

<平成24年度助成>

高脂肪摂取と脳ベータアミロイド沈着との 関連性に関する実験病理学的研究

チェンバーズ ジェームズ
(東京大学大学院農学生命科学研究科)

緒 言

現在、世界中で475万人が認知症を罹患している[世界保健機構調査]。認知症の罹患率は、地域によらず80歳で10%、90歳で40%程度である。そのため、先進国のみならず新興国の高齢化が進むなかで、急速に患者数が増加することが予想される。認知症の50-80%をアルツハイマー型認知症(AD)が、20-30%を血管型認知症(VD)が占めており、この2つの疾患が認知症の90%以上を占めている。ADとVDに共通する病態として脳に β アミロイド($A\beta$)が沈着することから、 $A\beta$ の沈着を抑制あるいは除去することが認知症の予防と治療に重要であると考えられている。しかしながら、現時点で有効な治療法は開発されておらず、発症リスク因子を除去することによって発症を予防あるいは遅らせることが期待されている[Gandy S. 2011]。

大規模な疫学調査において、高脂肪食の摂取や糖尿病と認知症の発症とのあいだに関連性が示されている[Kalmijn S 1997; Arvanitakis Z 2004]。高脂肪食の摂取については、特に中年期における脂肪摂取が認知機能低下に影響するといわれている[Eskelinen MH 2008]。また、スタチン(高コレステロール治療薬)を摂取している老人は認知症の発症率が低いことが報告されている[Jick H 2000]。実験動物を用いた研究では、ADモデルマウス(Tg2576)に高脂肪食を投与して糖尿病を誘発することにより $A\beta$ の産生と沈着が促進されることが報告されている[Ho L 2004]。一方で、高

脂肪食を別のADモデルマウス(3XTgAD)に投与した研究では、加齢性に記憶力が低下したが、 $A\beta$ の沈着量に変化は認められなかった[Knight EM 2014]。すなわち、高脂肪食の摂取がADの病理発生に与える影響については一定の見解が得られていない。また、マウスの認知機能評価とヒトの認知機能評価の方法が異なるため、ADの病態を客観的にあらかず指標を用いて評価することが望まれている。

$A\beta$ 沈着や認知機能の低下は健常老人においても認められるが、ADの患者の脳では健常老人の脳と比べて $A\beta$ のN末端が切断されたサブタイプ($A\beta$ N3)が優位に沈着することがわかっている[Piccini A 2005]。また、筆者らはヒト以外の動物の脳においてもプラークの中心部(コア)や血管壁に $A\beta$ N3が沈着することを確認しており、 $A\beta$ のN末端の切断はヒト以外の動物においても共通して起こる現象である[Chambers JK 2011]。 $A\beta$ のC末端サブタイプについては、AD患者の脳において $A\beta$ N3の沈着部位と一致して $A\beta$ C43の沈着がみられている[Saito T 2011]。そこで本研究では、これらの $A\beta$ のサブタイプに着目し、ADモデルマウス(5XFAD)を用いて中年期の高脂肪食摂取の影響を評価した。

材料と方法

(1) 動物

ADモデルトランスジェニック(Tg)マウス(Tg(APP^SwFl^{Lon}, PSEN1^{*}M146L*L286V)6799Vas)をJackson Laboratoryから購入、当研

究室で維持繁殖し、実験に供した。このマウスは、家族性アルツハイマー病の変異遺伝子を導入しており、変異型APPおよび変異型PSENを産生することにより早期にヒト型A β が脳に蓄積する。マウスの尾組織から抽出したDNAを以下のプライマーを使用して増幅し、ジェノタイピングを行った(C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。

