

き こ たけひろ

氏名（本籍地） 喜古健敬

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第1088号

学位授与年月日 平成26年3月26日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項

研究科，専攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科生物産業創成科学専攻

論文題目 アルツハイマー病の食品成分による制御と新規バイオマーカー探索に関する研究

博士論文審査委員（主査）教授 宮澤陽夫

教授 桑原重文

准教授 仲川清隆

准教授 都築毅

論文内容要旨

諸言

社会の高齢化に伴い、アルツハイマー病は深刻な社会問題となっている。当研究室では、アルツハイマー病患者の赤血球膜に過酸化リン脂質が異常に蓄積していることを見出した [1]。過酸化リン脂質を多く含む老化赤血球の増加は、血液レオロジーの悪化や脳への慢性的な酸素供給量の低下を引き起こし、アルツハイマー病などの老化性痴呆症の発症や進行に繋がると考えられた。そこで、赤血球膜脂質の過酸化を抑制できる食品成分を探索し、動物実験でカロテノイド摂取の有効性を確認した [2]。さらに、ヒト赤血球のカロテノイドの分析法を開発し、健常者の赤血球にルテインなどの極性カロテノイド(キサントフィル)が多いことを明らかにした [3]。本研究では、アルツハイマー病患者における赤血球過酸化リン脂質の高値の検証と、従来知られていない赤血球カロテノイド(とくにキサントフィル)との量的関係の解明を目的とした。さらに、赤血球の過酸化(老化)防止に着目しながら、キサントフィル摂取の有効性を *in vitro* 試験、マウス試験、およびヒト試験で明らかにし、アルツハイマー病における赤血球キサントフィルの生理的意義の解明を目指した。

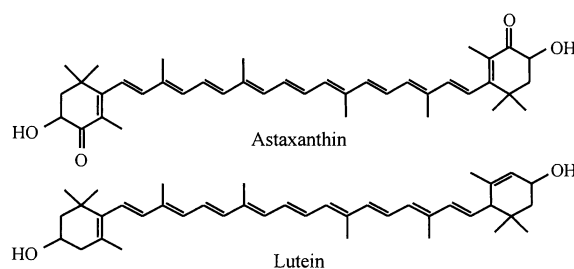


Fig. 1 Chemical structures of astaxanthin and lutein.

一方、アルツハイマー病の有効な治療法は未だ開発されていないため、早期に予防策を実施することが重要であると考えられている。したがって、アルツハイマー病を高感度選択的に検知できるバイオマーカーが求められているが、アルツハイマー病の確定診断に使用できるバイオマーカーは十分に発見されておらず、新しいアプローチが必要とされている [4, 5]。ヒトの体内には約 1000 種の microRNA (miRNA) の存在が知られるようになり、この中から疾病マーカー(とくに癌マーカー)を見出そうとする試みが諸外国で始められている [6, 7]。これまでにアルツハイマー病患者の miRNA 測定例は過去にほとんど無く(血漿の測定例は皆無)、miRNA の測定方法を構築させることで、血漿や脳脊髄液から新たなバイオマーカーを見出せる可能性がある。そこで本研究では、miRNA の測定方法を構築し、血漿や脳脊髄液から、アルツハイマー病の早期発見・予防に資する新規バイオマーカーの探索を目指した。

第1部 アルツハイマー病における赤血球キサントフィルの生理的意義

第1章 アルツハイマー病における赤血球老化とカロテノイドの関係

【目的】アルツハイマー病、赤血球脂質過酸化、カロテノイドの相互関係の解明に向けて、従来知られていないアルツハイマー病患者の赤血球カロテノイド組成、とくにキサントフィルと過酸化リン脂質の量的関係、健常者との比較に興味を持たれ、これらの点を明らかにしようとした。

【方法】アルツハイマー病患者(男性15名, 女性13名, 74±1歳(平均±標準誤差), BMI (Body mass index) 22±1 kg/m²)と、その健常配偶者(男性13名, 女性15名, 73±1歳, BMI 23±1 kg/m²)の赤血球と血漿のカロテノイド(UV-HPLC法)、過酸化リン脂質(化学発光検出-HPLC法)、ビタミンE(蛍光-HPLC法)を定量した。本実験は東北大学医学部との共同研究で行われた。

【結果】アルツハイマー病患者の赤血球では、極性カロテノイド(ルテイン、ゼアキサントリン、β-クリプトキサントリン)が全体の90%以上を占めた。これは健常者の赤血球カロテノイド組成と同様であったが、アルツハイマー病患者ではいずれの赤血球カロテノイド濃度も健常配偶者に比べ低値で(Fig. 2)、とくに赤血球の主要カロテノイドであるルテインの低下が著しいことを認めた。アルツハイマー病患者の赤血球膜の過酸化リン脂質は、年齢に伴い増加し(平均83±14 pmol/mL packed cells)、健常配偶者に比べ3倍高値であった(Fig. 2)。赤血球膜の過酸化リン脂質とルテイン濃度は逆相関することが明らかとなった(Fig. 3)。血漿の過酸化リン脂質と血中のビタミンEはアルツハイマー病患者と健常配偶者で差はなかった。以上より、赤血球の主要カロテノイドであるルテインが赤血球膜の過酸化抑制に寄与していると示唆された。

