

博士論文

マウスを用いた高脂肪食誘導性の代謝変化に対する

茶カテキンの効果に関する研究

The Effects of Green Tea Catechins on Metabolic Changes

Induced by High-fat Diet in Mice

2019年9月

花王株式会社 生物科学研究所

大西 慎太郎

Shintaro Onishi

目次

序論	1
第1章 C57BL/6J マウスを用いた高脂肪食摂取に伴うヘパトカイン産生に対する 茶カテキンのヘパトカイン低減効果の検討	
1.1. 緒言	6
1.2. 方法	8
1.2.1. 動物および食餌組成	
1.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量	
1.2.3. ウエスタンブロットによる解析	
1.2.4. 統計解析	
1.3. 結果	12
1.3.1. 食餌組成の違いが体重・体組成および血糖値に与える影響	
1.3.2. 茶抽出物の摂取がヘパトカイン産生に与える影響	
1.3.3. 茶抽出物の摂取がインスリンシグナルに与える影響	
1.3.4. 茶抽出物の摂取が代謝関連タンパク質の活性に与える影響	
1.4. 考察	16
1.5. 小括	19
第2章 老化促進モデルマウス（SAMP8）を用いた茶カテキンの高脂肪食誘導性筋萎縮 改善効果の検討	
2.1. 緒言	20
2.2. 方法	22
2.2.1. 動物および食餌組成	
2.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量	

2.2.3. 酵素免疫測定(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)法	
2.2.4. ウェスタンブロットによる解析	
2.2.5. 統計解析	
2.3. 結果	27
2.3.1. 加齢が体組成に与える影響	
2.3.2. 茶抽出物の摂取が SAMP8 マウスにおける高脂肪食誘導性筋萎縮に与える影響	
2.3.3. 茶抽出物の摂取が SAMP8 マウスにおけるインスリン抵抗性および血清 leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)濃度に与える影響	
2.3.4. 骨格筋におけるインスリンシグナルの活性化に関する評価	
2.3.5. 血清 LECT2 濃度と HOMA-IR 値および筋重量の関係に関する統計学的解析	
2.4. 考察	32
2.5. 小括	35
第3章 老化促進モデルマウス (SAMP8) を用いた高脂肪食誘導性認知機能低下に対する 茶カテキンの認知機能改善効果の検討	
3.1. 緒言	36
3.2. 方法	38
3.2.1. 動物および食餌組成	
3.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量	
3.2.3. 記憶学習機能評価試験	
3.2.4. 酵素免疫測定(ELISA)法による amyloid β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$)量の測定	
3.2.5. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)アッセイ法による malondialdehyde (MDA)量の測定	
3.2.6. ウェスタンブロットによる解析	

3.2.7. 統計解析	
3.3. 結果	42
3.3.1. 加齢および高脂肪食摂取が認知機能、脳重量、 $A\beta_{1-42}$ 蓄積に与える影響	
3.3.2. 茶抽出物の摂取が高脂肪食摂取に伴う SAMP8 マウスの認知機能低下および脳重量低下、 $A\beta_{1-42}$ 蓄積に与える影響	
3.3.3. 茶抽出物の摂取が高脂肪食によって誘導される脳内酸化ストレスに及ぼす影響	
3.3.4. 茶抽出物の摂取が海馬のシナプス形成関連因子産生量に与える影響	
3.3.5. 茶抽出物の摂取が海馬の Neprilysin 量に与える影響	
3.4. 考察	49
3.5. 小括	52
総括	53
謝辞	55
参考文献	56

略語一覧（アルファベット順）

A β : amyloid β

ACC: acetyl-CoA carboxylase

ADI: Alzheimer's Disease International

AMPK: adenosine-monophosphate-activated protein kinase

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

Cont: control

C: catechin

Cg: catechin gallate

EC: epicatechin

ECg: epicatechin gallate

EGC: epigallocatechin

EGCg: epigallocatechin gallate

eIF2 α : alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ER: endoplasmic reticulum

Fbx32: F-box protein 32

fet-A: fetuin-A

FoxO1: Forkhead box protein O1

FoxO4: Forkhead box protein O4

GC: gallic catechin

GCg: gallic catechin gallate

GTE: green tea extract

HF: high fat

HFGT: HF with GTE

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LECT2: leukocyte cell-derived chemotaxin 2

LKB1: liver kinase B1

mTOR: mammalian target of rapamycin

MDA: malondialdehyde

MuRF1: muscle RING-finger protein-1

NEP: neprilysin

PSD95: postsynaptic density protein 95

S6K: p70 S6 kinase

SeP: selenoprotein P

SAM: senescence-accelerated mouse

SAMP8: senescence-accelerated mouse prone-8

SAMR1: senescence-resistant inbred strain 1

TBARS: Thiobarbituric acid reactive species

4EBP1: 4E-binding protein1

序論

世界的に肥満をはじめとした非感染性疾患の蔓延に伴う医療コストの増大などが問題となり、肥満の予防や制御は現代社会における最も重要な課題の一つとなった。¹⁻² 肥満は様々なホルモンレベルおよび炎症性サイトカインレベルを変化させることでインスリン抵抗性の誘導や代謝異常を引き起こし、二次的に 2 型糖尿病や高血圧、心疾患、脂質異常症、骨格筋の筋機能低下や筋萎縮、認知機能低下など全身に様々な問題を引き起こす原因となることが広く知られている。³⁻⁵

肥満に伴う様々な疾患は生活習慣が発症原因に深く関与していると考えられており、生活習慣病と称される。生活習慣病を引き起こす生活として不健康な食習慣やアルコールの摂取、喫煙習慣、運動不足が挙げられる。⁶⁻⁷ 日本では食の欧米化により脂肪の摂取量が増加し、生活習慣病が顕著となった。⁸ 疫学研究において過食や高脂肪食の摂取が体重増加や脂肪蓄積、そして肥満を誘導することが示されている。⁹ 中でも過食や高脂肪食の摂取に伴う内臓脂肪の蓄積は高血糖やインスリン抵抗性を誘導し、高血圧や心疾患、糖尿病リスクを高めるなど、生体に様々な問題を引き起こす。¹⁰ 過食や高脂肪食の摂取が高血糖やインスリン抵抗性を誘導する分子メカニズムは長年不明であったが、1994 年に白色脂肪細胞から分泌されるホルモンとしてレプチンが同定されて以降、脂肪細胞から分泌される生理活性物質（アディポカインまたはアディポサイトカインと称される分泌タンパク質）の探索が進められ、その分泌動態の変化や脂肪組織以外の臓器での感受性の変化が肥満やインスリン抵抗性の誘導に関与していることが明らかにされ、創薬ターゲットとしての研究が進められてきた。¹¹⁻¹³ 脂肪細胞由来分泌タンパク質であるアディポカインと同様に、骨格筋由来分泌タンパク質であるマイオカインや肝臓由来分泌タンパク質であるヘパトカインなど、臓器間コミュニケーションに関わる生理活性物質の探索とそれらが肥満やインスリン抵抗性の誘導に与える影響などが盛んに研究され¹⁴、マイオカインは運動による制御¹⁵⁻¹⁶が、ヘパトカインは食事やサプリメントによる制御¹⁷が検討されている。

臨床研究において肥満やインスリン抵抗性の誘導に関わるヘパトカインとして leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)および selenoprotein P (SeP)、fetuin-A (fet-A)が報告されている。¹⁸⁻²³ 動物を用いた検討では肥満誘導モデルマウスにおいて高脂肪食の摂取が肝臓における adenosine-monophosphate-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化を抑制することにより、LECT2 レベル

を上昇させ、血中へと分泌された LECT2 が骨格筋においてインスリン抵抗性を誘導する可能性が示されている。¹⁹ 同様に、SeP についても代謝疾患を有する者と血中 SeP 濃度が同程度となるように SeP をマウスの腹腔へ投与すると肝細胞及び骨格筋細胞においてインスリン抵抗性の誘導及び糖代謝異常が引き起こされる。²⁰ このようなインスリン抵抗性の誘導や糖代謝異常は筋萎縮を誘導すると考えられる。骨格筋の重量や機能は一般的にタンパク質の合成と分解のバランスによって制御されるが、これらのバランスの制御にはインスリンシグナル伝達経路が深くかかわっている。²⁴ このため、肥満や 2 型糖尿病はインスリン抵抗性を伴うことで筋萎縮のリスク因子になり得る。²⁵ 従って、過剰な脂質の摂取はインスリン抵抗性を伴う肥満や 2 型糖尿病を引き起こすことで、骨格筋の筋タンパク質合成シグナルを抑制すると考えられる。²⁶ しかしながら、骨格筋におけるインスリン抵抗性の誘導とヘパトカイン産生量との間に明確な因果関係は明らかにはなっていない。そこで、脂質の過剰摂取に伴う肥満誘導が骨格筋におけるインスリン抵抗性の誘導に及ぼす影響およびヘパトカイン産生量へ及ぼす影響を明らかにし、骨格筋におけるインスリン抵抗性誘導の改善策を検討することは重要な研究課題である。

また、脂質を過剰に含む不健康な食事を継続的に摂取することに起因して発症する 2 型糖尿病は、認知機能の低下との関連²⁷⁻²⁸ が、肥満や 2 型糖尿病を引き起こすインスリン抵抗性を有する壮年期の方では脳萎縮状態や認知機能低下状態になるリスクが高いことが示されている。²⁹ 脳萎縮状態や認知機能低下状態が深刻な場合、認知症を発症するが、脳内の酸化ストレスの増大が病態を悪化させることが知られている。³⁰⁻
³¹ しかしながら、脂質の過剰摂取に伴い脳内酸化ストレスがどのように誘導されるのかなど、詳細なメカニズムは不明な点も多く、さらなる研究が望まれる。こうした背景から、脂質の過剰摂取が認知機能に与える影響を明らかにすること、また、そのメカニズムの一端として酸化ストレスがどのように関連しているのかなどを解明し、不健康な食事による認知機能低下に対する改善策を検討することは、超高齢化社会を迎えた現代において重要な研究課題であると言える。

疫学研究やヒト臨床試験において、エピガロカテキンガレート(epigallocatechin gallate; EGCg)をはじめとした茶カテキン類(緑茶ポリフェノール)を多量に含有する茶抽出物(green tea extract; GTE)を摂取することは、肥満や高血糖、インスリン抵抗性、炎症を抑制することや、血管内皮機能の改善等に効果的であることが報告されている。³²⁻³⁹ 特に肝臓組織において、茶カテキンは酸素消費量や脂質のβ酸化を亢進させ糖

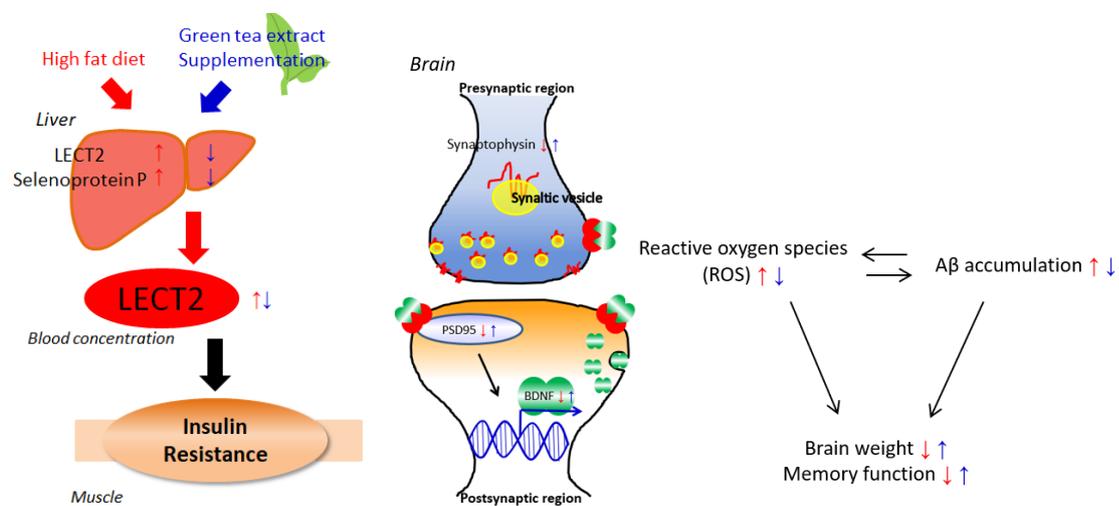
代謝および脂質代謝を改善させる。³⁷⁻⁴³ また、骨格筋組織では糖代謝改善作用が⁴⁴、脳神経細胞では脳神経保護作用⁴⁵⁻⁴⁶が報告されている。加えて、認知機能低下の原因と考えられる酸化ストレスに対し、茶カテキンを摂取した高齢者では酸化ストレスが抑制されること⁴⁷、げっ歯類を用いた数多くの研究により茶カテキンは抗酸化ストレス効果を有することが明らかにされている。^{46, 48-52}

茶カテキンの肝臓における代謝改善作用は培養細胞および動物を用いた実験で多くの分子メカニズムが明らかにされている。Muraseらの報告⁴¹によると、マウス肝臓由来の培養細胞であるHepa 1-6細胞に茶カテキン類を添加するとAMPKαおよび脂質代謝に関わるacetyl-CoA carboxylase (ACC)のリン酸化が誘導され活性化される。動物の肝臓においても同様にAMPKαおよびACCの活性化が誘導され、さらにAMPKαの上流因子としてliver kinase B1 (LKB1)の活性化が誘導される。加えて、上記シグナルの変化と同時に、酸素消費量や脂質のβ酸化が亢進される。また、AMPKの活性化はmammalian target of rapamycin (mTOR)シグナルとendoplasmic reticulum (ER)ストレスを抑制し、肝臓において脂質の蓄積を抑える。⁵³ Liuらの報告でもマウスにEGCgを添加した食餌を12週間給餌すると肝臓中の脂質の蓄積が顕著に抑制された。⁴⁴ 骨格筋組織においても茶カテキンがインスリンシグナル伝達に關与するAkt (protein kinase Bとしても知られる)のリン酸化を誘導することや、ラット筋芽細胞株であるL6細胞を用いた検討では肝臓と同様にAMPKαやACCの活性化を誘導することが報告されている。^{41, 44} しかしながら、培養細胞における検討で評価している茶カテキンの濃度は、生体で茶カテキン摂取後に血中に移行する茶カテキン濃度よりはるかに高い濃度で検討されており、生体の骨格筋においても茶カテキンが直接的に作用し、AMPKαやACCを活性化させるかは明らかではない。従って、茶カテキンの摂取が生体において骨格筋の代謝にどのように影響を及ぼしているのか、また、インスリンシグナル伝達経路の一つであるAktの活性化を制御するメカニズムや、骨格筋重量や筋萎縮にどのように影響を及ぼすかは明らかとは言えない。また、脳組織に対する茶カテキンの作用メカニズムには、酸化ストレス制御が関与すると考えられているが、その詳細なメカニズムは十分には明らかとなっていない。以上の茶カテキンの肝臓、骨格筋、脳組織に対する既存知見から、茶カテキンは肝臓において様々な代謝変化を引き起こすが、骨格筋や脳組織に対しては必ずしも直接的な作用だけではない、間接的な作用も存在すると考えられる。

そこで本論文では、茶カテキンの摂取は肝臓の代謝改善効果により全身性の代謝改善効果を発揮し、筋萎縮や認知機能低下を改善するのではないかと仮説を立て、肝臓由来分泌タンパク質であるヘパトカインやインスリン抵抗性の誘導、酸化ストレス制御に着目した検討を行った。試験には肥満誘導モデルとして高脂肪食をマウスに摂取させるモデルを用い、高脂肪食摂取によって誘導される肝臓、骨格筋、および脳組織の変化を捉え、高脂肪食摂取による代謝変化に対する茶カテキン摂取の効果を検証することで、茶カテキンの骨格筋や脳組織に対する効果の分子メカニズムを解明することを目的とした研究を行った。本研究全体の概略を Scheme 1 に示す。

第 1 章では 8 週齢の C57BL/6J マウスに通常食、高脂肪食、または高脂肪食に 0.4% の GTE を添加した食餌を 4 週間与え、肥満誘導時に起こる代謝変化を肝臓中のヘパトカイン (LECT2, SeP, fet-A) 産生量およびインスリン抵抗性の誘導に着目し解析し、GTE 摂取による肝臓でのヘパトカイン産生量の制御メカニズムについて考察した。第 2 章では 8 週齢の老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse (SAM) prone-8; SAMP8) に通常食、高脂肪食、または高脂肪食に 0.5% の GTE を添加した食餌を 4 ヶ月間与え、加齢に伴う高脂肪食誘導性筋萎縮に対する茶カテキンの筋萎縮改善効果について、血中ヘパトカイン量およびインスリン抵抗性の制御を中心に解析し、GTE 摂取による血中ヘパトカイン量の制御が筋萎縮の誘導に与える影響について考察した。第 3 章では、8 週齢の SAMP8 マウスに通常食、高脂肪食、または高脂肪食に 0.5% の GTE を添加した食餌を 4 ヶ月間与え、高脂肪食摂取が加齢に伴う認知機能の低下に及ぼす影響を明らかにするとともに、脳内酸化ストレスやシナプス可塑性および長期記憶の形成に必要なタンパク質に着目して解析し、茶カテキン摂取の認知機能改善効果の分子メカニズムについて考察した。

本研究の概要



Scheme 1. Hypothetical effects of GTE on liver, muscle, and brain tissue.

