

平成 28 年 12 月 29 日

## アルツハイマー病における介護負担軽減を目指したサルコペニアに対する治療戦略

代表研究者 熊本大学大学院生命科学研究部生体機能薬理学分野

講師 長谷川 雄

共同研究者 熊本大学大学院生命科学研究部生体機能薬理学分野

研究員 高根 紘希

熊本大学大学院生命科学研究部生体機能薬理学分野

大学院生 林 博文

### [まとめ]

アルツハイマー病(AD)を代表とした認知症は要介護原因疾患の第2位であり、介護量の負担は大きな社会問題である。我々は本研究において、ADのサルコペニアにおける増悪因子について実験的に検討した。その結果、高脂肪食負荷や脳内レニン・アンジオテンシン(RA)系の賦活化が、ADのサルコペニアを増悪させることが示された。従って、食生活の改善や脳内RA系を抑制する生活習慣病対策や薬が、AD患者の介護量軽減に寄与すると期待される。

#### 1. 研究の目的

高齢化社会における認知症患者の増加とその介護量の負担は、社会的にも医療経済的にも早急に対策すべき課題である。

認知症患者の多くを占めるアルツハイマー病(AD)では、認知機能低下だけでなく様々な脳外臓器の機能低下が生じると近年報告されている。その中でサルコペニアという、年齢とともに生じる筋肉量の減少や筋力の低下を特徴とした症候群についてもADとの関連が指摘されており、介護量負担の大きな原因となり得る。しかしながら、その増悪因子等の詳細については不明である。

近年様々な病態が認知機能低下と関連することが指摘されている。以前我々は、高脂肪食の長期負荷や脳内のレニン・アンジオテンシン(RA)系が認知機能低下と関連することを報告した(文献1、2)。

そこで今回我々は、ADにおけるサルコペニアの増悪因子としてそれらの病態が関与すると仮説を立て、ADモデルマウスを用いてその仮説を実験的に検討し、将来の介護量負担軽減を目指すことを本研究目的とした。

#### 2. 研究方法と経過

##### 2-1 研究方法

##### 2-1-1 研究1 高脂肪食の影響

高脂肪食摂取は、生活習慣病を惹起するだけでなく、それ自体が認知機能を悪化させることが指摘されている。また我々は以前の研究において、野生型マウスに対し高脂肪食を10カ月以上長期負荷することで、認知機能低下だけでなく筋力の低下と筋肉量の減少が生じることを報告した(文献1)。

そこで今回ADにおける高脂肪食の影響を検討するべく、13ヶ月齢のC57BL/6マウス(Wild-type)とADモデルマウスである5XFADマウスを用いて、1) Wild-typeマウス+コントロール食(WTLF)、2) Wild-typeマウス+高脂肪食(WTHF)、3) 5XFADマウス+コントロール食(ADLF)、4) 5XFADマウス+高脂肪食(ADHF)の4群に分けた。食餌組成は、コントロール食(3.85kcal/g; 10kcal% fat, 20kcal/protein, 70kcal% carbohydrate; D12450B, Research Diets, Inc., USA)、高脂肪食(5.24kcal/g; 60kcal% fat, 20kcal% protein, 20kcal% carbohydrate; D12492, Research Diets, Inc.)であり、これらを10週間食餌負荷した。

##### 2-1-2 研究2: 脳内RA系賦活化の影響

生活習慣病が惹起する認知機能低下において、脳内におけるRA系の賦活化との関連が指摘されている。RA系は高血圧の原因の一つとして知られているが、それ自体様々な臓器に酸化ストレスを惹起する。以前我々は脳内RA系を抑制する薬剤が認知機能を改善することを報告した(文献2)。そこで今回、アンジオテンシンII(AII)を脳室内に持続投与する方法を用いて脳内のRA系を賦活化し、サルコペニアとの関連を検討した。

12ヶ月齢のWild-typeマウスと5XFADマウスを用いて、1) Wild-typeマウス+生理食塩水(WTVe)、2) Wild-typeマウス+AII(WTAII)、3) 5XFADマウス+生理食塩水(ADVe)、4) 5XFADマウス+AII(ADAII)の4群に分けた。AIIの投与量は予備検討にて血圧が上昇する量である20 $\mu$ g/kg/hとした。上記マウスにおいて、イソフルレンによるガス麻酔下に右脳室内に脳室内投与キットを留置し、背部の皮下ポケットに

Alzet 微量持続ポンプ(model 1004)を埋め込み、AIIを脳室内に4週間投与した。

研究1, 2について次の検討を行った。

## 2-2 全身機能評価

経時的に体重、血圧(tail-cuff 法)、血糖値を計測した。また、代謝ケージを用いて、食餌量、飲水量、尿量を計測した。

## 2-4 認知機能評価

モリス水迷路試験にて各群の認知機能を比較検討した。具体的には、円形のプールを準備し、training session にてプールを泳がせた際の逃避台を周囲の環境から覚えさせる。その後マウスをプール内で強制的に泳がせ、記憶した空間認識を基に不可視化した逃避台にたどり着く時間を計測した (Hidden test)。これを1日4回、計4日間行い、各日の到達時間の平均を計測した。第5日目には、逃避台を一旦除去した上でマウスを1回のみ泳がせることで、記憶された逃避台の位置を探索する時間、または逃避台があった場所を横切る回数を比較検討した (Probe test)。最後に逃避台を元の場所に戻し、プラットフォームを可視化した状態でマウスを逃避台に到達する時間を比較検討すべく (Visible test) 計4回行い、その到達時間の平均を計測した。Hidden testは空間学習記憶、Probe testは空間参照記憶(長期記憶)、Visible testは視力や運動機能に差がないかどうかを評価できる。

## 2-5 運動機能評価

サルコペニアに関わる筋力評価としてロタロッドテストを行った。マウスに4回転/分の円筒上を1分間歩かせる(Training session)。次に5分間で4→40回転/分と加速度的に回転を速める円筒の上でマウスを歩かせて、落下するまでの時間を計測した。計3回行いその平均値にて比較検討した。

## 2-6 臓器重量

エンドポイント時に深麻酔下に脳、内臓脂肪(腎周囲、精巣上、腸管周囲を加算)、腓腹筋、ヒラメ筋を摘出し臓器重量を計測した。脳萎縮、脂肪量、サルコペニアに関わる筋量の評価は、これらの重量を各々の脛骨長で除した後に各群比較検討した。

## 2-7 脳内酸化ストレスとアミロイドβタンパクの沈着

海馬の酸化ストレスを検討すべく、マウスの脳アトラスを参考に、Bregmaより尾側へ1.43-2.43mmの範囲において脳を8μmの厚さで薄切した。その後Dihydroethidium(DHE)染色を用いてその染色性を計

測し、海馬のCA1におけるスーパーオキシドレベルを定量的に評価した。また、免疫組織学的に脳内アミロイドβタンパクの蓄積を比較検討した。さらに、脳内酸化ストレスに関連するNADPHオキシダーゼのサブタイプについて、ウェスタンブロット法にてその発現量を検討した。

## 2-8 統計

データは平均値±標準誤差で表記した。母集団が正規分布に従う且つ各群の分散が等しい場合は、one-way ANOVAとpost-hoc testとしてTukey法、母集団が正規分布に従わないまたは各群の分散が等しくない場合はKruskal-wallis検定とpost-hoc testとしてSteel-Dwass法を用いて検討した。

## 3. 研究の成果

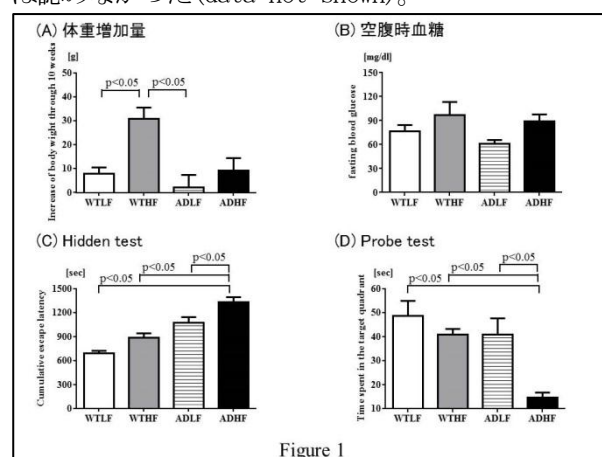
### 3-1 結果1 高脂肪食の影響

#### 3-1-1 全身機能

10週間の体重増加量において、WTHFでは有意に上昇した。しかしながら、ADでは高脂肪食による体重増加は認められなかった(Figure1A)。また空腹時血糖(Figure1B)や血圧、食餌量、飲水量、尿量は各群間で差は無かった(data not shown)。

