

<平成24年度助成>

## 抗酸化物質・クルクミンによる $\beta$ アミロイド沈着の抑制と 3次元・位相X線画像で解析する新しい試み

丸山 弘子・川上 文貴・武田 徹

(北里大学医療衛生学部病理学)

### 【要旨】

【目的】少子高齢化で長寿社会となった現代において、進行性の脳変性疾患であるアルツハイマー病の患者数増加が予想され、その社会への影響の大きさからアルツハイマー病の発症抑制が急務となっている。近年、食生活がアルツハイマー病発症の重要な要因となりうる可能性が示唆され、植物由来の抗酸化物質・クルクミンのアルツハイマー病抑制効果が注目されている。そこで、クルクミンのアルツハイマー病抑制効果を具体的に検討するため、アルツハイマーモデルマウス・B6SJL-Tg6799 (ADマウス)にクルクミンの長期間経口投与を行い、アミロイド斑とタウの過剰リン酸化に着目して検討を行った。また、高感度な位相X線画像によるアミロイド斑の画像化に関しても基礎的な検討を行った。

【方法】B6SJL-Tg6799 F<sub>1</sub>マウスでAPP、PS1両遺伝子陽性の雄性マウスを実験群とし、AD群、AD+Curcumin0.02%群とAD+Curcumin0.5%群の3群をもうけ、餌を自由摂食させた。各飼料群の1)マウスの生存率を求め、2)月齢10ヶ月の脳組織を抗A $\beta$ -40抗体、抗A $\beta$ -42抗体、抗p-Tau396抗体と抗p-Tau404抗体で免疫組織化学染色した後、大脳皮質5か所を評価した。病理画像から、A $\beta$ はImage Jを用いて画像内の3)A $\beta$ 斑の個数を算定し、各群を比較検討した。タウのリン酸化は、4)大脳皮質部位のタウリン酸化抗体陽性細胞数を算定し、各群間での違いを比較検討した。さらに、5)位相X線CT画像を17.8keVで撮影した。

【結果】1)月齢10ヶ月のADマウス各群の生存率は、AD群(n=14)が86%とAD+Curcumin0.02%群(n=16)が100%、AD+Curcumin0.5%群(n=19)で84%であったが、生存率の有意差は認められなかった。2)A $\beta$ -42陽性細胞数の結果はNormal群0個、AD群69個、AD+Curcumin0.02%群41個、AD+Curcumin0.5%群76個であり、Normal群に対しAD群で有意な増加が認められ( $p<0.01$ )、AD群に対しCurcumin0.02%群で有意な減少が認められた( $p<0.01$ )。3)p-Tau404陽性細胞数の結果は、Normal群110個、AD群205個、AD+Curcumin0.02%群102個、AD+Curcumin0.5%群208個であり、Normal群に対しAD群で有意な増加が認められ( $p<0.01$ )、AD群に対しCurcumin0.02%群で有意な減少が認められた( $p<0.01$ )。位相X線CT画像では、AD群とCurcumin0.5%で斑状の高密度病変が認められた。

【考察】生存率の結果から、クルクミンのアルツハイマー病抑制効果が認められた。脳内A $\beta$ 沈着数とリン酸化タウ陽性細胞数の結果から、クルクミンのA $\beta$ 沈着抑制効果が認められ、A $\beta$ 沈着量とリン酸化タウ陽性細胞数の結果に相関性が認められたことから、クルクミンはA $\beta$ のオリゴマー化を阻害する可能性が示唆された。また、クルクミンの濃度による差が認められたことからクルクミンの摂取には適量があることが示唆された。濃度によるアルツハイマー病抑制効果の差は、A $\beta$ 沈着に対するクルクミンの作用点に起因すると考えられ、今後の検討が必要と考えられた。アミロイドの沈着状態が位相X線CT画像でも病理と同様に見られた。しかし、実験時間が少なくCurcumin0.02%が撮影できなかった点が悔やまれる。

【結論】クルクミン0.02%がA $\beta$ 沈着を抑制しただけではなく、臨症症状と強い相関性を示し直接神経細胞死を引き起こすタウのリン酸化も同時に抑制した。また、月齢10ヶ月の脳内A $\beta$ 沈着量がクルクミン0.5%群では対照群と比べ有意な差は認められず、本研究におけるクルクミンの過剰摂取による副作用は認められなかった。クルクミンはアルツハイマー病予防に効果があり副作用は少ないと考えられた。