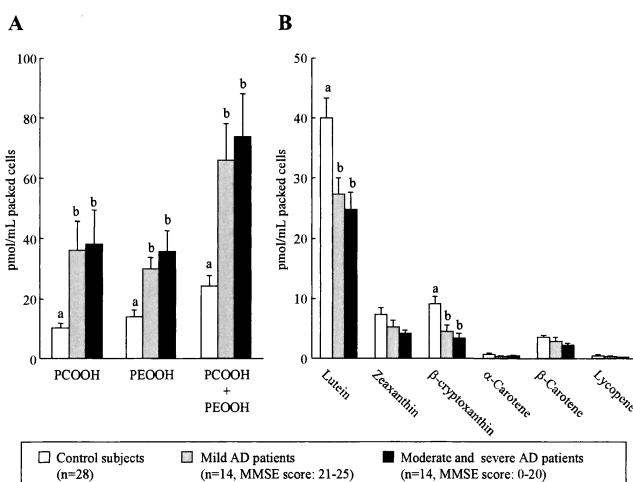


Fig. 2 RBC phospholipid hydroperoxide concentrations (A) and RBC carotenoid concentrations (B) in AD patients and control subjects. Values are means ± SE. Difference is considered significant from control subjects ($P < 0.05$).

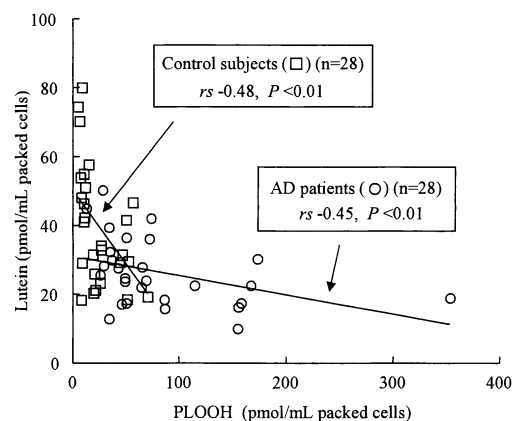


Fig. 3 Correlation between RBC phospholipid hydroperoxide and lutein concentrations in AD patients and control subjects (N=28).

第1部第2章 アルツハイマー病における赤血球老化とカロテノイド濃度低下の機構解明に関する *in vitro* 試験

【目的】近年、アミロイドβ (Aβ, アルツハイマー病要因のひとつ) が血液中に含まれることが明らかになってきており [8, 9]、Aβの赤血球に対する影響についても興味を持たれ始めてきている。赤血球に沈着したAβは、赤血球の形態や変形能を悪化させることが報告され [10]、Aβが第1章第1部で確認したアルツハイマー病患者の赤血球の過酸化リン脂質の蓄積や、赤血球機能の低下の要因となる可能性が推察された。そこで、本研究では、Aβが赤血球膜の過酸化に寄与しているか明らかにするため、*in vitro* 試験で赤血球にAβを処理し、赤血球の過酸化リン脂質と抗酸化物質であるカロテノイドを測定することにした。

【方法】*in vitro* 試験で、健常者赤血球にビオチン化したAβ (0~10 μM) を処理し、顕微鏡による形態観察とともに、フローサイトメーターにより接着量を測定した。健常者赤血球へAβ (0~10 μM) を処理し、過酸化リン脂質、カロテノイドをHPLCにより定量した。

【結果】*in vitro* 試験でAβを健常者赤血球に処理し、共焦点顕微鏡で観察したところ、Aβが赤血球の膜に沈着し、赤血球の凝集が認められた。Aβの赤血球への沈着量をフローサイトメーターにより測定すると、濃度依存的かつ時間依存的に接着していた。次に、Aβを処理した赤血球の過酸化リン脂質とカロテノイドを測定したところ、アルツハイマー病患者で見られたように過酸化リン脂質濃度は増加し (Fig. 4)、カロテノイド、とくにキサントフィル濃度は低下していた (Fig. 5)。Aβはフリーラジカルを発生し、細胞の損傷、脂質やタンパク質の過酸化を引き起こすことが知られている。Aβは血液中を循環していることから赤血球と容易に接触可能であるため、Aβが赤血球の老化に寄与していると考えられた。赤血球膜へのAβの沈着による赤血球の老化 (赤血球の変性や凝集、脂質過酸化の亢進) が、血液レオロジーの悪化、赤血球の酸素運搬能力の低下、赤血球の血管内皮細胞接着による血流の悪化を引き起こし、アルツハイマー病の発症や進行に繋がる一つの要因となる可能性が考えられた。

