

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580170

研究課題名(和文)アルツハイマーを予見するバイオマーカーと予防に資する食品の新機能の開拓

研究課題名(英文)Alzheimer's disease (AD) biomarkers and new food ingredients useful for AD prevention

研究代表者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80361145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー型認知症(AD)では、いち早く予防を開始できるように、ADバイオマーカーの開発が望まれている。本研究では、AD者の赤血球に過酸化リン脂質やキサントフィル、アミロイドの変動を認め、これらをADバイオマーカーとして活用できる可能性を見出した。また、AD血漿と髄液のマイクロRNA(miRNA)発現プロファイルを多く得て、ADバイオマーカーとして有用と考えられるmiRNAを絞り込んだ。加えて、これらADバイオマーカーを制御できるルテインなどの食品成分の効能評価を進めた。本研究の成果は、AD予防や食品の新しい機能の発見に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：It is desired to develop biomarkers for Alzheimer's disease (AD), in order to readily start AD prevention. In this study, we found changes of phospholipid peroxides, xanthophyll and amyloid levels in red blood cells of AD patients, indicating their usability for AD biomarkers. We obtained microRNA (miRNA) profile by analyzing AD plasma and cerebrospinal fluid, and selected potential miRNA useful for AD biomarkers. In addition, effects of food ingredients (e.g., lutein) capable of regulating these AD biomarkers were evaluated. The present results will lead to AD prevention and discovery of new food function.

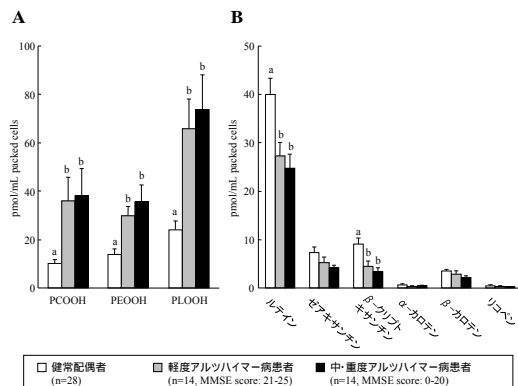
研究分野：食品科学

キーワード：過酸化脂質 miRNA アミロイド キサントフィル アルツハイマー バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

わが国はかつてない高齢化社会を迎え、認知症患者が増加し続け、その数は10年前の約1.5倍に達し、大きな社会問題となっている。認知症では、アルツハイマー型認知症(AD)の割合が最も多い。ADの有効な治療法は未だ開発されておらず、ADの発症機構を解明して、治療を可能にすることが待望されている。ADのメカニズムとしては、発症や病状進行への酸化ストレスの関与が古くから示唆されてきたものの、明確な証拠は得られていないのが現状であった。

そこで、我々は、酸化ストレスを鋭敏に評価できるように、生体内に微量に存在する過酸化脂質の正確な定量システムを開発して(参考論文1)AD患者の血液を調べてきた。その結果、ADの赤血球のリン脂質二重膜に、リン脂質の過酸化分子(過酸化リン脂質、PLOOH)が顕著に蓄積していることを見出した(下図A、参考論文2)。さらに、通常、ヒトの赤血球膜には抗酸化因子として高極性カロテノイド(キサントフィル)が多く分布しているものの、キサントフィルの内、ルテインがAD患者ではとくに低下していて、過酸化リン脂質とルテインの濃度は有意な逆相関を示すことを見出した(下図B、参考論文2)。



これらのことから、赤血球の過酸化障害により脳への酸素供給が損なわれるなどして、こうした機構で、酸化ストレス(脂質過酸化)はADの発症や病状の進行に深く関わる可能性を示唆した。さらに、AD赤血球の過酸化リン脂質とキサントフィル(ルテイン)の逆相関の理由を調べて、脳から血中へ漏出されてきたアミロイドβ(Aβ)の関わりがある可能性を示唆してきた(参考論文3,4)。

他方、上述のようなAD発症機構を明確にして治療の実現を目指すという方向性に加えて、最近では、“いち早くADを察知して、早期に予防策を開始できるようにする、このためのADバイオマーカーの開発”が強く望まれている。我々の知見、すなわち、ADにおける赤血球の過酸化リン脂質、キサントフィル、Aβの変動は、ADバイオマーカーへと活用できる可能性がある。

また、上記とはまったく異なる別のストラテジーとして、ヒトの体内には約1000種の

マイクロRNA(miRNA)の存在が知られるようになり、これらの中から、疾病マーカー(とくに癌)を見いだそうとする試みが諸外国で始められている。AD患者のmiRNA測定例は過去にほとんど無く、miRNA解析により血液から新たなADバイオマーカーを見いだせる可能性がある。

