

氏 名(本籍)	やま 山	した 下	しん 慎	し 司
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 博 第 9 1 4 号			
学位授与年月日	平 成 19 年 3 月 27 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科生物産業創成科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	アルツハイマーモデルラットの空間認知力とアミロイド β 凝集反応に対する食餌性プラズマローゲンの効能に関 する研究			
論文審査委員	(主 査)	教 授	宮 澤 陽 夫	
	(副 査)	教 授	山 下 ま り	
		助教授	仲 川 清 隆	
		助教授	清 田 洋 正	

論文内容要旨

緒言

認知（痴呆）症が増加し対策が急務である。我国の認知症の罹患率は平成 12 年に高齢者（65 歳以上）の 7%と報告され、30 年後の平成 42 年には 10%にまで増加すると予測されている¹。認知症の中で、とくにアルツハイマー型認知症の増加が著しい。

アルツハイマー型認知症を特徴付ける病理所見は、アミロイドβからなる老人斑の沈着、リン酸化タウを主要構成成分とする神経原繊維性変化、ならびに選択的神経細胞の脱落である。現在、各種薬剤が開発、実用化されているが、一度脱落した神経細胞を回復するのは難しく、進行の遅延が治療の主流になっている。したがって、アルツハイマー型認知症は予防が重要であり、薬剤開発とともに日常摂取可能な食品由来の成分の活用が期待が寄せられている。

中枢神経系は最も脂質に富む臓器であり、脂質は脳湿重量の 5~15%、乾燥重量にして 65%にものぼる。その脂質組成は特異的であり、ヒトでは全身のコレステロールの約 1/4 がここに含まれている。また、他臓器、例えば肝臓では、ホスファチジルエタノールアミン（PE）の 5%程度しか含まれないプラズマローゲンが脳では PE の 50~65%を占める。これらの脂質は、細胞膜の主要構成成分としての働きだけではなく、個々の脂質が固有の生理機能を担う可能性が示唆されている。

アルツハイマー型認知症の脳では、プラズマローゲン濃度の減少が古くから知られている（Fig. 1, 2）²。プラズマローゲンの生理的な役割はまだよく分かっていない。しかし、プラズマローゲンが非二重層構造であるヘキサゴナル II 構造を形成しやすく、脳神経細胞シナプスなどの膜融合が盛んな組織に多く含まれることから、プラズマローゲンは膜の動的状態（流動性、膜融合）を調節する因子として働いていると考えられる。以前、宮澤はプラズマローゲンが脳の神経細胞死（アポトーシス）を抑制する成分であることを発見した³。これらの事実は、プラズマローゲンが脳神経の機能維持に重要であり、また神経細胞の防御物質として働いている可能性を示唆する。

このような見地から本研究では、食品由来成分による認知症の予防に関する知見を得る目的で、経口的に摂取したプラズマローゲンがアルツハイマーモデ

ル動物の空間認識行動に及ぼす影響を測るとともに、その作用機構を明らかにしようとした。

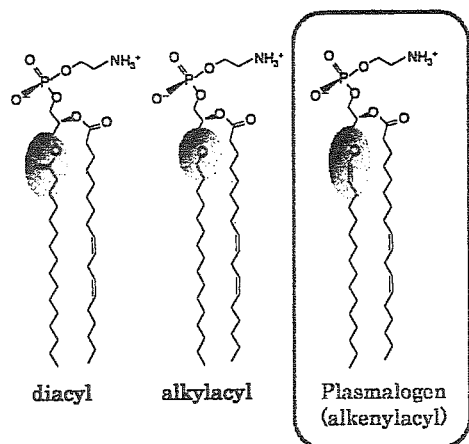


Fig. 1 Chemical structure of plasmalogen and phosphatidylethanolamines subclasses

