

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700829

研究課題名(和文) 運動により変化するガングリオシド変換酵素種の同定とアルツハイマー病への応用

研究課題名(英文) Decreased or increased ganglioside converting enzymes by daily exercise in adult mouse model and applied for Alzheimer's disease therapy

研究代表者

林 祐一 (HAYASHI, Yuichi)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00392366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の発症予防、進行抑制に関して、日常からの運動習慣が重要であるといわれているがメカニズムは不明である。St8Sia1は認知症の抑制効果があるされている蛋白である。そこで、我々はマウスを継続的に運動することにより海馬でのSt8Sia1の発現抑制がえられるかどうかを検討した。その結果、たしかにmRNAの発現が抑制されていた。タンパクレベルでは、2週間の連続運動を行った結果、蛋白の低下傾向を認めた。このことは、運動習慣がSt8Sia1を抑制するという経路を証明する結果となり、アルツハイマー病の発症予防にも重要な意義も持つと考えた。

研究成果の概要(英文)：St8Sia1 is one of the important protein concerning about progression of Alzheimer's disease experimental mouse model. The mRNA St8sia1 is down regulated by daily exercise in adult mice. The St8sia1 protein is slightly down regulated by daily exercise in adult mice. This result may be one the mechanisms concerning about anti- progression of Alzheimer's disease with daily exercise patients.

研究分野：応用健康科学

科研費の分科・細目：運動療法

キーワード：運動療法 St8Sia1

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症の改善に日ごろからの運動が有益であるという報告が相次いでいる。マウスレベルでは、運動しやすい環境でマウスを飼育しておく、アミロイドの蓄積が少なくなるという報告がある。ヒトでは、週7.5時間以上の運動者は非運動者に比べ、アミロイドの蓄積が少ないことがPET研究により近年明らかになっているが、その分子メカニズムはいまだ不明である。

一方、APP・PSEN1/のダブルノックアウトマウスは、APPのみのノックアウトマウスに比べ急速にアルツハイマー型認知症が起こることが知られている。そのAPP/PSEN1ノックアウトマウスにSt8Sia1のノックアウトマウスを掛け合わせると、アルツハイマー型認知症の記銘力の改善およびアミロイドプラークの減少を認めることが報告されている。このことから、St8Sia1の抑制が、直接的にアルツハイマー型認知症の進行およびアミロイド蓄積の抑制に密接に関わっていると考えた。St8Sia1の増加は、Bcl2を介してアポトーシスを誘導することが知られていることから、St8Sia1の抑制をすることができれば、海馬の神経細胞死抑制効果がえられると考えた。

ここで、運動とSt8Sia1に何らかの関係がないかと仮定した。

2. 研究の目的

運動によるアルツハイマー型認知症の進行抑制効果の分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とし、正常の成体マウスを運動させ、運動後の海馬でのSt8Sia1の遺伝子発現、蛋白発現の低下の有無について検討した。

3. 研究の方法

実験1：定期的な有酸素運動を30分間行ったときアミロイド凝集に関わるSt8Sia1 (GD3 synthase)の生理的抑制効果の検討。

マウス専用トレッドミル運動機器

(MK-680S)上で、8-10週齢のC57BL/6Jマウス (SRC, Hamamtsu, Japan) を13m/分、午前9時から毎日30分運動させ、0.5h, 6h, 12h, 24h後の両側海馬を未固定で採取する。コントロールとして、非運動群をおきSt8Sia1のmRNAの抑制の有無について検討した。この方法は、Hashimotoらの手法と同じ方法を用いた。運動条件に関しては、Hashimotoら^{2,3}、Kirkinezosらの方法と同じ条件に設定した。実験2：定期的な有酸素運動を一日30分間、を2週間連続で行ったときのSt8Sia1 (GD3 synthase)のmRNAの変動マウス専用トレッドミル運動機器 (MK-680S) 上で、8週齢のC57BL/6Jマウス (SRC, Hamamtsu, Japan) を13m/分、午前9時から毎日30分、2週間連続で運動させたのち、0.5h, 6h, 12h, 24h後の両側海馬を未固定で採取する。コントロールとして、非運動群をおき、St8Sia1のmRNAの抑制の有無について検討した。

実験3：定期的な有酸素運動を継続して4週間行ったのち、マウスの海馬を採取し、海馬におけるSt8Sia1蛋白量に関して、ウエスタンブロット法を用いて検討した。対照に非運動群をおいた。-actin蛋白を用いて補正し、濃度の差を半定量した。また、2週運動群と非運動群で海馬の切片を作成し、S58Sia1抗体の染色性を検討した。

なお、本研究は、岐阜大学動物実験施設倫理規定に基づき承認を得て行った。

4. 研究成果

実験の前段階として正常成体マウスを運動させ、中枢神経系において変動する遺伝子をmicroarray法を用いて網羅的に解析した結果、St8Sia1の有意な発現低下を認めた。St8Sia1は、ガングリオシド変換酵素種の1つであるが、他の変換酵素種の遺伝子は変化していなかったため、ガングリオシド変換酵素種では唯一、St8Sia1のみを検索すればよいと