2. 研究の目的

上記の背景を受けて、本研究では、(1)と(2)の研究を進めてADバイオマーカーを確立し、次いで、(3)こうしたADバイオマーカーを制御しAD予防につながり得る食品や食品成分の探索を目指す。すなわち、本研究では、次の研究課題の解決を目的とする。

- (1) ADバイオマーカーとしての赤血球の過酸化リン脂質、キサントフィル、Aβの有用性評価
- (2) miRNAを活用した血液からの新規ADバイオマーカーの探索と有用性評価
- (3) ADバイオマーカーを制御できる食品(成分)の探索と効能評価

3. 研究の方法

- (1) ADバイオマーカーとしての赤血球の過酸化リン脂質、キサントフィル、Aβの有用性評価

AD者(20名程度)と健常高齢者(同20名程度)を集める。この時、ADは外来患者とし、対照の健常高齢者はADの配偶者とする。食生活等の影響を減らし、ADと健常高齢者を比較しやすいように工夫する。加えて、軽度から高度の様々な進行度のAD患者を集める。これらの被験者から採血し、赤血球を調製して、過酸化リン脂質、キサントフィル、Aβを測定する。血漿も同様に調べる。

- (2) miRNAを活用した血液からの新規ADバイオマーカーの探索と有用性評価

ADと健常高齢者から採血する。赤血球や血漿からmiRNAを抽出し、miRNAマイクロアレイを用いて、赤血球や血漿に含まれる約1000種のmiRNAを網羅的に解析する。ADと健常高齢者のmiRNA発現プロファイルと比較し、さらにADのmiRNA発現プロファイルと臨床症状(認知機能等)の関係性を明確にして、有用なADバイオマーカーの発見につなげる。

- (3) ADバイオマーカーを制御できる食品(成分)の探索と効能評価

上述のとおりADバイオマーカーを絞り込んだ後に、これらマーカーを活用して、AD予防につながり得る食品や食品成分の探索へと研究(細胞実験や動物実験)を展開する。

4. 研究成果

- (1) ADバイオマーカーとしての赤血球の過酸化リン脂質、キサントフィル、Aβの有

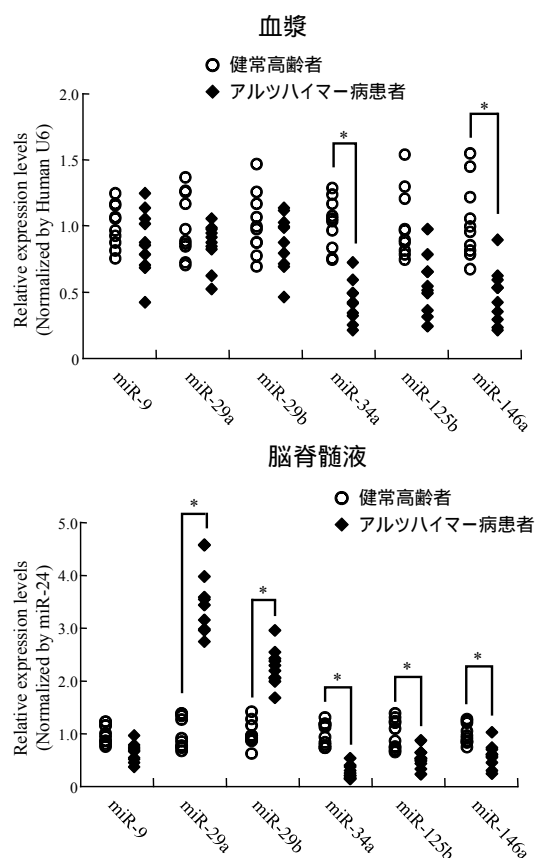
有用性評価

AD と健常高齢者ボランティアを新たに直ちに募集することが困難であったため、参考論文 1 や 2 で得た赤血球および血漿の A β を測定し、参考論文 1 や 2 の論文で既に測定を終えていた過酸化リン脂質とキサントフィル濃度との相関を調べた。その結果、とくに赤血球では A β が影響し、過酸化リン脂質やキサントフィルが大きく変動することを見出した(参考論文 5)。故に、これらの AD バイオマーカーとしての有用性を示唆する知見を得ることができた。

(2) miRNA を活用した血液からの新規 AD バイオマーカーの探索と有用性評価

連携研究者の荒井教授(東北大学加齢医学研究所)がこれまでストックしてきた AD と健常者の血漿から、miRNA を抽出し、血漿に含まれる miRNA を miRNA マイクロアレイや RT-PCR を用いて解析した。その結果、幾つかの有用な AD バイオマーカーを見出した(参考論文 6)。加えて、脳脊髄液も解析し、幾つかの有用な AD バイオマーカーを見出した(参考論文 6)。なお、赤血球の分析も行う予定であったが、試料が得られずこの分析はできなかった。

このようにヒト血漿と脳脊髄液の miRNA 発現プロファイルを数多く得ることができたため、さらに詳細な解析を行い、AD バイオマーカーとして活用できると考えられる有用なヒト miRNA を絞り込んだ(下図、参考論文 7)。