#### 3-1-2 認知機能

Hidden test、Probe testにおいて、高脂肪食はWild-typeでは認知機能に影響はなかったものの、ADでは有意に低下した(Figure 1C and D)。Visible testでは各群で有意な差は認めなかった(data not shown)。また、解剖時の脳重量は各群間で有意な差は認めなかった(data not shown)。



#### 3-1-3 サルコペニア

ロタロッドテストにおいて、ADではWild-typeと比べ落下時間は短縮、また高脂肪食摂取にてWild-type、ADとも落下時間の短縮が認められた

(Figure 2A)。内臓脂肪は高脂肪食で増加するものの、AD では全体的に内臓脂肪量が少なかった (Figure 2B)。筋重量においては、AD の腓腹筋重量は高脂肪食摂取にて有意に減少した (Figure 2C)。ヒラメ筋では Wild-type において、高脂肪食摂取による重量増加を認めた (Figure 2D)。

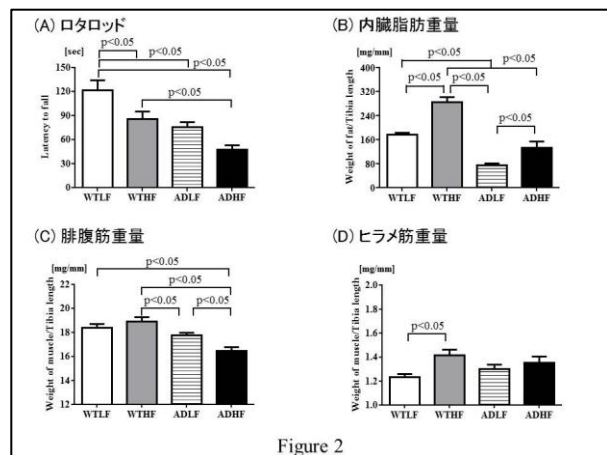


Figure 2

### 3-1-4 脳内の酸化ストレス、アミロイドβタンパクの蓄積 (Table 1)

ADHF 群において、海馬での DHE 染色性は有意に増加した。また、酸化ストレスの産生系である NADPH オキシダーゼのサブタイプである gp91<sup>phox</sup>、p22<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> の発現上昇を認めた。一方海馬におけるアミロイドβタンパクの蓄積は高脂肪食にて増加は認めないものの (data not shown)、脳表の皮質動脈ではその蓄積 (アミロイド血管症) が増加した。

	WTLF	WTHF	ADLF	ADHF
DHE (%)	100	132 ± 17	155 ± 8	351 ± 32 <sup>#</sup>
gp91 <sup>phox</sup> (%)	100 ± 25	147 ± 14	157 ± 15	289 ± 30 <sup>#</sup>
p22 <sup>phox</sup> (%)	100 ± 20	139 ± 18	161 ± 13	262 ± 22 <sup>#</sup>
p67 <sup>phox</sup> (%)	100 ± 5	97 ± 10	144 ± 8 <sup>+</sup>	154 ± 11 <sup>+</sup>
CAA (%)	-	-	17 ± 1	33 ± 3 <sup>#</sup>

[Table 1 高脂肪食負荷後の脳内酸化ストレス、アミロイド血管症の結果 (\* < 0.05 versus WTLF, # < 0.05 versus ADLF)]

## 3-2 結果 2 脳内 RA 系賦活化の影響

### 3-2-1 全身機能

4 週間の体重増加量においては、各群で有意な差は認められなかった (Figure 3A)。AII 負荷後 2 週間の血圧において、AII 投与群において有意な血圧上昇を認めた (Figure 3B)。食餌量、飲水量、尿量は各群間で差は無かった (data not shown)。

### 3-2-2

Hidden test、Probe test において、AII の脳室内持続投与は Wild-type では認知機能に影響はなかつ

たものの、AD では有意に低下した (Figure 3C and D)。Visible test では各群で有意な差は認めなかった (data not shown)。脳重量についても、各群間で有意な差は認めなかった (Figure 4B)。

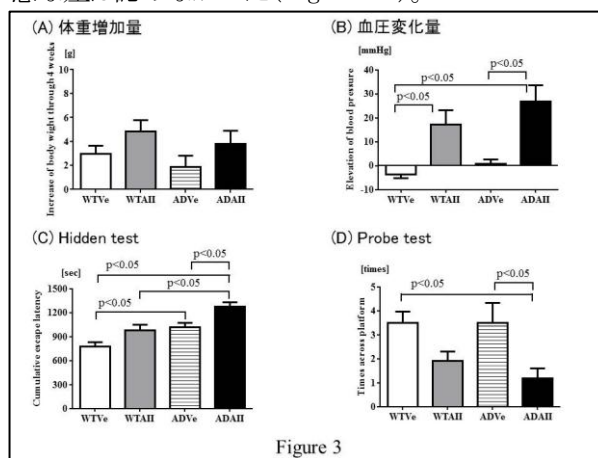


Figure 3

### 3-2-3 サルコペニア

ロタロッドテストにおいて、ADaiI 群は WTve 群と比べ明らかな落下時間の短縮を認めた (Figure 4A)。筋重量においても、ADaiI 群の腓腹筋重量は WTve と比べ有意に減少したが、ヒラメ筋では各群で差が無かった。

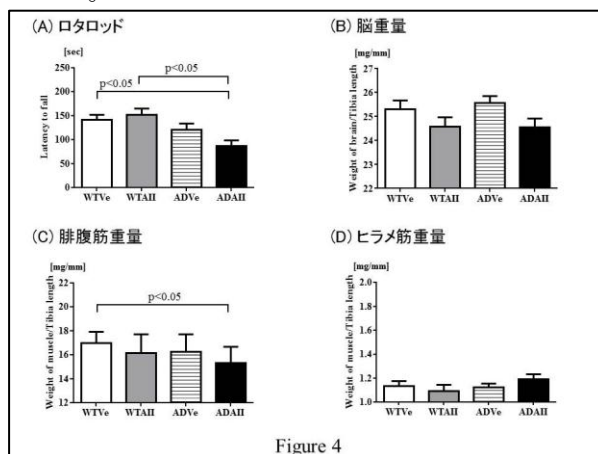


Figure 4

### 3-2-4 脳内の酸化ストレス、アミロイドβタンパクの蓄積

ADaiI 群において、海馬での DHE 染色性が有意に増加した (Table 2)。一方海馬におけるアミロイドβタンパクの蓄積は AII の投与にて増加は認めないものの (data not shown)、脳表の皮質動脈ではアミロイド血管症が増加した (Table 2)。

	WTve	WTaiI	ADve	ADaiI
DHE (%)	100	107 ± 6	117 ± 4 <sup>+</sup>	145 ± 10 <sup>#</sup>
CAA (%)	-	-	5 ± 1	26 ± 2 <sup>#</sup>

[Table 2 脳内 RA 系賦活化後の脳内酸化ストレス、アミロイド血管症の結果 (\* < 0.05 versus WTve, # < 0.05 versus ADve)]

## 3-2 考察

### 3-2-1 高脂肪食の影響

以前我々は、10 カ月超の高脂肪食長期負荷は野生型マウスの認知機能を有意に増悪することを報告した(文献1)。今回10週間という比較的短期間の高脂肪食負荷にてADでは認知機能が低下したが、それは脳内の酸化ストレスの上昇やアミロイド血管症の増加と関連するものの、体重増加や糖尿病の発症等とは非依存的に生じていた。従って、高脂肪食はそれ自体が直接ADにおける認知機能に対し悪影響を及ぼすと考えられた。

