

機関番号：32665
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780139
 研究課題名（和文）
 多価不飽和脂肪酸摂餌によるアルツハイマー病発症予防法開発に関する研究
 研究課題名（英文）
 Studies on the protective effects of polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease.
 研究代表者
 細野 崇 (HOSONO TAKASHI)
 日本大学・生物資源科学部・助手
 研究者番号：80445741

研究成果の概要（和文）：

本研究では多価不飽和脂肪酸（とくにアラキドン酸とドコサヘキサエン酸）に着目し、食餌による多価不飽和脂肪酸摂取がアルツハイマー病発症を予防できるか検討した。アルツハイマー病モデルマウスの Tg2576 にアラキドン酸またはドコサヘキサエン酸を含む餌を摂餌させた後、認知機能試験を行った結果、それら脂肪酸を含まない餌を与えられた Tg2576 と比べて認知機能障害発症を予防する効果が認められた。多価不飽和脂肪酸摂餌したマウスの脳内では、APP 代謝の変化による A β 42/A β 40 比低下により認知機能障害の軽減効果を誘導している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acid (arachidonic acid or docosahexaenoic acid) on Alzheimer's disease pathology. Polyunsaturated fatty acid diet prevents memory impairment in Alzheimer model Tg2576 mice. APP processing to generate soluble APP and A β synthesis were enhanced, but the A β 1-42/A β 1-40 ratio was decreased in Tg2576 mice fed with the arachidonic acid or docosahexaenoic acid diet. These findings suggest that polyunsaturated fatty acid diet could prevent cognitive dysfunction, and alter APP processing and A β 1-42/A β 1-40 ratio in Tg2576 mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品機能、アルツハイマー病、多価不飽和脂肪酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、アミロイド β (A β)を主成分とする老人斑とタウタンパク質を主成分とする神経原線維変化という病理的特徴がある。神経原線維変化の分布は、アルツ

ハイマー病の進行と相関し、A β の凝集物が神経原線維変化形成を促進すると考えられている(アミロイドカスケード仮説)。また、これらのタンパク質の異常な凝集に伴い、神経細胞死が起こり、記憶障害が生じると考えら

れている。そのため、蓄積した A β 量を減少させることがアルツハイマー病の治療・予防に有効な手段の1つであると考えられ、様々な研究が行われている。

これまでの研究の結果、脳内 A β 代謝がコレステロールやスフィンゴ脂質といった、脂質の影響を受けることを報告してきた (Sawamura *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004; Yu *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 2005)。脳内リン脂質には、多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸 (以下、ARA) やドコサヘキサエン酸 (以下、DHA) を多く含んでいること、脳内 ARA、DHA 量は 60 歳以降、加齢に伴って減少することが報告されていることから (Söderberg *et al.*, *Lipids*, 1991)、加齢に伴う多価不飽和脂肪酸の減少が各種神経変性疾患の病態に影響を及ぼすことが予想された。Calon らは、アルツハイマー病モデルマウス脳内の DHA 量が減少していること、DHA を多く含んだ餌を与えることでアルツハイマー病病態が改善できることを報告している (Calon *et al.*, *Neuron*, 2004)。しかしながら、リン脂質として脳内に多く含まれる ARA が A β 代謝やアルツハイマー病病態に及ぼす影響は不明であった。

2. 研究の目的

多価不飽和脂肪酸の摂餌がアルツハイマー病の症状を抑制できるか否かを検討するため、アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 に ARA、または DHA を含む餌とそれら脂肪酸を含まない餌を 4 カ月摂餌させる。その後、認知機能テストを行い、多価不飽和脂肪酸の摂取が認知機能の低下を緩和できるか検討する。さらに、A β 代謝に及ぼす多価不飽和脂肪酸摂餌の影響について解析を行い、多価不飽和脂肪酸がどのようなメカニズムで認知機能改善につながるかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルと餌

スウェーデン変異を有するヒト APP 遺伝子を脳内で過剰発現する APP トランスジェニックの Tg2576 を実験に使用した。AIN-76 を基本組成とし、総脂質の 4% ARA を含む餌を与えた ARA 食群、4% DHA を含む餌を与えた DHA 食群、いずれも含まない control 食群の計 3 群を用意した。9 ヶ月齢以降、実験食を 4 ヶ月間与えた後、各種認知機能試験 (Y 字迷路試験、新奇物体認識試験、恐怖条件付け学習試験) を行った。14 ヶ月齢で解剖し、脳や血液を回収、各種解析に使用した。

(2) 脳内 APP、APP 代謝産物、A β の定量

脳内 APP ならびにその代謝産物の sAPP α 、sAPP β 、CTF- α 、CTF- β の発現と、APP 代謝に関与する ADAM10、BACE1、Nicastrin、PS-1 の発

現は Western blotting により定量した。脳内 A β 1-40 と A β 1-42 量は ELISA を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 多価不飽和脂肪酸摂餌が短期記憶障害に及ぼす影響

ARA または DHA 摂餌による短期記憶への影響について Y 字迷路試験により検討した。Tg2576 マウスの alternation behavior は非遺伝子改変マウスと比較して有意な減少が見られたことから、Tg2576 マウスにおいて短期記憶の障害が示唆された (図 1A)。これに対し ARA 食または DHA 食を摂餌させた Tg2576 マウスでは、control 食を摂餌させた Tg2576 マウスと比較して alternation behavior の有意な増加が認められた。以上の結果から、ARA または DHA は Tg2576 マウスに認められる短期記憶障害発症を軽減させることが示唆された。

(2) 多価不飽和脂肪酸摂餌が視覚認知記憶障害に及ぼす影響

ARA 食または DHA 食の摂餌による視覚的認知記憶能への影響について、新奇物体認識試験により検討した。Tg2576 マウスでは、新奇物体に対する exploratory preference が非遺伝子改変マウスと比較して有意な減少が見られた (図 1B)。このことから Tg2576 マウスにおいて視覚的認知記憶の障害が示唆された。ARA 食を摂餌させた Tg2576 マウスでは、control 食を摂餌させた Tg2576 マウスと比べて新奇物体に対する exploratory preference が有意に増加した。しかし、有意な増加は DHA 食を摂餌させたマウスでは認められなかった。これらの結果から、ARA は Tg2576 マウスに認められる視覚認知記憶障害発症を軽減させることが示唆された。

(3) 多価不飽和脂肪酸摂餌が連合学習能に及ぼす影響

(電気刺激による恐怖条件付け)

ARA 食または DHA 食の摂餌による連合学習能への影響について、電気刺激による恐怖条件付け学習試験により検討した。条件付け前の訓練ケージへの暴露では非遺伝子変異マウス、Tg2576 マウスのすべての食餌群ともに顕著な freezing は認められなかった。条件付けの後、訓練ケージに非遺伝子変異マウスを暴露すると顕著な freezing を示したが、Tg2576 マウスの freezing time は非遺伝子変異マウスと比較して有意に短縮し、Tg2576 マウスにおいて文脈依存的な連合学習障害が示唆された (図 1C)。一方、ARA 食または DHA 食餌群の freezing time は非遺伝子変異マウスと比較して有意な短縮が認められたが、control 餌を与えた Tg2576 マウスと比べて有

意な延長が認められた。これらの結果から、ARA または DHA は Tg2576 マウスに認められる文脈依存的な連合学習障害発症を部分的だが軽減させることが示唆された。

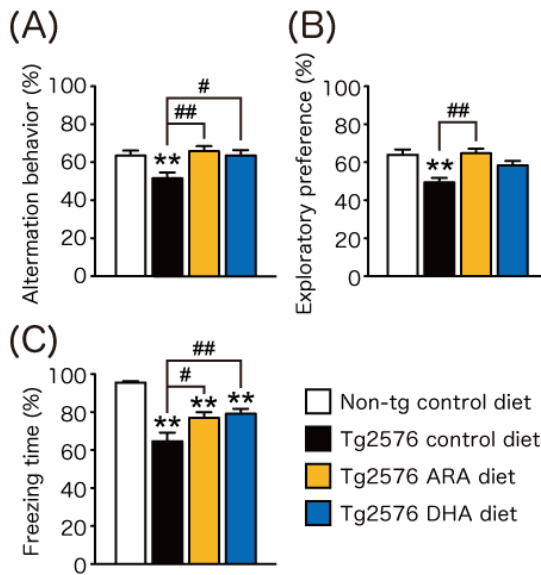


図 1. 多価不飽和脂肪酸摂取が各種認知機能テストに及ぼす影響 (A) Y 字迷路試験 (B) 新規物体認識試験 (C) 電気刺激による恐怖条件付試験

(4) 多価不飽和脂肪酸摂取が脳内 Aβ量に及ぼす影響

Aβはアルツハイマー病の原因物質の一つと考えられている。Tg2576 マウスでは加齢に伴い脳内 Aβ量が増加し、ARA または DHA 食を与えられた Tg2576 マウスでは各種認知機能の回復が見られたことから、これら脂肪酸の摂取は Aβ量を減少させるのではないかと考えた。14 ヶ月齢の Tg2576 マウスを解剖し、皮質と海馬から TBS 不溶性画分を調製し、Aβ量をサンドイッチ ELISA により定量した (図 2)。予想に反し ARA 食を与えられた Tg2576 マウス脳内の TBS 不溶性画分中の Aβ1-40, Aβ1-42 量は有意に増加した (図 2D, 2E)。さらに DHA 食の Tg2576 マウス脳内の TBS 不溶性画分中の Aβ1-40, Aβ1-42 量も増加傾向を示した。しかしながら、不溶性画分の Aβ42/Aβ40 比の低下が ARA または DHA 食群で見られた (図 2F)。家族性アルツハイマー病における遺伝子変異の機能解析から、Aβ毒性発現には Aβ42/Aβ40 比の上昇が深く関与するとされる。多価不飽和脂肪酸摂取したマウスの脳内では多価不飽和脂肪酸含有量の増加により APP の代謝が変化し、Aβ42/Aβ40 比が低下することで認知機能障害発症の軽減効果を誘導している可能性が考えられた。

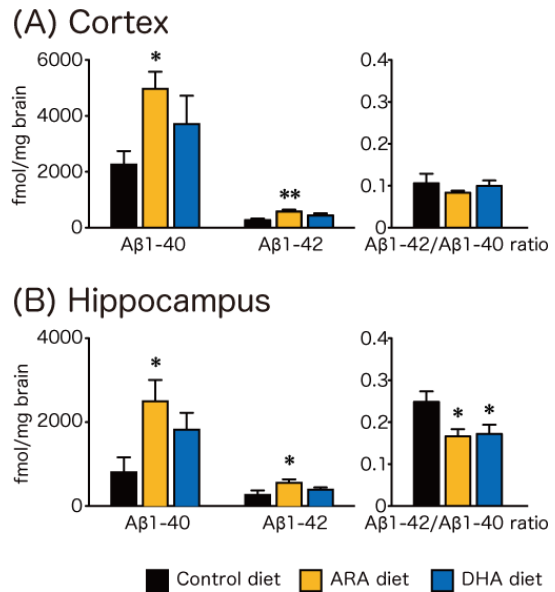


図 2. 多価不飽和脂肪酸摂取による脳内 Aβ定量

続いて ARA または DHA 食において脳内 Aβ量が増加したメカニズムを明らかにする目的で、Aβ産生酵素や Aβ分解酵素発現に及ぼす影響について検討した。ARA または DHA 食を摂取させた Tg2576 マウスの皮質において、Aβ産生酵素や Aβ分解酵素発現量に変化は認められなかった (図 3)。これに対し、Aβが産生される際に生じる代謝産物の APP 断片量が、ARA または DHA 食を摂取させた Tg2576 マウスの皮質において増加していた (図 3)。ARA または DHA 食の Tg2576 マウスの脳内では ARA または DHA 量が有意に増加していたこと、Aβは細胞膜中での切断により産生されることから、細胞膜の構成脂質の変化が Aβ産生酵素活性に影響を及ぼしていることが示唆された。また、APP の断片である sAPPαには神経保護作用があることが報告されており、ARA または DHA 食による APP 断片量の増加が認知機能障害発症の予防しているのではないかと考えられた。