## 【序 論】

アルツハイマー病は認知障害を主な臨床症状とする進行性の脳変性疾患である。アルツハイマー病は加齢に伴い発症率が増加することから、少子高齢化、長寿社会となった現代社会において患者数の増加が予想され、介護や医療コスト等、社会に与える影響が大きくなってきている。そのためアルツハイマー病の発症を抑えQOLの低下を抑えることが次世代への大きな課題となっている。

アルツハイマー病発症機序の全様については未だ十分に解明されていないが、その病理学的特長としては、老人斑や神経原線維変化が海馬および大脳皮質の広範囲に沈着することや、タウ蛋白質の異常リン酸化の進行に伴い神経細胞の脱落が起こり脳の萎縮、脳室の拡大が見られる。アルツハイマー病の発症機構として現在主流となっているのが、アミロイド前駆体蛋白質 (Amyloid precursor protein, APP) からアミロイド蛋白質 ( $A\beta$ ) が産生され、凝集およびタウ蛋白質の過剰リン酸化を引き起こすことによる神経細胞脱落というアミロイド仮説である。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子は、複数存在するが特に特徴的なものは APP 遺伝子と PS1 遺伝子である<sup>1,2)</sup>。この変異遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いた解析では、 $A\beta$ -42の産生を上昇させるとともに  $A\beta$ -40の産生を抑え  $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40比を上昇させる<sup>3-5)</sup>。 $A\beta$ -42の神経毒性機構については未だ十分に解明されていないが、 $A\beta$ -42/ $A\beta$ -40比の上昇がアルツハイマー病を引き起こす原因であることが示唆されている<sup>5)</sup>。さらに、アルツハイマー病ではタウ蛋白質の過剰リン酸化が起こることによる神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) が見られる。過剰にリン酸化されたタウ蛋白質が重合して $\beta$ シート構造を作ることにより生じる。NFTは  $A\beta$  に比べ臨床病態とより強い相関関係を示し、 $A\beta$  に

並び重要視されている。正常タウ蛋白質を PHF 様タウ蛋白質に変える酵素としてグリコーゲン合成酵素キナーゼ  $3\beta$  (GSK- $3\beta$ ) が挙げられる。GSK- $3\beta$  を過剰発現すると Ser396 と Ser404 の過剰リン酸化が起こり PHF タウに特徴的なエピトープが形成され、樹状突起のシナプスに影響を与えることなく神経変性を起こすことが知られている。

近年、アルツハイマー病の予防に植物由来 (フィトケミカル) の抗酸化物質であるクルクミンが注目されている。クルクミンとはカレーのスパイスであるウコン (ターメリック) の黄色色素で、ポリフェノールの一種であるクルクミノイドに分類される栄養成分である。一般的には、肝臓病やアルコールの大量摂取を原因とした病気などへの効果があるとされているが、脳内  $A\beta$  の沈着を抑制しアミロイド斑の増加を抑える効果が発見されアルツハイマー病予防への効果が期待されている。アルツハイマー病に対するクルクミンの効果については様々な研究が行われており<sup>6)</sup>、PC12細胞を用いた *In vitro* 実験や<sup>7)</sup>、*In vivo* 実験で  $A\beta$  による DNA ダメージを軽減する効果が示され<sup>8)</sup>、トランスジェニックマウス (Tg2576) を用いた経口投与の実験でも月齢5ヶ月におけるクルクミン 0.05%の経口投与で  $A\beta$  レベルを減少させる作用が確認されている<sup>9)</sup>。ここでは、クルクミンのアルツハイマー病発症抑制効果について検討する。

## 【目 的】

近年、ウコン由来の抗酸化物質であるクルクミンのアルツハイマー病発症抑制効果が注目されている。しかし、クルクミンの長期間経口投与による抑制効果の検討は未だ研究段階であることから、長期間経口投与による抑制効果の検討により、クルクミンの効果をより具体的に示す必要がある。そこで、本研究では、アルツハイマー病の特徴的な症状である、1)  $\beta$ アミロイド蛋白質の蓄積と、

