

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11593

研究課題名（和文）アミロイド 凝集における糖化ストレスと睡眠・メラトニンの関与

研究課題名（英文）Involvement of glycation stress, sleep and melatonin in amyloid beta aggregation

研究代表者

米井 嘉一（Yonei, Yoshikazu）

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40191655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではアルツハイマー病（AD）のリスク因子である糖化ストレスと「睡眠の質」低下とアミロイド（A）クリアランスとの関連性について、健診受診者69例の臨床研究では血漿A_{40/42}比を、実験では初代ミクログリア培養細胞のA 貪食能を指標とした解析を行った。重回帰分析ではA_{40/42}比を高める因子として動脈硬化と糖化ストレスが抽出され、「睡眠の質」低下者のA_{40/42}比は他の群に比べ有意に高かった。A 貪食能はメラトニン添加により促進され、糖化A_{40/42}に対し著明に低下した。AD進展予防には糖化ストレス対策と「睡眠の質」向上によるA_{40/42}クリアランスの恒常性維持が重要と推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路の広範な破壊を伴うADについては、治療による機能回復が困難であるため、発症後の治療よりも発症・進展予防に重点を置いた方が、患者にとって社会的意義はより大きいと思われる。今回の研究結果より、「睡眠の質」低下と糖化ストレスがA_{40/42}クリアランスを低下させる因子であることが示唆された。「睡眠の質」向上に伴い分泌が増加するメラトニンは終末糖化産物（AGEs）分解促進作用などの抗糖化ストレス作用を有する。ADの予防戦略については、「睡眠の質」改善と糖化ストレス対策を主軸に置いた、早期からの生活習慣改善によりA_{40/42}の糖化予防とA_{40/42}クリアランスの恒常性を維持する方向にパラダイムシフトすべきと考える。

研究成果の概要（英文）：We measured the plasma amyloid- (A) 40/42 ratio in 69 subjects undergoing health checkups and, in experiments, evaluated the A phagocytosis using the primary cultured microglia to analyze the relationship between Alzheimer's disease (AD) risk factors (glycative stress and "poor sleep quality") and A clearance. Multiple regression analysis identified atherosclerosis and glycative stress (skin autofluorescence measured by AGE Reader) as factors that increase the objective variable A 40/42 ratio, and A 40/42 ratio was significantly higher in those with "poor sleep quality" than in the others. Experimentally, A phagocytosis was enhanced by melatonin (an indicator hormone for sleep quality) and markedly decreased in response to glycated A (methylglyoxal- or acrolein-conjugated types). In conclusions, it is assumed that the maintenance of A clearance homeostasis by countermeasures against glycative stress and "high sleep quality" is important to prevent the progression of AD.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：アルツハイマー型認知症 アミロイド（A）貪食 ミクログリア 糖化ストレス 睡眠の質 メチルグリオキサール アクロレイン メラトニン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々の研究室では糖化ストレス (AGEs/RAGE 系) の実験的研究と睡眠・メラトニン分泌に関する臨床研究を行ってきた。糖化反応は還元糖と蛋白の非酵素的かつ不可逆的反応であり、最終的に終末糖化産物 (AGEs) が生成される。老廃物としての AGEs 蓄積、蛋白 AGEs 化による生体への直接的障害、RAGE (Receptor for AGEs) を介した炎症の惹起などの機序により、糖尿病合併症や加齢関連疾患に深く関与する。これらを総合したものが糖化ストレスの概念である。

近年増加傾向にある糖尿病は糖化ストレスが強い疾病の代表であり、認知症の危険因子となっている。我々の研究室では、皮膚に蓄積する AGEs は加齢に伴って増加し、睡眠不足が AGEs 蓄積量を増悪させることを報告してきた。しかしアルツハイマー型認知症 (AD) では、アミロイド β ($A\beta$) のクリアランス低下が重要な役割を果たすが、糖化ストレスや睡眠との関連については不明な点が多い。また、マクロファージやミクログリアの $A\beta$ 貪食に及ぼす糖化ストレスと睡眠の影響についても不明である。