(3) AD バイオマーカーを制御できる食品(成分)の探索と効能評価

上述の(1)と(2)の実験に結果に基づき、絞り込んできた AD バイオマーカーを制御できるルテインなどの食品成分の効能評価(細胞実験や動物実験)を行っている段階である。当初計画では(3)を終える予定であったが、途中となってしまったため、外部資金等を獲得するなどして、継続して(3)を今後も行いたいと考えている。

参考論文

1. K. Nakagawa, T. Kiko, T. Miyazawa, G.C. Burdeos, F. Kimura, A. Satoh, T. Miyazawa, Antioxidant effect of astaxanthin on phospholipid peroxidation in human erythrocytes. *Brit. J. Nutr.*, 105, 1563-1571 (2011)
2. T. Kiko, K. Nakagawa, T. Tsuduki, T. Suzuki, H. Arai, T. Miyazawa, Significance of lutein in red blood cells of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.*, 28, 593-600 (2012)
3. K. Nakagawa, T. Kiko, T. Miyazawa, P. Sookwong, T. Tsuduki, A. Satoh, T. Miyazawa, Amyloid β -induced erythrocytic damage and its attenuation by carotenoids. *FEBS Lett.*, 585, 1249-1254 (2011)
4. K. Nakagawa, T. Kiko, S. Kuriwada, T. Miyazawa, F. Kimura, T. Miyazawa, T. Miyazawa, Amyloid β induces adhesion of erythrocytes to endothelial cells and affects endothelial viability and functionality. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 2030-2033 (2011)
5. T. Kiko, K. Nakagawa, A. Satoh, T. Tsuduki, K. Furukawa, H. Arai, T. Miyazawa, Amyloid β levels in human red blood cells. *PLoS One*, 7, e49620 (2012)
6. T. Kiko, K. Nakagawa, T. Tsuduki, K. Furukawa, H. Arai, T. Miyazawa, MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 39, 253-259 (2014)
7. 喜古健敬, 仲川清隆, 宮澤陽夫, 赤血球キサントフィルの生理的意義: アルツハイマー病の早期発見と食品成分による予防を目指して. *New Food Industry*, 57, 1-9 (2015).

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4件)

1. 喜古健敬, 仲川清隆, 宮澤陽夫, 赤血球キサントフィルの生理的意義: アルツハイマー病の早期発見と食品成分による予防を目指して. *New Food Industry*, 57,

- 1-9 (2015) 査読無
2. T. Kiko, K. Nakagawa, T. Tsuduki, K. Furukawa, H. Arai, T. Miyazawa, MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis., 39, 253-259 (2014), 査読有
 3. K. Nakagawa, Studies targeting α -glucosidase inhibition, antiangiogenic effects, and lipid modification regulation: background, evaluation, and challenges in the development of food ingredients for therapeutic purposes. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 900-908 (2013), 査読有
 4. T. Kiko, K. Nakagawa, A. Satoh, T. Tsuduki, K. Furukawa, H. Arai, T. Miyazawa, Amyloid β levels in human red blood cells. PLoS One, 7, e49620 (2012), 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 仲川清隆, 脂質異常症などの疾病における酸化ストレス発生機序を探る. 第48回日本栄養・食糧学会東北支部大会および公開シンポジウム 2014年11月1日(宮城県仙台市)
2. 宮澤大樹, 仲川清隆, 木村ふみ子, 宮澤陽夫, 食品カロテノイドの生体内抗酸化作用. 日本油化学会第52回年会 2013年9月3-5日(宮城県仙台市)
3. 仲川清隆, 食品と生体の生理活性成分の分析手法開拓と応用. 日本農芸化学東北支部第147回大会 2012年10月5-6日(青森県弘前市)
4. 喜古健敬, 仲川清隆, 荒井啓行, 古川勝敏, 宮澤陽夫, ヒト赤血球に分布するアミロイド : 赤血球膜脂質過酸化、アルツハイマー病への関与の可能性. 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 第20回年会 2012年8月25日(宮城県仙台市)

〔図書〕(計1件)

1. T. Miyazawa, K. Nakagawa, T. Miyazawa, Chapter 12 Liquid chromatography-based assay for carotenoids in human blood. Food and Nutritional Components in Focus No. 1. Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Ed. by V.R. Preedy), The Royal Society of Chemistry, 583 (184-2039) (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲川 清隆 (NAKAGAWA, Kiyotaka)
 東北大学・大学院農学研究科 准教授
 研究者番号：80361145

(2)研究分担者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA, Teruo)
 東北大学・大学院農学研究科 教授
 研究者番号：20157639

(3)連携研究者

荒井 啓行 (ARAI, Hiroyuki)
 東北大学・加齢医学研究所 教授
 研究者番号：30261613