2) タウ蛋白質のリン酸化に焦点を当て、 $A\beta$ が多量に蓄積するモデルのダブルトランスジェニックマウス (Tg6799) を用いて、アミロイド斑の主な構成成分である  $A\beta$ -40 と  $A\beta$ -42 の脳内沈着について解析することにより、クルクミンの  $A\beta$  沈着抑制効果を検討し、 $A\beta$  沈着に伴う病態学的検討を行った。更に、 $A\beta$  沈着により誘導されるといわれているタウの過剰リン酸化とその局在について解析検討を行った。

## 【方 法】

### 1. マウスの作出と飼育

雄性 APP・PS1 ダブルトランスジェニックマウス・B6SJL-Tg6799 (The Jackson Labo.; PA, USA) と、雌性 ノーマルマウス・B6SJL (The Jackson Labo.) を用いて交配し、繁殖させた。作出したマウスの尾の先を切断し DNA を抽出し電気泳動により APP と PS1 遺伝子の両蛋白質が発現していることを確認したマウスを実験に用いた。

この実験は北里大学遺伝子組み換え実験安全委員会と、北里大学医療衛生学部実験動物倫理委員会の許可を得て行った。

### 2. 長期経口投与と実験方法

生後7週目から AD マウスに標準飼料 (Research Diets Inc.; NJ, USA)、標準飼料にクルクミン 0.02% (SIGMA-ALDRICH CO.; Mis, USA) 配合した飼料、クルクミン 0.5% 配合した飼料の3種類のいずれかを与える3群をもうけ、餌を自由摂食させた。10ヵ月の時点でエーテルを用いて麻酔をかけた後、ヘパリン入り生理食塩水と4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (PFA, pH7.4) で灌流固定をして脳組織を取り出した。脳の一部は脳内の過剰リン酸化を調べるために、 $-70^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。また、飼育中に死亡したマウスは肉眼的変化が無いことを確認し、実験終了時までの生存率を求めた。

### 3. マウスの遺伝子確認法 (DNA 抽出法、PCR 法、電気泳動法)

**DNA 抽出法:** マウスの尾約 2 mm をマイクロチューブに採取、DNA 抽出キット TaKaRa Simple Prep reagent for DNA Code9180 (タカラバイオ株式会社、日本) を用いて、定法に従い DNA 抽出液を得た。

**PCR 法:** APP 遺伝子検出では 1 検体につき蒸留水  $8.8\mu\text{l}$ 、APP プライマーの APP-F、APP-R、APP-1、APP-2 (SIGMA) をそれぞれ  $1.5\mu\text{l}$ 、dNTP を  $1\mu\text{l}$ 、ExTaq 緩衝液を  $2\mu\text{l}$ 、 $\gamma$ -Taq ( $5\text{unit}/\mu\text{l}$ ) を  $0.2\mu\text{l}$ 、DNA 抽出液  $2\mu\text{l}$  を加え、総量を  $20\mu\text{l}$  とした。同様に PS1 では、PS1 プライマーの PS1-F、PS1-R、PS1-1、PS1-2 (SIGMA) をそれぞれ  $1.5\mu\text{l}$ 、dNTP を  $1\mu\text{l}$ 、ExTaq 緩衝液を  $2\mu\text{l}$ 、 $\gamma$ -Taq ( $5\text{unit}/\mu\text{l}$ ) を  $0.2\mu\text{l}$ 、DNA 抽出液  $2\mu\text{l}$  を加え、総量を  $20\mu\text{l}$  とした。APP 遺伝子検出では  $95^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $54^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分 30 サイクル行い、PS1 遺伝子検出では  $95^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $57^{\circ}\text{C}$  30 秒、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分 30 サイクル行って PCR 反応液とした。

**電気泳動法:** PCR 反応液に Loading buffer を  $3\mu\text{l}$  ずつ加え、2% アガロースゲルのウェルに  $10\mu\text{l}$  ずつ入れ、分子量マーカーとともに電気泳動した。泳動の終わったゲルをエチレンブロマイドで染色し洗浄した後、写真撮影をしてバンドを確認した。これにより、APP と PS1 の両遺伝子が確認されたマウスを AD マウスとして実験に用いた。