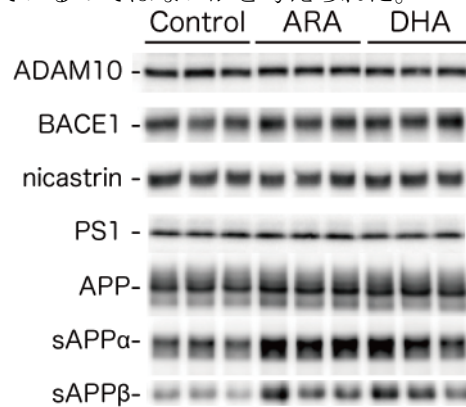


図 3. 多価不飽和脂肪酸摂取による APP 代謝産物発現と Aβ産生酵素発現に及ぼす影響

以上、本研究の結果、ARA または DHA 食を摂取させた Tg2576 マウスでは、それら脂肪酸を含まない餌を与えた Tg2576 マウスに比べて認知機能の改善が認められた。これまでの報告では DHA による認知機能の改善効果については報告があったが、DHA 同様 ARA においても改善効果が認められたことは興味深く、多価不飽和脂肪酸摂取によるアルツハイマー病予防の確立に向けて、今後さらに検討する必要がある。

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 6 件)

- ① Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, Michikawa M., Lipoprotein lipase is a novel amyloid β ($A\beta$)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of $A\beta$ in astrocytes. *Journal of biological chemistry*, 査読有, 286(8), 2011, 6393-6401.
- ② Shen Y, Fukushima M, Ito Y, Muraki E, Hosono T, Seki T, Ariga T., Verification of the antidiabetic effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) using insulin-uncontrolled type 1 diabetic rats and cultured adipocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 査読有, 74(12), 2010, 2418-2425.
- ③ Torimitsu M, Nagase R, Yanagi M, Homma M, Sasai Y, Ito Y, Hayamizu K, Nonaka S, Hosono T, Kise M, Seki T, Ariga T. Replacing white rice with pre-germinated brown rice mildly ameliorates hyperglycemia and imbalance of adipocytokine levels in type 2 diabetes model rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 査読有, 56, 2010, 287-292.
- ④ Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung CG, Komano H, Michikawa M., Homocysteine, another risk factor for Alzheimer disease, impairs apolipoprotein E3 function. *Journal of biological chemistry*, 査読有, 285(49), 2010, 38382-38388.
- ⑤ Iitsuka Y, Tanaka Y, Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T., Relationship between lipophilicity and inhibitory activity against cancer cell growth of nine kinds of alk(en)yl trisulfides with different side chains. *Oncology research*, 査読有, 18, 2010, 575-582.
- ⑥ Jung CG, Horike H, Cha BY, Uhm KO, Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Iida

K, Woo JT, Michikawa M. Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor β . *Biological & pharmaceutical bulletin*, 査読有, 33, 2010, 1105-1111.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 細野 崇、多価不飽和脂肪酸餌は LPS で誘導される脳内炎症を抑制する、第 29 回日本認知症学会学術集会、2010 年 11 月 5 日、名古屋
- ② 細野 崇、ガーリック香気成分 diallyl trisulfide の強いがん細胞増殖抑制活性は、システインとの反応性に起因する、第 15 回日本フードファクター学会、2010 年 10 月 4 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 崇 (HOSONO TAKASHI)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：80445741