第 1 章

C57BL/6J マウスを用いた高脂肪食摂取に伴うヘパトカイン産生に対する 茶カテキンのヘパトカイン低減効果の検討

1.1. 緒言

世界的に肥満をはじめとした非感染性疾患の蔓延に伴う医療コストの増大などが問題となり、肥満の予防や制御は現代社会における最も重要な課題の一つとなった。¹⁻² 肥満は様々なホルモンレベルおよび炎症性サイトカインレベルを変化させることでインスリン抵抗性の誘導や代謝異常を引き起こし、二次的に 2 型糖尿病や骨格筋の筋機能低下、認知機能低下など全身に様々な問題を引き起こす原因となることが知られている。⁴⁻⁵

GTE は生理活性物質として、インスリン抵抗性の改善効果がヒトや動物を用いた試験で実証されているエピガロカテキンガレート(epigallocatechin gallate; EGCg)やエピカテキンガレート(epicatechin gallate; ECG)などの茶カテキン類を多量に含み、GTE の摂取により、肥満や高血糖、炎症を抑制すること、血管内皮機能を改善することが報告されている。³²⁻³⁹ 加えて、Nagao らの報告³⁷⁻³⁹ によると茶カテキン類を豊富に含んだ市販飲料は体脂肪およびウエスト周囲長を減少させ、糖代謝および脂質代謝を改善する。Murase らはマウスに高脂肪食を負荷した肥満誘導モデル試験において、GTE の併用摂取は酸素消費量や脂質酸化を亢進し、さらには糖代謝および脂質代謝を亢進し、肥満を軽減することを明らかにしている。⁴⁰⁻⁴¹ これら茶カテキンの生理活性について、例えば脂質代謝の亢進作用には肝臓における AMPK のリン酸化を伴う活性化が脂質のβ酸化を亢進し、脂質合成を抑制することによるものであることが明らかとなっている。⁴¹⁻⁴³ 序論でより詳細に述べた通り、茶カテキンの肥満に対する生理作用については特に肝臓における作用が明らかとなっているが、一方で、肝臓以外の臓器に対する全身性の影響について分子レベルでは明らかにされていない。

臨床研究において肥満やインスリン抵抗性に関与する肝臓由来分泌タンパク質のうち、LECT2 および SeP、fet-A が肥満に伴い上昇することが報告されている。¹⁸⁻²³ 動物を用いた検討では肥満誘導モデルとして C57BL/6J マウスに対し高脂肪食を摂取させることで、肝臓における AMPK のリン酸化が抑制され、LECT2

レベルを上昇させ、血中へと分泌された LECT2 が骨格筋においてインスリン抵抗性を誘導する可能性が示されている。¹⁹ 同様に、SeP についても代謝疾患を有する者と血中 SeP 濃度が同程度となるように SeP をマウスへ投与すると肝細胞および骨格筋細胞においてインスリン抵抗性の誘導および糖代謝異常が引き起こされる。²⁰ さらにヘパトカインレベルの上昇は血管内皮細胞の破綻を誘導し心疾患リスクを増大させることが示唆されている。⁵⁴ このため GTE の生理機能として報告されている骨格筋でのインスリン抵抗性の改善や抗肥満効果、心疾患リスク低減効果などに、ヘパトカインの上昇抑制が関与することが推測される。

本章では C57BL/6J マウスに高脂肪食を摂取させる肥満誘導モデルを用い、GTE が 4 週間の高脂肪食摂取に伴うヘパトカインレベルに与える影響について検討した。同時に、4 週間の高脂肪食摂取によって誘導される肥満初期において、インスリン抵抗性の誘導とヘパトカインレベルの関係について、インスリン抵抗性が誘導された結果ヘパトカインレベルの上昇が誘導されるのか、またはヘパトカインレベルの上昇がインスリン抵抗性を誘導するのかを評価するため、インスリンシグナルの解析を行った。最後に、インスリン抵抗性に関与する代謝関連タンパク質の活性について評価し、茶カテキンがヘパトカイン産生に与える影響について分子レベルで考察した。

1.2. 方法

1.2.1. 動物および食餌組成

本研究は National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals および静岡県立大学の動物実験規定に準拠し計画した。また、全ての動物実験は静岡県立大学動物実験委員会により承認された上で行った（承認番号：155096）。動物に対する苦痛軽減の処置として、全ての解剖操作は sodium pentobarbital (Somnopenyl, Kyoritsu seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた麻酔下で行い、可能な限り苦痛の軽減に努め、本研究を実施した。

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス (Japan SLC Inc, Hamamatsu, Japan) を 12 時間の明暗サイクルにて飼育した。マウスは体重に群間差が無いように対照群 (Control; Cont)、高脂肪食群 (High fat; HF)、そして高脂肪食 + GTE 群 (HF+GTE; HFGT) の 3 群に 6 匹/群に群分けした。Cont 群のマウスには対照食としてコーン油 5.0%、カゼイン 20.0%、セルロース 4.0%、ミネラル類(AIN-76) 3.5%、そしてビタミン類(AIN-76) 1.0%を含む食餌を与えた。HF 群および HFGT 群には上記対照食に加え、ラード 5.0%、コーン油 20.0%、スクロース 13.0%を添加した高脂肪食を与えた。HFGT 群にはさらに GTE を 0.40%加えた。各食餌はポテトスターチにより総量をそろえた。Table 1 に食餌組成の詳細を示す。すべての実験に供されたマウスは 8 週齢から 12 週齢までの 4 週間、上記試験食を給餌された。

4 週間の試験食摂取期間後、16 時間の絶食の後、マウスに 10% sodium pentobarbital (Somnopenyl, Kyoritsu seiyaku Co., Ltd.) 150 μ L を腹腔内投与により与え、10–15 分後に麻酔下で開腹した。門脈から生理食塩水またはインスリン 1.0 μ M を 0.1 mL 投与し、1 分後に血液サンプルを腹部大静脈より採取し、血糖値を ACCU-CHEK Aviva (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて測定するとともに血清および血漿を回収した。その後、肝臓組織および脂肪組織 (epididymal, retroperitoneal、および mesenteric fat pads) を採取し、重量を測定後、液体窒素に凍結し、 -80°C で以降の解析に使用するまで保管した。

1.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量

茶抽出物 (Green tea extract; GTE) は三井農林株式会社 (Mitsui Norin Co., Ltd. Tokyo, Japan)より入手した。GTE に含まれる茶カテキン類の含有量は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。⁵⁵ GTE に含まれる全カテキン量は 77.6 g/100 g であり、その内訳はエピガロカテキンガレート (epigallocatechin gallate; EGCG, 55.6 g)、エピカテキンガレート (epicatechin gallate; ECg, 12.5 g)、ガロカテキンガレート (gallocatechin gallate; GCg, 4.85 g)、エピガロカテキン (epigallocatechin; EGC, 2.14 g)、エピカテキン (epicatechin ; EC, 0.962 g)、カテキンガレート (catechin gallate; Cg, 0.597 g)、ガロカテキン (gallocatechin; GC, 0.504 g)、カテキン(catechin; C, 0.186 g)、その他カテキン(other catechins, 0.202 g)であった(Table 2)。カフェイン含有量は 100 g の GTE 中に 0.151 g であった。

1.2.3. ウェスタンブロットによる解析

ウェスタンブロットによる解析は既報の方法⁵⁶を一部改変し実施した。解剖時に採取した肝臓サンプルに cComplete[®] Protease Inhibitor cocktail (Roche Diagnostics GmbH) と PhosSTOP phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics GmbH)を製造業者のプロトコルに従い添加した RIPA バッファー(Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を加えた。その後、組織破碎機 (Physcotron, Microtec Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い細胞溶解液を作製し、3,000 × *g* で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。細胞溶解液は最終タンパク質濃度が 1.0 mg/mL、還元剤として DL-dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)の最終濃度が 50 mM となるように Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を添加し、100°C で 5 分間処理した。各サンプル 10 µg のタンパク質量となるように 4–15% gradient gel (Bio-Rad Laboratories, Inc)にアプライし、SDS-PAGE を行った。その後、泳動により分離されたタンパク質を polyvinylidene fluoride membranes (メンブレン) に 100 V で 1 時間転写し、PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)で 3 時間振盪反応させた。その後メンブレンは 1:1000 倍に Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO Co., Ltd.)で希釈した一次抗体と 4°C で 16 時間反応させた。次いで、anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked 抗体 (#7074)または anti-mouse IgG horseradish

peroxidase-linked 抗体 (#7076) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)を 1:2000 倍に Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO Co., Ltd.)で希釈した抗体溶液と 1 時間反応させた。シグナルの検出には ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)を用い、luminescence imager (Ez-capture II, ATTO Co., Tokyo, Japan)により可視化した。LECT2 (sc-398072)、SeP (sc-376858)、および fet-A (sc-166531)に対する一次抗体は Santa Cruz Biotechnology, Inc.より購入し、AMPK (#2532)、phospho-AMPK (Thr172) (#2535)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) (#9252)、phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (#9251)、alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) (#9722)、phospho-eIF2 α (Ser51) (#9721)、Akt (#9272)、phospho-Akt (Ser473) (#4058)、mammalian target of rapamycin (mTOR) (#2983)、phospho-mTOR (Ser2481) (#2974)、4E-binding protein1 (4EBP1) (#9452)、phospho-4EBP1 (Thr37/46) (#2855)、および β -actin (#4967)に対する一次抗体は Cell Signaling Technology より購入した。

1.2.4. 統計解析

本章で得られた結果は平均値 \pm S.D.で示した。全てのデータは IBM SPSS Statistics Version 24 (IBM Corp., Armonk, NY)を用い解析した。群間における解析では一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、Tukey による有意水準の検定を行った。Table 3 における群間差の検定にはインスリン投与の有無に分け、3 群での検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

Table 1 Composition of experimental diets fed to mice.

	Cont	HF	HFGT
Lard	0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	25.0	25.0
Potato starch	66.5	28.5	28.1
Sucrose ^a	0	13.0	13.0
Casein	20.0	20.0	20.0
Cellulose	4.0	4.0	4.0
Vitamins (AIN-76)	3.5	3.5	3.5
Minerals (AIN-76)	1.0	1.0	1.0
Green tea extract (GTE) ^b	0	0	0.40
Energy ^c	%		
Protein	20.5	15.7	15.8
Fat	11.3	51.7	51.9
Carbohydrate	68.2	32.6	32.3

Cont, control diet; HF, high fat diet; HFGT, HF with 0.40% GTE diet; diet compositions are indicated in % (w/w).

^a Obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)

^b Obtained from Mitsui Norin Co., Ltd. (Tokyo, Japan)

^c Percent of kcal of each macronutrient

Other ingredients were obtained from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Table 2 Catechin content of GTE and HFGT diet.

	% of GTE	g/100 g of GTE	mg/100 g of HFGT diet
EGCg, epigallocatechin gallate	71.7	55.6	222
ECg, epicatechin gallate	16.2	12.5	50.1
GCg, gallic catechin gallate	6.25	4.85	19.4
EGC, epigallocatechin	2.76	2.14	8.56
EC, epicatechin	1.24	0.962	3.85
Cg, catechin gallate	0.77	0.597	2.39
GC, gallic catechin	0.65	0.504	2.02
C, catechin	0.24	0.186	0.745
Other catechins	0.26	0.202	0.807
Others *		22.4	
Total	100	100	309.9

*GTE purity was 77.6%. The caffeine content was 0.151 g/100 g of GTE (0.20% of total GTE).

1.3. 結果

1.3.1. 食餌組成の違いが体重・体組成および血糖値に与える影響

本試験期間における平均食餌摂取量(kcal/mouse/day)は 13.71 (Cont)、12.90 (HF)、および 11.17 (HFGT)であった。4 週間の試験終了時、体重・体組成および血糖値に統計学的に有意な群間差は認められなかった(Table 3)。

Table 3 Body weight, liver weight, fat weight, and blood glucose level in C57BL/6J mice.

	Insulin (-)			Insulin (+)		
	Cont	HF	HFGT	Cont	HF	HFGT
Final body weight, g	25.8 ± 1.9	29.5 ± 3.0	26.1 ± 1.5	23.1 ± 0.4	26.0 ± 2.4	24.7 ± 2.7
Liver weight, g	0.774 ± 0.216	0.869 ± 0.072	0.801 ± 0.071	0.664 ± 0.161	0.751 ± 0.203	0.766 ± 0.064
Epididymal fat, g	0.371 ± 0.224	0.851 ± 0.457	0.440 ± 0.125	0.168 ± 0.081	0.512 ± 0.365	0.520 ± 0.292
Mesenteric fat, g	0.0588 ± 0.0362	0.0932 ± 0.0392	0.0516 ± 0.0065	0.0230 ± 0.0134	0.0612 ± 0.0663	0.0455 ± 0.0371
Retroperitoneal fat, g	0.138 ± 0.126	0.370 ± 0.185	0.181 ± 0.080	0.0393 ± 0.0051	0.190 ± 0.166	0.191 ± 0.103
Blood glucose, mg/dL	108 ± 16	133 ± 16	119 ± 9	103 ± 16	107 ± 14	106 ± 5

Values are means ± S.D. from three mice per group. No significant differences were observed.

Cont, control diet; HF, high fat diet; HFGT, HF with 0.40% GTE diet.

Insulin (-) and Insulin (+) denote whether or not insulin was administered as described in the methods.

1.3.2. 茶抽出物の摂取がヘパトカイン産生に与える影響

食餌の違いによりヘパトカイン産生量がどのように変化するかを、肝臓組織を用いたウエスタンブロットにより解析した。fet-A 量は 4 週間の高脂肪食の摂取により対照群と比較し差は認められなかったが、SeP 量は高脂肪食摂取により増加傾向を示し、LECT2 量は高脂肪食摂取により統計学的に有意な増加が認められた (Fig 1)。一方、高脂肪食とともに GTE を摂取した HFGT 群では LECT2 量および SeP 量の統計学的に有意な減少が認められた (Fig 1B, C)。HFGT 群においても fet-A 量に変化は認められなかった (Fig 1D)。これらの結果から、GTE は LECT2 および SeP 量を減少させる効果が認められた。

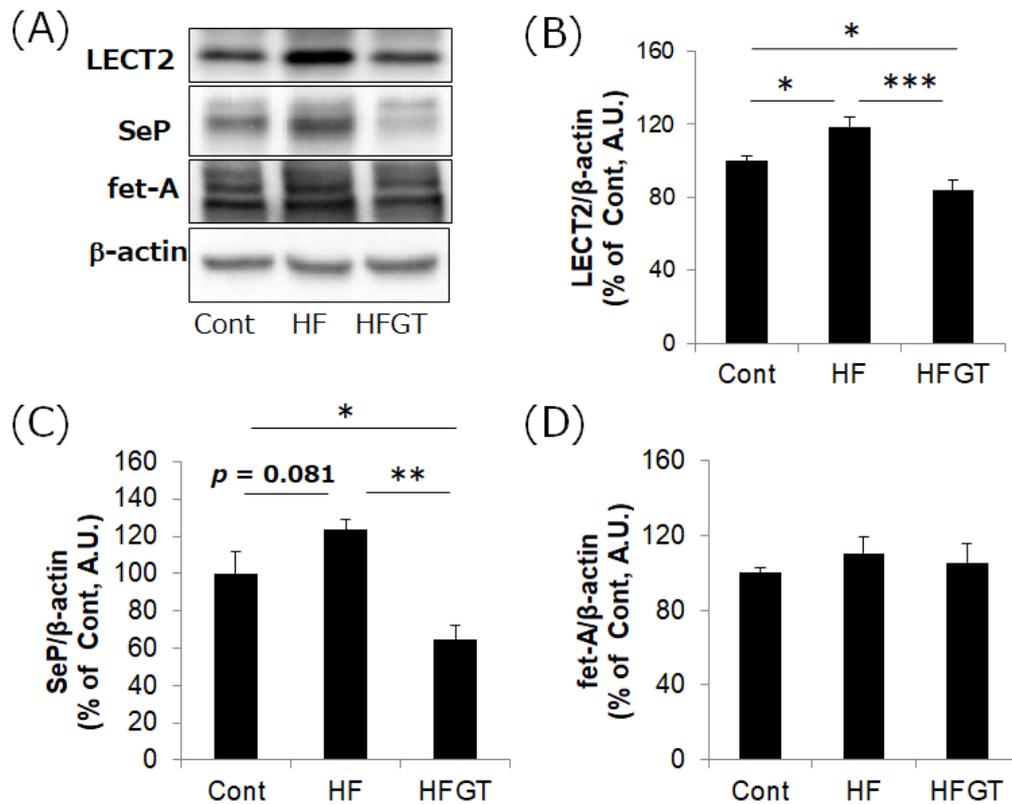


Fig 1. Hepatokine production levels in the livers of C57BL/6J mice.

Representative western blot analysis (A) and quantification of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) (B), selenoprotein P (SeP) (C), and fetuin-A (fet-A) (D) in the livers of C57BL/6J mice after the 4-week feeding period. Cont, control diet; HF, high-fat diet; HFGT, HF with 0.40% GTE diet. Data were normalized to the Cont diet group and are expressed as means \pm S.D. from three mice per group. A.U. means arbitrary units. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for comparison among the three different food intake groups. Significance is expressed as *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

1.3.3. 茶抽出物の摂取がインスリンシグナルに与える影響

LECT 2 および SeP 量の増加にインスリン抵抗性が関与していたか検証する目的でインスリンシグナル伝達経路に重要な Akt (Ser473)、mTOR (Ser2481)、および 4EBP1 (Thr37/46) タンパク質のリン酸化状態をインスリン血中投与条件においてグループ間で比較解析した。結果、上記 3 種のタンパク質全てにおいて、統計学的に有意なリン酸化の変化は認められなかった (Fig 2)。また、4 週間の試験期間において血糖値に群間差が認められていないことと合わせ、本試験期間の 4 週間の高脂肪食負荷でインスリン抵抗性は誘導されていないと推察される。

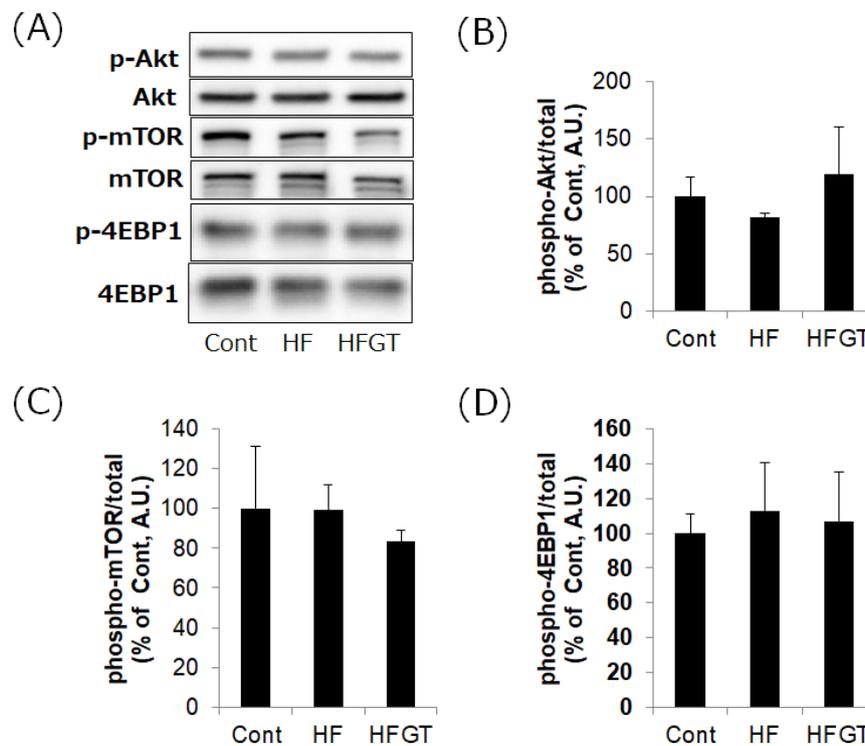


Fig 2. Analysis of insulin sensitivity in the livers of C57BL/6J mice following insulin perfusion. Representative western blot analysis (A) and phosphorylation levels of Akt (B), mTOR (C), and 4EBP1 (D) in the liver after the 4-week feeding period. Samples for analysis were dissected 120 to 150 sec after perfusion of 1 μ M insulin solution via the portal vein in the open abdominal cavity of each anesthetized mouse. Cont, control diet; HF, high fat diet; HFGT, HF with 0.40% GTE diet. Data were normalized to the Cont diet group and are expressed as means \pm S.D. from three mice per group. A.U. means arbitrary units. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for comparison among the three different food intake groups. No significant differences were observed.

1.3.4. 茶抽出物の摂取が代謝関連タンパク質の活性に与える影響

GTE や茶カテキン類がヘパトカイン産生を制御する分子メカニズムは報告されていない。一方で、AMPK、eIF2 α 、および JNK はヘパトカインの産生に分子レベルで関与することが報告されている。このため GTE のヘパトカイン産生量制御に上記因子が関与する可能性が考えられ、AMPK、eIF2 α 、および JNK のリン酸化状態について肝臓組織サンプルを用い解析した。GTE は肝臓における AMPK の活性化作用が報告されているが、本研究では予想に反し、AMPK のリン酸化状態に統計学的に有意な差は認められなかった (Fig 3A, B)。eIF2 α は ER ストレスのマーカーとして肥満や 2 型糖尿病発症に伴いリン酸化が増大し活性化することが報告されている。⁵⁷ 本研究においても HF 群で eIF2 α のリン酸化が統計学的に有意に増大することが示され、HFGT 群において高脂肪食摂取による影響は抑制された (Fig 3A, C)。一方、後期 ER ストレスマーカー因子である JNK に群間差は認められなかった (Fig 3A, D)。

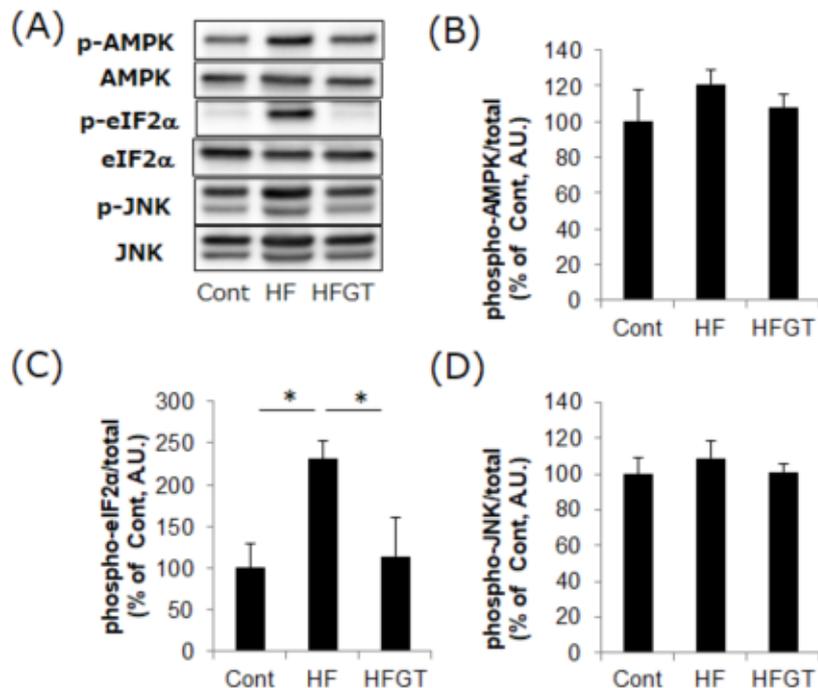


Fig 3. Phosphorylation of AMPK, eIF2 α , and JNK in the livers of C57BL/6J mice. Representative western blot analysis (A) and phosphorylation levels of AMPK (B), eIF2 α (C), and JNK (D) in the liver of C57BL/6J mice after the 4-week feeding period. Phosphorylation of eIF2 α was elevated in the HF diet group but reduced in the mice that received GTE. No alteration in the phosphorylation state of AMPK or JNK was observed. Data were normalized to the Cont diet group and are expressed as means \pm S.D. from three mice per group. Significance is expressed as *, $p < 0.05$.

1.4. 考察

疫学研究や実験的な試験により GTE の肥満や代謝疾患に関連する全身性の生理作用について検討が進められており、心疾患^{34-35, 38} や骨格筋におけるインスリン抵抗性⁴⁴ に対する有効性が明らかとなっているがその分子メカニズムについて、茶カテキンの直接的な作用か、他臓器を介した間接的な作用かは十分に解明されていない。ヘパトカインとして知られる LECT2、SeP および fet-A は肝臓由来タンパク質であるが、全身性の肥満や代謝に関与することが明らかとなっている。¹⁸⁻²³ 今回、高脂肪食を C57BL/6J マウスに摂取させる肥満誘導モデルを用い検討した結果、GTE は高脂肪食によって誘導される初期肥満時の LECT2 ならびに SeP のタンパク質量の増加を抑制することが明らかとなった。これにより、GTE 摂取の全身性の生理作用には肝臓におけるヘパトカイン産生量制御を介した間接的な作用が関与する可能性が示された。

近年、茶カテキンの体内動態について Shimizu らは、positron emission tomography および positron-labeled 4''-[¹¹C]methyl-epigallocatechin gallate を用いラットで検討している。⁵⁸ その結果、茶カテキンは飲用後、小腸より吸収され、血中に入り、一時的に肝臓組織へ蓄積され、部分的に小腸へと排泄されるとともに、代謝を受け尿中へ排泄されていることが明らかとなった。こうした結果から、GTE 摂取による全身性の生理作用について、GTE 摂取後に茶カテキンが肝臓で作用し、その結果、ヘパトカインと称される肝臓由来分泌タンパク質によって間接的に他臓器へ作用している可能性が考えられる。

Okumura らの報告によると、LECT2 の血中濃度と様々な肥満指標 (body mass index、waist circumference、waist-to-hip ratio、waist-to-height ratio、そして血清インスリン濃度) は正に相関することが示されている。¹⁸ 加えて Misu らの報告によると肝臓の SeP の mRNA 発現量および血中 SeP 濃度は空腹時および食後血糖値とそれぞれ正に相関し、血中 SeP 濃度は血糖値の長期指標として使用される HbA_{1c} 量と正に相関することがヒト臨床試験において明らかにされている。²⁰ また、動物を用いた検討でも、SeP の mRNA 量は 2 型糖尿病モデルマウスにおいて上昇していることが示されている。このためヘパトカイン量の増加は肥満やインスリン抵抗性を誘導する可能性が強く示唆されている。しかしながら、ヘパトカイン量の上昇が肥満やインスリン抵抗性を誘導するのか、肥満やインスリン抵抗性の誘導によりヘパトカイン量が上昇するのか、その因果関係までは明らかとなっていない。高脂肪食の長期摂取による肥満誘導モデルでは肥満とインス

リン抵抗性を誘導することが広く知られている。^{37, 59-60} 本研究により、高脂肪食の 4 週間の摂取による初期肥満誘導時には、体重や脂肪組織重量変化、インスリン抵抗性が誘導されない状態で、既に肝臓において LECT2 量および SeP 量が増大していることが判明した。Lan らは骨格筋細胞を用いて、LECT2 添加量依存的にインスリンシグナル伝達経路が損なわれることを報告している。¹⁹ Misu らは肝臓細胞および骨格筋細胞を用いて、SeP 添加によりインスリンシグナル伝達経路が損なわれ糖代謝が低下することを報告している。²⁰ こうした細胞および動物を用いた検討結果を合わせると、高脂肪食によって誘導される LECT2 量および SeP 量の増加が肥満やインスリン抵抗性を誘導していると考えられる。このため、LECT2 量と SeP 量の制御は肥満やインスリン抵抗性の改善に有効である可能性が高いと考えられる。

本研究において、GTE がどのようにして肝臓組織における LECT2 量および SeP 量を低減させたかは明らかにできていない。これまでの研究報告では細胞内の AMPK 活性がヘパトカインの産生量を制御している可能性を示している。⁶¹⁻⁶⁴ GTE 摂取による AMPK の活性化および茶カテキンの AMPK 活性化作用については既に報告されている⁴¹⁻⁴³ が、本研究においては GTE 摂取による肝臓における AMPK の活性化は認められなかった。本研究では 16 時間の絶食下における肝臓を評価しているが、Banerjee らの報告⁴² では、C57BL/6J マウスを用いた検討で GTE 投与後(100 mg/kg)の AMPK 活性化は投与 6 時間後に最も高く、その後減少していくことが示されている。よって、6 時間程度の短時間の絶食条件において GTE がヘパトカイン産生に与える影響およびそのメカニズムとして AMPK の活性化の関与を評価する必要性があるかもしれない。

動物を用いた検討では高脂肪食摂取が LECT2 量^{19, 61} および SeP 量⁶² を増大させることが示されている。さらに、Lee らの報告ではパルミチン酸誘導性の ER ストレスは HepG2 細胞において SeP の mRNA 量を増大させることが示されている。¹⁷ また、Li らの報告では高脂肪食摂取により ER ストレスマーカーである eIF2 α のリン酸化が増加することが示されている。⁵³ eIF2 α の活性化 (リン酸化) は一般的に mRNA の翻訳活性を低下させることが知られているが、一方で、ストレス誘導性因子の翻訳活性を一過的に上昇させることが知られている。⁶⁵ このため、高脂肪食摂取によるヘパトカイン量の上昇は、こうした ER ストレス誘導性の翻訳調節が関与している可能性が考えられる。今回、高脂肪食摂取により eIF2 α が活性化されたが、GTE 摂取により抑制された。茶カテキンが ER ストレスを抑制することは他の疾患モデルでも明らかにされており⁶⁶⁻⁶⁸、GTE 摂取による ER ストレスの変化が LECT2 量および SeP 量の抑制に関与した可能性は高い。しかしながら ER スレ

スに起因する肥満誘導に ER ストレスマーカーとして知られる JNK の関与が考えられており、JNK の活性化は炎症性サイトカインや脂肪酸により誘導され肥満やインスリン抵抗性を惹起する。^{57, 69-71} 今回の検討では高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性は誘導されなかったが、JNK の活性化も同様に誘導されていない。従って、本検討における高脂肪食摂取による ER ストレスは軽度であり、肥満の初期段階であったと考えられる。ER ストレスとヘパトカイン産生に関する分子メカニズムについてはより詳細な解析が必要であると考えられるが、本章における結果からは、GTE が ER ストレスを抑制したことによりヘパトカイン産生量の増加を抑制した可能性が考えられる。

1.5. 小括

第 1 章において GTE の摂取は肝臓組織における LECT2 量および SeP 量を抑制する可能性が示された。これまでに GTE による全身性の生理作用は各組織における直接的な作用が知られていたが、本研究により、ヘパトカイン産生量の制御を介した間接的な作用も存在することが初めて示唆された。GTE は肥満や代謝疾患の改善に向けて有効な生理活性物質と考えられており、今回、新たにヘパトカイン産生量制御の観点からも GTE の有用性が期待される。

第2章

老化促進モデルマウス（SAMP8）を用いた茶カテキンの高脂肪食誘導性 筋萎縮改善効果の検討

2.1. 緒言

近年、加齢に伴う骨格筋量の減少による筋萎縮は、生体の老化に伴い容易に誘導され、身体的不活動や生活の質の低下を招くリスク因子として広く認知されるようになった。⁷²⁻⁷⁷ 適切な骨格筋量および筋力を維持または増強するためには軽度な運動や高強度トレーニング、十分な栄養素の摂取が必要であるが、容易に達成されるものではない。⁷⁸⁻⁸¹

動物を用いた検討において筋萎縮は骨格筋重量の低下や骨格筋強度、および筋繊維タイプの変化によって評価される。⁸²⁻⁸³ Hamrick らは C57BL/6 マウスの自然老化に伴う後肢筋重量の低下は 18 月齢より開始されることを見出し、筋萎縮を評価する動物モデルとして確立した。⁸² しかしながら筋萎縮が誘導されるメカニズムの解明、並びに薬剤や食品組成物の摂取が筋萎縮に与える影響を明らかにする目的で Hamrick らの筋萎縮モデルを用いるには 18 か月以上の飼育期間を要してしまうため、その試験期間を短縮することが望まれている。

老化促進モデルマウス SAMP8 および自然老化を示す対照マウス（senescence-resistant inbred strain 1; SAMR1）は筋肉の老化を評価する目的でも有用なマウスモデルであることが示唆されている。⁸³⁻⁸⁶ Guo らは SAMP8 マウスの骨格筋重量は 7 月齢でピークに達し、8 月齢より減少に転じること、また、その際に骨格筋の強度や筋繊維タイプの変化といった機能的・構造的変化が観察されることを報告している。⁸³

筋重量は一般的にタンパク質の合成と分解のバランスによって制御されるが、これらのバランスの制御にはインスリンシグナル伝達経路が深くかかわっている。²⁴ 動物を用いた検討においては加齢に伴うミトコンドリア機能の低下はインスリン抵抗性を誘導することで骨格筋への糖取り込みを低下させ、それに伴い骨格筋のタンパク質合成は抑制される。⁴⁴ また、肥満や 2 型糖尿病はインスリン抵抗性を伴うことで筋萎縮のリスク因子になり得ることが示唆されている。²⁵ 過剰な脂質の摂取はインスリン抵抗性を伴う肥満や 2 型糖尿病を引き起こす原

因とされ、骨格筋の筋タンパク質合成シグナルを抑制する。²⁶ しかしながら、過剰な脂質の摂取が老化促進モデルマウスである SAMP8 マウスにおいて、加齢に伴い誘導されるインスリン抵抗性や筋萎縮にどのように影響を与えるのか、また、その程度や分子メカニズムについては明らかではない。

GTE は肥満や 2 型糖尿病、高血糖、インスリン抵抗性の改善作用など、様々な生理作用を有するポリフェノール類として茶カテキンを高濃度に含有している。^{32-37, 44} Liu らは 0.3%濃度の EGCg を食餌に混ぜて SAMP8 マウスに 12 週間摂取させると、加齢に伴う骨格筋重量の低下が改善されることを明らかにしている。

⁴⁴ 一方、高脂肪食が SAMP8 マウスの加齢に伴う筋萎縮を加速させるのか、また GTE 摂取が抑制するのかは明らかではない。

第 1 章で記載した通り、ヘパトカインと称される肝臓由来分泌タンパク質の一種である LECT2 の濃度は肥満モデルマウスや肥満者の血中で高値を示し、様々な臓器の代謝機能に影響を及ぼすことが報告されている。^{18, 87} Lan らは高脂肪食を摂取したマウスにおいても血清 LECT2 濃度は高値を示し、インスリン抵抗性の誘導と関連すること、また、LECT2 ノックアウトマウスでは骨格筋におけるインスリン感受性が亢進することを明らかにしている。¹⁹ これらの先行研究から、高脂肪食を長期間摂取し肥満が誘導されたマウスでは血中の LECT2 濃度が上昇し、骨格筋のインスリン感受性を低下させると考えられるが、LECT2 濃度の変化が筋萎縮にまで影響を及ぼすかは明らかにされていない。また、GTE が様々なメカニズムで肥満を抑制することは知られているが、血中の LECT2 濃度にどのように影響を及ぼすかについての報告は無い。

本章では SAMR1 マウスと SAMP8 マウスの加齢過程における骨格筋重量の変化に着目し、SAMP8 マウスに筋萎縮が誘導されていることを確かめるとともに、SAMP8 マウスにおいて対照食、高脂肪食、高脂肪食に 0.5% GTE を添加した食餌を 4 ヶ月間給餌した条件において骨格筋量を評価し、高脂肪食が加齢に伴う筋萎縮にどう影響を及ぼすのか、また、GTE 摂取が高脂肪食の影響を抑制するか評価した。また、SAMP8 マウスにおいて食餌の違いがインスリン抵抗性および血清 LECT2 濃度にどのように影響を及ぼすのかを解析し、筋萎縮誘導メカニズムについて考察した。

2.2. 方法

2.2.1. 動物および食餌組成

本研究は National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals および静岡県立大学の動物実験規定に準拠し計画した。また、全ての動物実験は静岡県立大学動物実験委員会より承認された上で行った（承認番号：136068）。動物に対する苦痛軽減の処置として、全ての解剖操作は 2.5% isoflurane (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を用いた麻酔下で行い、可能な限り苦痛の軽減に努め、本研究を実施した。

1 月齢の雄性 SAMP8 マウスおよび SAMR1 マウス (Japan SLC Inc, Hamamatsu, Japan)を 12 時間の明暗サイクルにて市販の CE-2 食(Japan SLC Inc.)の自由摂餌、自由飲水条件にて飼育した。3 週間後にマウスは体重に群間差が無いように SAMP8 マウスを対照群 (Cont; 8 匹)、SAMR1 マウスを対照群 (Cont; 8 匹) に群分けし 2 月齢(2M)解剖群とした。また、6 月齢(6M)解剖群として SAMP8 マウスを対照群 (Cont; 16 匹)、高脂肪食群 (HF; 16 匹)、そして高脂肪食 + GTE 群 (HFGT; 16 匹) に、SAMR1 マウスを対照群 (Cont; 16 匹) に群分けした。Cont 群のマウスには対照食としてコーン油 5.0%、カゼイン 20.0%、セルロース 4.0%、ミネラル類(AIN-76) 3.5%、そしてビタミン類(AIN-76) 1.0%を含む食餌を与えた。HF 群および HFGT 群には上記対照食に加え、ラード 5.0%、コーン油 20.0%、スクロース 13.0%を添加した高脂肪食を与えた。HFGT 群にはさらに GTE を 0.50%加えた。各食餌はポテスターチにより総量をそろえた。Table 4 に食餌組成の詳細を示す。全ての実験に供されたマウスは群分け時より 1 週間、対照食を摂取し、2 M 解剖群は初期値測定のための解剖を実施した。6M 解剖群は 2 月齢から 6 月齢までの 4 ヶ月間、上記試験食を給餌された後に解剖操作を行った。試験期間中の食餌摂取量の測定は週に 3 回行った。カロリー換算したマウス 1 匹当たりの 1 日平均食餌摂取量 (kcal/mouse/day)は 17.00 (SAMR1; Cont)、17.06 (SAMP8; Cont)、19.06 (SAMP8; HF)、そして 18.13 (SAMP8; HFGT) となり、各群で統計学的に有意な差は認められなかった。

解剖操作は 5 時間の絶食の後に 2.5% isoflurane (Wako Pure chemical Industries, Ltd.)麻酔下にて、2M 解剖群として SAMR1-Cont 群および SAMP8-Cont 群を各群 8 匹、6M 解剖群として

SAMR1-Cont 群、SAMP8-Cont、HF、および HFGT 群を各群 16 匹解剖した。麻酔下において開腹し腹部大静脈より採血し、放血によりマウスを安楽死させた。血糖値を ACCU-CHEK Aviva (Roche Diagnostics GmbH)を用いて測定するとともに血清および血漿を回収した。その後、代表的な骨格筋として左脚の大腿四頭筋(quadriceps muscle)を採取し、重量を測定後、液体窒素により凍結し、 -80°C で以降の解析に使用するまで保管した。

2.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量

茶抽出物 (GTE) は三井農林株式会社 (Mitsui Norin Co., Ltd.)より入手し、第 1 章 1.2.2.項で説明した通りの手法で GTE に含まれる主要なカテキン量を測定した。詳細は Table 2 に示す通りである。

HFGT 食に含まれる理論的な EGCg 量は 0.28% (HFGT 食に占める GTE 量: 0.5%、GTE 純度: 77.58%、EGCg 組成比: 71.68%)である。HFGT 群の 1 匹当たりの 1 日平均食餌摂取量は 3.49 g であり、計算上の茶カテキン類および EGCg の摂取量はマウス 1 匹当たりそれぞれ 13.5 mg と 9.7 mg であった (マウスの kg 体重当たり 373 および 269 mg)。本試験における茶カテキンおよび EGCg の摂取量および摂取期間 (4 ヶ月) は SAMP8 マウスにおいて骨格筋のインスリン抵抗性改善効果が知られる先行文献⁴⁴ および C57BL/6J マウスを用いた高脂肪食摂取による肥満誘導モデルにおいて EGCg が肥満改善効果を示した先行文献³⁶と同程度である。

2.2.3. 酵素免疫測定 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 法

血漿中インスリン濃度は Morinaga Mouse Insulin ELISA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., Yokohama, Japan)を用い測定した。キット付属の抗体固相化プレートに製造業者プロトコル指定の濃度に希釈したキット付属のモルモット抗マウスインスリン血清 95 μL およびキット付属の検体希釈液で適宜希釈した血漿サンプル 5 μL を加え、 4°C で 16 時間反応させ、その後 300 μL の洗浄液で 3 回洗浄した。次いでキット付属の酵素標識抗モルモット IgG 抗体溶液を製造業者プロトコル指定の濃度に希釈し 100 μL 加え、常温で 1 時間静置した。次いで、300 μL の洗浄液で 5 回洗浄した後、各ウェルにキット付属の酵素基質溶液 (TMB 溶液) を 100 μL 加え、常温で 30 分間静置して反応させた。最後に反応

停止液（1N 硫酸）を 100 μ L 加え、プレートリーダーで 450 nm の波長を検出し血漿中インスリン濃度を算出した。インスリン抵抗性の指標として用いられる Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)値は下記計算式によって算出した。HOMA-IR = fasting insulin (μ U/mL) \times fasting blood glucose (mg/dL) / 405. For human insulin, 1 ng/mL = 26 μ U/mL.

