koji Miwa, Toshio Shimada, Osamu Shido. Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro amyloid β_{1-42} fibrillation and amyloid β_{1-42} -induced toxicity in SH-S5Y5 cells. Journal of Neurochemistry 111:568-579, 2009. 査読あり

⑤ Michio Hashimoto, Shahdat Hossain, Yoko Tanabe, Akiko Kawashima, Tsuyoshi Harada, Takashi Yano, Kiyoshi Mizuguchi, Osamu Shido. The protective effect of dietary eicosapentaenoic acid on the impairment of spatial cognition learning ability in rats infused with amyloid $\beta_{(1-40)}$. Journal of Nutritional Biochemistry 20:965-973, 2009. 査読あり

⑥ 橋本道男、総説：多価不飽和脂肪酸と疾患 2 中枢神経系、治療学 43、838-844、2009. 査読あり

⑦ Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Shinji Yamashita, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Hironori Fujiwara, Shuji Gamoh, Teruo Miyazawa, Noriyuki Arai, Toshio Shimada, Osamu Shido. DHA disrupts in vitro amyloid β_{1-40} fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in

cerebral cortex tissue of Alzheimer's disease model rats. Journal of Neurochemistry 107:1634-1646, 2008. 査読あり

⑧橋本道男、山下一也、総説：食事で防ぐ認知症、最新精神医学 13、75-82、2008. 査読あり

⑨橋本道男、蒲生修治、片倉賢紀、Hossain Shahdat、総説： ω 3 多価不飽和脂肪酸と中枢神経疾患、The Lipid 19(4)、409-419、2008. 査読あり

⑩橋本道男、総説：アルツハイマー病と食事栄養-とくに銅・亜鉛とドコサヘキサエン酸、Trace Nutrients Research 25:8-18、2008. 査読あり

〔学会発表〕(計 88 件)

①橋本道男、ホサイン・シャハダト、片倉賢紀(シンポジウム)、n-3 系脂肪酸によるアルツハイマー型認知症予防・改善効果、第 83 回日本薬理学会年会シンポジウム、2010 年 3 月 17 日、大阪

②橋本道男、ホサイン・シャハダト、片倉賢紀、ドコサヘキサエン酸(DHA)と認知・記憶機能-認知症への介入試験の科学的根拠と作用メカニズム、第 13 回日本病態栄養学会年次学術集会ワークショップ、2010 年 1 月 10 日、京都

③橋本道男(招待講演)、脳機能賦活物質としてのドコサヘキサエン酸の魅力-島根疫学研究と基礎実験データから、第 8 回ホスファチジルセリン研究会、2009 年 11 月 20 日、東京

④橋本道男(招待講演)、DHA による脳・神経機能の維持、DHA・EPA 協議会主催 第 11 回公開講演会「DHA・EPA による疾病予防」、2009 年 10 月 27 日、東京

⑤ Masanori Katakura, Michio Hashimoto, Hossain M Shahdat, Shuji Gamoh, Toshiyuki Okui and Osamu Shido, Docosahexaenoic acid controls the expression of Hes1 and p27 on the neural stem cell differentiation 神経幹細胞における Hes1 と p27 発現量のドコサヘキサエン酸による調節、第 32 回日本神経科学会、2009 年 9 月 16 日、名古屋

⑥奥井俊之、橋本道男、片倉賢紀、紫藤 治、神経幹細胞のニューロン分化に及ぼす 9-cis, 11-trans-共役リノール酸の影響、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑦片倉賢紀、橋本道男、奥井俊之、紫藤 治、神経幹細胞のニューロンへの分化にともなう Hes1 と p27 の発現量の変化に及ぼすドコサヘキサエン酸の影響、日本脂質栄養学会第 18 回大会、2009 年 9 月 4 日、東京

⑧ Masanori Katakura, Michio Hashimoto, Shuji Gamoh, Toshiyuki Okui, Kentaro

Matsuzaki, Osamu Shido. Effect of polyunsaturated fatty acids on the cell cycle and the expression of bHLH transcriptional factors in neural stem cells. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, July 27-August 1(30), 2009.

⑨ Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Toshio Shimada, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid improves behavioral impairment in amyloid β (A β)-infused rats, by decreasing both *in vitro* A β fibrillation and A β levels in the brain. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, July 27-August 1(1), 2009.

⑩ Michio Hashimoto, Hossain Md. Shahdat, Masanori Katakura, Osamu Shido. Inhibiting effect of docosahexaenoic acid on the amyloid beta peptide fibrillation. 2009 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), Vienna, Austria, July 11-16(14), 2009.