APP: fw AGGACTGACCACTCGACCAG;

rev CGGGGGTCTAGTTCTGCAT

PSEN: fw AATAGAGAACGGCAGGAGCA;

rev GCCATGAGGGCACTAATCAT

Control: fw CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT;

rev GTAGGTGGAAATTCTAGCATCA TCC。

(2) 実験計画

雄のTgマウス10頭を用い、高脂肪食(High Fat Diet: HFD) 給餌群(n=5)および通常食(Normal Diet: ND) 給餌群(n=5)を設けた。それぞれの群は30日齢で離乳し、離乳後からHFD群には高脂肪飼料(High Fat Diet 32, CLEA Japan, Tokyo, Japan)を、ND群には標準飼料(MF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan)を給餌した。動物は、明暗周期および室温が管理された部屋で、自由に飲水および摂餌できる環境で飼育し、本学動物実験委員会の承認のもと実験が実施された。10日ごとに体重を測定、330日齢で安楽死し、病理解剖を行った。全血、大脳および全身諸臓器を採取した。全血は凝固後に3,000 rpmで10分間遠心し、分離した血清を-80°Cで保管した。大脳の半球を-80°Cで凍結保存し、残りの大脳半球とその他臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定した。

(3) 病理組織学的解析

固定した大脳半球を冠状断し、常法に従いパラフィン包埋、4 μ m厚の連続切片を作製、HE染色および免疫染色を実施した。免疫染色では、組織切片を脱パラフィン後に0.1%過酸化水素メタノール液に15分間浸漬し、内因性ペルオキシダー

ゼを不活化した。抗原賦活化処理として組織切片を98%ギ酸に5分間浸漬し、TBS(Tris-Buffered Saline)で洗浄後に一次抗体と4°Cで一晩反応させた。一次抗体として以下を使用した:マウス抗A β C42抗体(clone 12F4, Millipore, Temecula CA, USA)、マウス抗A β C40抗体(clone 11A5-B10, Millipore, Temecula CA, USA)、ウサギ抗A β C43抗体(IBL, Gunma, Japan)、ウサギ抗A β N1抗体(IBL, Gunma, Japan)、ウサギ抗A β N3抗体(IBL, Gunma, Japan)。TBSで洗浄後、HRP標識二次抗体ポリマー試薬(EnVision+, Dako, Tokyo, Japan)と37°Cで40分間反応させた。TBS洗浄後、0.03%過酸化水素0.05%3'3'-diaminobenzidine Tris-HCl緩衝液と反応させ、抗原抗体複合物を可視化した。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

(4) 画像解析

免疫染色を実施した標本を顕微鏡(Olympus BX50, Olympus, Tokyo, Japan)で観察し、海馬領域の写真を撮影した。Nikon DS-R1iカメラ(Nikon, Tokyo, Japan)で1280 \times 720画素のJPEG画像を取得し、画像解析ソフトImage Jで解析した。HSBカラーモデルで陽性領域を抽出(Hue 0-45; Saturation 25-255; Brightness 100-255)、8-bitグレースケールに変換し、2値化した。選択領域の面積(μ m²)を測定した。

(5) 血清学的解析

Mouse ApoE ELISA Kit(MyBioSource, San Diego, CA, USA)を用いて、血清中のアポリポ蛋白質E(ApoE)濃度を測定した。iMarkマイクロプレートリーダー(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、450 nm波長で吸光度を測定した。

(6) 統計学的解析

上記の解析で得られた数値について、2群間(ND群、HFD群)でスチューデントの*t*検定(下限5%危険率)を実施した。*p* < 0.05を有意とした。

結 果

(1) 体重の変化

実験開始時(30日齢)には、それぞれの群の平均体重に有意差は認められなかった(図1)。その後、両方の群で平均体重が増加し、150日齢以降はHFD群の平均体重がNDの平均体重と比べて有意に大きかった(図1)。