### 4. 免疫組織化学染色

#### ① $A\beta$ -40 と $A\beta$ -42 (ABC 法による DAB 発色) の免疫組織学染色

脳はパラフィン包埋して  $2\mu\text{m}$  に薄切した。組織切片の脱パラフィンを行い、水洗後、0.1M クエン酸緩衝液 (pH6.0) に浸して  $121^{\circ}\text{C}$  10 分間オートクレーブをかけ賦活化を行い、3% の過酸化水素 PBS で内因性ペルオキシダーゼ活性の処

理を室温で20分間、正常ヤギ血清を用いた非特異反応のブロッキングを室温で30分間行った。

次に、100倍希釈した一次抗体・Polyclonal rabbit antibody against Abeta 40 218202 (Synaptic Systems, GER)あるいはBeta Amyloid 42 (1-11-3) Rabbit monoclonal Antibody, Purified SIG-39169 (SIGNET) (CONVANCE; CA, USA)を4°Cで一晩、二次抗体・ABC試薬 (VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit PK-6101, Vector Labo.; CA, USA)を室温で1時間反応させ、3,3-diaminobenzidine (DAB) (和光純薬工業; 大阪)と過酸化水素水を用いて3~10分発色反応を行った。蒸留水中で反応停止後、水洗い、脱水、透徹、封入を行い観察した。

## ② リン酸化タウ Ser396 (p-Tau396)と

### Ser404 (p-Tau404)の免疫組織学染色

一次抗体として p-Tau (Ser396): sc-1011815 (Santa Cruz Biotechnology, inc.; CL, USA)あるいはRabbit monoclonal [EPR2605] to Tau (phospho S404) ab92676 (abcam Inc.; KY, USA)を用いて、①と同様にABC法(DAB発色)による免疫組織化学染色を行った。

## 5. 画像解析

免疫組織化学染色後の標本は大脳皮質部分をオールインワン蛍光顕微鏡BZ-9000(株式会社キーエンス; 大阪)を用いて200倍視野で1標本につき5ヶ所ずつ撮影し、Image J (National Institutes of Health; MD, USA)にて画像解析した。A $\beta$ の染色画像は、Image Jを用いて1枚ごとに抗A $\beta$ -40、42抗体陽性部位の面積を測定し、撮影した5ヶ所の平均値を各個体のデータとして平均を求め比較検討した。

タウ蛋白質のリン酸化の解析はp-Tau396とp-Tau404の抗体陽性細胞数を、撮影した5ヶ所の写真を用いコロニーカウンターにてカウントした。タウのリン酸化解析もA $\beta$ の解析と同様に、5ヶ所の平均値を各個体のデータとして求め比較

検討した。

## 6. 位相 X 線画像解析

固定後の脳は高エネルギー加速器研究機構(KEK)放射光施設(PE)で行った。位相 X 線イメージング装置はKEK内のPEのビームラインBL14Cに常設されている。撮影はX線エネルギー17.8 keVで行った。

## 7. 有意差検定

有意差検定はノンパラメトリック検定Dunnett法を用いて危険率5%以下を有意とした。

## 【結 果】

### 1. 実験期間中の生存率

実験期間中の週平均餌摂取量は、各添加飼料群間で差は認められなかった。

月齢10ヶ月の生存率は、ADマウス各群の生存率は、AD群(n=14)が86%とAD+Curcumin 0.02%群(n=16)が100%、AD+Curcumin 0.5%群(n=19)で84%であった(図1)。また、カプランマイヤー法による検定における生存率の有意差は認められなかった。

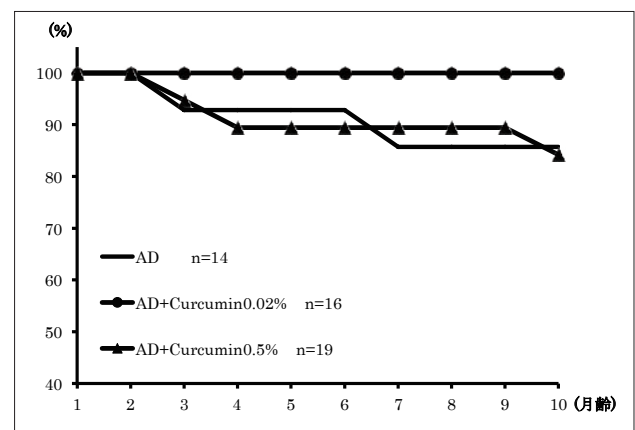


図1 雄性ADマウスの生存率

### 2. 画像解析結果

月齢10ヶ月マウスの大脳皮質200倍視野内におけるA $\beta$ -40斑の個数の平均値は、AD群(n=12)28個、AD+Curcumin 0.02%群(n=3)8個、AD+Curcumin 0.5%群(n=10)29個であり、AD群に対しAD+Curcumin 0.02%群で有意な減少が