⑪ Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Shuji Gamoh, Osamu Shido. Docosahexaenoic acid attenuates *in vitro* A β fibrillation with concomitant decreases of A β peptide levels in brain of AD model rats. 9th International Conference AD/PD 2009, Prague, Czech Republic, March 11-15, 2009

⑫橋本道男(特別講演)、ドコサヘキサエン酸(DHA)と脳機能-基礎研究から臨床応用に向けて、日本脂質栄養学会第 17 回大会サテライトシンポジウム「脳機能・行動・神経症に影響を与える脂質栄養」2008 年 9 月 7 日(大阪)

⑬Shahdat Hossain, Shuji Gamoh, Masanori Katakura, Michio Hashimoto. The role of docosahexaenoic acid for the constitution, function and maintenance of central nervous system. 第 31 回日本神経科学会大会シンポジウム、2008 年 7 月 9 日、東京

⑭橋本道男(特別講演)、食事で防ぐ認知症、日本食品保蔵科学会第 57 大会市民セミナー、2008 年 6 月 21-22 日(21)、松江市

⑮橋本道男(招待講演)、魚油成分(DHA・EPA)による認知症予防・改善効果、第 25 回日本微量栄養素学会学術集会、2008 年 5 月 30 日、京都

⑯橋本道男(特別講演)、認知症と食事栄養、第 3 回山陰高齢医学研究会、2008 年 4 月 25 日、松江

⑰片倉賢紀、橋本道男、蒲生修治、奥井俊之、紫藤 治、多価不飽和脂肪酸による神経幹細胞

胞の増殖・分化の変化、第 85 回日本生理学会大会、2008 年 3 月 25-27 日、東京

⑱橋本道男 (シンポジスト) n-3 系脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と認知症予防・改善効果、日本脂質栄養学会第 16 回大会シンポジウム、2007 年 8 月 31 日、出雲市

⑲橋本道男 (基調講演) DHA による認知症の改善、第 8 回全国エゴマサミット、2007、5 月 23-24 日、庄原

⑳橋本道男、片倉賢紀、田邊洋子、ホサイン・シャハダト、蒲生修治、宮澤陽夫、荒井啓行、紫藤 治、n-3 系脂肪酸と認知症、第 80 回日本薬理学会年会シンポジウム、2007、3 月 15 日、名古屋

㉑ Michio Hashimoto, Kazuya Yamashita, Masanori Katakura, Yuri Iyama, Ichie Matsumoto, Ayako Matsuoka, Osamu Shido, Setsushi Kato, Akira Ueki. FISH OIL CONSUMPTION AND COGNITIVE FUNCTION IN ELDERLY PEOPLE: FROM SHIMANE COHORT STUDY IN JAPAN. 8th International Conference AD/PD 2007, Salzburg, Austria, March 14-18, 2007

㉒ Michio Hashimoto, Hossain Md Shahdat, Shinji Yamashita, Masanori Katakura, Yoko Tanabe, Hironori Fujiwara, Shuji Gamoh, Teruo Miyazawa, Noriyuki Arai, Osamu Shido. MECHANISMS OF DIETARY DOCOSAHEXAENOIC ACID-INDUCED PROTECTION AND AMELIORATION ON IMPAIRMENT OF MEMORY LEARNING IN ALZHEIMER'S DISEASE MODEL RATS. 8th International Conference AD/PD 2007, Salzburg, Austria, March 14-18, 2007

㉓ Michio Hashimoto, Masanori Katakura, Eisuke Kawakita, Toshiyuki Okui, Shuji Gamoh, Haque Md Abdul, Budbazar Enkhjargal, Osamu Shido. PROMOTION OF NEUROGENESIS BY DOCOSAHEXAENOIC ACID IN VIVO AND IN VITRO. 8th International Conference AD/PD 2007, Salzburg, Austria, March 14-18, 2007

[図書] (計 2 件)

①Shuji Gamoh, Shahdat Md Hossain, Michio Hashimoto. Current opinions regarding fish oils remedies in the near future. In: Fish Oils and Health, Editor: E.P. Heikkinen, pp.87-115, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

DHA 強化ソーセージによるヒト試験に関する

インターネット・新聞報道

- 1) 中国新聞 2010 年 3 月 1 日
- 2) 水産タイムス 2010 年 2 月 4 日
- 3) 日刊水産通信 2010 年 2 月 4 日
- 4) 山陰中央新報 2010 年 2 月 3 日朝刊
- 5) みなと新聞 2010 年 2 月 3 日
- 6) 毎日新聞 2010 年 2 月 3 日夕刊第 2 面、朝刊第 3 面
- 7) ヤフー トップニュース 2010 年 2 月 3 日

青魚と認知症予防について

NHK 総合テレビ 2010 年 3 月 29 日「ゆうどきネットワーク」(16:55~18:00、全国放送)で放映

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

(3) 連携研究者

山下 一也 (YAMASHITA KAZUYA)

島根県立大学・短期大学部・教授

研究者番号：30210412