

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19666

研究課題名(和文)慢性脳低血流がアルツハイマー病に及ぼす影響と抗酸化機能食品による保護的効果の検討

研究課題名(英文)The Effect of Chronic Cerebral Hypoperfusion on Alzheimer's Disease and the Protective Effects of Antioxidant Functional Foods.

研究代表者

福井 裕介(FUKUI, Yusuke)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60824802

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):本研究は、慢性脳血流低下による酸化ストレスから認知機能障害へ至る経路について経時的解析を行い、アルツハイマー病(AD)の新たな予防法・治療法開発の可能性について検討した。ameriod constrictorsをADモデルマウス(APP23)の総頸動脈に装着し、約1ヶ月をかけた40%程度脳血流量を低下させた慢性脳低灌流モデルマウスを作成した。APP23マウスは脳血流量低下により通常よりも早い空間認知機能および血中酸化ストレス度の増悪を認めたが、このような悪化がプラズマローゲンの投与(APP23+CCH+Plasマウス)により改善されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果は、プラズマローゲンの継続的な摂取が血中および脳内の酸化ストレスを軽減し、脳内の炎症を抑制することで脳血流低下によるアミロイドの蓄積および認知機能低下を緩和する可能性を示した。サプリメントなどによるホヤ由来プラズマローゲンの日常的な摂取が体内の抗酸化に働き、脳保護的な役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, we analyzed the pathway from oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion to cognitive dysfunction, and investigated the possibility of developing new preventive and therapeutic methods for Alzheimer's disease (AD). The ameriod constrictors were placed in the common carotid artery of AD model mice (APP23), and cerebral blood flow was reduced by 40% over a period of about 1 month. APP23 mice showed faster than normal spatial cognitive function and deterioration of blood oxidative stress levels due to reduced cerebral blood flow, but these deteriorations were ameliorated by plasmalogene administration (APP23+CCH+Plas mice).

研究分野：神経病態学

キーワード：アルツハイマー病 慢性脳低灌流 プラズマローゲン

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えている本邦では、認知症患者数は2025年には700万人を超えることが予想されており極めて重要な社会問題となっているが、認知症の発症機序は未だ不明のままであり、根本的治療法はない。しかし、近年、認知症の約60%を占めるアルツハイマー病(AD)において、早期段階から脳血流低下が確認され、病態の進行と相関していること(Iturria-Medina Y et al., Net Commu. 2016)、生活習慣と密接に関連した血管障害リスク因子の管理が認知機能障害を有意に抑制することが報告されており(Deschaintre Y et al., Neurology. 2009)、新しいAD治療の手がかりとして脳血流と認知機能低下をつなぐメカニズムの解明が期待されている。そこで申請者らは、慢性的な脳血流低下がADの病態進行に与える影響について検討を行ってきた。その結果、申請者らは、

- AD患者の約90%の脳内に慢性的な脳血流低下に伴う慢性脳虚血性変化を認め、その重症化に伴い認知機能が低下していること
- ADモデルマウスの脳血流量を低下させるとAD病理の原因であるアミロイド(A $\beta$ )の凝集を加速させること

を明らかにした。さらにこの後の動物実験により、このような慢性脳血流低下を伴うAD病理の進展は、有害なフリーラジカルを除去し、脳を酸化障害から保護する薬剤であるエダラボン投与により抑制されることを明らかにしている。これらの結果は、脳血流低下による酸化ストレスが認知機能低下やAD病態の進行をもたらす過程に深く関与していることを強く示唆するものであった。そこで申請者は、「脳血流低下に伴う酸化ストレスの亢進がADの発症・進行にどのように関与するのか？」を本研究課題の核心をなす学術的「問い」として設定した。具体的には以下の3点を明らかにする。

## 2. 研究の目的

脳血流低下に伴う酸化ストレスの亢進がADの発症・進行にどのように関与するのかということ明らかにするために本研究では、慢性脳低灌流モデルマウスおよび慢性脳低灌流を呈するADモデルマウスを作成し、酸化ストレスが認知機能障害に与える経時的影響について精査することで認知機能障害およびAD病理の進展を導く分子機序を明らかにし、根本的なAD発症機構に迫る事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) 慢性脳低灌流モデルマウスの作成と酸化ストレス解析