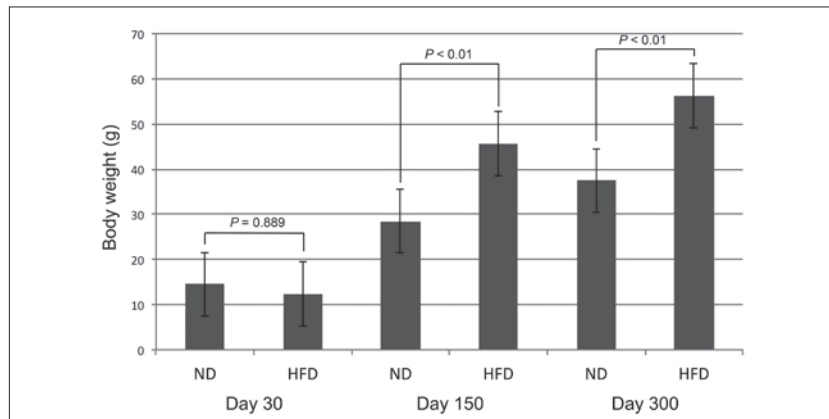


図1 通常食群(ND)と高脂肪食群(HFD)の平均体重。実験開始時(Day30)の平均体重に差は認められない。Day150およびDay300において、HFDの平均体重が有意に大きい($p < 0.01$)。

(2) 大脳のアβ沈着

両方の群で大脳皮質および海馬において、びまん性にAβが斑状に沈着し、境界不明瞭なプラークを形成していた。AβのC末端サブタイプの沈着パターンを比較すると、AβC40およびAβC42が主にプラークを形成しており、AβC43はプラークの中心部に限局してドット状に沈着していた(図2)。AβのN末端サブタイプの沈着パター

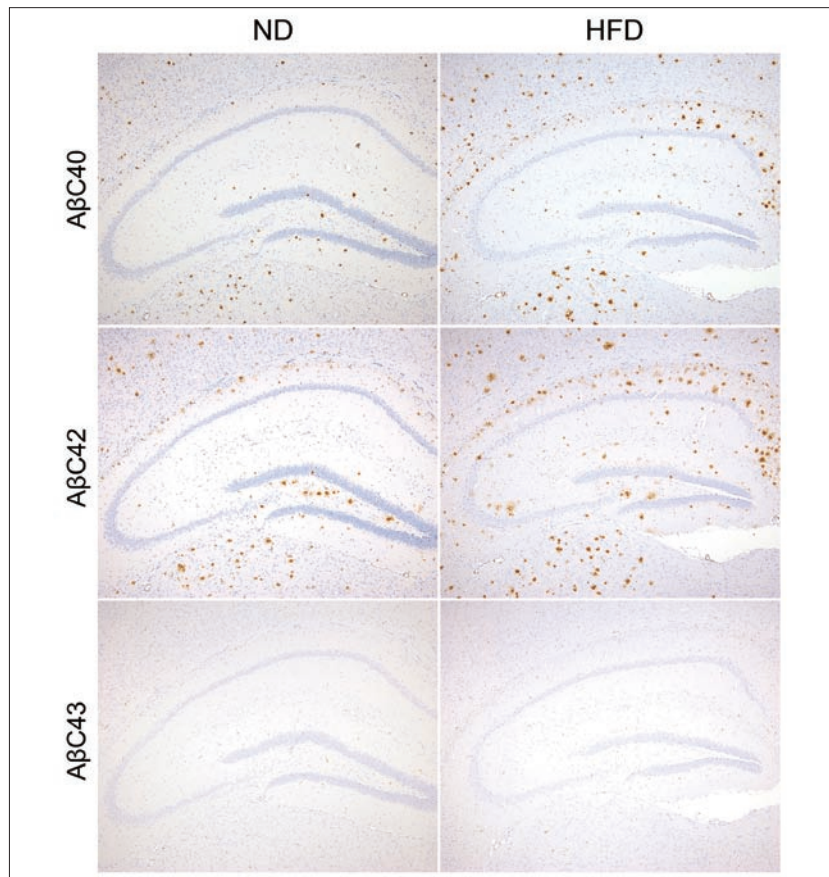


図2 通常食群(ND)と高脂肪食群(HFD)、AβのC末端に対する免疫染色。両方の群で海馬領域にAβC40、AβC42、AβC43が沈着し、プラークを形成する。主にAβC40およびAβC42が沈着し、AβC43の沈着は軽度。ND群と比べてHFD群の方が、沈着程度が大きい。