血清中の LECT2 濃度は Ab-Match Assembly Mouse LECT2 Kit および Ab-Match Universal Kit (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan)を用い測定した。製造業者プロトコル指定の濃度に希釈したキット付属のマウス抗マウス LECT2 モノクローナル抗体 100 μ L をキット付属のプレートの各ウェルに加え、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させ、その後 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄し、キット付属のブロッキング液を用い常温で 1 時間のブロッキング操作を行った。次いで、10 倍に希釈した血清 100 μ L を各ウェルに加え、常温で 1 時間反応させた。その後 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄し、キット付属のビオチン化マウス抗マウス LECT2 モノクローナル抗体 100 μ L を各ウェルに加え、常温で 1 時間反応させた。その後 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄し、キット付属のストレプトアビジン結合ペルオキシダーゼ 100 μ L を各ウェルに加え、常温で 30 分間反応させた。その後 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄し、キット付属の酵素基質溶液（TMB 溶液）100 μ L を各ウェルに加え、常温で 30 分間反応させた。最後に反応停止液（1N 硫酸）を 100 μ L 加え、プレートリーダーで 450 nm の波長を検出し血清中 LECT2 濃度を算出した。

2.2.4. ウェスタンブロットによる解析

解剖時に採取した大腿四頭筋組織サンプルを液体窒素で凍結させ、低温下で乳鉢にて破碎したサンプルを用い、第 1 章 1.2.3.項で説明した方法に従いウェスタンブロットによる解析を実施した。各サンプル 10 μ g のタンパク質量を用い SDS-PAGE を行った後、メンブレンへの転写、ブロッキング操作、一次抗体および二次抗体との反応を行い、バンドを検出した。Akt (#9272)、phospho-Akt (Ser473) (#4058)、p70 S6 kinase (S6K) (#9202)、phospho-S6K (Thr389) (#9205)、ubiquitin (#3936)、Forkhead box protein O1 (FoxO1) (#2880)、Forkhead box protein O4 (FoxO4) (#9472)、および phosphorylated FoxO1 (Thr24)/FoxO4 (Thr28) (#9461)に対する一次抗体は Cell Signaling

Technology より購入した。muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) (Ab172479)および F-box protein 32 (Fbx32) (#168372)に対する一次抗体は Abcam plc (Cambridge, UK)より購入した。

2.2.5. 統計解析

本章で得られた結果は平均値 \pm S.D.で示した。全てのデータは IBM SPSS Statistics Version 24 (IBM Corp., Armonk, NY)を用い解析した。Fig 4 におけるマウス種(SAMR1 および SAMP8)と解析時の月齢(2M および 6M)は繰り返しの無い二元配置分散分析 (Two-way factorial ANOVA without replication) およびその後の Student's *t*-test により群間差を解析した。Fig 5-7 における群間の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、Tukey による有意水準の検定を行った。Table 5 における筋組織重量(Muscle weight)、HOMA-IR、および血清中 LECT2 濃度(Serum LECT2)の相関解析には二値間ピアソン相関係数(bivariate Pearson correlation)を用いた。Table 6 における解析には偏相関解析を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

Table 4 Composition of experimental diets fed to mice.

	Cont	HF	HFGT
Lard	0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	25.0	25.0
Potato starch	66.5	28.5	28.0
Sucrose ^a	0	13.0	13.0
Casein	20.0	20.0	20.0
Cellulose	4.0	4.0	4.0
Vitamins (AIN-76)	3.5	3.5	3.5
Minerals (AIN-76)	1.0	1.0	1.0
Green tea extract (GTE) ^b	0	0	0.50
Energy ^c	%		
Protein	20.5	15.7	15.8
Fat	11.3	51.7	51.9
Carbohydrate	68.2	32.6	32.3

Cont, control diet; HF, high fat diet; HFGT, HF with 0.50% GTE diet; diet compositions are indicated in % (w/w).

^a Obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)

^b Obtained from Mitsui Norin Co., Ltd. (Tokyo, Japan)

^c Percent of kcal of each macronutrient

Other ingredients were obtained from Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

2.3. 結果

2.3.1. 加齢が体組成に与える影響

2M から 6M にかけて通常老化を示す SAMR1 マウスおよび老化促進モデルマウスである SAMP8 マウスともに体重の増加が認められた (Fig 4A)。一方、骨格筋重量の増加は SAMR1 マウスにのみ認められた (Fig 4B)。また、二元配置分散分析によりマウス種の違いにおける骨格筋の加齢性変化には交互作用が認められた ($p = 0.002$)。

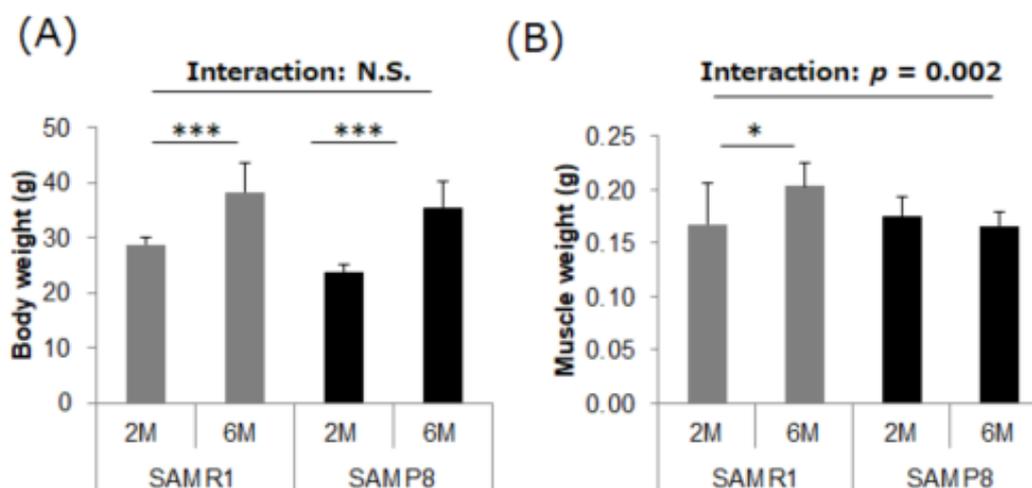


Fig 4. Body weight and skeletal muscle weight in aging SAMR1 and SAMP8 mice. Body weight (A) and skeletal muscle weight (B) were measured in young (2M) and adult (6M) mice fed a Cont diet. Skeletal muscle weight increased in SAMR1 mice concomitantly with body weight gain but did not increase in SAMP8 mice. Data are means \pm S.D. (8 to 16 mice per group). Statistical significance of the interaction between mouse strain (SAMR1 and SAMP8) and age (2M and 6M) was determined by two-way factorial ANOVA without replication, and Student's *t*-test was used for comparison between the two age groups. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

2.3.2. 茶抽出物の摂取が SAMP8 マウスにおける高脂肪食誘導性筋萎縮に与える影響

響

SAMP8 マウスの加齢における筋萎縮に食餌の違いが及ぼす影響を解析した。SAMP8 マウスは加齢に伴い統計学的に有意な体重の増加が認められた。一方、筋重量は対照群(Cont)で 0.176 ± 0.018 g (2M) から 0.170 ± 0.116 g (6M)へと減少し、HF 群において 0.149 ± 0.216 g (6M)にまで低下した($p = 0.016$; 2M Cont vs. 6M HF)。この HF 群における筋重量の低下は HFGT 群では 0.182 ± 0.126 g まで改善した ($p = 0.002$ HF vs. HFGT) (Fig 5)。

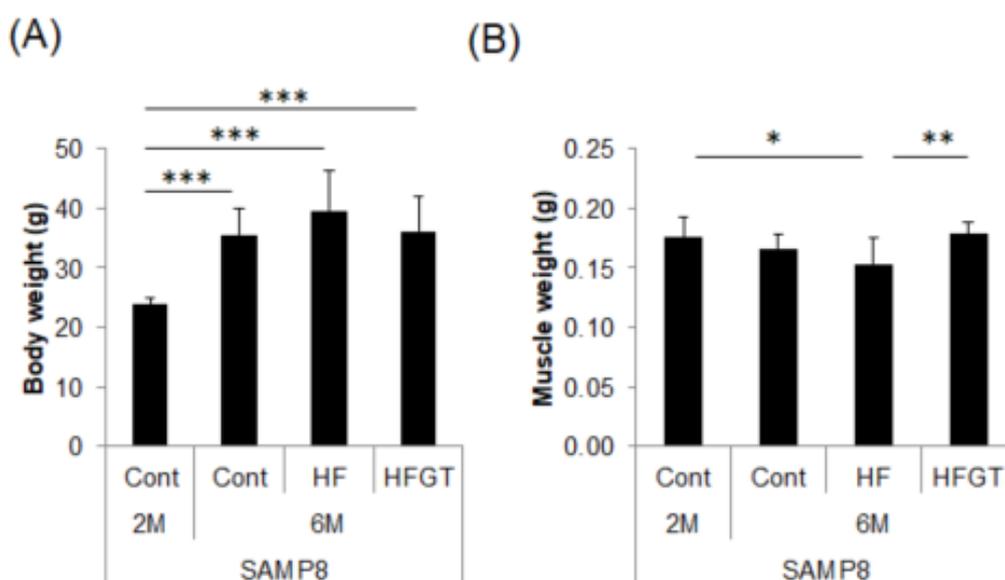


Fig 5. Body weight and skeletal muscle weight in SAMP8 mice on different diets. Body weight (A); skeletal muscle weight (B). Skeletal muscle loss with aging was exacerbated by an HF diet (2M Cont vs. 6M HF; $p = 0.016$) but was significantly prevented by GTE in the HFGT group (HF vs. HFGT; $p = 0.002$). Data are means \pm S.D. (8 to 16 mice per group). One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for comparison among groups. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

2.3.3. 茶抽出物の摂取が SAMP8 マウスにおけるインスリン抵抗性および血清

leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)濃度に与える影響

SAMP8 マウスのインスリン抵抗性の指標として血糖値および血漿インスリン濃度を測定し、HOMA-IR 値を算出した。また、血清 LECT2 濃度を測定した。血糖値および血漿インスリン濃度は HF 群で高値を示し、HOMA-IR 値は HF 群において他群と比較し統計学的有意に高値を示した (Fig 6A-C)。血清 LECT2 濃度も同様に、他群と比較し HF 群で統計学的有意に高値を示した (Fig 6D)。HFGT 群では高脂肪食摂取によって誘導された HOMA-IR および LECT2 の上昇を共に抑制した。

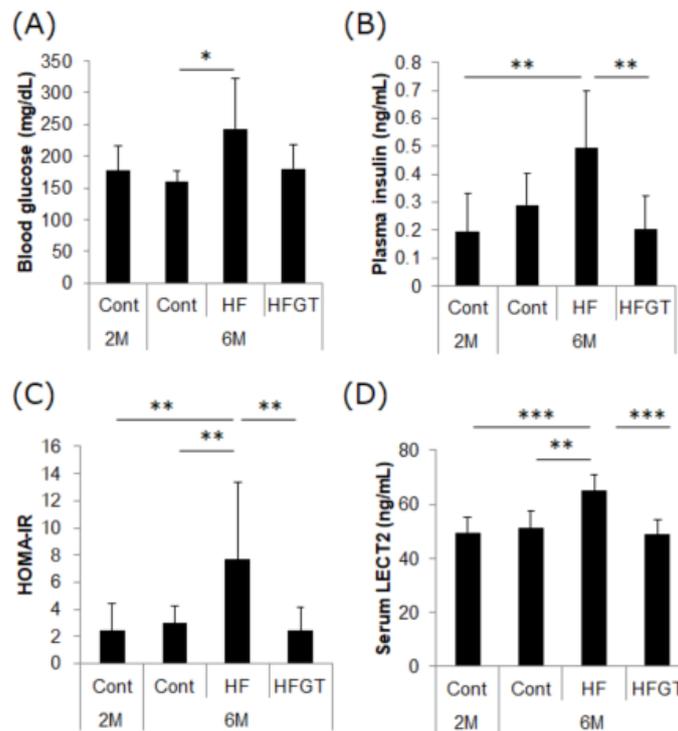


Fig 6. Blood glucose, plasma insulin, HOMA-IR, and serum LECT2 concentrations in SAMP8 mice. Blood glucose levels were analyzed at dissection after 5 h of fasting by ACCU-CHEK Aviva described in Materials and Methods (A). Plasma insulin (B) and serum LECT2 (D) concentrations were analyzed after serum and plasma sample collection by enzyme-linked immunosorbent assay. HOMA-IR was calculated as described in the Materials and Methods (C). Data are means \pm S.D. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for comparison among groups. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

2.3.4. 骨格筋におけるインスリンシグナルの活性化に関する評価

食餌の違いが骨格筋におけるインスリン感受性に及ぼす影響を解析するため、インスリンシグナルに重要な働きを示す Akt および S6K のリン酸化状態について、代表的な骨格筋として大腿四頭筋組織を用い解析した。これら 2 種のタンパク質はキナーゼ活性を有し、インスリンを感知することで活性化し、下流で筋タンパク質合成を制御することが報告されている。²⁴ 上記 2 種のキナーゼのリン酸化状態は Cont 群と比較し HF 群において低下傾向を示した (Fig 7)。一方、HFGT 群では HF 群と比較して統計学的に有意に高い Akt および S6K のリン酸化が認められた (Fig 7)。これらの結果から、GTE の摂取は高脂肪食摂取に伴う骨格筋のインスリン感受性の低下を改善することが考えられた。

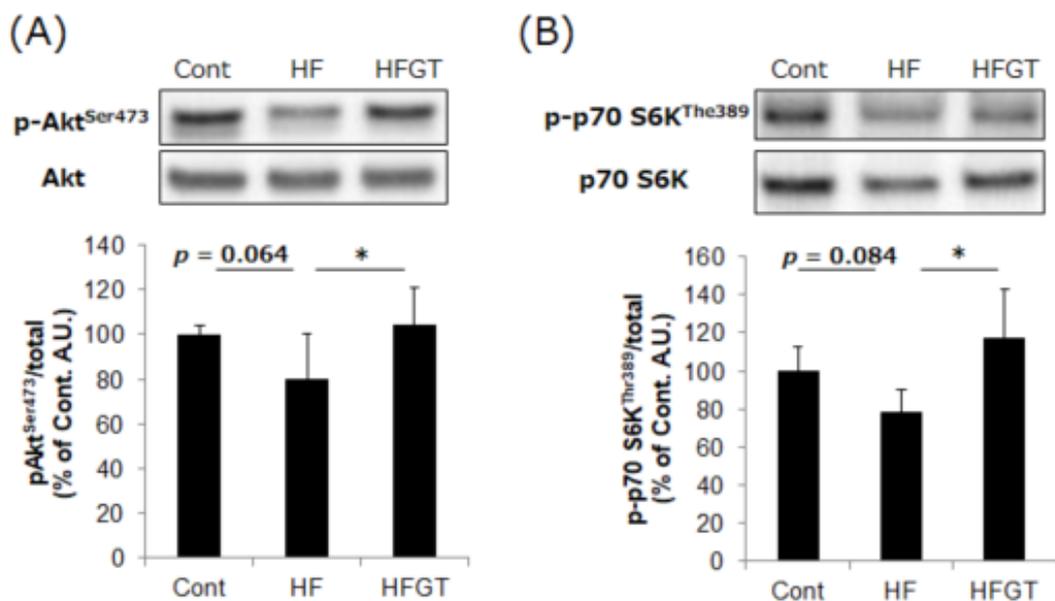


Fig 7. Phosphorylation of kinases involved in insulin signaling in skeletal muscle of adult (6M) SAMP8 mice. Representative western blot images (upper panels) and quantification of phosphorylation (lower graphs) are shown for Akt (A) and S6K (B). Data are means \pm S.D. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used for comparison among groups. *, $p < 0.05$.

2.3.5. 血清 LECT2 濃度と HOMA-IR 値および筋重量の関係に関する統計学的解析

SAMP8 マウスを用い二値間ピアソン相関係数を解析した結果、HOMA-IR 値は血中 LECT2 濃度($r = 0.437, p < 0.01$)および筋重量($r = -0.455, p < 0.01$)と統計学的有意な相関関係が認められ、血清 LECT2 濃度と筋重量の間($r = -0.333, p < 0.05$)にも統計学的有意な相関関係が認められた (Table 5)。偏相関係数を解析したところ、血清 LECT2 濃度を制御因子とした場合、HOMA-IR 値と筋重量に有意な相関関係が認められた ($r = -0.365, p < 0.05$) (Table 6)。また、筋重量を制御因子とした場合、HOMA-IR 値と血清 LECT2 の間に有意な相関関係が認められた ($r = 0.340, p < 0.05$) (Table 6)。しかしながら、HOMA-IR 値を制御因子とした場合、血清 LECT2 濃度と筋重量の間に相関関係は認められなかった ($r = -0.168, p = 0.19$) (Table 6)。以上の結果から、HOMA-IR 値は血清 LECT2 と筋重量の間に介入効果を有する可能性が示唆された。

Table 5 Matrix of bivariate correlations among muscle weight, HOMA-IR, and serum LECT2.

Variable		HOMA-IR	Serum LECT2	Muscle weight
HOMA-IR	Pearson correlation	1	0.437**	-0.455**
	<i>P</i> -value		0.007	0.005
Serum LECT2	Pearson correlation		1	-0.333*
	<i>P</i> -value			0.033
Muscle weight	Pearson correlation			1
	<i>P</i> -value			

*Correlation is significant at the $p < 0.05$ level (1-tailed)

**Correlation is significant at the $p < 0.01$ level (1-tailed)

Table 6 Partial correlations among muscle weight, HOMA-IR, and serum LECT2.