(2) 我々は「睡眠の質」と糖化ストレスをつなぐ因子としてメラトニンに注目し、メラトニン分泌の評価指標として尿中メラトニン代謝産物定量が適していること、メラトニンが AGEs 分解を促進すること、睡眠前にメラトニン経口摂取することより翌朝の食後高血糖が有意に緩和することを報告してきた。メラトニンの AGEs 生成・分解・排出機構に対する作用機序や睡眠障害に伴う糖代謝異常の発症機序を解明することは、AGEs が原因となる様々な疾患の発症予防への新たなアプローチとして期待される。また、AD における $A\beta$ クリアランスの指標として血漿中 $A\beta_{40/42}$ が提唱されているが、年齢推移や「睡眠の質」との関連については情報が無い。

2. 研究の目的

$A\beta$ は AD の発症や進行に重要な役割を果たす一方で、その生理的な役割は不明である。 $A\beta$ の重合は、神経毒性の増強、難分解性化、脳への沈着をきたし、その結果 $A\beta$ クリアランスが減少する。糖尿病や「睡眠の質」低下は、AD の危険因子とされている。脂質を多く含有する脳では脂質の酸化により脂肪酸由来アルデヒド (アクロレイン、メチルグリオキサール[MGO] など) が生成されやすく、AD 患者脳では MGO 結合型蛋白の沈着が認められる。AD の進展予防のためには $A\beta$ クリアランスの恒常性維持が重要であるが、糖化ストレスや「睡眠の質」低下は $A\beta$ クリアランスに大きな影響を及ぼす可能性がある。進行した AD は神経ネットワークの広範な破壊を伴うことから治療による機能回復は困難と言わざるを得ず、AD の発症および進展をできるだけ予防することの意義は大きいと思われる。そこで我々は、 $A\beta$ クリアランスが糖化ストレスならびに「睡眠の質」がどのように影響するか解明することを目的として、臨床研究と基礎実験の両面から研究を進める計画をたてた。

臨床研究では $A\beta$ クリアランス指標として血漿 $A\beta_{40/42}$ を測定し、年齢推移、糖化ストレスの影響、「睡眠の質」の影響を解析することを目的とした。

基礎実験では、 $A\beta$ クリアランスに関与するミクログリア $A\beta$ 貪食に着目し、糖化ストレスの影響、「睡眠の質」の影響を解析することを目的とした。「睡眠の質」の指標としてメラトニンをを用いた。その理由として、メラトニンは抗酸化作用ならびに AGEs 分解促進作用、糖脂質代謝の改善作用を有しており、ヒトにおいて「睡眠の質」との関連がもっとも深いからである。

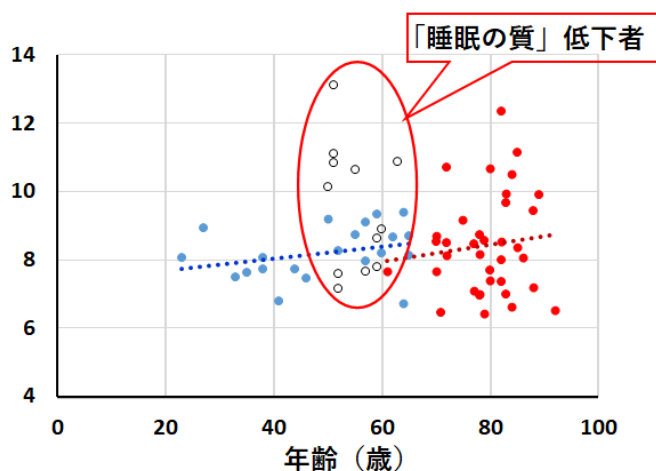
3. 研究の方法

(1) 【臨床研究】対象は、アンチエイジング健診を受診した大学教職員 21 名 (男性 18 名、女性 3 名、 49.3 ± 12.9 歳) および京都市下京区有隣地区在住の自立高齢者 36 名 (男性 16 名、女性 20 名、 79.3 ± 6.4 歳)、「睡眠の質」低下と軽度肥満を伴う中年男女 12 名 (男性 4 名、女性 8 名、 55.0 ± 4.4 歳) を対象とし、血漿 $A\beta_{40/42}$ 比を測定した。健診受診者については血管年齢を指尖加速度脈にて、糖化ストレスは AGE Reader にて測定した皮膚 AGEs 蛍光強度で評価し、 $A\beta_{40/42}$ 比を目的変数とする重回帰分析を施行した。本研究は同志社大学または一般社団法人糖化ストレス研究会の倫理審査の承認を得て実施した。