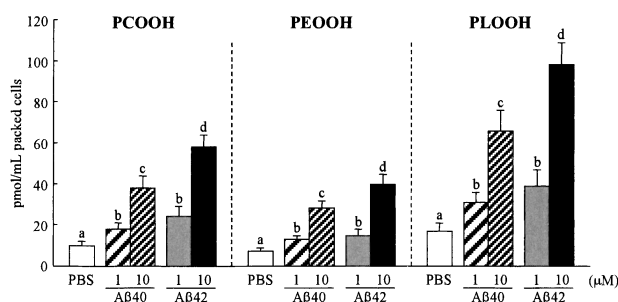


Fig. 4 Aβ40 or Aβ42 induces membrane phospholipid peroxidation increase in RBCs. RBCs were exposed for 12 hour at 37°C to the indicated concentrations of Aβ40 or Aβ42 and the levels of RBCs phospholipid hydroperoxides were quantified. Values are expressed as mean ± SD. The determinations were made from 3 separated experiments. Means with different superscript letter (a,b,c,d) are significantly different ($P < 0.05$).

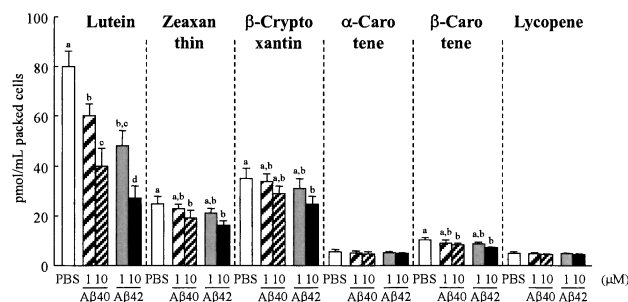


Fig. 5 Aβ40 or Aβ42 induces membrane carotenoids decrease in RBCs. RBCs were exposed for 12 hour at 37°C to the indicated concentrations of Aβ40 or Aβ42 and the levels of RBCs carotenoids (A), and RBCs tocopherols (B) were quantified. Values are expressed as mean ± SD. The determinations were made from 3 separated experiments. Means with different superscript letter (a,b,c,d) are significantly different ($P < 0.05$).

第1部第3章 赤血球の老化防止のためのカロテノイド摂取の有効性に関する*in vitro*、マウス、およびヒト試験

【目的】第1部第1章でアルツハイマー病患者の赤血球の過酸化リン脂質の蓄積と、赤血球カロテノイド、とくにキサントフィル濃度の低下を明らかにした。第1部第2章で、*in vitro* 試験により、Aβが赤血球の脂質過酸化とカロテノイド濃度の低下を引き起こすことを見出した。そこで本研究では、赤血球の過酸化（老化）防止に着目しながら、キサントフィル摂取の有効性を *in vitro* 試験、マウス試験、およびヒト試験で明らかにし、アルツハイマー病における赤血球キサントフィルの生理的意義の解明を目指した。

【方法】*in vitro* 試験で、健常者赤血球あるいはキサントフィルを多含させた赤血球にAβを処理し、顕微鏡による形態観察とともに、過酸化リン脂質とカロテノイドを定量した。マウスにルテインあるいはアスタキサンチン（40 mg/kg/day）を一週間与え、その後にAβを尾静脈注射し、赤血球の過酸化リン脂質、カロテノイドを測定した。キサントフィルのサプリメント（アスタキサンチン 0~12 mg/day）を健常者に12週間与え、赤血球のアスタキサンチン、過酸化リン脂質、Aβを定量した。

【結果】*in vitro* 試験でAβをキサントフィル（ルテイン、アスタキサンチン）をあらかじめ高めた赤血球に処理すると、Aβの沈着や脂質過酸化は認められなかったため（Fig. 6）、キサントフィルの生理的意義として赤血球の抗老化作用が示唆された。動物試験においても、キサントフィル（ルテイン、アスタキサンチン）を摂取させたマウスでは、尾静脈注射したAβの赤血球膜への沈着、脂質過酸化が抑制された（Fig. 7）。そこでヒト試験を行い、アスタキサンチン投与による赤血球のアスタキサンチンの増加、過酸化リン脂質とAβの低下を認めた（Fig. 8-12）。以上より、赤血球の老化抑制にキサントフィルの寄与が明らかとなり、キサントフィル摂取によるアルツハイマー病の予防や進行抑制の可能性を見出した。

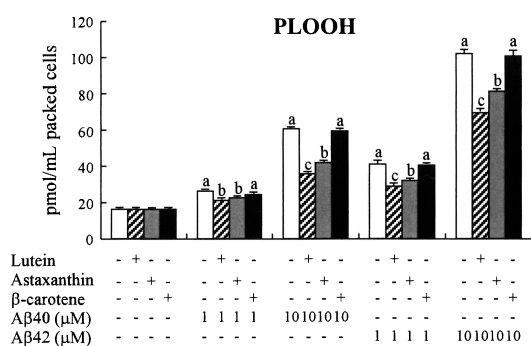


Fig. 6 Effect of carotenoids on the phospholipids peroxidation of RBCs exposed to Aβ40 or Aβ42. RBCs were treated with lutein, astaxanthin, β-carotene or PBS (control) for 4 hour at 37°C. Then these RBCs were reacted with indicated concentrations of Aβ40 or Aβ42 for 12 hour at 37°C, and the levels of RBC phospholipid hydroperoxides (PLOOH) were quantified. Values are expressed as mean ± SD. The determinations were made from 3 separated experiments. Means with different superscript letter (a,b,c) are significantly different ($P < 0.05$).

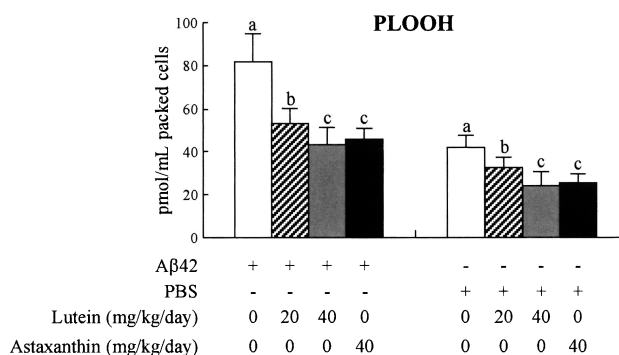


Fig. 7 Effect of lutein or astaxanthin on levels of phospholipid peroxidation products of RBCs exposed to Aβ42. A suspension of the Aβ42 at a concentration of 100 μM was made in PBS, and 100 μL of this suspension was injected to mice via their tail vein. After 5 hours of the injection, mice were de-headed and blood was collected. RBCs were separated and levels of phospholipid hydroperoxides (PLOOH) were quantified. Values are expressed as mean ± SD. The determinations were made from 3 separated experiments. Means with different superscript letter (a,b,c) are significantly different ($P < 0.05$).

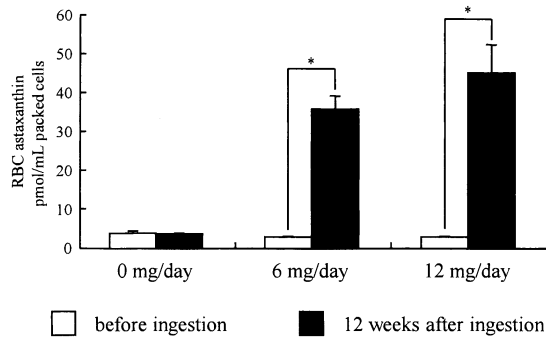


Fig. 8 Concentrations of astaxanthin in RBCs. Subjects took one capsule (containing 0, or 6 or 12 mg astaxanthin) once a day for 12 weeks. Values were expressed as mean \pm SE. (N=10). Difference is considered significant from before ingestion (* $P < 0.01$).

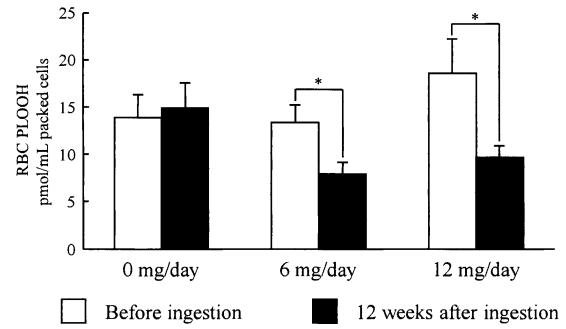


Fig. 9 Concentrations of phospholipid hydroperoxides (PLOOH) in RBCs. Subjects took one capsule (containing 0, or 6 or 12 mg astaxanthin) once a day for 12 weeks. Values were expressed as mean \pm SE. (N=10). Difference is considered significant from before ingestion (* $P < 0.05$).

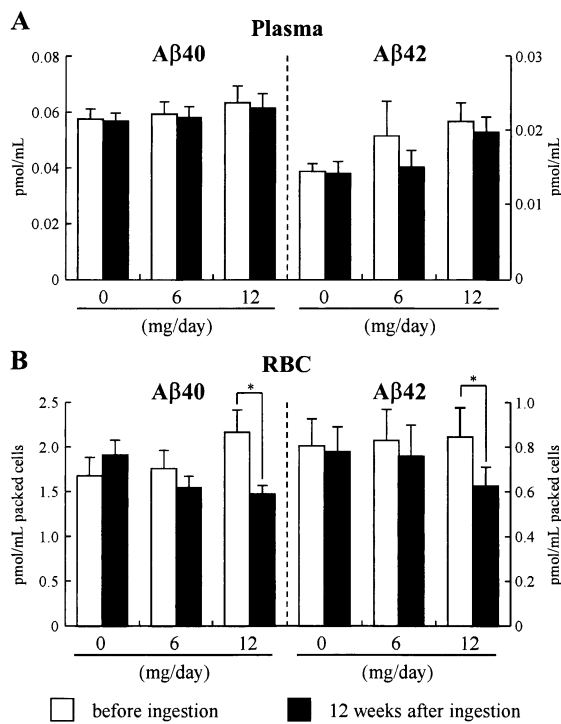


Fig. 10 Concentrations of Aβ40 and Aβ42 in RBCs. Subjects took one capsule (containing 0, or 6 or 12 mg astaxanthin) once a day for 12 weeks. Values were expressed as mean \pm SE. (N=10). Difference is considered significant from before ingestion (* $P < 0.01$).