Control variable	Variable	Coefficient	<i>P</i> -value
Serum LECT2	HOMA-IR & Muscle weight	-0.365*	0.024
HOMA-IR	Serum LECT2 & Muscle weight	-0.168	0.188
Muscle weight	HOMA-IR & Serum LECT2	0.340*	0.033

*Correlation is significant at the $p < 0.05$ level (1-tailed)

2.4. 考察

世界的な食の欧米化に伴い高脂肪食を摂取することが加齢に伴う様々な疾患に対しどの程度悪影響を及ぼしているかを明らかにすることは非常に重要である。⁸⁸ 臨床試験や実験的な研究により加齢や肥満はそれぞれが筋萎縮のリスク因子と考えられているが、加齢に伴う筋萎縮に高脂肪食の摂取がどのように影響を及ぼすかを明らかにした研究は報告されていない。本研究は老化促進モデルを用いることで、大腿四頭筋が加齢に伴う筋萎縮の影響を受けやすいことを SAMP8 マウスと SAMR1 マウスの比較解析により明らかにし、高脂肪食の摂取は上記筋萎縮を促進させることを示した。これらの発見は高脂肪食を給餌した SAMP8 マウスが筋萎縮モデルとして有用であることを示している。また、本マウスモデルでは GTE 摂取が骨格筋のインスリン抵抗性を改善することで筋萎縮を改善することを明らかにした。

Guo らは SAMP8 マウスの筋重量は 7 月齢でピークを迎え、その後、筋萎縮が誘導されることで 10 月齢になるまでに筋重量は 12% 減少することを明らかにしている。⁸³ 本研究では高脂肪食摂取により筋重量は 15.3% 減少したが、GTE を摂取した SAMP8 マウスでは高脂肪食を摂取した SAMP8 マウスと比較し筋重量を 22.1% 増加させた。本研究において認められた筋重量の変化の大きさは Guo らの報告⁸³と同程度である。また、本研究において得られた高脂肪食摂取による筋重量の低下は加齢に伴う筋萎縮を促進した結果を示すものであり、GTE 摂取による筋重量の増加は筋萎縮を改善した結果であると考えられる。

筋萎縮は不活動や筋タンパク質合成に必要な栄養素の欠乏、インスリン抵抗性による筋タンパク質合成低下など、様々な要因によって誘導される。^{25, 89-90} 本研究では各マウスの活動量を測定していないため、活動量が筋重量にどのように影響したか明らかにすることはできないが、不活動による筋萎縮の誘導時にはインスリン感受性の低下および筋タンパク質合成の低下が誘導され、筋タンパク質分解は促進されることが報告されている。^{24, 91} 栄養素の供給に関して、各群で摂餌量に差はなかったことから、本研究における筋萎縮はインスリン抵抗性による筋タンパク質合成低下が関与した可能性が高いと考えられる。本研究では高脂肪食摂取に伴いインスリン感受性の指標である Akt の活性およびその下流で筋タンパク質合成に働く S6K²⁶ の活性が低下し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR 値が高脂肪食摂取により高値を示した。一方で、筋タンパク質分解に関与する因子として骨格筋中の MuRF1 および Fbx32、全ユビキチン化タンパク質量、FoxO1 および

FoxO4 の活性化について評価したが、いずれも群間差は認められなかった（データ未搭載）。これらの結果から筋萎縮の制御にはインスリン感受性が重要な役割を担うものと考えられる。

骨格筋におけるインスリン抵抗性がどのようなメカニズムで誘導されているかについて、特に他臓器とのコミュニケーションに着目した研究はほとんどない。数少ない報告の中で、血中に存在する LECT2 が骨格筋におけるインスリン感受性の制御に関与することが示唆されている。¹⁹ Lanらはヒトにおいて血中 LECT2 濃度が HOMA-IR 値と正に相関し、インスリン感受性と負に相関することを明らかにしている。¹⁹ また、*Lect2* 遺伝子の欠損動物では食餌誘導性の骨格筋でのインスリン抵抗性が改善されること、骨格筋由来の細胞に *Lect2* 遺伝子を強制発現させるとインスリン感受性が低下することが報告されている。¹⁹ 本研究においても SAMP8 マウスでは血清 LECT2 濃度と HOMA-IR 値は正相関を示した。また、高脂肪食を摂取したマウスでは血清 LECT2 濃度は高値を示し、骨格筋のインスリン感受性は低下傾向を示した。LECT2 と筋萎縮の関係を明確に示すにはさらなる検討が必要であると考えているが、偏相関解析において血清 LECT2 濃度と筋重量との間に HOMA-IR 値は介入効果を示したことから、血中 LECT2 濃度の上昇は骨格筋にインスリン抵抗性を誘導することで筋萎縮を引き起こす可能性が考えられた。また、第 1 章でヘパトカインの分泌制御には肝臓における ER ストレスが関与する可能性を示した。加えて LECT2 は骨格筋で JNK のリン酸化を誘導することが示されている。¹⁹ ER ストレスも LECT2 同様に JNK のリン酸化を誘導することが明らかとなっている。^{57, 69} さらに骨格筋において ER ストレスはインスリン抵抗性を誘導することが動物を用いた試験や臨床研究によって明らかにされている。⁹²⁻⁹³ このことから、これまで知られていた ER ストレスによる骨格筋のインスリン抵抗性を伴う機能低下に LECT2 をはじめとしたヘパトカインの骨格筋への作用が関与している可能性が考えられた。

本研究により、GTE 摂取は血中 LECT2 濃度を減少させ、骨格筋においてインスリン抵抗性を改善したことで高脂肪食摂取および加齢に伴う筋萎縮を改善することを明らかにした。第 1 章で示した通り、GTE は高脂肪食摂取における初期肥満誘導時に肝臓における LECT2 の産生量を抑制する。今後、GTE の摂取がどのようなメカニズムで LECT2 の産生量を抑制しているのか、さらなる検討は必要である。LECT2 産生に関わる分子メカニズムとして、肝臓由来細胞を用いた培養実験では AMPK の活性化が LECT2 産生を抑制することが報告されている。¹⁹ 高脂肪食を 16 週間摂取したマウスの肝臓において、GTE を添加した高脂肪食を摂取したマウスでは AMPK の活性化が誘導されること⁴³、また、マウスに GTE を単回投与すると肝臓において AMPK

活性が亢進することが報告されている。⁴² 本研究では AMPK 活性を測定していないが、GTE の摂取により肝臓における AMPK 等の代謝関連因子の活性が変化したことで肝臓における LECT2 産生量が変化し、血中における LECT2 濃度が変化したものと考えられる。

筋萎縮の予防や改善を目指した介入試験として、食事の介入や高強度トレーニングを実施する研究などが世界的に数多く報告されている。^{81, 94-97} 上記介入研究では適切な栄養素の摂取や高強度トレーニングを実施することで除脂肪体重を増加させることが可能であると示されているが、高齢者に対する介入効果は限定的である。高強度トレーニングの後に筋タンパク質合成を誘導するためには、運動後の休息期に骨格筋で筋タンパク質合成が開始されることが重要である。⁹⁸ しかしながら高齢者は骨格筋のインスリン感受性が低下している場合が多く、アミノ酸やグルコースを摂取しても、また、インスリンを注入しても十分に筋タンパク質合成が誘導されない。⁹⁹⁻¹⁰⁰ ヘパトカインの抑制は骨格筋においてインスリン感受性を高めるだけでなく、運動トレーニングの効果を高めることが報告されている。^{19-20, 101} 本研究においてヘパトカインの一種である LECT2 の制御が筋重量に影響を及ぼす直接的なデータは得られていないが、インスリン抵抗性を介して筋重量を制御している可能性を示した。こうした結果から、LECT2 をはじめとしたヘパトカインを制御することは、インスリン抵抗性の改善を促し、筋萎縮を防ぐことに役立つと考えられ、GTE の摂取により LECT2 量を制御できることは、インスリン抵抗性のリスクが高い高齢者や高脂肪食を日常的に摂取する機会が多い現代社会において、筋萎縮を防ぐことにつながるものと期待される。

2.5. 小括

第 2 章において老化促進モデルである SAMP8 マウスを用いることで、高脂肪食の摂取はインスリン抵抗性の誘導を伴い、加齢に伴う筋萎縮を促進させることを明らかにした。一方、SAMP8 マウスにおいて GTE の摂取は骨格筋におけるインスリン抵抗性を改善し、筋萎縮を抑制することを明らかにした。また、高脂肪食の摂取により骨格筋のインスリン抵抗性誘導と関係が深い血中 LECT2 濃度が上昇したが、GTE 摂取により高脂肪食による影響は抑制された。血中 LECT2 濃度と筋重量の直接的な関係は明らかにできていないが、LECT2 はインスリン抵抗性の誘導を介して筋重量を制御する可能性を示した。今後は GTE がどのように LECT2 の分泌に影響を及ぼし、筋重量を制御したか、その詳細なメカニズムの解明が望まれる。

第3章

老化促進モデルマウス（SAMP8）を用いた高脂肪食誘導性認知機能低下 に対する茶カテキンの認知機能改善効果の検討

3.1. 緒言

超高齢化社会を迎えた先進諸国における社会的課題の一つに、認知症が挙げられる。認知症の患者およびその家族の生活の質向上を目指す国際的な研究機関である Alzheimer's Disease International (ADI) のまとめによると、世界的な人口増加及び寿命の延伸に伴い、認知症は今や世界的な課題となりつつある。¹⁰² ADI の試算では、2018 年に認知症の患者数は 5,000 万人に達し、認知症に関連する社会コストは世界総計で 1 兆米ドルに達し (<https://www.alz.co.uk/media/quick-facts>, アクセス日：2018 年 11 月 22 日)、2050 年における認知症患者数は現在の約 3 倍の 1 億 3,200 万人に達するとされている。認知症に対する治療薬は世界中で開発途上であるが、いまだ実現には至らず、近年では認知症発症後の治療ではなく、長期的な予防策を講じる重要性が議論されるようになり、中でも認知症の発症リスクを高める肥満や糖尿病、高血圧、運動不足や喫煙に対し対策を講じることが認知症リスク低減に有効であると考えられている。¹⁰³⁻¹⁰⁴

脂質を過剰に含む不健康な食事を継続的に摂取することは、肥満や 2 型糖尿病、高血圧につながると考えられる。^{4, 105} 特に 2 型糖尿病に関しては認知機能の低下との関連が示されており²⁷⁻²⁸、また、肥満や 2 型糖尿病を引き起こすインスリン抵抗性を有する壮年期の方では脳萎縮状態や認知機能低下状態となるリスクが高まることが示されている。²⁹ このように、不健康な食事に伴う肥満やインスリン抵抗性の誘導が認知機能に与える影響を明らかにすること、また、その対策法を検討することは超高齢化社会を迎えた現代における認知症という社会的課題の解決に向け重要な研究課題であると言える。

認知機能に関する研究を進める上で、老化促進モデルマウスである SAMP8 と、通常老化を示す SAMR1 マウスを用いた研究が近年盛んに行われている。¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ 不健康な食事を模倣した高脂肪食を摂取させた

SAMP8 マウスでは肥満や糖尿病、インスリン抵抗性に関わる代謝機能の変化を伴い、加齢とともに認知機能の低下が誘導される。¹⁰⁸ 従って、不健康な食事は加齢とともに認知機能を低下させることは明らかである。

第 1 章および第 2 章でも述べた通り、GTE は肥満や糖尿病、インスリン抵抗性の改善効果を有する茶カテキンを高濃度に含有している。^{32, 34-37, 40, 44, 109} GTE の肥満関連疾患の改善効果には糖代謝や脂質代謝の改善効果や^{37, 41-43, 55}、抗酸化ストレス効果^{32, 34}、抗炎症効果^{34, 36}等が知られている。加えて茶カテキンの主要成分である EGCg には神経保護作用が⁴⁵⁻⁴⁶、GTE または EGCg を摂取させたげっ歯類では認知機能改善効果が報告されている。^{106-107, 110} 上記 EGCg の認知機能改善効果には、アルツハイマー病の発症に深くかかわる amyloid β ($A\beta$)を分解する酵素として知られる neprilysin (NEP; または neutral endopeptidase-24.11, $A\beta$ -degrading protein として知られている¹¹¹⁻¹¹²)量を EGCg が制御することで $A\beta$ の蓄積を抑制すること、また、シナプス形成因子の機能調節などが報告されている。しかしながら、老化促進モデルである SAMP8 マウスにおいて高脂肪食によって誘導される認知機能の低下に対する茶カテキンの効果については未だ明らかではない。そこで肥満やインスリン抵抗性等の認知機能低下リスク因子に有用な作用を示す GTE の摂取が、上記 SAMP8 マウスにおいて高脂肪食摂取に伴う認知機能低下に対し、認知機能改善効果を有するのではないかと仮説を立て、検証を行った。

本章では、脳機能の評価として SAMR1 と SAMP8 マウスの記憶保持能、脳重量、そして $A\beta_{1-42}$ の大脳皮質における蓄積量を測定し、高脂肪食の影響について解析した。その後、GTE 摂取が高脂肪食摂取の認知機能への影響に対しどのような効果をもたらすか評価した。さらに茶カテキンの作用メカニズムの一端として、大脳皮質内の酸化ストレスおよび海馬におけるシナプス形成因子のタンパク質量について、食餌の違いがどのように影響したか解析し、茶カテキンの効果および作用メカニズムについて考察した。

3.2. 方法

3.2.1. 動物および食餌組成

本章における動物を用いた検討では、第 2 章において骨格筋を解剖したマウスの脳のサンプルを用いて解析した。解剖操作は 5 時間の絶食の後に 2.5% isoflurane (Wako Pure chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 麻酔下にて、2M 解剖群として SAMR1-Cont 群および SAMP8-Cont 群を各群 8 匹、6M 解剖群として SAMR1-Cont 群、SAMP8-Cont、HF、および HFGT 群を各群 16 匹解剖した。麻酔下において開腹し腹部大静脈より採血し、放血によりマウスを安楽死させた後、第 2 章における骨格筋の採取を行った後、本試験の解析サンプルとして脳組織を採取し、全脳重量を測定した後、大脳皮質および海馬を採取し、重量を測定後、液体窒素により凍結し、 -80°C で以降の解析に使用するまで保管した。

第 2 章で示した通り、カロリー換算の試験食摂取量に群間差は認められず、また、6 月齢において体重に群間差は認められないが HF 群においてインスリン抵抗性の誘導が認められた。¹⁰⁹

3.2.2. 茶抽出物中の茶カテキン組成およびカフェイン含有量

茶抽出物 (GTE) は三井農林株式会社 (Mitsui Norin Co., Ltd.) より入手し、第 1 章 1.2.2. 項で説明した通りの手法で GTE に含まれる主要なカテキン量を測定した。詳細は Table 2 に示す通りである。また、HFGT 食に含まれる理論的な EGCg 量は 0.28% (HFGT 食に占める GTE 量: 0.5%、GTE 純度: 77.58%、EGCg 組成比: 71.68%) であり、HFGT 群の 1 匹当たりの 1 日平均食餌摂取量は 3.49 g であり、計算上の茶カテキン類および EGCg の摂取量はマウス 1 匹当たりそれぞれ 13.5 mg と 9.7 mg であった(マウスの kg 体重当たり 373 および 269 mg)。

本試験における茶カテキンおよび EGCg の摂取量および摂取期間 (4 ヶ月) は SAMP8 マウスにおいて骨格筋のインスリン抵抗性改善効果が知られる先行文献⁴⁴ および C57BL/6J マウスを用いた高脂肪負荷による肥満誘導モデルにおいて EGCg が肥満改善効果を示した先行文献³⁶ と同程度である。認知機能に関して、SAMP8 マウスを通常食で飼育した場合に 0.071% の EGCg を 6 ヶ月間自由に飲用させた試験では EGCg

摂取により認知機能が改善したことが報告されている¹⁰⁷が、本試験における EGCg の摂取量は EGCg の認知機能改善効果を評価した先行研究と同水準である。

3.2.3. 記憶学習機能評価試験

6 月齢のマウスを用い、記憶学習機能試験の一つであるステップスルー受動回避試験を過去に Unno らが行った方法¹¹³⁻¹¹⁴から記憶定着時の電気刺激の強度と統計解析手法を改変して実施した。マウスを明室と暗室に分かれたケージの明室に入れ、暗室に入った場合は 80 μ A の電気ショックを 1 秒間与え、暗室が危険であることを学習させた。翌日、マウスが上記刺激を記憶しているか検証するため、再度明室にマウスを入れ、300 秒間の内にマウスが暗室へ入るかどうかが測定した。マウスが暗室へ入るまでの時間は正規分布しないことから、マウスが暗室へ入るまでの時間を 3 つのタイムグループに分け(各 100 秒)、統計解析(第 3.2.7.項)で示す通り、カイ二乗検定にて解析した。

3.2.4. 酵素免疫測定 (ELISA)法による amyloid β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$)量の測定

大脳皮質中の $A\beta_{1-42}$ 量は human/rat β amyloid (42) ELISA kit Wako, High-Sensitive (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)を用いて測定した。各測定サンプルは Hosoda ら¹¹⁵および Borchelt ら¹¹⁶が報告している方法に軽微な修正を加えて実施した。約 100 mg の大脳皮質を Physcotron homogenizer (Microtec Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用い 70%ギ酸溶液 0.7 mL 中で破碎し、100,000 $\times g$ で 1 時間遠心分離し、可溶性画分および不溶性画分を取得した。遠心後の可溶性画分は 1 M トリスリン酸バッファーにて 20 倍希釈し、中性条件へと中和した。可溶性および不溶性の $A\beta_{1-42}$ を上述の ELISA キットにより測定した。100 μ L のサンプルを製品付属のプレートに添加し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。その後 300 μ L の洗浄液で 4 回洗浄し、キット品に付属のペルオキシダーゼ標識した検出用抗体 100 μ L を各ウェルに加え、常温で 1 時間反応させた。その後 300 μ L の洗浄液で 5 回洗浄し、キット品に付属の酵素基質溶液 (TMB 溶液) 100 μ L を各ウェルに加え、常温で 30 分間反応させた。最後に反応停止液 (1N 硫酸) を 100 μ L 加え、プレートリーダーで 450 nm の波長を検出し $A\beta_{1-42}$ 量を算出した。

3.2.5. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)アッセイ法による

malondialdehyde (MDA)量の測定

大脳皮質中の酸化ストレスレベルを測定するため、脂質酸化ストレスの指標となる MDA 量を TBARS アッセイ法を用いて解析した。本解析には MDA ELISA kit (Japan Institute for the Control of Aging, NIKKEN SEIL Co., Ltd., Shizuoka, Japan)を用いた。各測定サンプルは約 100 mg の大脳皮質を Physcotron homogenizer (Microtec Co., Ltd.)を用い 250 μ L の RIPA buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)中で破碎し、1,600 $\times g$ で 10 分間遠心分離することでその上清を試験サンプルとし、上記 MDA ELISA kit を用いて酸化ストレス量を測定した。エッペンチューブにキット品に付属の Buthylated hydroxytoluene 溶液を 10 μ L 分注し、サンプルを 250 μ L 添加した。次いで 1 M リン酸溶液を 250 μ L 添加し、キット品に付属の 2-thiobarbituric acid 試薬を 250 μ L 添加し、約 5 秒間ボルテックスでよく攪拌した。60°C で 1 時間反応させ、10,000 $\times g$ で 3 分間遠心し、上清を回収し、96 ウェルプレートに添加し、プレートリーダーで 532 nm の波長を検出し MDA 量を算出した。測定値の校正にはキット品に付属の Tetramethoxypropane 溶液 (0—4 μ M の MDA 量相当) を使用した。