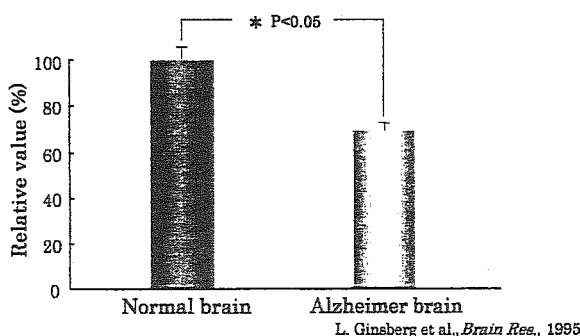


Fig. 2 Decrease of amount of plasmalogen in Alzheimer brain in humans

第一章 アルツハイマーモデルラットにおけるプラズマローゲンの行動改善効果

プラズマローゲンの主な供給源とされる牛脳は、BSE 問題により大量に得るのは困難であり、ヒトへの応用を考えると牛脳を使用するのは不適切であった。以前の宮澤らの研究で、海産無脊椎動物であるホヤ (Fig. 3) には大量にプラズマローゲンが含まれていることが明らかにされている。そこで、ホヤ内臓から40%純度のプラズマローゲンを精製した。これを用いて、プラズマローゲンの経口投与がアルツハイマーモデルラットの行動に与える影響を明らかにしようとした。

[方法]

4世代にわたり魚油抜き飼料 (F-1 : 船橋農場、千葉県、Table 1) で飼育した Wistar 系雄ラットを用い、以下の行動試験を行った (Fig. 4)。行動試験を行うにあたり、ラットを実験者と実験場所に慣らすために、ハンドリングおよびシェーピングを1週間行った。その後、正常時の行動試験を4週間行った。アルツハイマーモデルラットは、凝集核として塩化アルミニウムを脳梁に注入後、アミロイドβ (1-40) を脳梁にオスミニウムポンプにより2週間持続注入することで作製した⁴。アミロイドβを持続的に注入することにより認知障害を起こしたかどうかを4週間の行動試験を行い正常時と比較し、空間認知障害を起

こしているものを、コントロール群とプラズマローゲン群に分け、プラズマローゲンを経口投与した。プラズマローゲンを4週間経口投与後、2週間の行動評価を行い、アルツハイマーモデルラットの空間認知機能に与えるプラズマローゲン経口投与の影響を評価した。行動評価は放射状迷路法による空間認知機能評価を行なった。評価はラットの行動の妨げにならないように、弱光下で、さらにヒトの呼吸音、着ずれの音を消すために、一定のノイズを流しながら行った。参照記憶エラー数 (Reference memory errors; RMEs) は長期記憶を、作業記憶エラー数 (Working memory errors; WMEs) は短期記憶を表す。プラズマローゲンをパーム核由来中鎖脂肪酸に溶解し、150 mg/kg/day で胃ゾンデを6週間経口投与した。なお、プラズマローゲンは酸に弱く、胃内を想定した0.1 M HCl と混合すると、反応30分後から分解が始まることを確認したので、プラズマローゲン投与直前に5%重炭酸ナトリウム水溶液を500 μ l 投与し、胃液内を中和することによりプラズマローゲンの分解を防いだ。ちなみに、食餌と同時にプラズマローゲンを与えると、食餌の緩衝作用によりプラズマローゲンの胃内分解はないことが知られている。

[結果と考察]

●プラズマローゲン投与による行動改善効果

プラズマローゲンをアルツハイマーモデルラットに与えると、行動試験のごく初期から、参照記憶エラー数と作業記憶エラー数が低値を示すことがわかった (Fig. 5)。このことから、プラズマローゲンの経口摂取は即効的に空間認知の改善を促す可能性が示された。

●血漿、肝臓の生化学パラメータへの影響

試験期間終了後のラット体重と肝臓重量に、コントロール群とプラズマローゲン投与群で有意な差はなかった。また、肝臓の機能障害の指標である GOT (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)、GPT (グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)、 γ -GTP (g-グルタールトランスペプチダーゼ) 値および生体内の酸化状態の指標とされている TBARS (チオバルビツール酸反応物質)、 α -トコフェロール (α -Toc) 量においても有意な差はなかった (Table 2)。不飽和脂肪酸を含む飼料を長期投与した試験では、生体内の酸化状態が著しく悪くなることが知られている。プラズマローゲンはそのグリセロール骨格1位のビニルエーテル基および3位のアミノ基により、2位の不飽和脂肪酸が安定である可能性が考えられる。

●血漿、赤血球、肝臓、大脳皮質、海馬の脂質組成に与える影響

ホヤ由来プラズマローゲンを構成する脂肪酸の大部分はドコサヘキサエン酸 (DHA) とエイコサペンタエン酸 (EPA) などの高度不飽和脂肪酸である (Fig.

