

# 平成 19 年度研究報告書

研究代表者

島根難病研究所研究部門 老年研究部門

所属 島根大学医学部生理学講座環境生理学

氏名 橋本道男

## 1. 研究テーマ

スタチン系薬剤によるアルツハイマー型認知症の予防・改善効果（その1）

アルツハイマー型認知症モデルラットの大脳皮質細胞膜脂質ラフト・コレステロールの測定

## 2. 研究者所属氏名

ホサイン・シャダト<sup>1</sup>, 橋本道男<sup>2</sup>, 島田俊夫<sup>3</sup>

## 3. 研究概要

(目的)

近年、アルツハイマー型認知症(AD)の罹患率は脳血管性認知症を上回る様になり、ADの予防・治療法の確立が急がれている。最近、ADの病因として最も注目されているアミロイドタンパク(A $\beta$ )の沈着の過程に、脳内コレステロールが影響している可能性が報告されているが、そのメカニズムの詳細は不明である。一般的に、脳内コレステロール代謝は、血中コレステロール量の変動による影響を受けないとされているが、培養実験、動物実験から得られたデータとヒトでの知見との解離がある。もしも関連性があるとすれば、血中コレステロール代謝は Fluvastatin をはじめとする既知のスタチン系薬剤でコントロールが可能であり、コレステロール代謝と A $\beta$  との関係が明らかになれば、ADの予防・治療法の確立に新たな道が開けると思われる。

神経細胞膜の界面活性剤不溶性膜分画には、コレステロールとスフィンゴ脂質からなる脂質ラフトとよばれる脂質画分が含まれる。神経細胞膜コレステロール量の増加は膜流動性を減弱させ、神経細胞での A $\beta$  の産生と膜への沈着は、この脂質ラフト中のコレステロールの増加により増大すると推察される。我々は最近、A $\beta$  を脳内に沈着させて作製した空間認知機能障害ラット(ADモデルラット)を用いて、ドコサヘキサエン酸(DHA)による空間認知機能予防・改善効果を見出している

---

<sup>1</sup> 難病研究所客員研究員

<sup>2</sup> 島根大学医学部生理学講座環境生理学

<sup>3</sup> 島根大学医学部附属病院循環器診療科

(Hashimoto et al., 2002; Hashimoto et al., 2005). 本研究では、スタチン系薬剤によるアルツハイマー型認知症の予防・改善効果を最終検討課題とし、本年度はこの AD モデルラットの脳皮質由来脂質ラフトのコレステロールと A 量との関係を明らかにする事を目的とする。

(方法)

### 1) アルツハイマー型認知症モデルラットの作製

A<sub>1-40</sub>(ペプチド研究所, 大阪)を最終濃度 0.1 mg / mL となるように溶媒( 35%アセトニトリル + 0.1%トリフルオロ酢酸, pH 2.0)に溶解し、その A をミニ浸透圧ポンプ (Alzet 2002, U.S.A) に注入した。なお、コントロール群には、同様に手術を施し、溶媒のみを側脳室内投与した。手術の手順を以下に示す。Wistar 雄ラット(約 20 週齢)をペントバビタールナトリウム(50mg/kg BW, i.p.)で麻酔したのち、Ear Bars(成茂, 東京)を耳にはめ込み、stereotaxic frame(成茂, 東京)に設置し、頭部を固定した。イソジンで頭皮を消毒し、頭皮を正中切開して頭蓋骨を露出させ、プレグマから後方へ 0.8mm、側方両側へ 1.5mm の部位にマークをし、電動ドリルで穴を開けた。その穴から深さ 3.5mm の位置をもって側脳室とした。なお、側脳室の位置はラット脳地図(Paxinos and Watson)に従って決定した。A 溶液(A 群)または溶剤(vehicle 群)を充填したミニ浸透圧ポンプを背側皮下に装着させ、カニューレ法で右側脳室に刺入し、A あるいは溶媒を右側脳室に注入した。左側脳室には、マイクロシリンジを用いて、AlCl<sub>3</sub>(0.1 mg/mL)を 1 分あたり 1 μL の速度で 5 μL 注入した後、1 分間放置し、針を抜いた。カニューレは、ねじと歯科用セメントで頭蓋骨に固定し、ポンプはラットの背部皮下に埋め込んだ。その後、縫合を行い、縫合周辺部をイソジンで消毒し、ホットカーペット上で、自力で這うようになるまで静置した。側脳室への注入は約 2 週間で終了し、3 週間以上経過すると、脳皮質・海馬への A の沈着が認められるようになる。

### 2) 脳皮質神経細胞の膜ラフトの単離

A 注入後、18 週間後にラットを屠殺し、脳皮質を摘出後、約 100mg の脳皮質を 1%(v/v) Triton X-100 と各種蛋白分解酵素阻害剤を含む 1 mL の Tris-saline 緩衝液( 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl )中で粉碎し、100,000g で 30 分間遠心後、得られた上清はアミロイド 蛋白の測定に供与され、一方の沈渣は、1%(v/v) Triton X-100 と各種蛋白分解酵素阻害剤を含む 1 mL の MES 緩衝液( 25 mM MES, pH 6.5, 0.15 M NaCl )に溶解し、これを界面活性剤不溶性膜分画(脂質ラフト)とした。

### 3) 脂質ラフト中のコレステロール、アミロイド 蛋白、および脂肪酸量の測定

脳皮質から抽出された脂質ラフト分画を、6M 塩酸グアニジンを含む 50mM

Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) に再溶解し、遠心後、得られた上清から、コレステロール、A $\beta$ 、ならびに脂肪酸を測定した。

コレステロールと脂肪酸はガスクロマト法で、A $\beta$  は ELISA 法で測定した。

表1 脂質ラフトの脂質と A $\beta$  量に及ぼすの A $\beta$  の側脳室への注入の影響

	Vehicle 群 (n=7)	A $\beta$ 群 (n=7)
Cholesterol ( $\mu$ g / mg DIFs 蛋白)	245 $\pm$ 12	328 $\pm$ 25 *
Amyloid $\beta$ protein (pg / mg DIFs 蛋白)	87 $\pm$ 5	116 $\pm$ 8 *
Fatty acids (mg / mg DIFs 蛋白)		
Palmitic acid	93 $\pm$ 6	113 $\pm$ 8 *
Stearic acid	84 $\pm$ 2	103 $\pm$ 8 *
Oleic acid	50 $\pm$ 5	61 $\pm$ 6 *
Linoleic acid	2 $\pm$ 0.1	2 $\pm$ 0.1
Linolenic acid	0.05 $\pm$ 0	0.05 $\pm$ 0
Arachidonic acid	20 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2
Eicosapentaenoic acid	2 $\pm$ 0.5	3 $\pm$ 0.4
Docosahexaemoic acid	36 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2

平均値  $\pm$  標準誤差、DIF: 界面活性剤不溶性膜分画、\*: P<0.05

(結果)

1) 体重への影響

最終的には、Vehicle 群、A $\beta$  群、それぞれ 7 匹が生存した。

実験終了後の体重は、vehicle 群 485 $\pm$ 7g、A $\beta$  群 487 $\pm$ 8g であり、両群間には有意差が認められなかった。

## 2) 大脳皮質神経細胞膜の脂質ラフト中コレステロール、アミロイド 蛋白量 ならびに脂肪酸量への影響

表1には各群ラットの脂質ラフト中の脂質量と A 量が示されている。A 群の脂質ラフト中のコレステロールと A 量は共に、vehicle 群に較べて有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸、ならびに一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸は、A 群では vehicle 群に較べて夫々、21%、23%、23%、有意に増加した ( $P < 0.05$ )。その他の脂肪酸(リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸)には両群間では有意差は認められなかった。

### (考察)

本研究では、ラット側脳室への A<sub>1-40</sub> の注入は、大脳皮質神経細胞膜の脂質ラフトへの A 量を増加させるばかりでなく、コレステロール、パルミチン酸、ステアリン酸、ならびにオレイン酸も増加させる事が見出された。

アミロイド 蛋白(A<sub>β</sub>)は主要なアルツハイマー病の原因蛋白の一つであり、その脳内への沈着は酸化ストレスを増大させ、神経細胞死を惹起し、脳組織(特に海馬・大脳皮質)を萎縮させ、記憶・学習機能障害をもたらす。我々は既に、ラット側脳室への A<sub>β</sub> の注入は空間認知機能を低下させる事を見出し、この認知機能障害ラットを、アルツハイマー型認知症モデルラットとして、アルツハイマー病の予防・改善物質の探索に用いている。

脂質ラフトへのコレステロールやスフィンゴ脂質の増加は膜流動性を低下させ、各種の膜結合型の受容体や酵素の活性に強く影響を及ぼす事が良く知られている。アルツハイマー病の原因蛋白の一つとして考えられている A<sub>β</sub> は、その前駆体蛋白(APP: amyloid precursor protein)に分解酵素の β-, γ-セクレターゼが作用して造られるが、膜流動性の低下はこれら分解酵素の活性に影響を及ぼし、A<sub>β</sub> の産生増加に関与しているかもしれない。また、神経細胞膜の脂質ラフトへの A<sub>β</sub> の沈着のメカニズムは解明されていないが、神経細胞膜の脂質ラフトへのコレステロールの増加は、A<sub>β</sub> の産生・沈着を促進する事が報告されていることから、本研究で見出された脂質ラフトのコレステロールの増加は A<sub>β</sub> の沈着を加速する要因の一つであることが推察される。

細胞膜に結合したコレステロールは、飽和脂肪酸のアシル鎖と高親和性を持つ為に、容易に結合することが報告されている。それゆえ、本研究での脂質ラフトのコレステロールの増加は、飽和脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸、さらには一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸を増加させて一因である事が示唆される。

(結語)

神経細胞膜脂質ラフトのコレステロールを低下させる物質は、アミロイド 蛋白の脳内への沈着を抑制し、アルツハイマー型認知症の予防・改善効果を発揮する事が推察される。

#### 4. 学会機関誌もしくは学会への関連論文(演題)

(論文)

- 1) Shahdat Hossain, Azizur Rahman, Yearul Kabir, Ali Ahmed Shams, Fahmida Afros, Michio Hashimoto  
Effects of Shrimp (*Macrobracium Rosenbergii*)-derived chitosan on plasma lipid profiles and liver lipid peroxide levels in normo- and hypercholesterolaemic rats.  
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 34: 170-176, 2007.
- 2) Michio Hashimoto, Satomi Kagota, Yoko Kubota, Masanori Katakura, Budbazar Enkhjargal, Shuji Gamoh, Haque Md Abdul, Osamu Shido, Masaru Kunitomo, Kazumasa Shinozuka  
Effect of amlodipine, a calcium channel antagonist, on cholesterol level in the cerebral cortex and hippocampus of obese and hypertensive SHR.Cg-*Lep<sup>ob</sup>*/NDmcr rats.  
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 34: S35-S36, 2007
- 3) 橋本道男、山下一也  
総説: 食事で防ぐ認知症  
最新精神医学 13、75-82、2008
- 4) 山下一也、橋本道男  
総説: 認知機能、抑うつ状態と栄養 - 地域高齢者の調査から -  
臨床栄養 112(2)、135-141、2008
- 5) 栗野貴子、橋本道男、植木 彰  
脂質栄養: 脂質と認知症 - 日本脂質栄養学会第 16 回大会モリス博士基調講演の記録 -  
脂質栄養学 17(1)、7-18、2008

(学会発表)

- 1) 橋本道男(基調講演)  
DHA による認知症の改善  
第8回全国エゴマサミット, 2007、5月23-24日、庄原
- 2) 山下慎司、藤原博典、仲川清隆、橋本道男、荒井啓行、宮澤陽夫  
プラズマローゲンによる アミロイドの凝集抑制と解離促進  
第15回生体パーオキシド研究会、2007、8月25日、仙台

- 3) 山下慎司、藤原博典、仲川清隆、橋本道男、紫藤 治、荒井啓行  
宮澤陽夫  
海産プラズマローゲンによるアルツハイマー型認知症の予防  
日本脂質栄養学会第 16 回大会、2007、8 月 31 日～9 月 1 日、出雲市
- 4) 橋本道男(シンポジスト)  
n - 3 系脂肪酸、特にドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と認知症 予防・改善効果  
日本脂質栄養学会第 16 回大会、2007、8 月 31 日～9 月 1 日、出雲市
- 5) 粟野貴子、吉川靖、長島康成、橋本道男  
魚油の給与が烏骨鶏の卵黄中 n - 3 系脂肪酸組成に及ぼす影響  
日本脂質栄養学会第 16 回大会、2007、8 月 31 日～9 月 1 日、出雲市
- 6) 篠塚和正、窪田洋子、籠田智美、紫藤治、國友勝、橋本道男  
メタボリックシンドロームモデルラット(SHR.Cg-Lepr<sup>cp</sup>/NDmcr)の大脳皮質・海馬神経細胞膜のコ  
レステロールレベルに対する降圧薬の影響  
日本脂質栄養学会第 16 回大会、2007、8 月 31 日～9 月 1 日、出雲市
- 7) Shahdat Hossain、Michio Hashimoto、Toshio Shimada、Osamu Shido  
Synaptic Plasma membrane-bound acetylcholinesterase activity is not affected by  
docasahexaenoic acid-induced decrease in membrane order  
日本脂質栄養学会第 16 回大会、2007、8 月 31 日～9 月 1 日、出雲市
- 8) 橋本道男、ホサイン・シャハダト、田邊洋子、川島晶子、原田 剛、片倉賢紀、蒲生修治、矢野  
崇、水口 清、紫藤 治  
食餌性エイコサペンタエン酸はラットでのアミロイド 蛋白誘発性空間認知機能障害を予防で  
きる  
第 81 回日本薬理学会年会、2008、3 月 17～19 日、横浜市