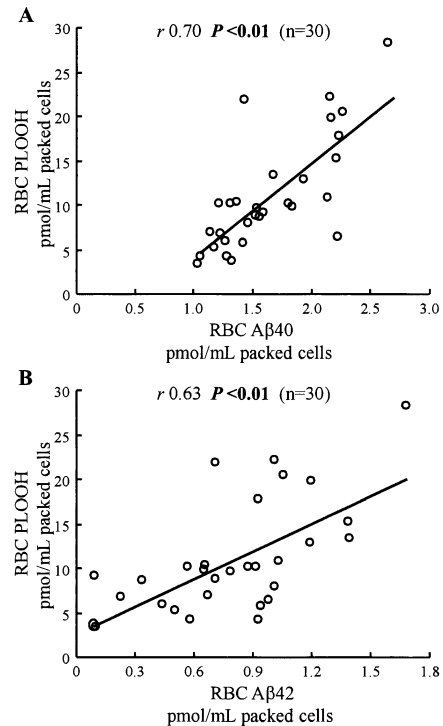


Fig. 11 Correlation plot between PLOOH and Aβ40 (A), PLOOH and Aβ42 (B) taken 12 weeks after ingestion of food-grade astaxanthin. A significant positive correlation ($P < 0.01$) is found in samples (N=30).

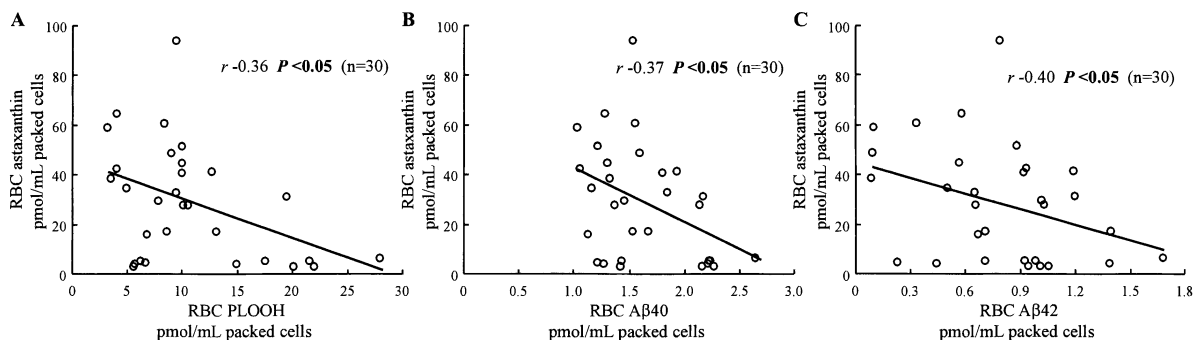


Fig. 12 Correlation plot between astaxanthin and PLOOH (A), astaxanthin and Aβ40 (B), or astaxanthin and Aβ42 (C) taken 12 weeks after ingestion of food-grade astaxanthin. A significant negative correlation ($P < 0.05$) is found in samples (N=30).

第2部 microRNA を用いたアルツハイマー病のバイオマーカー探索

第1章 血漿および脳脊髄液の microRNA 抽出法の検討

【目的】血液などの体液中に存在する miRNA のバイオマーカー研究は、ここ数年で急速に進展した分野であるため、体液中の miRNA 定量の標準化されたプロトコールが確立されていない。そこで、miRNA によるアルツハイマー病のバイオマーカー探索に向け、血漿、脳脊髄液の miRNA 定量法を確立にすることにした。

【方法】ラット及びヒト血漿、脳脊髄液を以下のキット及び方法（miRNeasy Mini、Qiagen、mirVana miRNA PARIS Kit、Ambion、mirVana miRNA Isolation Kit、Ambion、Isopropanol 沈殿法）により、抽出法を検討することにした。miRNA 濃度は、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers により測定した。miRNA の抽出の確認は、Agilent 2100 Bioanalyzer にて行った。Real-time 定量 RT-PCR 分析により、内部標準遺伝子の確認を行った。

【結果】miRNeasy Mini を用いた場合には、血漿及び脳脊髄液に 3.5 倍量の QIAzol Lysis Reagent を加え、0.7 倍量のクロロホルム、1.5 倍量のエタノールを処理すると血漿及び脳脊髄液の miRNA を抽出することができた。また、血漿についてはヘパリン採血は適しておらず、EDTA 採血でなければならないことが明らかとなった。Agilent 2100 Bioanalyzer の分析により、血漿、脳脊髄液の miRNA のピークが明瞭に認められた。Real-time 定量 RT-PCR 分析により、血漿、脳脊髄液の内部標準遺伝子（ヒト血漿：Human U6、ヒト脳脊髄液：miR-24）（ラット血漿：U6 snRNA、ラット脳脊髄液：miR-124）の確認ができた。次に他の方法と比較したところ、mirVana miRNA PARIS Kit、mirVana miRNA Isolation Kit では、Agilent 2100 Bioanalyzer によるピークが認められず、これらの方法では血漿及び脳脊髄液 miRNA を適切に抽出することができないことがわかった。Isopropanol 沈殿法では、miRNA の抽出を確認できたが、操作が煩雑かつ時間がかかることから、miRNeasy Mini を用いた方がよいと考えられた。本研究において、血漿と脳脊髄液の miRNA 抽出法の確立に成功した。この方法を用いて、血漿と脳脊髄液の miRNA を用いたアルツハイマー病バイオマーカー探索を行うことにした。

第2部第2章 microRNA を用いたアルツハイマー病のバイオマーカー探索

【目的】アルツハイマー病患者の非侵襲サンプルの miRNA 分析例は2例（脳脊髄液や白血球）しかなく、血漿および脳脊髄液の miRNA がアルツハイマー病の確定診断に有用なツールかは未だ不明確なままである。これらの研究や他の非侵襲性の miRNA 発現解析の最近の報告をもとに、本研究ではアルツハイマー病患者と健常高齢者の血漿と脳脊髄液のバイオマーカー候補 miRNA (miR-9、miR-29a、miR-29b、miR-34a、miR-125b、miR-146a) を定量 RT-PCR を用いて分析し、アルツハイマー病の miRNA バイオマーカーを探索することにした。

【方法】アルツハイマー病患者（男性3名、女性7名、81±6歳（平均±標準偏差））と、その健常高齢者（男性4名、女性6名、73±5歳）の血漿と脳脊髄液の6種類の miRNA (miR-9、miR-29a、miR-29b、miR-34a、miR-125b、miR-146a) を定量 RT-PCR によりした。本実験は東北大学医学部との共同研究で行われた。

【結果】血漿及び脳脊髄液の6つの miRNA (miR-9、miR-29a、miR-29b、miR-34a、miR-125b、miR-146a) は、定量 RT-PCR により測定することができた (Fig. 13, 14)。miR-29a と miR-29b は脳で発現し、アルツハイマー病の原因の一つである Aβ の発現を抑制すると考えられている。本研究の結果から、miR-29a と miR-29b は脳から髄液中に放出されると予想され、脳内 Aβ の増加（アルツハイマー症状の増悪化）に繋がるという新たな可能性が示唆された。また、miR-34a や miR-146a などは、アルツハイマー病の要因の一つである酸化ストレスの発生に係ることが知られており、これらの miRNA は脳脊髄液中の濃度が低値となることも明らかとなった。さらに、脳に非常に多く含まれ、ニューロン形成、形態形成、脳細胞増殖に関与する miR-9 や miR-125b も、血漿と脳脊髄液で低値であった。こうした結果から、今回我々が見出したアルツハイマー病患者の血漿や脳脊髄液で変動している6種の miRNA は、病状との関係が示唆され、それ故、バイオマーカーとしての活用が期待された。今後、血漿や脳脊髄液中に miRNA が排泄されるメカニズムを詳細に解明していくことで、バイオマーカーとしての有用性がさらに高まると考えられた。

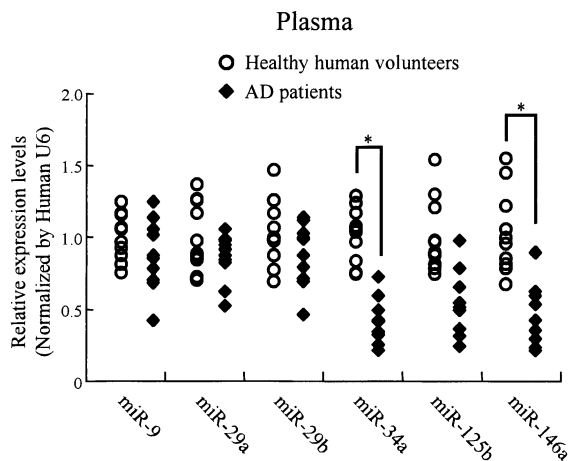


Fig. 13 miRNA levels in plasma of healthy human volunteers and AD patients. Values are mean ± SD (N=10). Difference is considered significant from control subjects ($P < 0.05$).

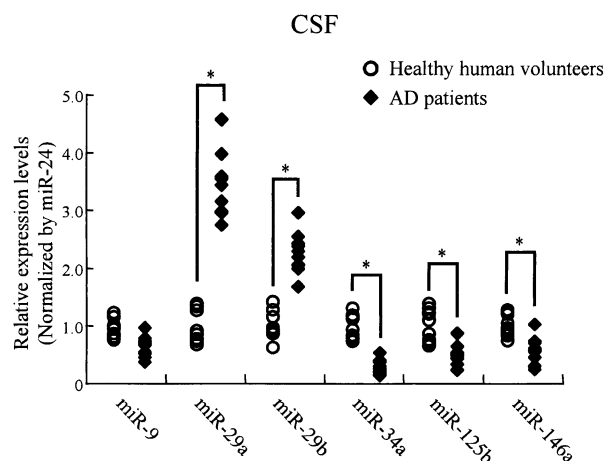


Fig. 14 miRNA levels in CSF of healthy human volunteers and AD patients. Values are mean ± SD (N=10). Difference is considered significant from control subjects ($P < 0.05$).

総括

本研究で得た結果を以下に総括する。

第1部第1章では、アルツハイマー病患者では、健常配偶者に比べ、赤血球の過酸化リン脂質濃度が高値で、ルテインなどのキサントフィルは低値であり、過酸化リン脂質濃度とルテインの濃度が逆相関することを明らかとした。

第1部第2章では、 $A\beta$ に着目し、*in vitro*試験により、アルツハイマー病における赤血球老化とカロテノイド濃度低下の機構を明らかとした。 $A\beta$ は、濃度かつ時間依存的に赤血球膜に沈着し、赤血球膜を変性させ、赤血球の凝集、脂質過酸化の亢進を引き起こし、 $A\beta$ が赤血球の老化に重要な意義を持つ可能性を見出した。また、赤血球のカロテノイド、とくにルテイン濃度を低下させることを明らかにした。

第1部第3章では、赤血球老化に対するカロテノイド補給の有効性を明らかとした。*in vitro*試験において、キサントフィル（ルテイン、アスタキサンチン）をあらかじめ高めた赤血球では、 $A\beta$ の沈着や脂質過酸化は認められなかった。動物試験の結果もこれを支持するものであった。さらに、ヒト試験においても、キサントフィル投与による赤血球のアスタキサンチンの増加、過酸化リン脂質、 $A\beta$ の低下を認めた。

第2部第1章では、血漿と脳脊髄液からのmiRNA抽出法を確立させた。

第2部第2章では、アルツハイマー病の病状との関係が示唆される血漿と脳脊髄液の6種類のバイオマーカー候補miRNA（血漿:miR-34a、miR-146a）（脳脊髄液miR-29a、miR-29b、miR-34a、miR-125b、miR-146a）を見出した。

アルツハイマー病のように長期間の継続的な摂取が想定される場合には、摂取する成分の安全性が特に重要である。ルテインやアスタキサンチンなどのキサントフィルのような食品成分は、その長い食経験から裏付けられた高い安全性に大きな利点がある。食品成分の利用に際し、相乗的な作用を期待するためには、食品成分の機能性や作用機構を明らかにしていくことは重要であると考えられる。

以上より、赤血球のキサントフィルの生理的意義としての赤血球の老化抑制作用を明らかにした。ヒト臨床試験においての更なる検討は必要であるが、アルツハイマー病の予防や治療に貢献できるキサントフィルの可能性が期待された。

一方、現段階では、アルツハイマー病を完治できる治療法は見出されていないため、早期に予防策を開始できるように、アルツハイマー病の早期発見・予防に資するバイオマーカーを組み合わせることで予防や治療を有効に進めていくことも求められている。本研究では、血漿、脳脊髄液から新たなアルツハイマー病のバイオマーカー候補を見出すことができた。これらバイオマーカーの活用により、アルツハイマー病発症の前段階で病気の予兆を見出すことができれば、薬だけでなく、日常生活を営みながらキサントフィルを含む食品（または食品成分）でアルツハイマー病の発症や進展を抑制できる可能性が期待された。

引用文献

- 1) Miyazawa, T., Suzuki, T., Yasuda, K., Fujimoto, K., Meguro, K., Sasaki, H. (1992) *Oxygen Radicals* Elsevier, Amsterdam, 327-330
- 2) Nakagawa, K., Fujimoto, K., Miyazawa, T. (1996) *Biochim Biophys Acta* 1299, 110-116
- 3) Nakagawa, K., Kiko, T., Hatade, K., Akira, A., Kimura, F., Sookwong, P., Tsuduki, T., Arai, H., Miyazawa, T. (2008) *Anal Biochem* 381, 129-134
- 4) Han, X., Rozen, S., Boyle, S.H., Hellegers, C., Cheng, H., Burke, J.R., Welsh-Bohmer, K.A., Doraiswamy, P.M., Kaddurah-Daouk, R. (2011) *PLoS One* 6, e21643
- 5) Hye, A., Lynham, S., Thambisetty, M., Causevic, M., Campbell, J., Byers, H.L., Hooper, C., Rijdsdijk, F., Tabrizi, S.J., Banner, S., Shaw, C.E., Foy, C., Poppe, M., Archer, N., Hamilton, G., Powell, J., Brown, R.G., Sham, P., Ward, M., Lovestone, S. (2006) *Brain* 129, 3042-3050
- 6) Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 10513-10518
- 7) Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.Y. (2008) *Cell Res* 18, 997-1006
- 8) Van Oijen, M., Hofman, A., Soares, H.D., Koudstaal, P.J., Breteler, M.M. (2006) *Lancet Neurol* 5, 655-660
- 9) DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M., Holtzman, D.M. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8850-8855
- 10) Jayakumar, R., Kusiak, J.W., Chrest, F.J., Demehin, A.A., Murali, J., Wersto, R.P., Nagababu, E., Ravi, L., Rifkind, J.M. (2003) *Biochim Biophys Acta* 1622, 20-28