4)。プラズマローゲンの経口投与は、血漿、赤血球、肝臓中のプラズマローゲン量および DHA と EPA の量を増加させた (Fig. 7, 8)。また、海馬中の n-3 系脂肪酸であるドコサペンタエン酸 (DPA) 量と DHA/AA (アラキドン酸) 比、大脳皮質中の DPA 量を増加させることがわかった (Table 3, 4)。脳中の n-3 系の高度不飽和脂肪酸量や DHA/AA 比は、炎症や行動と関係があることが報告されている。アルツハイマーはアミロイドβを原因とする慢性的な炎症であり、その結果、脳細胞死そして認知障害を引き起こすことが明らかにされている。さらに老化などに起因する血液循環系の低下が脳細胞の貧栄養状態をつくりだし、脳細胞死を促進することが報告されている。今回、脳中のプラズマローゲンの増加は確認できなかったが (Fig. 9)、プラズマローゲンの経口投与による脳中の n-3 系の高度不飽和脂肪酸量の増加と DHA/AA 比の上昇、また血中の DHA と EPA 量の増加は、炎症を防ぎ、血液の流動性を高める効果が期待され、これらが脳神経細胞死の予防に役立っている可能性が示された。



Fig. 3 *Halocynthia roretzi* (common sea squirt)

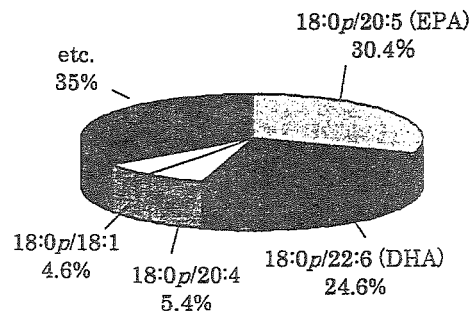
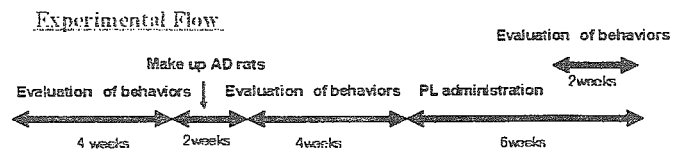
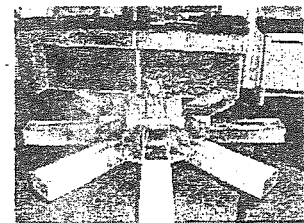


Fig. 4 PE composition of Plasmalogen fraction from Sea squirt



Making up AD rats



Evaluation of behaviors with 8 arms maze

Fig. 5 Preparation of Aβ-infused rats and Radial maze-learning ability

Table 1. Ingredients and fatty acid composition of the F1 diet

	F1 ¹	Fatty acid	F1 ²
	g/kg		g/kg
Corn grain	191	Myristic acid (14:0)	0.9 ± 0.9
Wheat bran	218	Palmitic acid (16:0)	156 ± 5.3
Wheat flour	358	Palmitoleic acid [17:1(n-7)]	ND
Soybean meal	80	Stearic acid (18:0)	54.1 ± 0.9
Casein	40	Oleic acid [18:1(n-9)]	211 ± 1.7
Dry skim milk	38	Linoleic acid [18:2(n-6)]	524 ± 8
Soybean oil	15	Linolenic acid [18:2(n-3)]	44.9 ± 1.3
Mineral mixture	10	Arachidic acid (20:0)	1.4 ± 0.9
Vitamin mixture	10	Eicosenoic acid [20:1(n-9)]	3.3 ± 1.3
Amino acid mixture	10	Arachidonic acid [20:4(n-6)]	ND
DL-Methionine	1	Eicosapentaenoic acid [20:5(n-3)]	0.6 ± 0.6
Calcium carbonate	9	Docosapentaenoic acid [22:5(n-3)]	ND
		Docosahexaenoic acid [22:6(n-3)]	ND
		Lignoceric acid (24:0)	1.1 ± 0.7

¹ The F1 standard diet, containing no fish products, comprised (g/100 g): protein, 21.3; fat 5.1; fiber 1; carbohydrate, 5; nonnitrogen, 57.5; and total energy, 17.7 J/g and was purchased from Funabashi Farm, Chiba, Japan. ² Values are means ± SEM. n = 4; ND, not detected.

Table 2. Body weight, Liver weight and injury index in liver and plasma of Control group and Plasmalogen group for 6 wk

	Control group	Plasmalogen group
Body weight (g/rat)	403 ± 4	404 ± 7
Liver weight (g/rat)	10.4 ± 0.5	10.2 ± 0.2
Liver		
TBARS (pmol/mg protein)	741.4 ± 32.5	820.8 ± 91.4
αToc (ng/mg protein)	319.9 ± 20.2	421.5 ± 26.9
Plasma		
GOT (IU/l)	56.6 ± 1.9	54.8 ± 1.2
GPT (IU/l)	27.4 ± 0.9	31.1 ± 0.6
γGTP (IU/l)	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2
Total cholesterol (mg/dl)	81.4 ± 3.4	79.3 ± 2.0
HDL-cholesterol (mg/dl)	44.4 ± 1.5	45.4 ± 1.1
LDL-cholesterol (mg/dl)	37.6 ± 2.0	33.9 ± 0.9
TBARS (nmol/ml)	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0
αToc (μg/ml)	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2

Values are means ± SEM, n=8

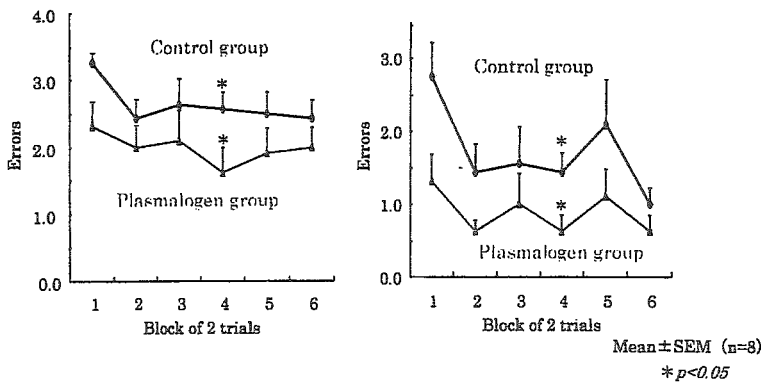


Fig. 6 Effect of plasmalogen administered to Aβ-infused rats on reference memory-related learning ability (right panel) and working memory-related learning ability (left panel) in the radial maze task

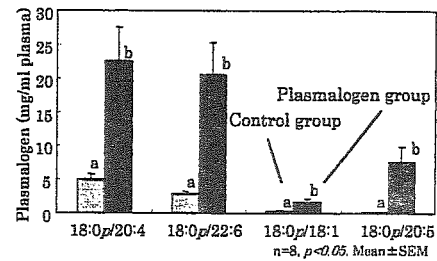


Fig. 7 Plasmalogen amounts in plasma of control group and plasmalogen group rats

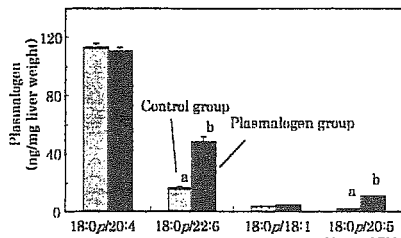


Fig. 8 Plasmalogen amounts in liver of control group and plasmalogen group rats

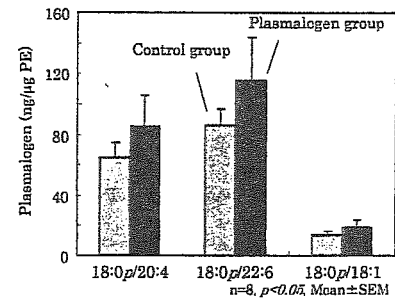


Fig. 9 Plasmalogen amounts in cortex of control group and plasmalogen group rats

Table 3. Hippocampal fatty acid profile in rats of Control group and Plasmalogen group

	Control group	Plasmalogen group
PA	26.48 ± 0.18	26.04 ± 0.14
SA	27.01 ± 0.24	26.74 ± 0.04
OA	18.09 ± 0.33	18.30 ± 0.50
LA	0.69 ± 0.02 ^a	0.75 ± 0.01 ^b
LnA	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
AA	13.32 ± 0.17	13.19 ± 0.18
EPA	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.00
DPA	0.10 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^b
DHA	14.21 ± 0.15	14.77 ± 0.22
DHA/AA	1.07 ± 0.02 ^a	1.12 ± 0.01 ^b

n=8, p<0.05. Mean ± SEM
PA: palmitic acid, SA: stearic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, LnA: n-linolenic acid, AA: arachidonic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid

Table 4. Cortico fatty acid profile in rats of Control group and Plasmalogen group

	Control group	Plasmalogen group
PA	28.15 ± 0.23	28.71 ± 0.55
SA	27.32 ± 0.17	25.76 ± 1.25
OA	15.10 ± 0.27	14.79 ± 0.31
LA	0.89 ± 0.07	0.90 ± 0.05
LnA	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
AA	12.31 ± 0.37	12.67 ± 0.43
EPA	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00
DPA	0.12 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.01 ^b
DHA	16.03 ± 0.35	16.92 ± 0.26
DHA/AA	1.32 ± 0.06	1.35 ± 0.06

n=8, p<0.05. Mean ± SEM
PA: palmitic acid, SA: stearic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, LnA: n-linolenic acid, AA: arachidonic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DPA: docosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid

第二章 プラズマローゲンによるアミロイドβ凝集抑制および分解促進効果

アミロイドβが蓄積すると、脳内に活性酸素が産生され、それによって細胞障害が誘発されることが報告されている。その結果、脳の神経細胞死（アポトーシス）が起こり、記憶伝達のネットワークが断裂され、もの忘れなどの臨床症状が現れるとされている。このことから、アルツハイマー病の予防を目的として、脳内の活性酸素を除去できる成分や、アミロイド蛋白の凝集を抑制する成分、さらには凝集した蛋白を分解できる成分の食品からの探索に興味もたれた。

第一章では、プラズマローゲンの投与によるアルツハイマーモデルラットの行動改善効果が見出された。しかし、プラズマローゲンがどのように行動改善に働いたかは不明であるため、それを明らかにする目的で、本研究ではプラズマローゲンによるアミロイドβ分解促進作用とアミロイドβ凝集抑制作用についてその効能を明らかにしようとした。

【方法】

プラズマローゲンおよびその他のリン脂質のアミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用を、チオフラビンT法によって検討した。チオフラビンTは、凝集しているアミロイドβのβ-シートに結合して蛍光を発する試薬である。すなわち、アミロイドβの凝集体が多ければ多いほど蛍光量は増大し、これを蛍光プレートリーダーで検出することによって、蛋白凝集の指標とする。脂質により蛋白が凝集できなくなると、色素は結合できなくなり、蛍光量は減少する。分解促進実験は、あらかじめ凝集させたアミロイドβと脂質を反応させ、蛋白が解離していくかどうかを測定し、アルツハイマー病の治療効果を検討するものである。また、凝集抑制実験は、未凝集のアミロイドβと脂質を同時に反応させ、蛋白の凝集に対して脂質がどのように影響するかを測定し、アルツハイマー病の予防効果を検討するものである。また、アミロイドβの分解促進効果を透過型電子顕微鏡により確認した⁵。

【結果と考察】

●プラズマローゲンによるアミロイドβ凝集抑制および分解促進効果

グリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンに強いアミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用が認められた (Fig. 10, 11)。同

ジグリセロール骨格の2位にDHAを有するPEおよびPCはアミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用が弱かった。また、オレイン酸あるいはアラキドン酸を含むプラズマローゲンもアミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用は弱かった。