考えた。

マウス専用トレッドミルによる運動を単回行った群と行わなかった群を比べると、運動後の mRNA の変化を時間単位海馬でも mRNA レベルで St8Sia1 が約 60%程度まで抑制されていることが分かった。30 分間の運動を 2 週間継続してみると、St8Sia1 mRNA レベルは正常化していた。蛋白レベルでは、有意差はみられなかったが、St8Sia1 が抑制される傾向にあった。そのため、2 週間運動群と非運動群の海馬票紋を作成し、St8Sia1 で染色したところ、海馬の染色性に変化がみられた。

この実験結果より、運動により mRNA レベルで St8Sia1 が抑制されることを解明した。詳細な機構の解明は今後の課題であり、ベータアミロイド蓄積との関連について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 13 件)

1) Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Tatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Astuta N, Soube G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology*. 査読有 82, 705-712, 2014.

2) Hayashi Y, Suwa T, Inuzuka T: Intracranial calcification in a patient with HDR syndrome and a GATA3 mutation. *Internal Med*. 査読有 52, 161-162, 2013

3) Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, Akaiwa Y, Shimohata T, Nishizawa M, Inuzuka T, Hozumi I. High frequency of calcification

in basal ganglia on brain CT images in Japanese elderly people. *Geriatr Gerontol Int*. 査読有 13, 706-710, 2013.

4) Takagi M, Ozawa K, Yasuda H, Douke M, Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I: Decreased bioelements content in the hair of patients with Fahr 's disease (idiopathic bilateral calcification in the brain). *Biol Trace Elem Res*. 査読有 151, 9-13, 2013

5) Tanaka Y, Kato T, Nishida H, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Araki H, Murase M, Nagaki M, Moriwaki H, Inuzuka T. Is there a difference in gastric emptying between myotonic dystrophy type 1 patients with and without gastrointestinal symptoms? *J Neurol*. 査読有 260, 1611-1616, 2013.

6) Kimura A, Sakurai T, Yoshikura N, Hayashi Y, Takemura M, Takahashi H, Inuzuka T. Corticosteroid therapy in a patient with cerebral amyloid angiopathy-related inflammation. *J Neuroinflammation*. 査読有 10, 39, 2013.

7) Tanaka Y, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Inuzuka T. Cardiac sympathetic function in the patients with amyotrophic lateral sclerosis: analysis using cardiac [123I] MIBG scintigraphy. *J Neurol*. 査読有 260, 2380-2386, 2013.

8) Hayashi Y, Yoshikura N, Kimura A, Inuzuka T: Peduncular hallucination in brainstem encephalitis drawn by a patient. *Neurology* 査読有 79, 1625, 2012

9) Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Ohtaki H, Chousa M, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Anti-endothelial cell antibodies in patients with cerebral small

vessel disease. Curr Neurovasc Res. 査読有 9, 296-301, 2012

10) Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Elevated anti-heat shock protein 60 antibody titer is related to white matter hyperintensities. J Stroke Cerebrovasc Dis. 査読有 21, 305-309, 2012

11) Tanaka Y, Yoshikura N, Harada N, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Inuzuka T: Late-onset patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Japan have a higher progression rate of ALSFRS-R at time of diagnosis. Internal Med. 査読有 51, 579-584, 2012

12) Tanaka Y, Kato T, Nishida H, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Hayashi Y, Kimura A, Hozumi I, Araki H, Murase M, Nagaki M, Moriwaki H, Inuzuka T: Is there delayed gastric emptying in patients with multiple system atrophy? An analysis using the 13C-acetate breath test. J Neurol. 査読有 259, 1448-1462, 2012

13) Kimura A, Sakurai T, Yamada M, Koumura A, Hayashi Y, Tanaka Y, Hozumi I, Ohtaki H, Chousa M, Takemura M, Seishima M, Inuzuka T: Antibodies against the Tom40 subunit of the translocation of the outer mitochondrial membrane complex and cognitive impairment in Alzheimer disease. J Alzheimers Dis. 査読有 29, 373-377, 2012

[学会発表](計 2 件)

1) Hayashi Y, Shinoda J, Yoshikura N, Waza M, Asano Y, Kimura A, Inuzuka T. Difference in ¹¹C-PIB-PET imaging patterns in patients with Alzheimer's disease without microbleeds and those with cerebral amyloid angiopathy. The

66th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Philadelphia, USA, 2014.

2) 林 祐一, 橋本和宜, 山田 恵, 保住 功, 犬塚 貴. トレッドミル運動負荷によるマウス海馬における St8Sia1 の発現抑制. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012/5/25、東京

[図書](計 0 件)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 祐一 (HAYASHI, Yuichi)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 00392366

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし