

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580145

研究課題名（和文） 抗酸化物質が β アミロイド沈着を低下させる可能性を位相 X 線画像で解析する新しい試み研究課題名（英文） Antioxidant induced decrement of β -amyloid deposits by phase contrast X-ray technique

研究代表者

丸山 弘子 (MARUYAMA HIROKO)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：50129269

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病は抗酸化物質・クルクミンで抑制されると言われている。アルツハイマーモデル (AD) マウスにクルクミンを 10 ヶ月間摂食させ、短期記憶障害、 β アミロイド ($A\beta$) 斑、タウ蛋白質のリン酸化と位相 X 線 CT 画像による $A\beta$ の解析を行った。クルクミン摂取で短期記憶力低下の抑制、 $A\beta$ の沈着軽減、タウ蛋白質リン酸化抑制とマウスの延命効果が認められ、クルクミンのアルツハイマー症発症の抑制効果が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Inhibition of Alzheimer's disease (AD) by antioxidant curcumin has attracted the attention of scientists. Curcumin effect on Alzheimer's disease was examined for short-term memory impairment, reduced amyloid deposits and tau hyperphosphorylation using AD model mouse. Our study demonstrates that curcumin is not only inhibited $A\beta$ deposition but also to prevent Tau phosphorylation. Thus, curcumin might be considered to prevent the AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：総合栄養科学

キーワード：アルツハイマー病、 β アミロイド蛋白質、タウ蛋白質、クルクミン、タウ蛋白質リン酸化、位相 X 線画像

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化が進む日本では、アルツハイマー型認知症の発症率は年齢とともに増加することが報告されており、社会的に大きな問題となっている。アルツハイマー病などの神経変性疾患では β アミロイドの細胞外蓄積（老人斑）と過剰にリン酸化されたタウタンパク質の細胞内凝集（神経原線維変化）がともに、アルツハイマー病脳で顕著に観察されることが報告されている。分担者の武田は位相X線CTの開発により造影剤を用いることなく生体軟部組織構造や病的変化の詳細な画像化が可能なることを世界で初めて示した（Nature Med. 2:473-475,1996）。この技術を応用して、従来の透過型X線CTで描出できないアルツハイマー病モデルマウス脳病変（APP & PS1 double transgenic）を観察する事に成功した（Neuroscience 138: 1205-1213, 2006）。特に、無造影で β アミロイドの集積状態を3次的に、その大きさや密度変化を定量的に解析出来る事が、薬剤等の効果判定に重要となる。

一方、タウタンパク質のリン酸化酵素であるGSK-3 β によるリン酸化がタウタンパク質結合性因子の α -シヌクレインおよびシンダピン-1によって促進されることを見いだした。この結果から、 α -シヌクレインおよびシンダピン-1はタウタンパク質の高リン酸化の誘導に関わる重要な調節因子となることを報告した（Biochim.Biophys.Acta. 1790(3): 188-197, 2009）。本研究により抗酸化物質によるアルツハイマー病発症の抑制効果を客観的に評価することが可能となり、またその作用機序を解析することができる。この研究を通じて食習慣とアルツハイマー病発症との関係について明らかに出来る。

2. 研究の目的

植物由来の抗酸化物質であるクルクミン

のアルツハイマー病発症抑制効果が注目されている。しかし、クルクミンの長期間経口投与による抑制効果の検討は未だ研究段階であることから、長期間経口投与による抑制効果の検討により、クルクミンの効果をより具体的に示す必要がある。そこで、本研究では、アミロイド仮説を基にアルツハイマー病の特徴的な症状である、 β アミロイド蛋白質（A β ）の蓄積に焦点を当て、A β が多量に蓄積するモデルのダブルトランスジェニックマウス（Tg6799）を用いて、アルツハイマー病患者は短期記憶に障害が起こることから、短期記憶に関する行動実験を行い、アミロイド斑の主な構成成分であるA β -40とA β -42の脳内沈着について解析することにより、クルクミンのA β 沈着抑制効果を検討し、A β 沈着に伴う病態学的検討を行った。更に、A β 沈着により誘導されるといわれているタウの過剰リン酸化についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウスの作出と飼育

雄性 APP・PS1 ダブルトランスジェニックマウス・B6SJL-Tg6799 (The Jackson Labo. ; PA, USA)と、雌性ノーマルマウス・B6SJL (The Jackson Labo.)を用いて交配し、繁殖させた。作出したマウスの尾先からDNAを抽出し電気泳動によりAPP遺伝子とPS1遺伝子の両蛋白質が発現を確認したマウスのみを実験群に使用した。この実験は北里大学遺伝子組み換え実験安全委員会と、北里大学医療衛生学部実験動物倫理委員会の許可を得た。

(2) 長期経口投与実験方法

生後7週目からADマウスに標準飼料 (Research Diets Inc. ; NJ.USA)、標準飼料にクルクミン 0.02% (SIGMA-ALDORICH CO. ; Mis. USA) 配合飼料或はクルクミン 0.5%配合した飼料の3種類のいずれかを与える3群

をもうけ、餌を自由摂食させた。10 ヶ月または 13 ヶ月の時点でエーテルを用いて麻酔をかけた後、生理食塩水と 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(PFA, pH7.4)で灌流固定をして脳組織を取り出した。脳の一部は脳内の過剰リン酸化を調べるためのウェスタンブロッティング用として-70°Cで凍結保存した。また、飼育中に死亡したマウスは肉眼的変化が無いことを確認し、解剖時までの生存率を求めた。

(3) マウスの遺伝子確認法 (DNA 抽出法、PCR 法、電気泳動法)

DNA 抽出法：マウスの尾約 2mm をマイクロチューブに採取、DNA 抽出キット TaKaRa Simple Prep reagent for DNA Code9180 (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本)を用いて、DNA を抽出した。

PCR 法：APP 遺伝子検出では 1 検体につき蒸留水 8.8 μ l、APPプライマーの APP-F、APP-R、APP-1、APP-2 をそれぞれ 1.5 μ l、dNTP を 1 μ l、ExTaq 緩衝液を 2 μ l、 γ -Taq (5unit/ μ l) を 0.2 μ l、DNA 抽出液 2 μ l を加え、総量を 20 μ l とした。同様に PS I では、PS I プライマーの PS1-F、PS1-R、PS1-1、PS1-2 (SIGMA) をそれぞれ 1.5 μ l、dNTP を 1 μ l、 \times 10ExTaq 緩衝液を 2 μ l、 γ -Taq (5unit/ μ l) を 0.2 μ l、DNA 抽出液 2 μ l を加え、総量を 20 μ l とした。APP 遺伝子検出では 95°C30 秒、54°C30 秒、72°C1 分 30 サイクル行い、PS I 遺伝子検出では 95°C30 秒、57°C30 秒、72°C1 分 30 サイクル行って PCR 反応液とした。

電気泳動法：PCR 反応液に Loading buffer を加え、2%アガロースゲルのウェルに 10 μ l ずつ入れ、分子量マーカーとともに電気泳動した。泳動の終わったゲルをエチレンブロマイドで染色し洗浄した後、バンドを確認した。これにより、APP と PS I の両遺伝子が確認されたマウスを AD マウスとして実験に用いた。

(4) 免疫組織化学染色

①A β -40 (ABC 法) 染色

4%PFA 固定後の脳を自動包埋装置でパラフィン浸透させた後、パラフィンブロックを作製した。組織切片の脱パラフィンを行い、水洗後、0.1M クエン酸緩衝液 (pH6.0)に浸して 121°C10 分間オートクレーブをかけ賦活化を行い、3%過酸化水素 PBS で内因性ペルオキシダーゼ活性の処理を室温で 20 分間、正常ヤギ血清を用いた非特異反応のブロッキングを室温で 30 分間行った。次に、100 倍希釈した一次抗体 (Polyclonal rabbit antibody against Abeta 40 218202 (Synaptic Systems, GER))を 4°Cで一晩、二次抗体・ABC 試薬 (VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit PK-6101, Vector Labo. ; CA. USA)を室温で 1 時間反応させ、3,3-diaminobenzidine (DAB) (和光純薬工業;大阪)を用いて 3 分間発色反応を行った。蒸留水中で反応停止後、水洗い、脱水、透徹、封入を行い観察した。