ンを比較すると、 $A\beta$ N1が主にプラークを形成しており、 $A\beta$ N3はプラークの中心部に局限してドット状に沈着していた(図3)。海馬領域においてプラークを構成する $A\beta$ のサブタイプの割合を図4に示した。 $A\beta$ のC末端サブタイプについては、 $A\beta$ 42の割合が最も大きく、 $A\beta$ 43の割合は小さかった。また、HFDの摂取により $A\beta$ 40の割合が増大する傾向を認めた。 $A\beta$ のN末端サブタイプについては、 $A\beta$ N1が主体であり、HFD摂取により $A\beta$ N3の割合が軽度が増大する傾向を認めた。

海馬領域における $A\beta$ のC末端およびN末端サブタイプの沈着面積をND群とHFD群で比較し

たところ、 $A\beta$ C40および $A\beta$ C42の沈着面積がHFD群においてND群よりも有意に大きかった(図5)。 $A\beta$ C43の沈着面積については、2群間で差は認められなかった。 $A\beta$ N1および $A\beta$ N3の沈着面積については、HFD群においてND群よりも大きい傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった(図5)。

(3) 血清ApoE濃度

採取した血清の色調はHFD群において白濁していた。ELISAを用いて血清中のApoE濃度を測定した結果、HFD群の方がND群よりも平均値が大きいが、2群間で統計学的な有意差は認められなかった(図6)。

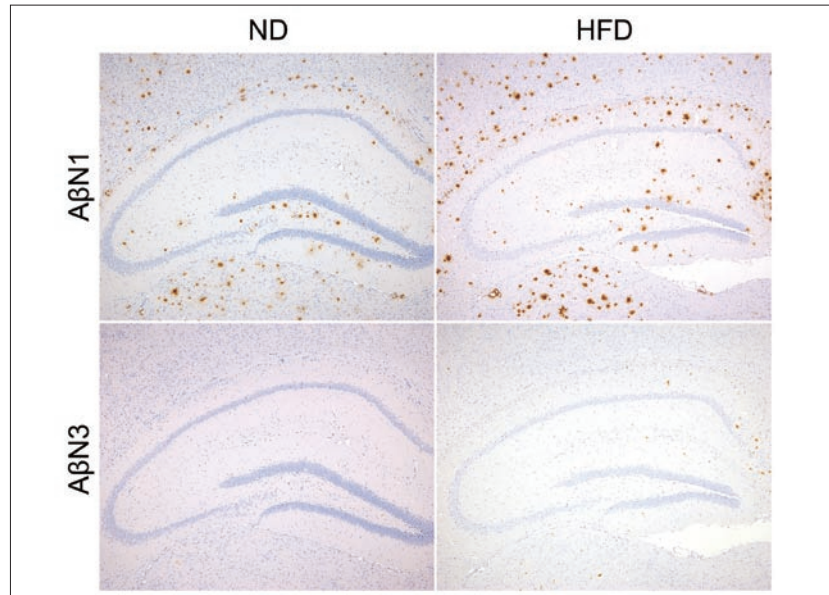


図3 通常食群(ND)と高脂肪食群(HFD)、 $A\beta$ のN末端に対する免疫染色。両方の群において海馬領域に $A\beta$ N1、 $A\beta$ N3が沈着し、プラークを形成する。主に $A\beta$ N1が沈着し、 $A\beta$ N3の沈着は軽度。ND群と比べてHFD群の方が、沈着程度が大きい。