認められた ( $p < 0.05$ )。

脳内 Aβ 沈着量の画像解析においては、AD 群に比べて AD+Curcumin 0.02% 群で脳皮質内の Aβ-42 斑の数に有意な減少が認められ、クルクミンが Aβ の蓄積を阻害していることが確認された。しかし、AD+Curcumin 0.5% 群は AD 群との差は認められなかった (図 2)。脳皮質 200 倍視野内における Aβ-42 斑の個数の平均値は、AD 群 (n=12) 69 個、AD+Curcumin 0.02% 群 (n=3) 41 個、AD+Curcumin 0.5% 群 (n=10) 76 個であり、AD 群に対し AD+Curcumin 0.02% 群で有意な減少が認められた ( $p < 0.05$ ) (図 3)。

また、月齢 10 ヶ月の Normal 群では Aβ-40、Aβ-42、いずれにおいても染色されず、個数ま

たは面積の値が 0 だった。

月齢 10 ヶ月雄性マウス的大脑皮質 200 倍視野内における p-Tau396 陽性細胞数の各飼料群平均値は、Normal 群 (n=4) 106 個、AD 群 (n=13) 153 個、AD+Curcumin 0.02% 群 (n=9) 90 個、AD+Curcumin 0.5% 群 (n=8) 197 個であり、Normal 群 (n=4) に対し AD 群 (n=13) で増加傾向が見られ、AD 群 (n=13) に対し AD+Curcumin 0.02% 群 (n=9) で有意な減少が認められた ( $p < 0.01$ )。

月齢 10 ヶ月マウス的大脑皮質 200 倍視野内における p-Tau404 陽性細胞数の各飼料群平均値は、Normal 群 (n=4) 110 個、AD 群 (n=10) 205 個、AD+Curcumin 0.02% 群 (n=9) 102 個、