3.2.6. ウェスタンブロットによる解析

解剖時に採取した海馬のサンプルの半量を使用し、第 1 章 1.2.3.項で説明した方法を一部改変し、ウェスタンブロットによる解析を実施した。破碎した海馬の細胞溶解液を 12,000 $\times g$ で 15 分間遠心分離し、その上清を回収し、最終タンパク質濃度が 3 mg/mL となるようにサンプル濃度を調整した。各サンプル 15 μ g のタンパク質量を用い SDS-PAGE を行った後、メンブレンへの転写、ブロッキング操作、一次抗体および二次抗体との反応を行い、バンドを検出した。Postsynaptic density protein 95 (PSD95; #2450)、Synaptophysin (#4329)、および β -actin (#4967)に対する一次抗体は Cell Signaling Technology より購入した。NEP (ab79423)に対する一次抗体は Abcam plc, (Cambridge, UK)より購入した。Brain-derived neurotrophic factor (BDNF; AB1534SP)に対する一次抗体は Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)より購入した。

3.2.7. 統計解析

本章で得られた結果は平均値 ± S.D.で示した。全てのデータは IBM SPSS Statistics Version 24 (IBM Corp., Armonk, NY)を用い解析した。Fig 8A および Fig 9A、Fig 10A はカイ二乗検定を行い、Fig 9A ではその後に Kruskal-Wallis の一元配置分散分析および Bonferroni 補正を行った。Fig 9B および 9C における群間の比較には一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、Tukey による有意水準の検定を行った。Fig 8(B,C)および Fig 10(B,C)における群間の比較には Student's *t*-test を用い有意水準の検定を行った。Fig 11-13 は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、Dunnett による有意水準の検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

3.3. 結果

3.3.1. 加齢および高脂肪食摂取が認知機能、脳重量、 $A\beta_{1-42}$ 蓄積に与える影響

2 月齢時点において通常老化を示す SAMR1 マウスと老化促進モデルマウスである SAMP8 マウスの間に認知機能および脳重量、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積量の差は認められなかった (Fig 8)。6 月齢まで異なる食餌を摂取させ飼育した結果、SAMR1 マウスと比較し SAMP8 マウスでは認知機能が低下しており、高脂肪食を摂取させると統計学的に有意な認知機能の低下が認められた ($\chi^2 (1) = 10.9, p = 0.015$) (Fig 9A)。食餌の違いに関係なく、SAMP8 マウスでは SAMR1 マウスと比較して統計学的に有意な脳重量の低下が認められたが、SAMP8 マウスの老化促進モデルとしての表現型が現れた結果と考えられた (Fig 9B)。 $A\beta_{1-42}$ の蓄積量は SAMR1 マウスと比較し、高脂肪食を摂取した SAMP8 マウスで統計学的に有意な上昇が認められた (Fig 9C)。これらの結果から、高脂肪食を摂取した SAMP8 マウスでは認知機能および脳重量の低下、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積量の増加が誘導されたと考えられた。

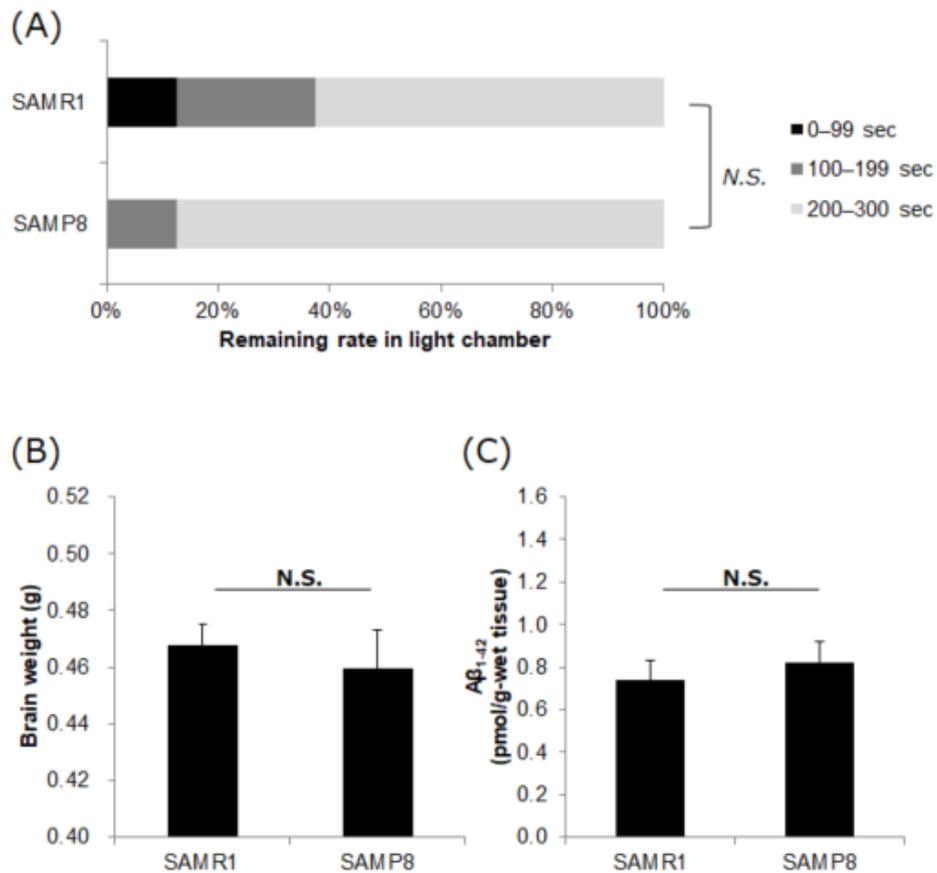


Fig 8. Memory retention, total brain weight, and Aβ₁₋₄₂ accumulation in SAMR1 and SAMP8 mice at 2 months of age. (A) Memory retention was measured by a step-through passive avoidance test 1 day after the mice acquired memory at 2 months of age. Memory retention was not different between SAMR1 and SAMP8 mice at 2 months of age; $\chi^2 (1) = 1.67, p = 0.435$. (B) Total brain weight and (C) Aβ₁₋₄₂ accumulation in cerebral cortex were not different between SAMR1 and SAMP8 mice at 2 months of age. Data are means \pm S.D. (8 mice per group). Statistical significance was determined by (A) chi-squared test; (B, C) Student's *t*-test.

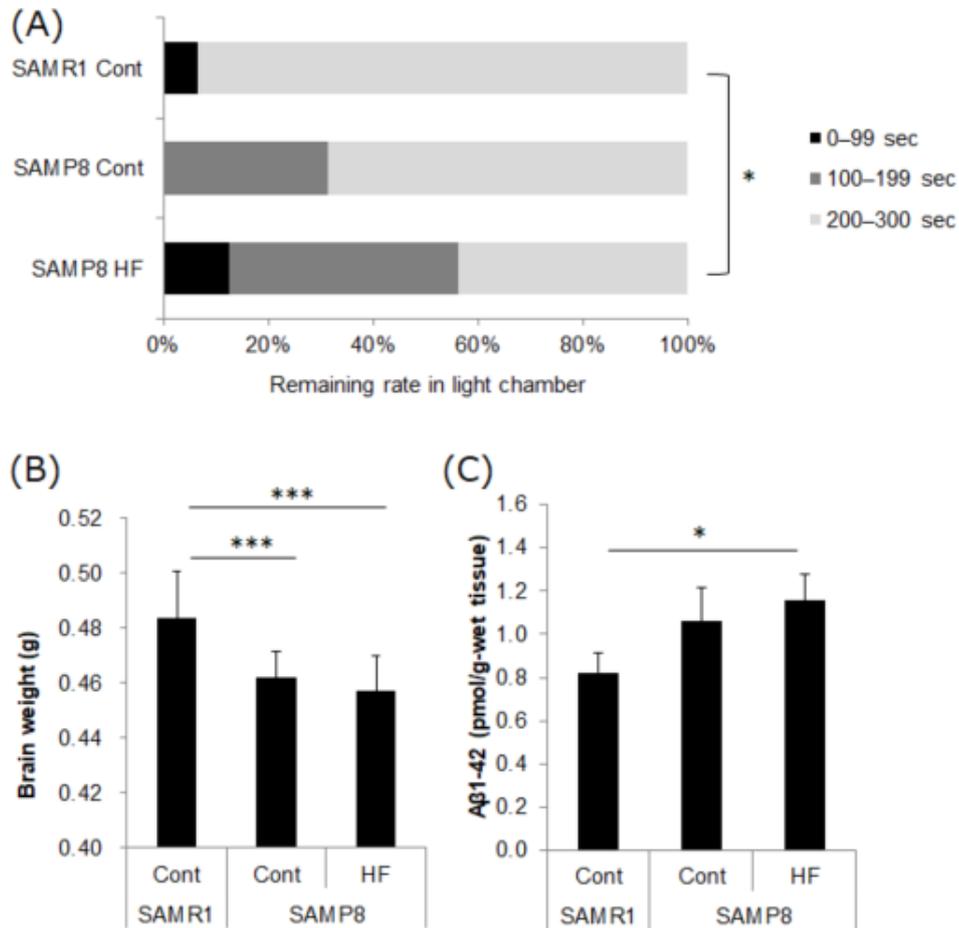


Fig 9. Effects of a HF diet on memory function, total brain weight, and Aβ₁₋₄₂ accumulation in a senescence-accelerated mouse model at 6 months of age. (A) Memory retention was measured by described methods in Figure 8A. (B) Total brain weight. (C) Aβ₁₋₄₂ accumulation in cerebral cortex. Cont, control diet; HF, high-fat diet. Data are means ± S.D. (16 mice per group). Statistical significance was determined by: (A) chi-squared test followed by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and Bonferroni correction; and (B,C) one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

3.3.2. 茶抽出物の摂取が高脂肪食摂取に伴う SAMP8 マウスの認知機能低下および脳重量低下、 $A\beta_{1-42}$ 蓄積に与える影響

認知機能低下モデルとして高脂肪食を摂取した SAMP8 マウスにおいて GTE の認知機能改善効果を検証した。認知機能は HF 群と比較し HFGT 群において統計学的に有意に高値を示した($\chi^2(1) = 6.02, p = 0.049$) (Fig 10A)。また、全脳重量は HF 群と比較し HFGT 群で有意に上昇し(Fig 10B)、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積量は HF 群と比較し HFGT 群で有意に減少した(Fig 10C)。

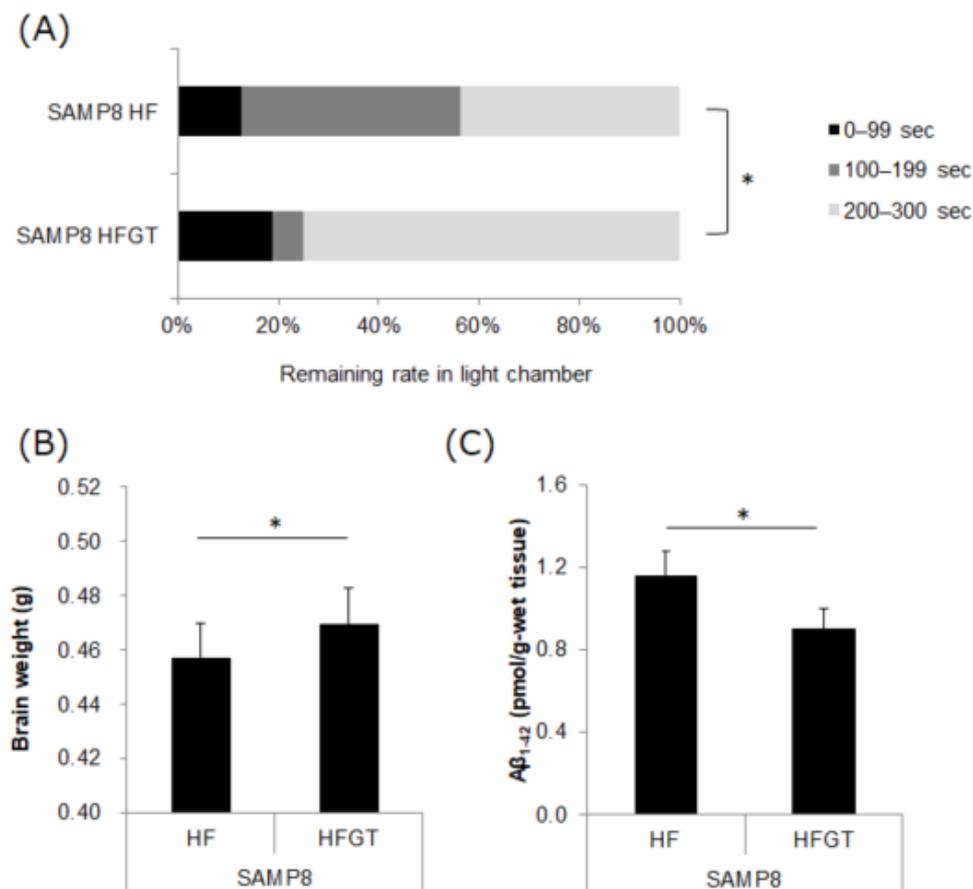


Fig 10. Effects of GTE intake on memory function, total brain weight, and $A\beta_{1-42}$ accumulation in HF diet-fed SAMP8 mice at 6 months of age. (A) Memory retention was measured by described methods in Figure 8A. (B) Total brain weight. (C) $A\beta_{1-42}$ accumulation in cerebral cortex. HFGT, HF diet with 0.5% GTE. Data are means \pm S.D. (16 mice per group). Statistical significance was determined by: (A) chi-squared test; and (B,C) Student's *t*-test. *, $p < 0.05$.

3.3.3. 茶抽出物の摂取が高脂肪食によって誘導される脳内酸化ストレスに及ぼす影響

SAMP8 マウスの脳内酸化ストレスを測定する目的で、大脳皮質を用い脂質酸化ストレスの指標となるMDA量を測定した(Fig 11)。結果、MDA量はCont群(4.91 nmol/mg-protein)と比較し、HF群で高値(5.91 nmol/mg-protein)を示した。HFGT群ではCont群と同程度の値を示した(4.99 nmol/mg-protein)。

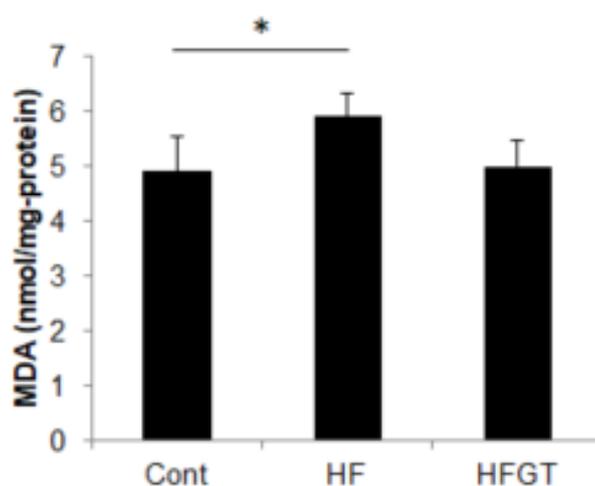


Fig 11. Effects of GTE intake on HF diet-induced oxidative stress in SAMP8 mice.

The levels of malondialdehyde (MDA), a lipid peroxide degradation product, in the cerebral cortex were measured by thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay. Data are means \pm S.D. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used for comparison among groups (Number of samples, $N = 4$). *, $p < 0.05$.

3.3.4. 茶抽出物の摂取が海馬のシナプス形成関連因子産生量に与える影響

食餌の違いがシナプス形成に重要なタンパク質の産生量に与える影響を評価したところ、BDNF および PSD95 量は Cont 群と比較し HF 群で有意に減少し、Synaptophysin 量も低下傾向を示した(Fig 12)。一方、HFGT 群では上記変化は認められなかった。海馬におけるこれらのタンパク質量は記憶形成や記憶保持能に重要な役割を担うと考えられ、GTE 摂取による認知機能改善効果に関与している可能性を示唆している。

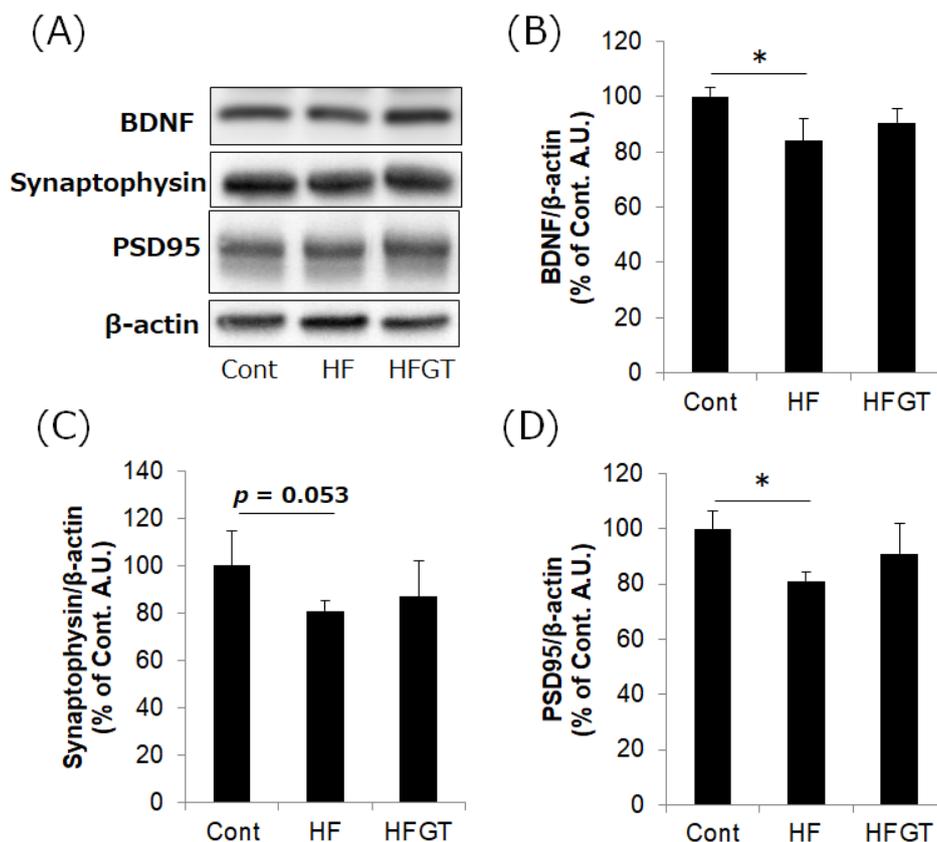


Fig 12. Effects of GTE intake on the levels of BDNF, Synaptophysin, and PSD95 in SAMP8 mice. (A) Representative western blot images; and quantification of protein levels for: (B) brain-derived neurotrophic factor (BDNF); (C) Synaptophysin; and (D) postsynaptic density protein 95 (PSD95). Data are means \pm S.D. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used for comparison among groups (N = 4). *, $p < 0.05$.