(2) 【基礎実験】細胞実験にはマクロファージ継代培養細胞 RAW264.7 (ATCC® TIB-71TM) ならびにラット由来初代ミクログリア細胞 (コスモバイオ) を用いた。ミクログリア使用時には、マクロファージ接着防止コーティング剤でコーティングした器材を用いて、余計な付着を防ぐ施策を講じた。 $A\beta$ として $A\beta$ (Human, 1-40、ペプチド研究所) および蛍光標識 $A\beta$ (TAMRA- $A\beta$ 、コスモバイオ) を用いた。 $A\beta$ を MGO またはアクロレイン (各 $1 \mu\text{M}$ 10mM 、1 昼夜) と反応させて作成した。メラトニンは培養液中最終濃度が $100 \mu\text{M}$ になるように添加した。細胞播種後 2 日目から 4 日間 $A\beta$ (対照、無処置 $A\beta$ 、糖化 $A\beta$) を培地に添加 (終濃度 $1 \mu\text{M}$)、その後 8 日目まで $A\beta$ 貪食を位相差顕微鏡または蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光標識 $A\beta$ を用いたミクログリア貪食能は、 $A\beta$ を取り込んだ細胞の蛍光強度の画像解析を行って評価した。

4. 研究成果

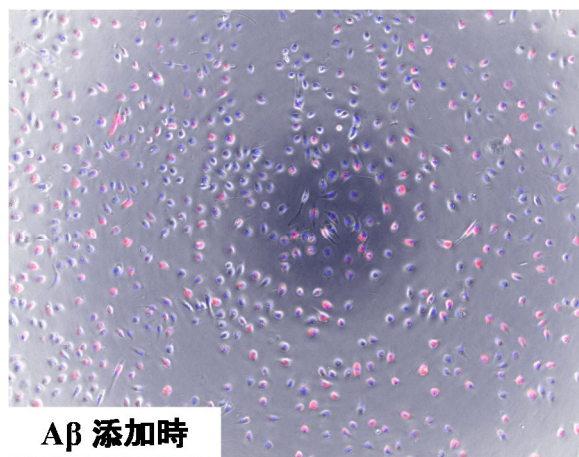
(1)【臨床研究】血漿 A β 40/42 比は加齢に伴い徐々に増加する傾向がみられ、アンチエイジング健診を受診した 37 名を重回帰分析にて解析した結果、血漿 A β 40/42 比を高める因子として血管年齢と糖化ストレスが抽出された。このうち大学教職員 21 名の重回帰分析では血漿 A β 40/42 比を高める因子として生活習慣スコアが抽出され、特に睡眠不足の影響が大きいと考察された。また、「睡眠の質」低下者 12 名とアンチエイジング健診受診者 37 名を比較した結果、「睡眠の質」低下者の血漿 A β 40/42 比が有意に高かった。血漿 A β 40/42 比高値者は A β クリアランスが低く認知症リスクが高いことが知られており、今回の結果で示された血管年齢（動脈硬化）、糖化ストレス、睡眠の質低下は認知症のリスク要因になっていることが示唆される。



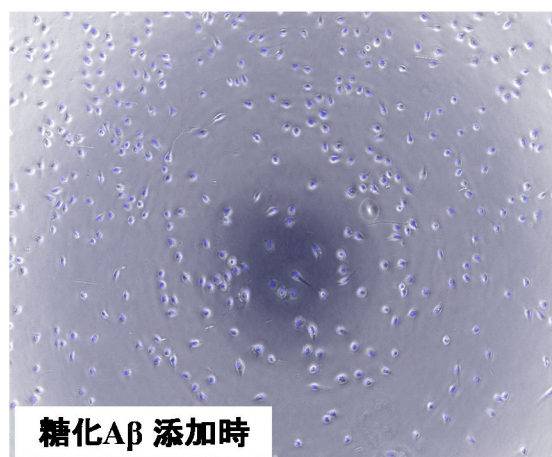
血漿 A β 40/42 の年齢推移：大学教職員（青丸）、自立高齢者（赤丸）、「睡眠の質」低下者（○）