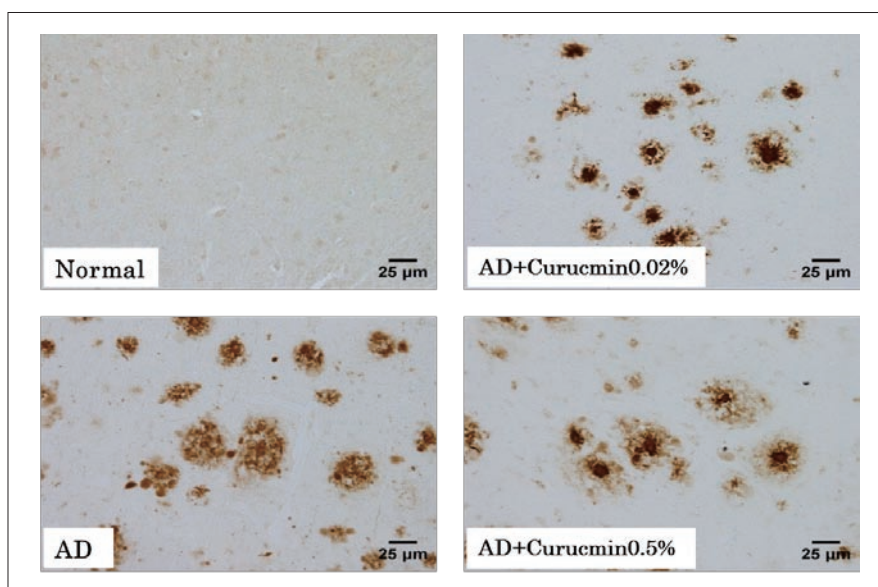


図 2 Aβ-42 染色

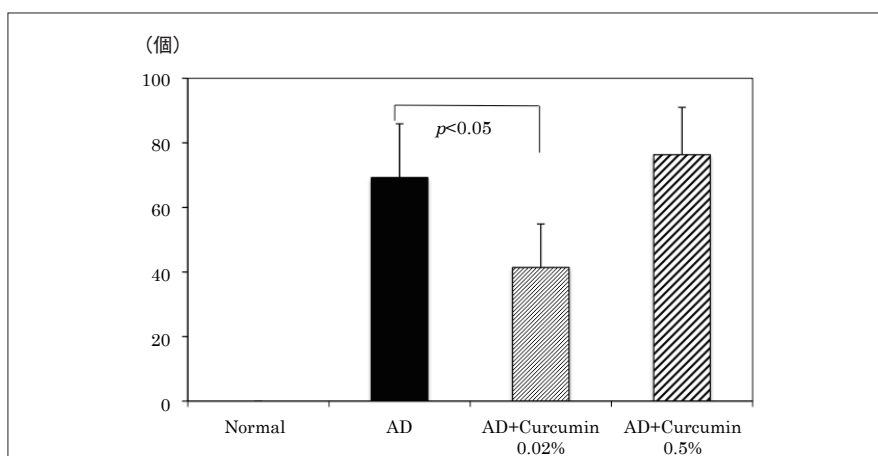


図 3 雄性マウス月齢 10 ヶ月：Aβ-42 斑の個数

AD+Curcumin0.5%群 (n=8) 208個であり、Normal群 (n=4) に対しAD群 (n=10) で有意な増加が認められ ( $p<0.01$ )、AD群 (n=10) に対しAD+Curcumin0.02%群 (n=9) で有意な減少が認められた ( $p<0.01$ ) (図4, 5)。

位相X線CT画像では、AD群とAD+Curcumin0.5%で斑状の高密度病変アミロイド斑が認められた。健常マウスでは、灰白質部にアミロイド斑が見られなかったが、AD群ではアミロイド沈着が確認できた。沈着の状態は病理標本と類似していた。しかし、今回の動物モデルでは、以前のAD動物モデルと異なり、アミロイド斑の大きさ

が小さく、撮像系の空間分解能の関係で、個々のアミロイド斑を計測することが難しい事が明らかとなった。

#### 【考 察】

本研究で用いたAPP・PS1ダブルトランスジェニックマウス・B6SJL-Tg6799は生後2ヶ月からA $\beta$ の蓄積が始まり、沈着量は生後4ヶ月以降指数関数的に上昇する。本研究における月齢10ヵ月時点での生存率は、ADマウスではAD群とAD+Curcumin0.5%群で85%に低下した。A $\beta$ の沈着が始まる生後2ヶ月と沈着量が急激に増加