3.3.5. 茶抽出物の摂取が海馬の Neprilysin 量に与える影響

A β の蓄積に関与する NEP の産生量を評価したところ、Cont 群と比較し HF 群で減少傾向が認められた(Fig 13)。一方、HFGT 群では上記減少は認められなかった。このことから、GTE 摂取による A β_{1-42} 蓄積抑制効果に NEP 量に関与している可能性を示唆している(Fig 13)。

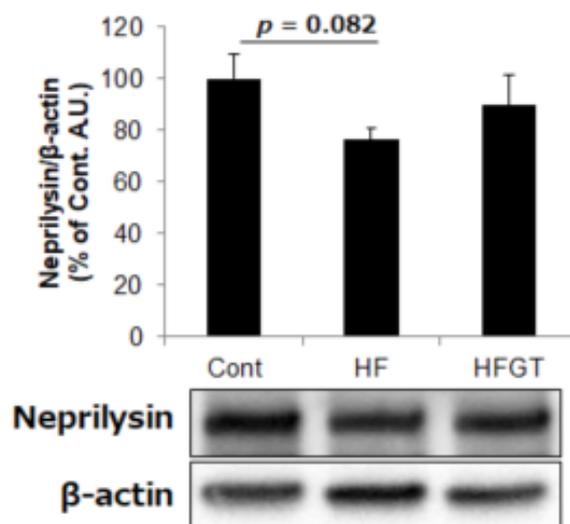


Fig 13. Effects of GTE intake on NEP levels in SAMP8 mice. Quantification of protein levels (upper) and representative western blot images (lower panels) are shown. Western blotting showed that NEP levels tended to be lower by 23.6% in SAMP8 mice fed HF diet than in the Cont group. GTE intake reduced this difference to 10.5%. Data are means \pm S.D. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used for comparison among groups (N = 4).

3.4. 考察

第 3 章では高脂肪食の摂取が加齢に伴う認知機能の低下に及ぼす影響を明らかにするとともに、GTE の認知機能改善効果を明らかにすることを目的に老化促進モデルである SAMP8 マウスを用い検討を進めた。第 2 章で示した通り、SAMP8 マウスに高脂肪食（脂質比率：51.7 Kcal%）を摂取させることでインスリン抵抗性が誘導された。Mehla らはグルコース負荷試験による耐糖能の評価系を用いて、高脂肪食（脂質比率：60 Kcal%）を摂取した SAMP8 マウスはインスリン抵抗性が誘導され、認知機能が低下することを報告している。¹⁰⁸ 本研究における試験デザインと Mehla らの試験デザインは完全には一致しないが、共に SAMP8 マウスに高脂肪食を摂取させることでインスリン抵抗性が誘導されるとともに、認知機能低下が誘導された点において認知機能低下モデルとして SAMP8 マウスに高脂肪食を負荷する試験には一定の再現性が得られたと考えられる。さらに本研究においては GTE の摂取は上記認知機能低下モデルに対し、認知機能改善効果を示すことを明らかにした。

SAMP8 マウスに誘導される認知機能低下には大脳皮質における脂質酸化ストレスの増大が関与することが示されている。¹¹⁷ 加えて、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積に関与する因子の一つとして酸化ストレスの増大が知られている。¹¹⁸ 本試験において高脂肪食摂取に伴う $A\beta_{1-42}$ の蓄積は、高脂肪食摂取群における MDA 量の増加および、 $A\beta$ 分解酵素である NEP が減少傾向を示したことなどから、高脂肪食摂取に伴う脂質の酸化ストレスの増大と $A\beta_{1-42}$ の分解抑制が $A\beta_{1-42}$ の蓄積量の増加を誘導したものと考えられる。一方で、これらの変化は GTE 摂取により抑制された。茶カテキンの摂取は高齢者の酸化ストレスを抑制することが報告されている。⁴⁷ また、茶カテキンの抗酸化ストレス効果についてはげっ歯類を用いた数多くの研究により明らかにされている。^{46, 48-52} 酸化ストレスの増大が $A\beta$ の蓄積を伴いアルツハイマー病の病態を悪化させることが知られており³⁰⁻³¹、茶カテキン摂取により酸化ストレスを抑制できることは認知機能の改善に重要な役割を担うと考えられる。加えて、 $A\beta$ 分解酵素である NEP の発現量はげっ歯類に EGCg を 60 日間腹腔内投与(5-50 mg/kg 体重)することで増加すると報告されている。¹⁰⁶ 従って、茶カテキン摂取は酸化ストレスの抑制と NEP の発現量制御を介して $A\beta_{1-42}$ の蓄積を抑えることで、高脂肪食を摂取した SAMP8 マウスの認知機能を改善したと考えられる。

記憶保持能には様々な因子が影響することが報告されている。例えば上述の通り $A\beta$ の蓄積や酸化ストレス¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ だけでなく、脳由来神経栄養因子(BDNF)や Synaptophysin、シナプス後肥厚部タンパク質

95(PSD95)が関与する神経シナプス可塑性^{107, 119-124}が挙げられる。BDNFは学習と記憶の際に重要な役割を担い、シナプス可塑性を制御する。¹¹⁹⁻¹²⁰ 記憶が獲得されるとき、前シナプスおよび後シナプス領域では情報伝達が起こるが、Synaptophysinは前シナプスのマーカータンパク質であり、シナプスから放出されるシナプス粒子の形成や情報伝達に必要なタンパク質である。¹²¹⁻¹²² PSD95は後シナプスのマーカータンパク質であり、シナプスの形成や後シナプスにおけるシナプス刺激受容に必要なタンパク質である。¹²²⁻¹²⁴ Liらの報告によると茶カテキン溶液(0.05—0.10%)を通常食飼育条件下で6ヶ月間自由に飲用したSAMP8マウス(4—10月齢)では脳内のBDNFとPSD95量が増加する。¹⁰⁷ また、茶カテキン溶液(0.05%)を通常食飼育条件下で6ヶ月間自由に飲用したC57BL/6Jマウス(14—20月齢)においてもPSD95の量が増大した。⁴⁸ 本研究ではSAMP8マウスにおいて高脂肪食の摂取に伴う海馬におけるBDNFとPSD95の低下をGTE摂取が抑制した。加えて、他の研究グループがEGCgはセボフルラン誘導性神経変性をBDNFが関与するシグナル伝達系を介して保護することを明らかにしている。¹²⁵ これらの結果から、茶カテキンの摂取は高脂肪食摂取に伴い誘導されるシナプス可塑性に影響する神経障害を保護する可能性が考えられる。

本研究に用いた茶カテキンはEGCgを主要成分とする茶抽出物であり、8種カテキンの組成を同定している。しかしながら未同定成分を含有しており、また、茶に含まれる成分は抽出法により変化することが報告されているため¹²⁶⁻¹²⁷、本研究の有効成分および有効濃度を同定することは難しい。さらに本研究では茶カテキンを単一濃度でのみ摂取(高脂肪食中に0.5%濃度で添加)させており、より低濃度でも効果を発揮するのか、又はより高濃度の茶カテキンを摂取することで認知機能改善効果が高まるかは不明である。今後、様々な茶抽出物や複数の投与濃度で茶カテキンの認知機能改善効果を比較解析する必要がある。さらに、本試験の試験設計についても制限事項が含まれる。本試験ではマウスの性周期(月経)が行動や代謝系に及ぼす影響を考慮し、雄性のマウスのみを使用している。しかしながら、ヒトおよびアルツハイマー病モデルマウスを用いた検討では性差が加齢に伴う認知機能低下に影響を及ぼすことが報告されている。¹²⁸⁻¹²⁹ 従って、本試験で示した茶カテキンの効果に関して、雌性マウスを用いた検討を進める必要がある。

現在までに認知症を根治可能な治療薬や予防薬は上市されていない。¹³⁰ 治療薬の開発は未だ成功を見ないが、食品成分による早期介入により認知機能低下を予防することを目指した介入研究が数多く進められており^{45, 47, 131-137}、茶カテキンの効果を検証した介入研究はこれまでに3件報告されている。^{45, 47, 131} 2件

の研究は健常者を対象に茶カテキンの単回投与が脳に与える影響を検証しており、1 件は高齢者を対象とした長期の茶カテキン摂取が認知機能に与える影響を検証している。しかしながら、加齢の過程において茶カテキンを長期間摂取した場合に認知機能に与える影響は明らかではない。一方、肥満関連疾患は認知症のリスク因子として知られているが^{4, 27-28, 103-105}、長期間の茶カテキン摂取は肥満関連疾患に対する有効性が示されている。^{32, 34-35, 37} また、本研究では4ヶ月間の茶カテキン摂取により脳内酸化ストレスや A β ₁₋₄₂ の蓄積を抑えることを示したが、酸化ストレスや A β ₁₋₄₂ の蓄積はアルツハイマー病の発症や認知症の進行に悪影響を及ぼす。^{118, 138} 従って、上述の茶カテキン長期間摂取によるヒトおよびマウスにおける肥満関連疾患に対する有効性を鑑みると、茶カテキンの長期間摂取はヒトにおいても認知機能低下の予防または改善に有用である可能性が考えられる。茶カテキン摂取が認知機能低下に与える影響について、今後、ヒトでの効果検証は必要であるが、本研究により、酸化ストレスおよび A β ₁₋₄₂ の蓄積が関与する認知機能の低下に茶カテキンが有用である可能性が示された。このことから、日常的な茶カテキンの摂取は脂質の過剰摂取状態にある不健康な食事を継続している現代社会において、脳機能や認知機能の低下を抑制する手段の一つになることが期待される。

3.5. 小括

第 3 章において老化促進モデルである SAMP8 マウスを用いることで、高脂肪食の摂取は脳内に酸化ストレスを誘導し、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積を伴う加齢性の認知機能の低下を促進することを明らかにし、GTE の摂取は脳内酸化ストレスおよび $A\beta_{1-42}$ の蓄積を抑制するとともに認知機能を改善することを明らかにした。これらの結果は、加齢に伴う認知機能の低下が社会的な問題となっている現代において GTE 摂取の有用性を明らかにした研究であり、今後、ヒトでの効果検証が望まれる。

総括

本論文では、高脂肪食の摂取によって誘導される肝臓および骨格筋、脳組織における代謝変化に対する茶カテキン摂取の効果およびそのメカニズムを解析し、茶カテキンの新たな作用メカニズムとして肝臓におけるヘパトカイン産生量制御および、脳内酸化ストレス抑制作用を見出した。これまで、茶カテキンの生理作用については数多くの研究報告がなされているが、全身性の作用については不明な点が多い。今回、茶カテキン摂取によりヘパトカイン産生量を制御していることを明らかにしたことで、茶カテキンの肝臓への作用が全身に影響を及ぼしている可能性が示された。今後、茶カテキンの全身性の代謝改善効果について、これまで明らかとなっていなかった新たな作用メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

第1章では8週齢のC57BL/6Jマウスに通常食、高脂肪食、または高脂肪食に0.4%のGTEを添加した食餌を4週間与え、初期肥満誘導時に起こる代謝変化を肝臓中のヘパトカイン（LECT2、SeP、fet-A）産生量およびインスリン抵抗性の誘導に着目し解析した。その結果、高脂肪食の摂取に伴い、肝臓中のヘパトカイン産生量が増加すること、GTE摂取によりヘパトカインの過剰産生は抑制されることを明らかにした。また、ヘパトカイン産生とインスリン抵抗性誘導の因果関係については未だ不明な点も多く残されているが、今回の検討において、ヘパトカイン産生量に変化が起きた時点において血糖値やインスリン感受性は変化していなかった。このことから、ヘパトカイン産生量の変化が高血糖やインスリン抵抗性を誘導している可能性が示唆された。

第2章では老化促進モデルマウス（SAMP8）を用い加齢に伴う高脂肪食誘導性筋萎縮に対する茶カテキンの筋萎縮改善効果について、ヘパトカインおよびインスリン抵抗性の制御を中心に解析した。8週齢のSAMP8マウスに通常食、高脂肪食、または高脂肪食に0.5%のGTEを添加した食餌を4ヶ月間与えたところ、加齢に伴い大腿四頭筋の萎縮が認められ、高脂肪食の摂取により筋萎縮の促進ならびにインスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値の上昇が認められた。さらに血中LECT2濃度は高脂肪食摂取により上昇し、大腿四頭筋ではインスリン抵抗性の指標であるAktのリン酸化および筋タンパク質合成シグナルの低下が認められた。一方、GTEを摂取していた群では、上記変化は認められなかった。従って、茶カテキンは肝臓に作用することで高脂肪食摂取に伴うLECT2の分泌を抑制し、骨格筋のインスリン抵抗性を改善し、筋タンパク質合成の低下を抑制することで筋萎縮を改善する可能性が明らかとなった。本章で明らかとなった知見は、第1章

で示した茶カテキン摂取によるヘパトカイン産生量の制御が筋萎縮を改善するという具体的な例を示すものであり、茶カテキンがヘパトカイン産生量を制御できることの重要性を示すものであると考えられる。

第3章では、高脂肪食摂取が加齢に伴う認知機能の低下に及ぼす影響を明らかにするとともに、茶カテキン摂取の効果およびそのメカニズムを解析する目的で、8週齢の SAMP8 マウスに通常食、高脂肪食、または高脂肪食に 0.5% の GTE を添加した食餌を 4 ヶ月間与え、認知機能試験を実施し、試験後、脳湿重量の測定、大脳皮質中の $A\beta_{1-42}$ 蓄積量および脂質酸化ストレス量を測定した。さらに、海馬における分子生物学的解析を行った。結果、高脂肪食摂取が加齢に伴う認知機能の低下を促進することを明らかにした。加えて、高脂肪食の摂取に伴い脳内酸化ストレスの増大とシナプス形成因子のタンパク質量が低下すること、 $A\beta_{1-42}$ の蓄積量が増加することを明らかにした。一方で、茶カテキンを摂取することで、高脂肪食摂取によって誘導された脳内酸化ストレスは抑制され、シナプス形成因子のタンパク質量の低下および $A\beta_{1-42}$ の蓄積量は改善されることを明らかにした。今回、茶カテキン摂取による酸化ストレス制御メカニズムの解明には至らないが、茶カテキンの摂取は脳内酸化ストレスを抑制し、認知機能の低下を改善する可能性を明らかにした。

茶カテキンは主に肝臓で代謝されるが、骨格筋や脳など、全身性の影響を及ぼす可能性が明らかになった。茶カテキンの全身性の作用の全貌を明らかにするにはさらなる研究が必要であると考えられるが、高脂肪食摂取によって誘導される肝臓、骨格筋および脳組織の代謝変化に対して、茶カテキンは直接的に効果を発現するだけでなく、ヘパトカインや酸化ストレス制御を介した間接的な効果も有することが明らかとなった。

世界的に肥満の予防や早期介入による制御が社会的な課題として挙げられる現代において、本研究をはじめ、茶カテキンの代謝改善効果に関する知見を蓄積することが社会的課題の解決に向けた一助となることを願う。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました花王株式会社生物科学研究所主席研究員の目黒真一博士、研究員の北澤秀文氏、花王株式会社で研究フェローを務め、現在、人間総合科学大学教授の時光一郎博士、そして静岡県立大学の三浦進司教授、吉成浩一教授、海野けい子准教授に心より御礼申し上げます。特に、時光一郎博士、目黒真一博士におかれましては、本研究の全てにおいて、研究の方針から結果の解釈、考察に至るまで、懇切丁寧なご指導とご助言を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

本論文を提出するにあたり、主査および副査をお願いしてご指導、ご助言を賜りました静岡県立大学の鈴木隆教授、浅井章良教授、浅井知浩教授、山田浩教授に厚く御礼申し上げます。先生方からはいくつもの有益なご指導、ご助言を賜り、本論文を磨き上げることができました。謹んで感謝申し上げます。また、本論文の口述発表に先立ち、静岡県立大学薬学部生化学教室の鈴木隆教授、高橋忠伸准教授、南彰講師には本研究のさらなる発展に向けたご助言、さらには本研究における課題や問題点等をご指摘いただき、深い考察を促してくださいましたこと、深く感謝申し上げます。

研究者人生のスタートにおいて多くのご指導を賜りました名古屋大学大学院工学研究科・生物機能工学専攻・遺伝子工学研究グループの飯島信司教授、西島謙一准教授、そして、同期として日夜研究に励んだ奥寄雄也博士、増田裕介博士、財津芳紀氏、梶田悠矢氏にこの場を借りて感謝申し上げます。特に、同期の中で最初に博士研究者としてのキャリアをスタートさせた奥寄雄也博士には生物における真理を探究する面白さを学び、私を研究者の土俵に引き上げてくれたことに深く感謝申し上げます。増田裕介博士には研究者としての在り方について議論し、励まし合い、近い立場の研究者として切磋琢磨できたことに深く感謝申し上げます。

最後に、大学進学から現在に至るまで常に応援してくれた親族の皆様と、研究を優先する生活を理解し、陰で支えてくれた妻の朋美に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Zimmet, P.,Alberti, K. G.,Shaw, J., Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. **2001**, *414*, 782-7.
2. Wang, Y.,Beydoun, M. A.,Liang, L., et al., Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic. *Obesity (Silver Spring)*. **2008**, *16*, 2323-30.
3. Kenchaiah, S.,Evans, J. C.,Levy, D., et al., Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med*. **2002**, *347*, 305-13.
4. Kahn, S. E.,Hull, R. L.,Utzschneider, K. M., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. **2006**, *444*, 840-6.
5. Kopelman, P. G., Obesity as a medical problem. *Nature*. **2000**, *404*, 635-43.
6. Sundstrom, J.,Riserus, U.,Byberg, L., et al., Clinical value of the metabolic syndrome for long term prediction of total and cardiovascular mortality: prospective, population based cohort study. *BMJ*. **2006**, *332*, 878-82.
7. Whatnall, M. C.,Collins, C. E.,Callister, R., et al., Associations between Unhealthy Diet and Lifestyle Behaviours and Increased Cardiovascular Disease Risk in Young Overweight and Obese Women. *Healthcare (Basel, Switzerland)*. **2016**, *4*. pii: E57.
8. Kagawa, Y., Impact of Westernization on the nutrition of Japanese: changes in physique, cancer, longevity and centenarians. *Prev. Med*. **1978**, *7*, 205-17.
9. Swinburn, B. A.,Caterson, I.,Seidell, J. C., et al., Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr*. **2004**, *7*, 123-46.
10. Matsuzawa, Y.,Shimomura, I.,Nakamura, T., et al., Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Diabetes Res. Clin. Pract*. **1994**, *24 Suppl*: S111-6.
11. Zhang, Y.,Proenca, R.,Maffei, M., et al., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **1994**, *372*, 425-32.
12. Khan, M.,Joseph, F., Adipose tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica*. **2014**, *2014*: 328592.
13. Achari, A. E.,Jain, S. K., Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci*. **2017**, *18*. pii: E1321.
14. Oh, K. J.,Lee, D. S.,Kim, W. K., et al., Metabolic Adaptation in Obesity and Type II Diabetes: Myokines, Adipokines and Hepatokines. *Int. J. Mol. Sci*. **2016**, *18*. pii: E8
15. Yeo, N. H.,Woo, J.,Shin, K. O., et al., The effects of different exercise intensity on myokine and angiogenesis factors. *J. Sports Med. Phys. Fitness*. **2012**, *52*, 448-54.
16. He, Z.,Tian, Y.,Valenzuela, P. L., et al., Myokine Response to High-Intensity Interval vs. Resistance Exercise: An Individual Approach. *Front. Physiol*. **2018**, *9*: 1735.