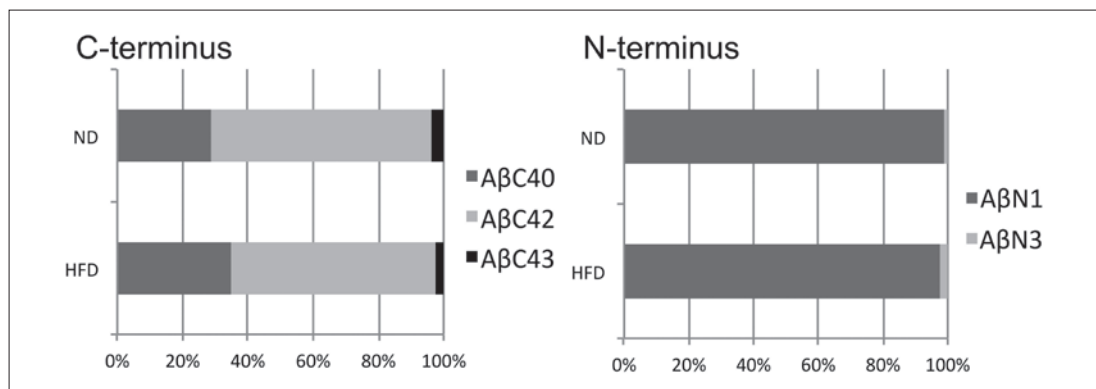


図4 通常食群(ND)と高脂肪食群(HFD)の海馬領域に沈着した $A\beta$ のC末端およびN末端サブタイプの割合。C末端サブタイプについては、 $A\beta$ 42の沈着割合が最も大きい。HFD群では $A\beta$ 40の沈着割合が軽度が増大する。