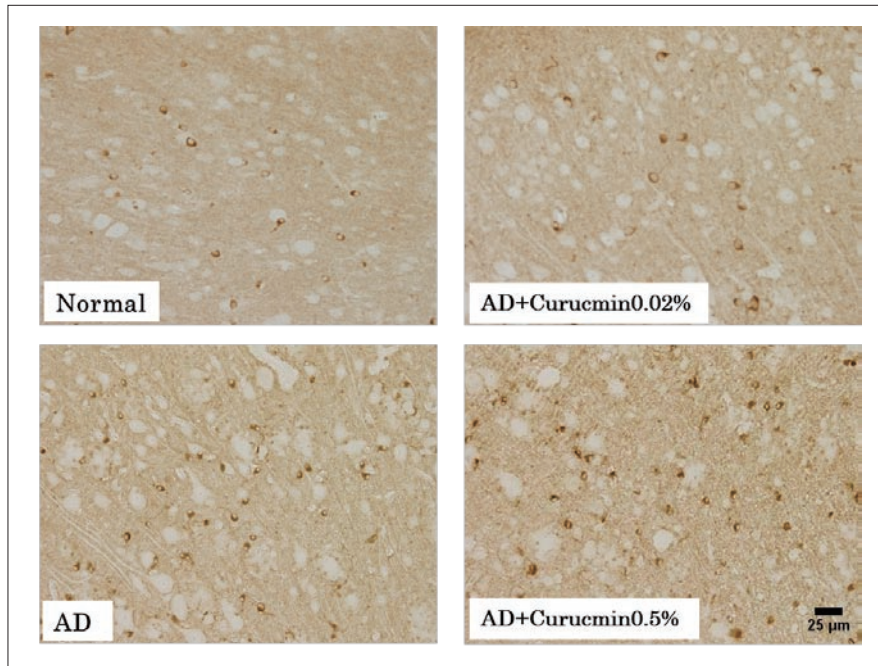


図4 p-Tau404染色

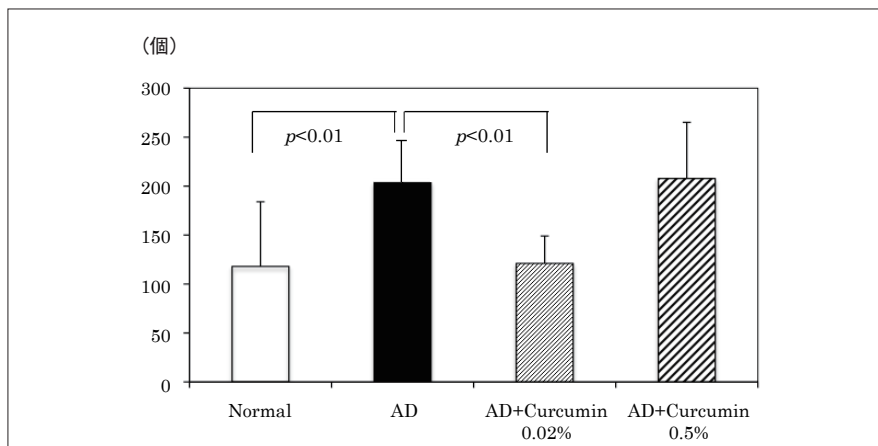


図5 雄性マウス月齢10ヵ月：p-Tau404陽性細胞

する生後4～6ヵ月に生存率の低下が認められたが、AD+Curcumin0.02%群で死亡が確認されなかった(図1)。この結果からクルクミンにはアルツハイマー病抑制効果があることが認められ、クルクミンの添加濃度による効果の差があることが示唆された。

AD群に比べてAD+Curcumin0.02%群で有意な減少が認められ、AD群とAD+Curcumin0.5%群で差が認められなかったことから、クルクミンの摂取には適量があり、過剰な摂取はA $\beta$ 沈着抑制効果を示さない可能性が示唆された。

脳内リン酸化タウ陽性細胞数の結果は、p-Tau396およびp-Tau404の両方で、AD群に比べAD+Curcumin0.02%群で有意な減少が認められた(図4,5)。しかし、AD群とAD+Curcumin0.5%群で差が認められず、脳内A $\beta$ 沈着数解析の結果と同様の傾向を示した。脳内A $\beta$ 沈着数と脳内p-Tau陽性細胞数の両方の値がAD群に比べてAD+Curcumin0.02%群で減少しており、AD群とAD+Curcumin0.5%群で差が認められないという傾向を示した。これから、脳内A $\beta$ 沈着数と脳内p-Tau陽性細胞数の相関性が認められ、脳内A $\beta$ 沈着からタウ過剰リン酸化へ至るカスケードの正当性が示唆された。本研究におけるクルクミンの0.5%摂取による副作用は認められなかったが、クルクミンの摂取量による影響を検討する必要があると考えられる。今後は、発症早期段階での脳組織を解析することで、クルクミンのアミロイド沈着抑制のメカニズムを明らかにできると考えられる。

位相X線CT画像で、AD群とAD+Curcumin0.5%で斑状の高密度病変アミロイド斑が認められた。沈着の状態は病理標本と類似していた。しかし、本動物モデルでは、アミロイド斑の大きさが小さく、撮像系の空間分解能の関係で、個々のアミロイド斑を計測することが難しい事が判明した。そこで、MRIを用いた信号解析技術を応用