17. Lee, J., Hong, S. W., Park, S. E., et al., Exendin-4 Inhibits the Expression of SEPP1 and Fetuin-A via Improvement of Palmitic Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress by AMPK. *Endocrinol. Metab. (Seoul)*. **2015**, *30*, 177-84.
18. Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Matsushita, Y., et al., Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver. *Biosci. Trends*. **2013**, *7*, 276-83.
19. Lan, F., Misu, H., Chikamoto, K., et al., LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. *Diabetes*. **2014**, *63*, 1649-64.
20. Misu, H., Takamura, T., Takayama, H., et al., A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. **2010**, *12*, 483-95.
21. Yang, S. J., Hwang, S. Y., Choi, H. Y., et al., Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2011**, *96*, E1325-9.
22. Mori, K., Emoto, M., Yokoyama, H., et al., Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. **2006**, *29*: 468.
23. Stefan, N., Hennige, A. M., Staiger, H., et al., Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care*. **2006**, *29*, 853-7.
24. Egerman, M. A., Glass, D. J., Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **2014**, *49*, 59-68.
25. Kalyani, R. R., Corriere, M., Ferrucci, L., Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol*. **2014**, *2*, 819-29.
26. Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C. R., Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **2014**, *6*. pii: a009191.
27. Reijmer, Y. D., van den Berg, E., Ruis, C., et al., Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev*. **2010**, *26*, 507-19.
28. Umegaki, H., Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 1011-9.
29. Willette, A. A., Xu, G., Johnson, S. C., et al., Insulin resistance, brain atrophy, and cognitive performance in late middle-aged adults. *Diabetes Care*. **2013**, *36*, 443-9.
30. Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., et al., Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimers disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet*. **2006**, *15*, 1437-49.

31. Reddy, P. H., Beal, M. F., Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimers disease. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 45-53.
32. Ferreira, M. A., Silva, D. M., de Morais, A. C., Jr., et al., Therapeutic potential of green tea on risk factors for type 2 diabetes in obese adults - a review. *Obes. Rev.* **2016**, *17*, 1316-28.
33. Legeay, S., Rodier, M., Fillon, L., et al., Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients.* **2015**, *7*, 5443-68.
34. Yang, C. S., Zhang, J., Zhang, L., et al., Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 160-74.
35. Brown, A. L., Lane, J., Coverly, J., et al., Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 886-94.
36. Bose, M., Lambert, J. D., Ju, J., et al., The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1677-83.
37. Nagao, T., Meguro, S., Hase, T., et al., A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. **2009**, *17*, 310-7.
38. Nagao, T., Hase, T., Tokimitsu, I., A green tea extract high in catechins reduces body fat and cardiovascular risks in humans. *Obesity (Silver Spring)*. **2007**, *15*, 1473-83.
39. Nagao, T., Komine, Y., Soga, S., et al., Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 122-9.
40. Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., et al., Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2002**, *26*, 1459-64.
41. Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S., et al., Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 78-84.
42. Banerjee, S., Ghoshal, S., Porter, T. D., Phosphorylation of hepatic AMP-activated protein kinase and liver kinase B1 is increased after a single oral dose of green tea extract to mice. *Nutr. Res.* **2012**, *32*, 985-90.
43. Santamarina, A. B., Oliveira, J. L., Silva, F. P., et al., Green Tea Extract Rich in Epigallocatechin-3-Gallate Prevents Fatty Liver by AMPK Activation via LKB1 in Mice Fed a High-Fat Diet. *PLoS One.* **2015**, *10*, e0141227.

44. Liu, H. W., Chan, Y. C., Wang, M. F., et al., Dietary (-)-Epigallocatechin-3-gallate Supplementation Counteracts Aging-Associated Skeletal Muscle Insulin Resistance and Fatty Liver in Senescence-Accelerated Mouse. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 8407-17.
45. Scholey, A., Downey, L. A., Ciorciari, J., et al., Acute neurocognitive effects of epigallocatechin gallate (EGCG). *Appetite.* **2012**, *58*, 767-70.
46. Singh, N. A., Mandal, A. K., Khan, Z. A., Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutr. J.* **2016**, *15*, 60.
47. Ide, K., Yamada, H., Takuma, N., et al., Effects of green tea consumption on cognitive dysfunction in an elderly population: a randomized placebo-controlled study. *Nutr. J.* **2016**, *15*, 49.
48. Li, Q., Zhao, H., Zhao, M., et al., Chronic green tea catechins administration prevents oxidative stress-related brain aging in C57BL/6J mice. *Brain Res.* **2010**, *1353*, 28-35.
49. Sharma, R., Sharma, A., Kumari, A., et al., Consumption of green tea epigallocatechin-3-gallate enhances systemic immune response, antioxidative capacity and HPA axis functions in aged male swiss albino mice. *Biogerontology.* **2017**, *18*, 367-82.
50. He, Y., Tan, D., Bai, B., et al., Epigallocatechin-3-gallate attenuates acrylamide-induced apoptosis and astrogliosis in rat cerebral cortex. *Toxicol. Mech. Methods.* **2017**, *27*, 298-306.
51. Wang, M. H., Lin, R. F., Tseng, H. C., et al., (-) Epigallocatechin-3-gallate attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2015**, *131*, 71-6.
52. Bai, Q., Lyu, Z., Yang, X., et al., Epigallocatechin-3-gallate promotes angiogenesis via up-regulation of Nfr2 signaling pathway in a mouse model of ischemic stroke. *Behav. Brain Res.* **2017**, *321*, 79-86.
53. Li, H., Min, Q., Ouyang, C., et al., AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, *1842*, 1844-54.
54. Jung, T. W., Yoo, H. J., Choi, K. M., Implication of hepatokines in metabolic disorders and cardiovascular diseases. *BBA Clin.* **2016**, *5*, 108-13.
55. Murase, T., Haramizu, S., Shimotoyodome, A., et al., Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, *288*, R708-15.

56. Chen, S., Osaki, N., Shimotoyodome, A., Green tea catechins enhance norepinephrine-induced lipolysis via a protein kinase A-dependent pathway in adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *461*, 1-7.
57. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., et al., Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* **2004**, *306*, 457-61.
58. Shimizu, K., Asakawa, T., Harada, N., et al., Use of positron emission tomography for real-time imaging of biodistribution of green tea catechin. *PLoS One.* **2014**, *9*, e85520.
59. Yu, Z., Shao, W., Chiang, Y., et al., Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected](NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetologia.* **2011**, *54*, 922-34.
60. Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., et al., Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* **1988**, *37*, 1163-7.
61. Hwang, H. J., Jung, T. W., Kim, B. H., et al., A dipeptidyl peptidase-IV inhibitor improves hepatic steatosis and insulin resistance by AMPK-dependent and JNK-dependent inhibition of LECT2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 157-66.
62. Jung, T. W., Choi, H. Y., Lee, S. Y., et al., Salsalate and Adiponectin Improve Palmitate-Induced Insulin Resistance via Inhibition of Selenoprotein P through the AMPK-FOXO1alpha Pathway. *PLoS One.* **2013**, *8*, e66529.
63. Takayama, H., Misu, H., Iwama, H., et al., Metformin suppresses expression of the selenoprotein P gene via an AMP-activated kinase (AMPK)/FoxO3a pathway in H4IIEC3 hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 335-45.
64. Lee, H. J., Lim, Y., Yang, S. J., Involvement of resveratrol in crosstalk between adipokine adiponectin and hepatokine fetuin-A in vivo and in vitro. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 1254-60.
65. Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., et al., Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* **2000**, *6*, 1099-108.
66. Chen, B., Liu, G., Zou, P., et al., Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **2015**, *240*, 1513-9.
67. Wu, J., Xu, X., Li, Y., et al., Quercetin, luteolin and epigallocatechin gallate alleviate TXNIP and NLRP3-mediated inflammation and apoptosis with regulation of AMPK in endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *745*, 59-68.
68. Lee, Y. J., Kim, S. J., Heo, T. H., Protective effect of catechin in type I Gaucher disease cells by reducing endoplasmic reticulum stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *413*, 254-8.

69. Kaneto, H.,Nakatani, Y.,Matsuhisa, M., ER stress and the JNK pathway in insulin resistance. *Gene Ther. Mol. Biol.* **2004**, *8*, 515-22.
70. Seki, E.,Brenner, D. A.,Karin, M., A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology.* **2012**, *143*, 307-20.
71. Hirosumi, J.,Tuncman, G.,Chang, L., et al., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* **2002**, *420*, 333-6.
72. Greenlund, L. J.,Nair, K. S., Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech. Ageing Dev.* **2003**, *124*, 287-99.
73. Lexell, J.,Taylor, C. C.,Sjostrom, M., What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J. Neurol. Sci.* **1988**, *84*, 275-94.
74. Thomas, D. R., Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clin. Nutr.* **2007**, *26*, 389-99.
75. Hairi, N. N.,Cumming, R. G.,Naganathan, V., et al., Loss of muscle strength, mass (sarcopenia), and quality (specific force) and its relationship with functional limitation and physical disability: the Concord Health and Ageing in Men Project. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2010**, *58*, 2055-62.
76. Keller, K.,Engelhardt, M., Strength and muscle mass loss with aging process. Age and strength loss. *Muscles Ligaments Tendons J.* **2013**, *3*, 346-50.
77. McGregor, R. A.,Cameron-Smith, D.,Poppitt, S. D., It is not just muscle mass: a review of muscle quality, composition and metabolism during ageing as determinants of muscle function and mobility in later life. *Longev. Healthspan.* **2014**, *3*, 9.
78. Bosaeus, I.,Rothenberg, E., Nutrition and physical activity for the prevention and treatment of age-related sarcopenia. *Proc. Nutr. Soc.* **2016**, *75*, 174-80.
79. Brady, A. O.,Straight, C. R., Muscle capacity and physical function in older women: What are the impacts of resistance training? *Journal of Sport and Health Science.* **2014**, *3*, 179-88.
80. Kim, H. K.,Suzuki, T.,Saito, K., et al., Effects of exercise and amino acid supplementation on body composition and physical function in community-dwelling elderly Japanese sarcopenic women: a randomized controlled trial. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2012**, *60*, 16-23.
81. Tieland, M.,van de Rest, O.,Dirks, M. L., et al., Protein supplementation improves physical performance in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **2012**, *13*, 720-6.

82. Hamrick, M. W., Ding, K. H., Pennington, C., et al., Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone*. **2006**, *39*, 845-53.
83. Guo, A. Y., Leung, K. S., Siu, P. M., et al., Muscle mass, structural and functional investigations of senescence-accelerated mouse P8 (SAMP8). *Exp. Anim.* **2015**, *64*, 425-33.
84. Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K., Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. *Exp. Gerontol.* **1997**, *32*, 105-9.
85. Derave, W., Eijnde, B. O., Ramaekers, M., et al., Soleus muscles of SAMP8 mice provide an accelerated model of skeletal muscle senescence. *Exp. Gerontol.* **2005**, *40*, 562-72.
86. Derave, W., Eijnde, B. O., Ramaekers, M., et al., No effects of lifelong creatine supplementation on sarcopenia in senescence-accelerated mice (SAMP8). *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2005**, *289*, E272-7.
87. Okumura, A., Unoki-Kubota, H., Yoshida-Hata, N., et al., Reduced serum level of leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is associated with the presence of diabetic retinopathy. *Clin. Chim. Acta.* **2016**, *463*, 145-149.
88. Popkin, B. M., Adair, L. S., Ng, S. W., Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr. Rev.* **2012**, *70*, 3-21.
89. Bodine, S. C., Disuse-induced muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2200-8.
90. de Oliveira Nunes Teixeira, V., Filippin, L. I., Viacava, P. R., et al., Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **2013**, *238*, 1421-30.
91. Gordon, B. S., Kelleher, A. R., Kimball, S. R., Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2147-57.
92. Reddy, S. S., Shruthi, K., Prabhakar, Y. K., et al., Implication of altered ubiquitin-proteasome system and ER stress in the muscle atrophy of diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *639*, 16-25.
93. Ahn, N., Koh, J., Kim, K., Endoplasmic Reticulum Stress of Skeletal Muscle and Exercise Training Effects in Aging and Obesity. *Asian J. Kinesiol.* **2018**, *20*, 1-10.
94. Borsheim, E., Bui, Q. U., Tissier, S., et al., Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly. *Clin. Nutr.* **2008**, *27*, 189-95.
95. Dillon, E. L., Sheffield-Moore, M., Paddon-Jones, D., et al., Amino acid supplementation increases lean body mass, basal muscle protein synthesis, and

- insulin-like growth factor-I expression in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 1630-7.
96. Ferrando, A. A., Paddon-Jones, D., Hays, N. P., et al., EAA supplementation to increase nitrogen intake improves muscle function during bed rest in the elderly. *Clin. Nutr.* **2010**, *29*, 18-23.
 97. Verdijk, L. B., Jonkers, R. A., Gleeson, B. G., et al., Protein supplementation before and after exercise does not further augment skeletal muscle hypertrophy after resistance training in elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 608-16.
 98. Biolo, G., Williams, B. D., Fleming, R. Y., et al., Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. *Diabetes.* **1999**, *48*, 949-57.
 99. Fujita, S., Volpi, E., Nutrition and sarcopenia of ageing. *Nutr. Res. Rev.* **2004**, *17*, 69-76.
 100. Rasmussen, B. B., Fujita, S., Wolfe, R. R., et al., Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J.* **2006**, *20*, 768-9.
 101. Misu, H., Takayama, H., Saito, Y., et al., Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 508-516.
 102. Prince, M., Comas-Herrera, A., Knapp, M., et al., Improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. *World Alzheimer Report.* **2016**.
 103. Travers, C., Martin-Khan, M., Lie, D., Barriers and enablers of health promotion, prevention and early intervention in primary care: evidence to inform the Australian national dementia strategy. *Australas. J. Ageing* **2009**, *28*, 51-7.
 104. Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M., et al., Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors. *World Alzheimer Report.* **2014**, 66-83.
 105. DeMarco, V. G., Aroor, A. R., Sowers, J. R., The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 364-76.
 106. Chang, X., Rong, C., Chen, Y., et al., (-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates cognitive deterioration in Alzheimers disease model mice by upregulating neprilysin expression. *Exp. Cell. Res.* **2015**, *334*, 136-45.
 107. Li, Q., Zhao, H. F., Zhang, Z. F., et al., Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and

- upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience*. **2009**, *163*, 741-9.
108. Mehla, J., Chauhan, B. C., Chauhan, N. B., Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *39*, 145-62.
 109. Onishi, S., Ishino, M., Kitazawa, H., et al., Green tea extracts ameliorate high-fat diet-induced muscle atrophy in senescence-accelerated mouse prone-8 mice. *PLoS One*. **2018**, *13*, e0195753.
 110. Lee, J. W., Lee, Y. K., Ban, J. O., et al., Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 1987-93.
 111. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., et al., Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. **2001**, *292*, 1550-2.
 112. Park, M. H., Lee, J. K., Choi, S., et al., Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimers disease mice. *Brain Res.* **2013**, *1529*, 113-24.
 113. Unno, K., Konishi, T., Nakagawa, A., et al., Cognitive dysfunction and amyloid β accumulation are ameliorated by the ingestion of green soybean extract in aged mice. *J. Funct. Foods.* **2015**, *14*, 345-53.
 114. Unno, K., Takabayashi, F., Kishido, T., et al., Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 1027-34.
 115. Hosoda, R., Saido, T. C., Otvos, L., Jr., et al., Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 1089-95.
 116. Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., et al., Familial Alzheimers disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. **1996**, *17*, 1005-13.
 117. Sato, E., Oda, N., Ozaki, N., et al., Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech. Ageing Dev.* **1996**, *86*, 105-14.
 118. Zuo, L., Hemmelgarn, B. T., Chuang, C. C., et al., The Role of Oxidative Stress-Induced Epigenetic Alterations in Amyloid-beta Production in Alzheimers Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 604658.

119. Genoud, C., Knott, G. W., Sakata, K., et al., Altered synapse formation in the adult somatosensory cortex of brain-derived neurotrophic factor heterozygote mice. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 2394-400.
120. Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., et al., Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell.* **2013**, *155*, 1596-609.
121. Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., et al., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* **2006**, *127*, 831-46.
122. Bjorklund, N. L., Sadagoparamanujam, V. M., Taglialatela, G., Selective, quantitative measurement of releasable synaptic zinc in human autopsy hippocampal brain tissue from Alzheimers disease patients. *J. Neurosci. Methods.* **2012**, *203*, 146-51.
123. Beique, J. C., Andrade, R., PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol.* **2003**, *546*, 859-67.
124. Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., et al., PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J. Cell. Biol.* **2008**, *183*, 1115-27.
125. Ding, M. L., Ma, H., Man, Y. G., et al., Protective effects of a green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, against sevoflurane-induced neuronal apoptosis involve regulation of CREB/BDNF/TrkB and PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neonatal mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2017**, *95*, 1396-405.
126. Hu, J., Zhou, D., Chen, Y., Preparation and antioxidant activity of green tea extract enriched in epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1349-53.
127. Roman, M. C., Determination of catechins and caffeine in camillia sinensis raw materials, extracts, and dietary supplements by HPLC-uv: single-laboratory validation. *J AOAC Int.* **2013**, *96*, 933-41.
128. Li, R., Singh, M., Sex differences in cognitive impairment and Alzheimers disease. *Front. Neuroendocrinol.* **2014**, *35*, 385-403.
129. McEwen, B. S., Milner, T. A., Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *J. Neurosci. Res.* **2017**, *95*, 24-39.
130. Cummings, J. L., Morstorf, T., Zhong, K., Alzheimers disease drug -development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res. Ther.* **2014**, *6*, 37.
131. Wightman, E. L., Haskell, C. F., Forster, J. S., et al., Epigallocatechin gallate, cerebral blood flow parameters, cognitive performance and mood in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Hum. Psychopharmacol.* **2012**, *27*, 177-86.

132. Meeusen, R.,Decroix, L., Nutritional Supplements and the Brain. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2018**, *28*, 200-11.
133. Dodge, H. H.,Zitzelberger, T.,Oken, B. S., et al., A randomized placebo-controlled trial of Ginkgo biloba for the prevention of cognitive decline. *Neurology.* **2008**, *70*, 1809-17.
134. Snitz, B. E.,OMeara, E. S.,Carlson, M. C., et al., Ginkgo biloba for preventing cognitive decline in older adults: a randomized trial. *JAMA.* **2009**, *302*, 2663-70.
135. Kato-Kataoka, A.,Sakai, M.,Ebina, R., et al., Soybean-derived phosphatidylserine improves memory function of the elderly Japanese subjects with memory complaints. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2010**, *47*, 246-55.
136. Glade, M. J.,Smith, K., Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition.* **2015**, *31*, 781-6.
137. Zhang, Y. Y.,Yang, L. Q.,Guo, L. M., Effect of phosphatidylserine on memory in patients and rats with Alzheimers disease. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 9325-33.
138. Butterfield, D. A.,Swomley, A. M.,Sultana, R., Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 823-35.