これまでの慢性脳低灌流モデルマウスは、手術直後から急激な脳血流低下を起こし、臨床病態との違いが指摘されていた。そこで、吸水膨張とともにリング内腔が狭まる ameriod constrictors (Research Instruments NW)を野生型マウスの総頸動脈に装着し、約1ヶ月をかけ40%程度脳血流量を低下させた慢性脳低灌流モデルマウスを作成する。上記マウスの脳血流をレイザードップラーを用いて測定し、酸化ストレス関連タンパク質(DNA酸化損傷:8-OHdG, 脂質過酸化:4-HNE, 糖酸化産物:CML)とその関係シグナルを免疫組織化学染色により解析し、酸化ストレスの変動と影響について明らかにする。

#### 慢性脳低灌流モデルマウスの認知機能解析

8方向放射状迷路試験を用いて上記マウスの空間作業記憶・空間参照記憶の経時的変化について解析する。さらにRotarodを用いて運動学習と協調運動を評価し、慢性脳低灌流と認知能および学習能の関連性について評価する。

### 2) 慢性脳低灌流を負荷したADモデルマウスの作成と酸化ストレス・認知機能解析

外因性変異アミロイド前駆体タンパク質(APP)過剰発現に基づくADモデルマウスは数多く存在するが、本研究では脳実質へのA $\beta$ 蓄積に加え脳アミロイド血管障害を発症することが確認されているAPP23マウスを使用する。このAPP23マウスに慢性脳低灌流を負荷し、上記と同様の解析を行う。

#### 慢性脳低灌流を負荷したADモデルマウスのAD病理解析

酸化ストレスと炎症は、A $\beta$ の産生や凝集に関連していると言われている(Nunomura A et al., J Neuropathol Exp Neurol. 2012, Liu Z et al., Oxid Med Cell Longev. 2015)。そこで、AD病理形成に関わる因子(A $\beta$ オリゴマー, A $\beta$ 40)と炎症性マーカータンパク質(GFAP, Iba-1, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )、の変化を免疫組織化学により解析し、その関係性について精査する。

### 3) 高機能食品成分投与による酸化ストレスおよびAD発症抑制効果の検討

抗酸化・抗炎症作用を持つ高機能食品成分イミダゾールジペプチド(プラズマローゲン)

を2種類の上記モデルマウスとその対照群に混水投与し、同様の解析を行う。これらの結果から慢性脳低灌流による酸化ストレスが認知機能低下、AD病理の進展をもたらす分子機序を精査し、栄養によるAD予防の可能性を明らかにする。さらにプラズマローゲンの抗酸化・抗炎症作用の汎用性を調べるためにその病態に強い酸化ストレス発現が関与している一過性脳虚血モデルマウスを作成し、プラズマローゲンを腹腔内投与した。

#### 4. 研究成果

12ヶ月齢における野生型マウスとAPP23マウスの脳血流量はAPP23マウスに減少傾向がみられるものの有意差は認めなかった。しかし、ameriod constrictorsを装着したAPP23マウス（APP23+CCHマウス）は当初の狙い通り約40%の血流量の低下を呈し、このマウスにプラズマローゲンを投与した群（APP23+CCH+sPlasマウス）では血流量の有意な改善を認めた。これはAD病理進展による血流低下に対し、プラズマローゲンが保護的に働いたと考えられる。

通常APP23マウスは16ヶ月齢程度での認知機能低下を呈することが知られており、本研究においても12ヶ月齢の時点で8方向放射状迷路試験とRotarodでは野生型マウスとAPP23マウスに有意差は見られなかった。それに対し、APP23+CCHマウス群はAPP23マウス群に比べ有意に増悪化し、APP23+CCH+sPlasマウス群ではAPP23マウス群と同程度まで回復していた。プラズマローゲンの継続的な投与が空間作業記憶および協調運動を改善したと考えられる。