(2)【基礎実験】A β 貪食能を評価する上で、RAW264.7 と初代マイクログリア細胞を比較すると、RAW264.7 の方が A β 貪食能は明らかに低い。継代回数が増えるに従って細胞内 AGEs 蓄積量が増加して、細胞機能が低下した可能性が考えられる。また蛍光標識 A β と無標識 A β を比較すると、無標識 A β を用いた実験系では定量評価が困難であった。

初代マイクログリア細胞を用いた実験系では、糖化 A β に対する貪食能は著しく低下していた。メラトニン添加は無処置 A β に対する貪食能は顕著に促進したが、糖化 A β 貪食能に対しては、実験条件の範囲内で、有意な影響はなかった。培養マイクログリアの自然死は、A β 添加時の方が無添加時よりも少なく、A β がグリアプロテクションとして作用した可能性があるが、本件に関しては今後の検証が必要である。糖化ストレスにより A β クリアランスが低下することが知られているが、その機序としてマイクログリアによる A β 貪食低下の関与が示唆された。



A β 添加時



糖化A β 添加時

蛍光顕微鏡像：赤く染まった細胞は A β 貪食したマイクログリア。糖化 A β 貪食は著明に減少。

(3) 進行した AD は神経ネットワークの広範な破壊を伴うことから治療による機能回復は困難と言わざるを得ず、AD の発症および進展をできるだけ予防することの意義は大きいと思われる。今回の臨床研究と基礎実験から、糖化ストレスと「睡眠の質」低下が A β クリアランス低下を惹起する重要な因子であることが示された。メラトニンが「睡眠の質」向上に伴い分泌が

増加するホルモンであることから、従来の A β 除去に主眼を置く治療よりも、糖化ストレス対策と「睡眠の質」向上により A β の糖化修飾を予防することが、AD の進展予防に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yonei Y, Taira T, Otaka S, Sekiguchi S, Mamun-or-Rashid ANM, Yagi M, Masuzaki H.	4. 巻 9(3)
2. 論文標題 Amyloid beta clearance and microglia: Effects of glycative stress and melatonin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 135-145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24659/gsr.9.3_135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yonei Y, Yagi M, Mamun-or-Rashid ANM, Sato K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Glycative Stress and the progression of Alzheimer-type Dementia: From the Perspective of Amyloid-beta Clearance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 3374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18103/mra.v10i12.3374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mamun-Or-Rashid A. N. M., Lucy Tanzima Tarannum, Yagi Masayuki, Yonei Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibitory Effects of Astaxanthin on CML-HSA-Induced Inflammatory and RANKL-Induced Osteoclastogenic Gene Expression in RAW 264.7 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 54 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10010054	査読の有無 無
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 Lucy Tanzima Tarannum, Mamun-Or-Rashid A. N. M., Yagi Masayuki, Yonei Yoshikazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Serial Passaging of RAW 264.7 Cells Modulates Intracellular AGE Formation and Downregulates RANKL-Induced In Vitro Osteoclastogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2371 ~ 2371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042371	査読の有無 無
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 Meno M, Yokota S, Hashimoto M, Yagi M, Yonei Y.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Plasma amyloid 40/42 ratio and its characteristics.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 62-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24659/gsr.8.2_62	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Haasbroek K, Yagi M, Ando M, Nonomura T, Shimura Y, Yonei Y.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Effects of mats with "A Distinctive 4-Layer 3-Dimensional Structure" on sleep quality and gut microbiota: A non-controlled open-label study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 73-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24659/gsr.8.2_73	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukushima M, Uenaka S, Yagi M, Takabe W, Yonei Y.	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Effect of the newly developed articulatory panels (Aural Sonic):A pilot clinical trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 123-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24659/gsr.7.2_123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yonei Y, Yagi M, Meno M.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Anti-aging medical checkup and its evidence.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ningen Dock International	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11320/ningendockitn.8.1_3	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米井嘉一
2. 発表標題 糖化ストレスからみた認知症対策
3. 学会等名 第25回糖化ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米井 嘉一、八木 雅之、ANM Mamun-or-Rashid
2. 発表標題 ミクログリアamyloid 食食能と糖化ストレス
3. 学会等名 第32回日本メイラード学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米井嘉一、川端万葉、横田早貴、橋本美帆、八木雅之.
2. 発表標題 アンチエイジング健診データからみた血漿A 40/42 比の意義.
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------