●DHAとアミロイドβの相互間作用

遊離のDHAについて同様のアミロイドβ分解促進およびアミロイドβ凝集抑制試験を行った。DHAはグリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンと同等の強いアミロイドβ分解促進作用を有していたが、アミロイドβ凝集抑制作用は弱かった (Fig. 14)。24時間、37°CでインキュベートしたDHAをアミロイドβ分解試験に供したところ、分解促進活性が認められなかった (Fig. 15)。これらのことから、グリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンは非二重層であるヘキサゴナルII構造により、DHAがアミロイドに作用しやすい形を保ち、かつ1位のビニルエーテル基および3位のアミノ基によりDHAの酸化を防ぐことにより、強いアミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用を示すことが示唆された。

ホヤプラズマローゲンにはグリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンが多いため、アミロイドβ分解促進作用およびアミロイドβ凝集抑制作用をもつ。

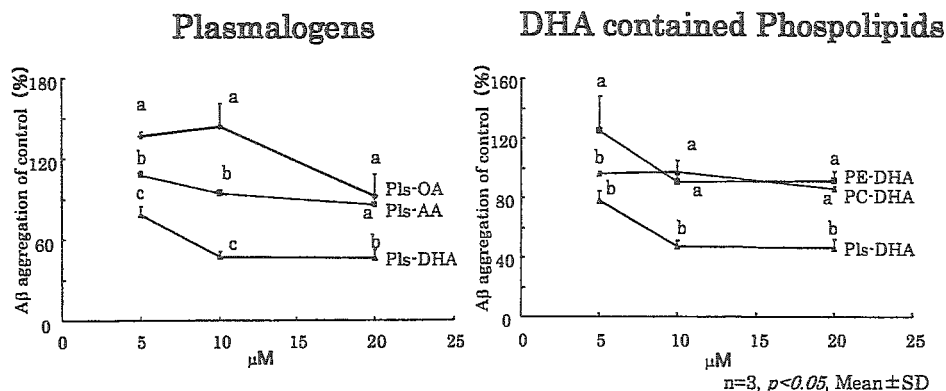


Fig. 10 Effects of plasmalogens and DHA-contained phospholipids on Aβ aggregation

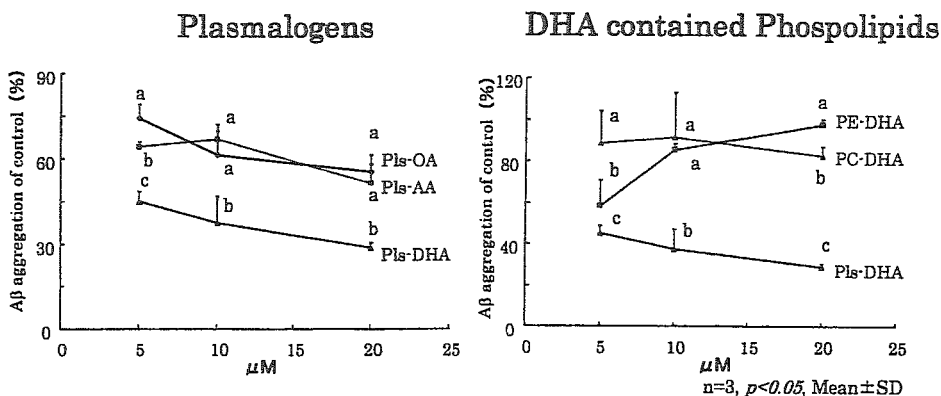


Fig. 11 Effects of plasmalogens and DHA contained phospholipids on destabilization