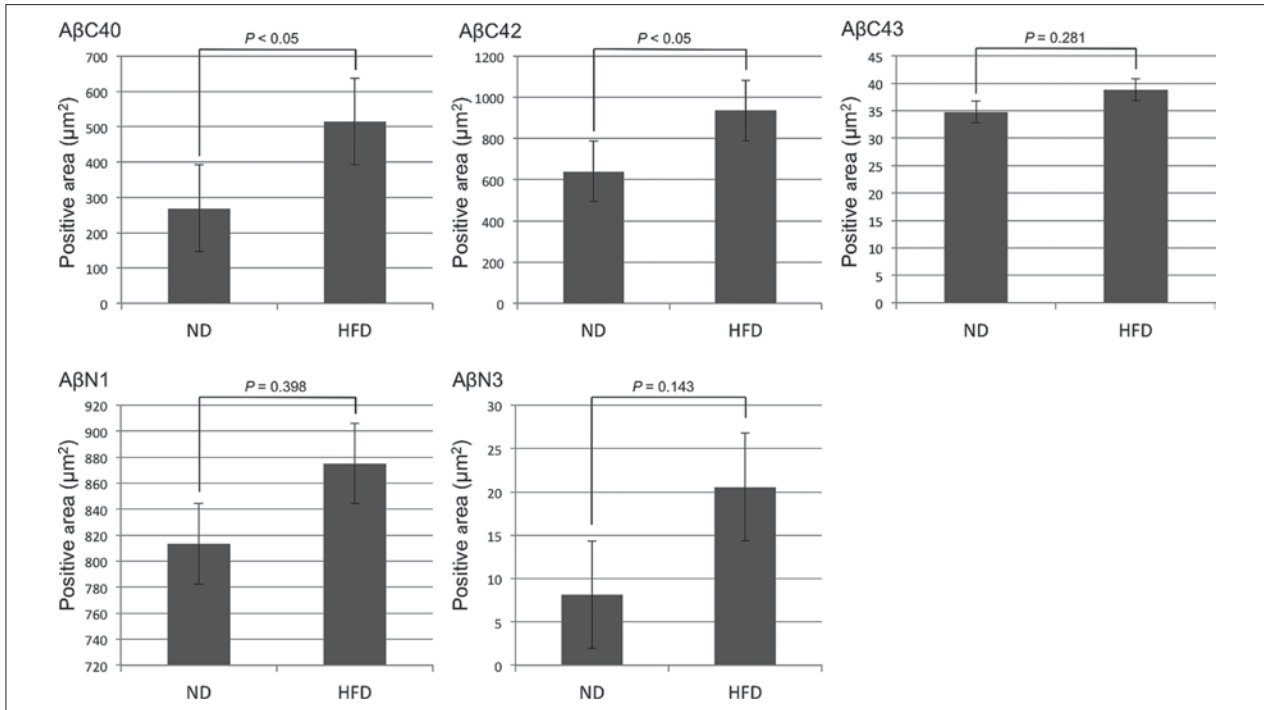


図5 通常食群 (ND) と高脂肪食群 (HFD) の海馬領域におけるAβ沈着面積 (μm²)。HFD群は、ND群と比較してAβC40とAβC42の沈着面積が有意に大きい ($p < 0.05$)。AβC43の沈着面積は、ND群とHFD群で同程度 ($p = 0.281$)。HFD群は、ND群と比較してAβN1とAβN3の沈着面積が大きい、統計学的有意差は認められない ($p = 0.398$; $p = 0.143$)。

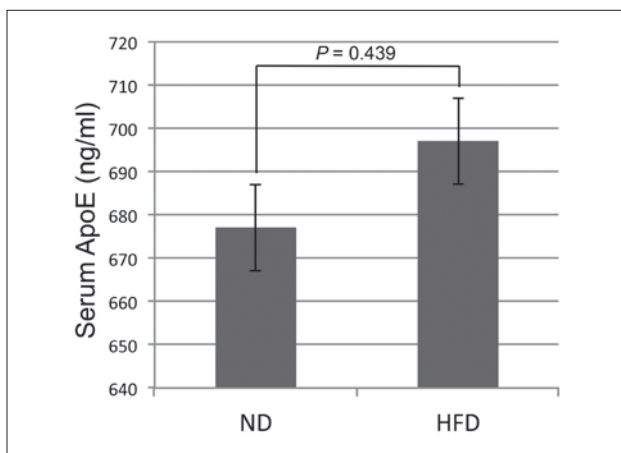


図6 通常食群 (ND) と高脂肪食群 (HFD) の血清ApoE濃度。HFD群の血清ApoE濃度の方が、ND群の血清ApoE濃度よりも高いが、統計学的有意差は認められない ($p = 0.439$)。

考 察

本研究では、AβのN末端およびC末端に着目し、長期間の高脂肪食 (HFD) 摂取によるAD病理への影響を解析した。Aβは、その前駆蛋白質 (APP: amyloid precursor protein) が切断されることにより産生されるが、切断される部位によりN末端およびC末端の様々なサブタイプが生じる。

本研究で使用したADモデルマウス (5XFAD) は、5種類の家族性ADの遺伝子変異が導入されており、早期にAβが脳に沈着することからAD研究で汎用されている。しかしながら、本マウスの脳におけるAβN3およびAβC43の沈着についてはあまり解析されていなかった。本研究の結果から、5XFADマウスにおいてもAβN3およびAβC43サブタイプが脳に沈着するが、その割合は他のサブタイプと比べて小さく、プラークの中心部 (コア) にドット状に観察された。

HFD群は150日齢、300日齢において有意に体重が大きく、採取した血清が白濁していたことから、HFD群は肥満と高脂血症の状態であったと考えた。海馬は認知機能を司る主要な領域であるため、AD研究においてAβの沈着量の評価に用いられる。HFD群とND群の海馬におけるAβの沈着面積を比較すると、AβC40およびAβC42の沈着面積がHFD群で有意に大きかったことから、5XFADマウスでは長期的な高脂肪食摂取に

よりA β C40とA β C42の沈着量が増加すると考えられた。A β C43については、2群間でほとんど違いがみられなかった。A β N末端サブタイプについては、A β N1およびA β N3の両方がHFD群において沈着面積が増加する傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。このことから、高脂肪食摂取により増加するA β のサブタイプはA β 1-40、A β 1-42、A β 3-40、A β 3-42が主体であるが、その他のN末端サブタイプA β X-40、A β X-42が含まれる可能性が示唆された。

ApoE蛋白質は肝臓やマクロファージ、星状膠細胞で産生され、脂質の輸送に関与している。ヒトではApoE4遺伝子型が高脂血症およびADのリスク因子であり、マウスではApoE遺伝子をノックアウトすることでA β 沈着量が減少することが報告されている[Fagan AM 2002; Kim J 2011]。本研究では、HFD群で血清中のApoE濃度が高値を示したが、ND群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。HFD群においてA β 沈着が増大したと血清ApoEの高値の関連性については、脳内のApoE濃度等について検討する必要があると思われる。