②A β -42 染色

一次抗体として ((Beta Amyloid 42 1-11-3)Rabbit monoclonal Antibody, Purified SIG-39169(SIGNET) (CONVANCE; CA. USA))を用いて、A β -40 (ABC 法による DAB 発色染色)と同様に免疫組織化学染色を行った。

③リン酸化タウ Ser396 (p-Tau396) 染色

一次抗体として p-Tau (Ser396): sc-1011815 (Santa Cruz Biotechnology, inc.;CL,USA)を用いて、A β -40 と同様に免疫化学染色を行った。

④リン酸化タウ Ser404 (p-Tau404) 染色

一次抗体として Rabbit monoclonal [EPR2605] to Tau (phospho S404) ab92676 (abcam Inc. ; KY. USA)を用いて、A β -40 と同様に免疫組織化学染色を行った。

⑤Y 字迷路試験

Y 字迷路は、マウスが場所に対する新規探索行動特性を利用した短期記憶試験であり、

マウス用 (アーム長×アーム幅下部・上部×高さ:400mm×30mm・100mm×120mm 株式会社シンファクトリー; 福岡)を用いて、生後6ヵ月、10ヵ月のマウスでY字迷路試験を行った。試験を行う前にY字迷路の空間にマウスを慣れさせた後、アームのスタート位置はマウスごとにランダムとし、Y字迷路内を8分間自由行動させた。物音を立てないように細心の注意を払いビデオカメラにて動画を撮影した。その後、試験を撮影した動画を解析し、各アームへの進入率、滞在時間、進入回数、立ち上り回数を求め月齢や添加飼料による差を比較検討した。Y字迷路試験は、その指標とした交替行動率は、交替行動数を異なる3本のアームへ連続して進入した回数として、次の式より求めた。交替行動率 (%) = 交替行動数 ÷ (総アーム進入回数 - 2) × 100

⑥画像解析

免疫組織化学染色を行った標本の大脳皮質をオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (株式会社キーエンス;大阪)を用いて 200 倍視野で1標本につき5ヶ所ずつ撮影し、Image J (National Institutes of Health ; MD, USA) にて画像解析した。撮影部位は全標本ほぼ同じ部位となるように撮影を行った。Aβ-40とAβ-42の染色画像は、Image Jを用いて1枚ごとに抗Aβ-40抗体または抗Aβ-42抗体陽性部位の面積を測定し、5カ所の平均値を各個体のデータとして飼料群ごとに平均を求め比較検討した。画像1枚の総面積は約 $273 \times 10^3 \mu m^2$ であった。同様に、1枚ごとアミロイド斑の個数をカウントし、5枚の平均値を各個体のデータとして飼料群ごとに平均を求めた。Aβ-42の面積はアミロイド斑1つ1つの広がり性を各飼料群間で比較検討するために、アミロイド斑の部位を全体、中心部と周辺部(全体の値から中心部の値を減じた値)に分け解析を行った。

p-Tau396とp-Tau404の解析は、撮影した5枚の写真を印刷してコロニーカウンターにて、抗p-Tau396抗体陽性細胞数または抗p-Tau404抗体陽性細胞数をカウントした。p-Tauの解析もAβの解析と同様、画像1枚ごとに抗p-Tau396抗体陽性細胞数または抗p-Tau404抗体陽性細胞数をカウントし、5枚の平均値を各個体のデータとして各飼料群で平均値を求め比較検討した。