国際学会での発表

- 1) The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine, Sendai, Japan, 4-6 November 2009
Miyazawa, T., Kiko, T., Nakagawa, K., Arai, H., Miyazawa, T.
"Amyloid- β causes erythrocyte membrane lipid peroxidation being characteristic in Alzheimer disease."
- 2) New Developments in Carotenoids Research, Boston, USA, 11-12 March 2011
Miyazawa, T., Kiko, T., Nakagawa, K., Arai, H., Miyazawa, T.
"Lutein and astaxanthin prevent lipid oxidation in erythrocyte membrane as being characteristic Alzheimer disease"
- 3) XI Asian Congress of Nutrition 2011, Singapore, 13-16 July 2011
Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kiko, T., Sato, A., Miyazawa, T.
"Dietary astaxanthin prevents membrane phospholipid oxidation in red blood cells"

論文審査結果要旨

社会の高齢化に伴い、アルツハイマー病（AD）は深刻な社会問題となっている。機能分子解析学研究室では、AD患者の赤血球膜に過酸化リン脂質が異常に蓄積していることを見出した。赤血球膜脂質の過酸化を抑制できる食品成分を探索し、動物実験でカロテノイド摂取の有効性を確認した。上記知見から、本博士論文第一部では、次の成果を論じたものである。AD患者における赤血球過酸化リン脂質の高値の検証と、赤血球カロテノイド（とくにキサントフィル）との量的関係を明らかにする。さらに、キサントフィル摂取の有効性を *in vitro* 試験、マウス試験、およびヒト試験で明らかにし、ADにおける赤血球キサントフィルの生理的意義を解明する。

一方、ADの有効な治療法は未だ開発されていないため、早期に予防策を実施することが重要である。しかし、ADの確定診断に使用できるバイオマーカーは発見されていないため、新しいアプローチが必要とされている。本博士論文第二部では、次の成果を論じたものである。血漿と脳脊髄液の miRNA 測定方法を構築し、血漿と脳脊髄液から、ADの早期発見・予防に資する新規バイオマーカーを探索する。

第一部第一章では、AD患者では、健常配偶者に比べ、赤血球の過酸化リン脂質濃度が高値で、ルテインなどのキサントフィルは低値であり、過酸化リン脂質濃度とルテインの濃度が逆相関することを明らかにした。

第一部第二章では、アミロイドβ（Aβ, AD要因のひとつ）は、濃度かつ時間依存的に赤血球膜に沈着し、赤血球膜を変性させ、赤血球の凝集、脂質過酸化の亢進、およびカロテノイド、とくにキサントフィル濃度の低下を引き起こし、Aβが赤血球の老化に重要な意義を持つことを見出した。

第一部第三章では、赤血球老化に対するカロテノイド補給の有効性を明らかにした。*in vitro* 試験において、キサントフィルをあらかじめ高めた赤血球では、Aβの沈着や脂質過酸化は認められなかった。動物試験の結果もこれを支持するものであった。さらに、ヒト試験においても、キサントフィル投与による赤血球のキサントフィルの増加、過酸化リン脂質、Aβの低下を認めた。したがって、赤血球キサントフィルの生理的意義として、赤血球の老化抑制作用を明らかにした。

第二部第一章では、血漿と脳脊髄液からの miRNA 抽出法を確立した。

第二部第二章では、血漿と脳脊髄液の miRNA を定量 RT-PCR を用いて分析し、6種類のバイオマーカー候補 miRNA（血漿：miR-34a、miR-146a）（脳脊髄液：miR-29a、miR-29b、miR-34a、miR-125b、miR-146a）を見出した。miR-29a と miR-29b は脳で発現し、ADの原因の一つである Aβ の発現を抑制すると考えられている。本研究の結果から、miR-29a と miR-29b は脳から髄液中に放出されると予想され、脳内 Aβ の増加に繋がるという新たな可能性が示された。また、ADの要因の一つである酸化ストレスの発生に関与する miR-34a、miR-146a や、ニューロン形成、脳細胞増殖に関与する miR-9 や miR-125b は、血漿あるいは脳脊髄液で低値であった。したがって、これら6種の miRNA は病状との関係が示唆され、バイオマーカーとしての活用が期待された。

以上示したように、本博士論文は、①従来知られていなかった赤血球キサントフィルの生理的意義として赤血球の老化抑制作用を明らかにし、②miRNA に着目した早期発見・予防に資する新規バイオマーカーを見出していることから、新規的な学術的知見を非常に多く含む。これらは、ADの発症や進展の抑制、およびADの早期発見に大きく寄与するものであり、博士（農学）の学位に値するものと認定した。