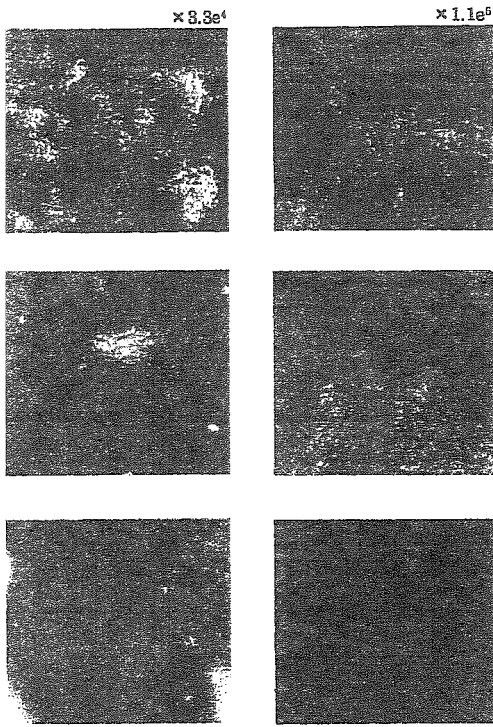


Fig. 12 Electron micrographs of destabilized Aβ. Control (A)*, (B)**, 10 μM DHA (C)*, (D)**, 50 μM (E)*, (F)** * × 3.3e⁴, ** × 1.1e⁵

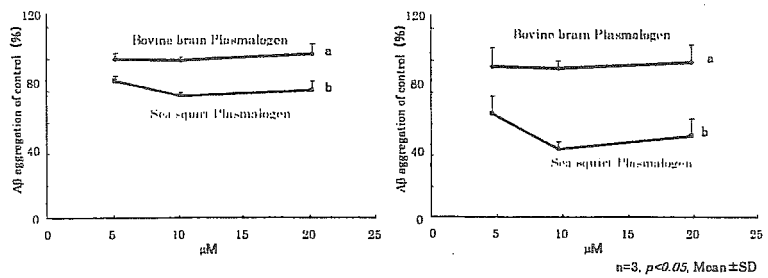


Fig. 13 Effects of plasmalogen from bovine brain and sea squirt on Aβ-aggregation (left panel) and destabilization (right panel) of aggregated Aβ

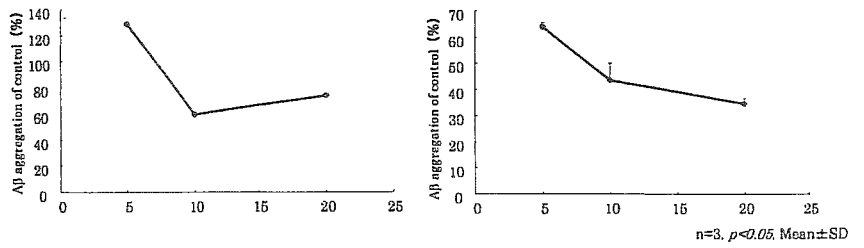


Fig. 14 Effects of DHA on Aβ aggregation (left panel) and destabilization (right panel) of aggregated Aβ

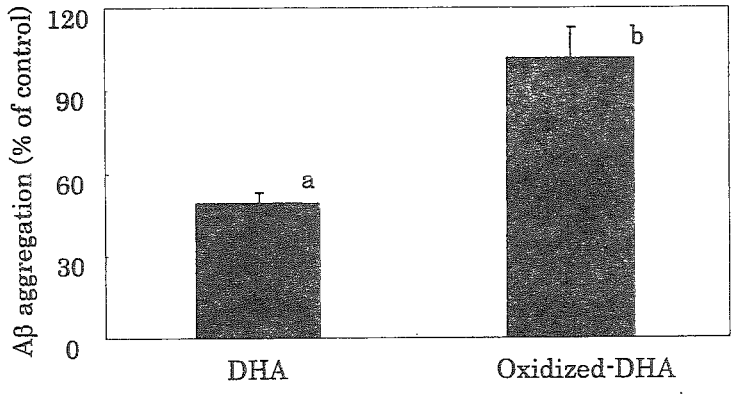


Fig. 15 Effects of DHA and oxidized-DHA on destabilization of aggregated Aβ

【総括】

本研究は、プラズマローゲンのアルツハイマーモデルラットに対する行動改善作用およびその作用機構の解明を目的とした。

アルツハイマーモデルラットを用いた実験の結果、プラズマローゲンの経口投与は、モデルラットの起こす空間認知機能の低下を改善することがわかった。*in vitro*におけるアミロイドβの凝集抑制、分解促進作用の実験の結果、プラズマローゲン、とくにグリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンにアミロイドβの凝集抑制作用と分解促進作用の両方の働きがあることがわかった。