Fig.1

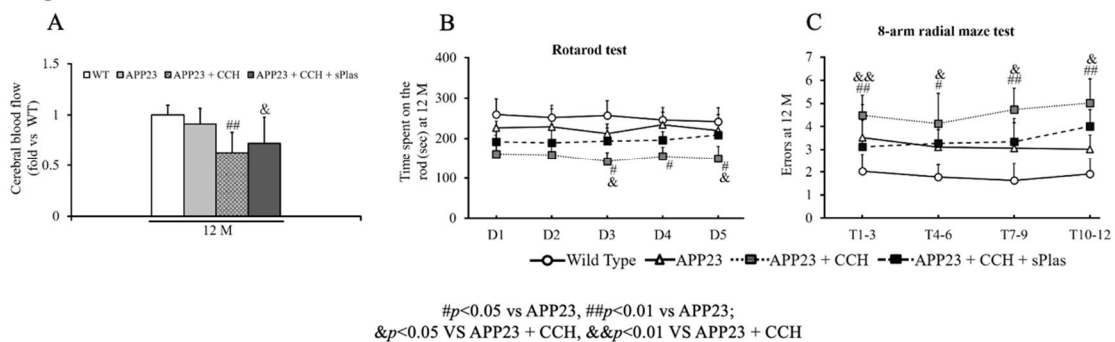


Fig.1 プラズマローゲンは慢性脳低灌流を荷した APP23 マウスの(A)脳血流、(B)協調運動および(C)空間作業記憶を改善する。

AD病理に特徴的なAオリゴマーおよびA<sub>40</sub>の蓄積は、APP23群に比べAPP23+CCHマウス群では海馬および皮質において有意に上昇し、APP23+CCH+sPlasマウス群では有意に抑制されていた。これらA<sub>40</sub>に対する炎症反応を精査するために炎症性マーカータンパク質(GFAP, Iba-1, TNF, IL-1)の変化を免疫組織化学により解析した。APP23+CCHマウス群ではAPP23マウス群に比べアストロサイトおよびミクログリアの活性化が見られ、プラズマローゲンの投与によりそれらが抑制されていた。同様にAPP23+CCHマウス群ではAPP23マウス群に比べサイトカインネットワークの異常亢進が見られ、プラズマローゲンの投与によりそれらが抑制されていた。また、プラズマローゲンはその構造から強い抗酸化作用を示すことがわかっており、APP23+CCHマウス群の皮質および海馬の脂質過酸化を初期の段階から抑制した。このようなプラズマローゲンの作用は一時的に強い酸化ストレスの発現が確認されている一過性脳虚血モデルマウスでも血中の酸化ストレスを抑制し、脳内において強い抗炎症・抗酸化作用を示すことが確認された。