有意差検定はDunnett法を用いて危険率5%以下を有意とした。

⑦位相X線CTによるβアミロイドの集積解析

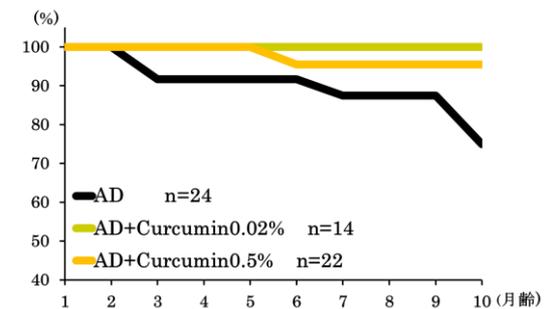
固定された脳全体の撮影は16%ショ糖液に浸漬後、撮影画像は高エネルギー加速器研究機構(KEK)で収集し、位相X線CT画像撮影時のX線エネルギーは17.8 keVで行った。画像は再構成を行い、計算機を用いβアミロイドの集積を画像化し、その定量的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 延命効果

実験期間中の餌摂取量は、各添加飼料群間で差は認められなかった。

月齢10ヶ月の生存率は、雌性ADマウスではAD群に比べAD+Curcumin0.02%群、AD+Curcumin0.5%群で延命効果が認められたが、生存率の有意差はなかった。

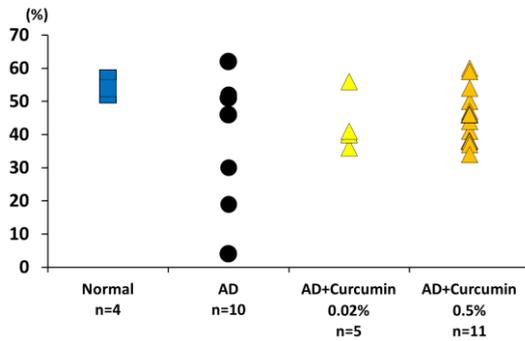


雌性ADマウス生存率

(2) Y字迷路試験結果

雌性マウスの交替行動率の平均値には、各群差は認められなかったが、ばらつきを示す変動係数の値は、雌性Normal群4%に

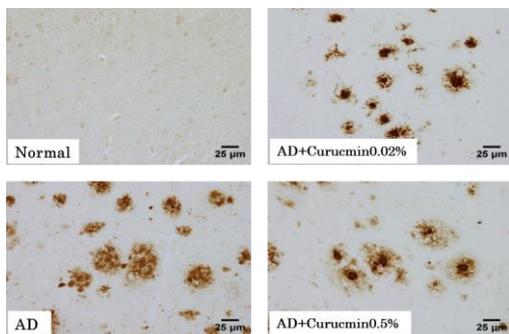
対し、AD 群 45%、AD+Curcumin0.02%群 18%、AD+Curcumin0.5%群 19%となり、AD 群に比べて AD+Curcumin0.02%群と AD+Curcumin 0.5%群で低い値となった。



雌性マウス月齢 6 ヶ月 交替行動率

(3) 画像解析結果

コンゴー赤染色により偏光顕微鏡にてアミロイド陽性であることを確認し、同部位が抗 Aβ-40 抗体、抗 Aβ-42 抗体に陽性を示すことを免疫組織化学染色 (ABC 法) で確認した。

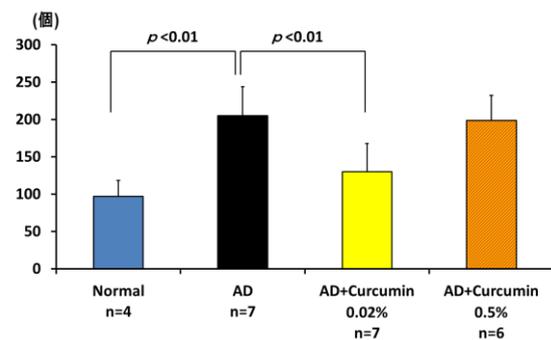


Aβ-42 染色

月齢 10 ヶ月雌性マウス的大脑皮質 200 倍視野内における Aβ-40 および Aβ-42 斑の個数では各群間の有意差は認められなかった。大脑皮質 200 倍視野内 ($273 \times 10^3 \mu m^2$) における Aβ-40 斑の占める面積の比較では、有意差は認められなかった。Aβ-42 斑 (周辺部) の面積値は、AD 群 $19 \times 10^3 \mu m^2$ 、AD+Curcumin0.02% 群 $10 \times 10^3 \mu m^2$ 、AD+Curcumin0.5% 群 $21 \times 10^3 \mu m^2$ であり、AD 群に対して AD+Curcumin0.02% 群で有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。また、

Normal 群の Aβ-40、Aβ-42 は、月齢 10 ヶ月のいずれにおいても染色されず、個数または面積の値が 0 だった。

p-Tau396 陽性細胞数の各群平均値は、Normal 群 73 個、AD 群 169 個、AD+Curcumin0.02% 群 104 個、AD+Curcumin0.5% 群 159 個であり、Normal 群に対し AD 群で有意な増加が認められ ($p < 0.05$)、AD 群に対し AD+Curcumin0.02% 群で有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。p-Tau404 陽性細胞数の各群平均値は、Normal 群 106 個、AD 群 205 個、AD+Curcumin0.02% 群 130 個、AD+Curcumin0.5% 群 (n=6) 199 個であり、Normal 群に対し AD 群で有意な増加が認められ ($p < 0.01$)、AD 群に対し AD+Curcumin0.02% 群で有意な減少が認められた ($p < 0.01$)。



雌性マウス月齢 10 ヶ月 p-Tau404 陽性細胞数

位相 X 線 3 次元画像は、13 ヶ月齢で Normal マウスでは大脑皮質と海馬領域で、異常な高密度 Aβ は描出されなかったが、AD 群では Aβ-40 が多数描出された。一方、Curcumin 群では Aβ の減少と沈着がない個体も認められ、本法により 3 次的に Aβ の存在部位を解析するには有効であることが分かった。

(4) まとめ

以上の結果から、月齢 6 ヶ月の短期記憶試験では、クルクミン 0.02% と 0.5% 添加での効果が認められたことから、発症早期段

階では濃度による差は無く発症が遅延することが分かった。しかし、後期になり A β の線維化段階では高濃度では抑制作用は認められなくなることから、摂取には適量があることが示唆された。月齢 10 ヶ月の AD マウスの脳内の神経細胞は、正常マウス脳に比べ海馬付近の神経細胞の極性が乱れており、膨化傾向が確認された。アミロイド斑周辺の神経細胞にも変性が認められ、これらの変性は A β の毒性機構というよりは、むしろアミロイド斑の存在による物理的な影響であると考えられる。これらの所見から、認知症症状は神経細胞死以前の神経細胞変性の増加が影響していると考えられ、A β 沈着を抑制するクルクミンはアルツハイマー病発症抑制に効果があると考えられた。しかし、クルクミンはアルツハイマー病の発症後の治療には有効と言えず、予防的に大きな効果があることが期待された。

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 1 件)

(1) Tohoru Takeda, Thet-Thet-Lwin, Takuya Kunii, Ryota Sirai, Takahito Ohizumi, Hiroko Maruyama, Kazuyuki Hyodo, Akio Yoneyama, and Kazuhiro Ueda: Ethanol fixed brain imaging by phase-contrast X-ray technique. Journal of Physics: Conference Series 査読有 425 (2013) p1-4. DOI : 10.1088/1742-6596/425/2/022004

[学会発表] (計 2 件)

(1) 大泉孝仁、丸山弘子、國井琢矢、白井亮多、秋田久直、川上文貴、大部誠、武田徹 クルクミンによる β アミロイド蛋白質産生抑制効果の基礎的検討、第66回日本栄養・食糧学会講演要旨集、p96 仙台 (2012. 5. 19).
(2) 大泉孝仁、丸山弘子、國井琢矢、白井亮多、秋田久直、川上文貴、大部誠、武田徹 ア

ルツハイマーモデルマウスにおけるクルクミンの発症抑制効果、第25回北里大学バイオサイエンスフォーラム、東京 (2012. 8. 2).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 弘子 (MARUYAMA HIROKO)
北里大学医療衛生学部・准教授
研究者番号 : 50129269

(2) 研究分担者

武田 徹 (TAKEDA TOHORU)
北里大学医療衛生学部・教授
研究者番号 : 10197311
川上 文貴 (KAWAKAMI FUMITAKA)
北里大学医療衛生学部・助教
研究者番号 : 50511896