機能性脂質として知られているDHAはアルツハイマー型認知症に効果があることが動物試験およびヒト試験で証明されつつある。しかし、高度不飽和脂肪酸であるDHAの長期投与は生体内の過酸化を引き起こすことが危惧されている。

今回の研究からホヤプラズマローゲンのようにグリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンは高度不飽和脂肪酸を有するにも関わらず、生体内の過酸化を引き起こさないことが確認された。

認知症の予防にかかわる食品成分は長期間摂取可能なものでなければならない。その点で、海産物、とくにホヤに多く含まれるグリセロール骨格の2位にDHAを有するプラズマローゲンは酸化しにくく、長期間の摂取が可能である利点があるため、今後の応用に期待がもたれた。

【参考文献】

1. 国立社会保障人口問題研究所平成14年推計(2002).
2. Ginsberg, L., Rafique, S., Xuereb, J. H., Rapoport, S. I. & Gershfild, N. L. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 698, 223-6 (1995).
3. 官澤陽夫. 神経細胞死予防剤. 特許公開 2004-26803.
4. Hashimoto, M., Hossain, S. & Shido, O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem* 81, 1084-91 (2002)
5. Fujiwara, H., & Arai, H. Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's beta-amyloid proteins. *J Neurosci Res* 84, 427-33 (2006)

論文審査結果要旨

近年、社会の高齢化に伴い認知症、とくにアルツハイマー型認知症が増加し、大きな社会問題となっている。現在のところ、アルツハイマー型認知症に対する有効な治療法はなく、対処は進行の遅延が主である。したがって、アルツハイマー型認知症は早期発見と予防が重要と考えられている。とくに、食品成分の機能性を生かした認知症の進展予防については社会から大きな期待が寄せられている。

アルツハイマー型認知症患者の脳ではビニルエーテル型グリセリン脂質であるプラズマローゲン量が減少することが知られているが、プラズマローゲンの脳神経細胞に対する生理作用は全く解明されていない。そこで本研究では、予備実験で効果の高かった海産物由来プラズマローゲンがアルツハイマーモデル動物の行動に与える影響を明らかにしようとした。

第一章において、アルツハイマー型認知症の原因のひとつであるアミロイド β をラット脳室内へ持続的に注入を行うアルツハイマーモデルラットを作製した。このモデルラットを用い、海産プラズマローゲンの経口投与と空間認知試験を行った。プラズマローゲンの経口投与はモデルラットの空間認知障害を有意に改善することを明らかにした。また、高度不飽和脂肪酸を含むプラズマローゲンの長期摂取は生体内脂質の過酸化が危惧されたが、血漿や肝臓の過酸化指標であるTBARS(チオバルビツール酸様物質)値や α -Toc(トコフェロール)量の変化がないことから、悪影響はないことを明らかにした。したがって、プラズマローゲンの経口投与はアミロイド β に起因する空間認知障害を改善し、かつ、体内において酸化していないことから長期投与が可能であり、アルツハイマー型認知症の予防に対する有効性が示唆された。

第二章で、前章の実験の空間認知障害の改善に対する海産プラズマローゲンの作用機構を明らかにするために、プラズマローゲンとアミロイド β を用いた *in vitro* 系での実験を行った。アミロイド β は凝集することで神経毒性を示し、神経細胞を死に至らしめることがわかっている。そこでプラズマローゲン、とくに分子内グリセロール骨格の2位にドコサヘキサエン酸(DHA)を有するプラズマローゲンに強いアミロイド β 凝集抑制および凝集物分解作用があることを明らかにした。また、これはプラズマローゲン分子内に特有のものであり、グリセロール骨格の2位にDHAを有するほかのグリセリン脂質では凝集抑制も凝集物分解作用も示さないことを明らかにした。

以上のように、本研究では海産プラズマローゲンが脳内のアミロイド β により引き起こされる空間認知障害を改善することをはじめて明らかにした。また、そのプラズマローゲン、とくに海産プラズマローゲンに多く含まれるグリセロール骨格の2位にDHAをもつプラズマローゲンに強いアミロイド β 凝集抑制および分解作用があることを明らかにした。これらの発見の社会への波及性はきわめて高いと判断した。したがって、審査員一同は、本研究を博士(農学)の学位を授与するに値するものと認定した。