Fig. 2

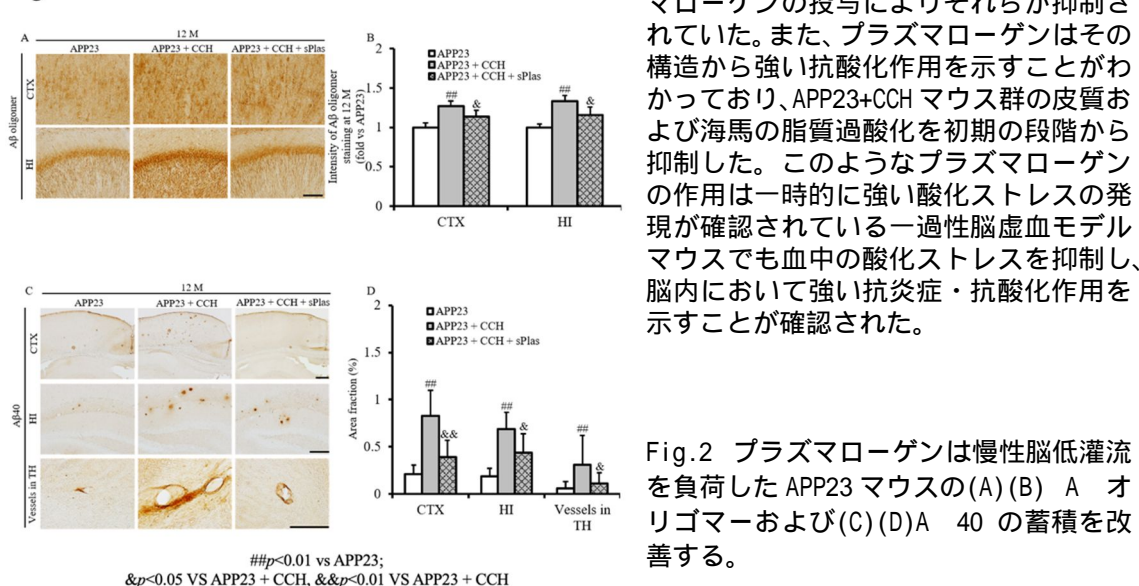


Fig.2 プラズマローゲンは慢性脳低灌流を荷した APP23 マウスの(A)(B) Aオリゴマーおよび(C)(D)A<sub>40</sub>の蓄積を改善する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yusuke Fukui, Tian Feng, Koh Tadokoro, Yoshio Omote, Mami Takemoto, Ryuta Morihara, Toru Yamashita, Koji Abe	4. 巻 3
2. 論文標題 Antioxidative and neuroprotective effects of ascidiacea-derived plasmalogen in a mouse stroke model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Supplement	6. 最初と最後の頁 8-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yamashita Toru, Hatakeyama Tetsuhiro, Sato Kota, Fukui Yusuke, Hishikawa Nozomi, Takemoto Mami, Ohta Yasuyuki, Nishiyama Yoshihiro, Kawai Nobuyuki, Tamiya Takashi, Abe Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypoxic stress visualized in the cervical spinal cord of ALS patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Research	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01616412.2020.1866383	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 Tadokoro Koh, Fukui Yusuke, Yamashita Toru, Liu Xia, Tsunoda Keiichiro, Shang Jingwei, Morihara Ryuta, Nakano Yumiko, Tian Feng, Sasaki Ryo, Matsumoto Namiko, Nomura Emi, Shi Xiaowen, Omote Yoshio, Takemoto Mami, Hishikawa Nozomi, Ohta Yasuyuki, Abe Koji	4. 巻 29
2. 論文標題 Bone Marrow Stromal Cell Transplantation Drives Molecular Switch from Autophagy to the Ubiquitin-Proteasome System in Ischemic Stroke Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 104743 ~ 104743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104743	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 Feng Tian, Hu Xinran, Fukui Yusuke, Bian Zhihong, Bian Yuting, Sun Hongming, Takemoto Mami, Yunoki Taijun, Nakano Yumiko, Morihara Ryuta, Abe Koji, Yamashita Toru	4. 巻 86
2. 論文標題 Clinical and Pathological Benefits of Scallop-Derived Plasmalogen in a Novel Mouse Model of Alzheimer's Disease with Chronic Cerebral Hypoperfusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1973 ~ 1982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-215246	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 Moriyama Ryuta, Yamashita Toru, Osakada Yosuke, Feng Tian, Hu Xinran, Fukui Yusuke, Tadokoro Koh, Takemoto Mami, Abe Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficacy and safety of spot heating and ultrasound irradiation on in vitro and in vivo thrombolysis models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221079127	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 Bian Zhihong, Liu Xia, Feng Tian, Yu Haibo, Hu Xiao, Hu Xinran, Bian Yuting, Sun Hongming, Tadokoro Koh, Takemoto Mami, Yunoki Taijun, Nakano Yumiko, Fukui Yusuke, Morihara Ryuta, Abe Koji, Yamashita Toru	4. 巻 86
2. 論文標題 Protective Effect of Rivaroxaban Against Amyloid Pathology and Neuroinflammation Through Inhibiting PAR-1 and PAR-2 in Alzheimer's Disease Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 111 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-215318	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 Tadokoro Koh, Yamashita Toru, Fukui Yusuke, Nomura Emi, Ohta Yasuyuki, Ueno Setsuko, Nishina Saya, Tsunoda Keiichiro, Wakutani Yosuke, Takao Yoshiki, Miyoshi Takahiro, Higashi Yasuto, Osakada Yosuke, Sasaki Ryo, Matsumoto Namiko, Kawahara Yuko, Omote Yoshio, Takemoto Mami, Hishikawa Nozomi, Morihara Ryuta, Abe Koji	4. 巻 427
2. 論文標題 Early detection of cognitive decline in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with a novel eye tracking test	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 117529 ~ 117529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2021.117529	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 Feng Tian, Hu Xinran, Fukui Yusuke, Tadokoro Koh, Bian Zhihong, Morihara Ryuta, Yamashita Toru, Abe Koji	4. 巻 1766
2. 論文標題 Neuroprotective effects of Scallop-derived plasmalogen in a mouse model of ischemic stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147516 ~ 147516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147516	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福井裕介
2. 発表標題 脳梗塞モデルマウスにおけるホヤ由来プラズマローゲンの神経保護作用の検討
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井裕介
2. 発表標題 Antioxidative and neuroprotective effects of ascidiacea-derived plasmalogen in a mouse stroke model
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------