本研究は、大脳に沈着するA β のN末端およびC末端サブタイプに着目して、高脂肪食のAD病理に与える影響を解析したはじめての研究である。5XFADマウスでは中年期の高脂肪食摂取により海馬におけるA β C40およびA β C42の沈着量が増加するが、A β C43やA β N3の沈着および血中ApoE濃度に対する作用が比較的小さいことから、高脂肪食摂取のAD病理への影響は限定的なものであると考えられた。

謝 辞

本研究は、公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団の支援のもと実施されました、この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol*. 2004 May; **61**(5):661-6.
- 2) Chambers JK, Mutsuga M, Uchida K, Nakayama H. Characterization of A β pN3 deposition in the brains of dogs of various ages and other animal species. *Amyloid*. 2011; **18**(2):63-71.
- 3) Eskelinen MH, Ngandu T, Helkala EL, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H, Kivipelto M. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2008; **23**(7):741-7.
- 4) Fagan AM, Watson M, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM. Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2002; **9**(3):305-18.
- 5) Gandy S. Perspective: prevention is better than cure. *Nature*. 2011; **475**(7355):S15.
- 6) Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs CV, Hof PR, Pasinetti GM. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004; **18**(7):902-4.
- 7) Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 2000; **356**(9242):1627-31.
- 8) Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol*. 1997; **42**(5):776-82.
- 9) Kim J, Jiang H, Park S, Eltorai AE, Stewart FR, Yoon H, Basak JM, Finn MB, Holtzman DM. Haploinsufficiency of human APOE reduces amyloid deposition in a mouse model of amyloid- β amyloidosis. *J Neurosci*. 2011; **31**(49):18007-12.
- 10) Knight EM, Martins IV, Gümüşgöz S, Allan SM, Lawrence CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging*. 2014; **35**(8):1821-32.
- 11) Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R, Giliberto L, Armirotti A, D'Arrigo C, Bachi A, Cattaneo A, Canale C, Torrassa S, Saido TC, Markesbery W, Gambetti P, Tabaton M. beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2005; **280**(40):34186-92.
- 12) Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat Neurosci*. 2011; **14**(8):1023-32.

Experimental-pathological study on relation between high fat intake and cerebral beta-amyloid deposition

James K. Chambers

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences
The University of Tokyo*

As the global population is getting older, number of dementia patients is increasing. Alzheimer's disease and vascular dementia accounts for more than 90% of dementia cases. Because β -amyloid ($A\beta$) is involved in the pathogenesis of both Alzheimer's disease and vascular dementia, the main strategy for preventing and/or curing the diseases is to decrease cerebral $A\beta$ deposition. Several epidemiological studies have suggested high fat intake as risk factor for developing dementia. In the present study, we examined the effect of high fat diet on $A\beta$ deposition in a mouse model of AD. Mice that were fed with high fat diet for 300 days showed significantly higher $A\beta$ C40 and $A\beta$ C42 deposition in the hippocampal area compared to mice that were fed with normal diet. However, $A\beta$ C43 deposition level was the same among the two groups. In respect of the N-terminus of $A\beta$, $A\beta$ N1 was dominant compared to $A\beta$ N3 in both high fat diet group and normal diet group. Both $A\beta$ N1 and $A\beta$ N3 deposition tended to increase in the high fat group, although the differences were not statistically significant. Also, serum Apolipoprotein E level tended to increase in the high fat group, although differences were not statistically significant. The above findings may indicate increase of other N-terminal subtypes of $A\beta$ (i.e. $A\beta$ x-40 and $A\beta$ x-42) by feeding high fat diet to AD model mouse. In addition, since $A\beta$ N3, the dominant subtype that is deposited in AD brains, did not significantly increase by high fat diet, the effect of high fat intake is modest in AD pathology.