一方、今回の研究において、ADHF群にて筋力や腓腹筋重量の低下を認めたことから、ADでは10週間という比較的短期間の高脂肪食負荷でもサルコペニアが生じたと考えられる。高脂肪食摂取による脂肪の蓄積が様々なサイトカインを発現し、サルコペニアを惹起することが報告されているが、今回高脂肪食にて同じように脂肪が増加しているにもかかわらず、ADモデルマウスでのみサルコペニアが増悪した。従って、脂肪からのサイトカインではなく、高脂肪食が直接惹起する病態が関与している可能性があり、脳のDHE染色の結果から、酸化ストレスがその主要な病態だと推察される。

### 3-2-2 脳内RA系賦活化の影響

以前我々はアンギオテンシン転換酵素阻害薬がADモデルマウスの認知機能低下を軽減することを報告したように(文献2)、脳内のRA系はADを含む認知症との関連が指摘されている。

研究2では脳内のRA系に焦点を当て、脳室内に持続的にAIIを投与した。このモデルの利点は、脳内でAIIが高濃度に作用し全身には低濃度で存在するため、各臓器障害が中枢からの作用にて生じていると考えられる点である。今回、28日間の持続的なAII投与にて同程度の血圧上昇が認められたにもかかわらず、認知機能は他のグループと比べてADAI群のみ著明に増悪した。海馬でのDHEの染色性が有意に増加しているため、AII投与による海馬での酸化ストレスの表現型がADではより強く生じることが認知機能低下と関連したと考えられる。さらにアミロイド血管症の増加も認知機能の増悪に関与した可能性がある。

一方、サルコペニアについては、脳内のAII投与がWT<sub>e</sub>群と比べ有意に生じている結果を得た。このことは、サルコペニアの病態に対し中枢のRA系が関与している可能性を示唆する所見である。今後腓腹筋での細胞傷害性変化に対するさらなる検討が必要だが、脳内のRA系を賦活化し酸化ストレスが上昇することで、何らかの全身反応、例えば交感神経の活性化が生じ、その結果サルコペニアが惹起されたのかもしれない。

## 4. 今後の課題

上述の2つの研究から、高脂肪食等の食生活の改善や脳内のRA系を賦活化するような高血圧を代表とする疾病の管理が、AD患者におけるサルコペニアの進展を抑制するという可能性が示唆された。また、加齢に伴うサルコペニアは遅筋(ヒラメ筋)よりも速筋(腓腹筋)に萎縮が認められることが報告されており、ADではそれらの負荷にて加齢が進んだとも考えられる。現時点ではサルコペニアが増悪する詳細なメカニズムについては不明であるが、今後それを明らかにし、サルコペニアに対する多角的な治療戦略につながる可能性を模索したい。

## 5. 研究成果の公表方法

研究1の結果を基に作成した論文①は下記国際誌に掲載された。研究2の結果を基に作成した論文②は現在国際誌に投稿中である。また今回使用したFigureやTableは下記①②の図を一部改変して用いた。

① Lin, B.; Hasegawa, Y.; Takane, K.; Koibuchi, N.; Cao, C.; Kim-Mitsuyama, S., High-Fat-Diet Intake Enhances Cerebral Amyloid Angiopathy and Cognitive Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease, Independently of Metabolic Disorders. *Journal of the American Heart Association* 2016, 5 (6).

② Takane, K.; Hasegawa, Y.; Lin, B.; Koibuchi, N.; Cao, Cheng.; Yokoo, T.; Kim-Mitsuyama, S., Detrimental effects of centrally administered angiotensin II are enhanced in a mouse model of Alzheimer's disease independently blood pressure. Under review.

## 6. 参考文献

① Toyama, K.; Koibuchi, N.; Hasegawa, Y.; Kim-Mitsuyama, S., et al., ASK1 is involved in cognitive impairment caused by long-term high-fat diet feeding in mice. *Scientific reports* 2015, 5, 10844.

② Dong, Y. F.; Kataoka, K.; Kim-Mitsuyama, S., et al., Perindopril, a centrally active angiotensin-converting enzyme inhibitor, prevents cognitive impairment in mouse models of Alzheimer's disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011, 25 (9), 2911-20.