した定量解析法を用い、沈着量の定量的な解析法を現在進めている。

## 謝 辞

本研究は、科学研究費補助金(22580145)ならびに公益財団法人浦上食品・食文化振興財団助成金を受けて実施された。

## 文 献

- 1) Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;349(6311):704-6.
- 2) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;375(6534):754-60.
- 3) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, *et al.* An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994;264(5163):1336-40.
- 4) Maruyama K, Tomita T, Shinozaki K, Kume H, Asada H, Saido TC, *et al.* Familial Alzheimer's disease-linked mutations at Val717 of amyloid precursor protein are specific for the increased secretion of A beta 42(43). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227(3):730-5.
- 5) De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, *et al.* Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet*. 2001;10(16):1665-71.
- 6) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2010;16(5):285-97.
- 7) Park SY, Kim HS, Cho EK, Kwon BY, Phark S, Hwang KW, *et al.* Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(8):2881-7.
- 8) Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*. 2001;21(21):8370-7.
- 9) Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubada OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, *et al.* Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5892-901.

## Inhibitory effect of antioxidant, curcumin of $\beta$ amyloid deposition and new attempt to analyze the three-dimensional-phase X-ray image of the mouse brain

Hiroko Maruyama, Fumitaka Kawakami, Tohoru Takeda  
*Department of Histocytology,  
Kitasato University Graduate School of Medical Sciences*

The patient of Alzheimer's disease (AD) is increasing in worldwide, and prevention of AD is urgently needed. Recently, occurrence of AD is partially thought to be affected by dietary habits, and inhibition of AD by plant-derived antioxidants curcumin has great attention from many AD researches. In this study, the effect of curcumin was examined for impaired long-term memory, inhibition of amyloid deposition and hyperphosphorylation of tau in the brain using long-term oral administration of curcumin to AD model (B6SJL-Tg6799) mouse. In addition, phase contrast X-ray CT with X-ray energy 17.8 keV was performed.

The F<sub>1</sub> mice with both genes of APP and PS1 was divided into three groups; AD male mouse (AD), AD mouse feeding curcumin 0.02% (AD+Curcumin 0.02%), and AD mouse feeding curcumin 0.5% (AD+Curcumin 0.5%). The immunohistochemical staining of brain was performed with anti-A $\beta$ -40 antibody, anti-A $\beta$ -42 antibody, anti-p-Tau396 antibody, and anti-p-Tau404 antibody issue at 10 months of age. We measured the area and the number of A $\beta$  plaques in five-point of cerebral cortex using Image J, and compared among three groups. The number of phosphorylated tau protein (p-Tau) positive cells p-Tau396 and p-Tau404 was also measured.

The 10 months survival rate in AD mouse was 86 % in AD group, 100 % in AD+Curcumin 0.02% group, and 84 % in AD+Curcumin 0.5% groups. At 10 months of age, number of A $\beta$ -42 plaque in the cerebral cortex (measured size:  $273 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) of male mice was 69 in AD group, 41 in AD+Curcumin 0.02% group, and 76 in AD+Curcumin 0.5% group. A decreased area in AD+Curcumin 0.02% group was significantly observed comparing to the AD group ( $p < 0.05$ ). In male mouse, positive cell number of p-Tau404 was observed 110 in normal group, 205 in the AD group, 102 in the AD+Curcumin 0.02% group and 208 in the AD+Curcumin 0.5% group, respectively. The increased p-Tau was observed in the AD group significantly comparing to the normal group ( $p < 0.01$ ), and the decreased p-Tau was shown in AD+Curcumin 0.02% group compared to the AD group ( $p < 0.01$ ). In phase contrast X-ray CT, high-density spots were observed in AD and Curcumin 0.5% groups.

In Alzheimer's disease model mouse, 0.02% curcumin improved the survival rate, and short-term memory impairment. The A $\beta$  deposition and phosphorylated tau were also inhibited by 0.02% curcumin. On the other hand, 0.5% curcumin had not suppressed the amyloid deposition and phosphorylated tau. Owing to different response by curcumin dose, we must consider the adequate dose of antioxidants as curcumin to inhibit A $\beta$  deposition. High-density spot observed in phase contrast X-ray CT corresponded to amyloid plaques in pathological images. However, Curcumin 0.02% group could not be imaged by phase contrast X-ray CT due to the limited experimental time.

Curcumin is not only inhibited A $\beta$  deposition but also to prevent the Tau phosphorylation, and especially, the different effect to prevent A $\beta$  deposition depend to dose was very important result. Low dose curcumin might be considered to prevent the AD, and this causes to very little side effect.