

博士論文

論文題目 認知症とカルニチンの関連：
基礎および臨床的検討

氏名 本多正幸

目次

1. 要旨	2
2. 序文	3
3. 目的	18
4. 方法	19
5. 結果	31
5-1. 基礎的検討	31
5-2. 臨床的検討	43
6. 考察	54
7. 引用文献	62
8. 謝辞	72

1 要旨

超高齢社会を迎えるわが国において急増するアルツハイマー病(AD)の発症に関与する機序としてアポトーシスや酸化ストレスが知られている。神経細胞保護的に働く物質の一つとしてのカルニチンは脂肪酸代謝に必須であるが、長鎖アシルカルニチンの神経系への作用は明らかにされていない。Neuro-2a 細胞において、長鎖アシルカルニチンは濃度依存性に細胞障害性を示し、アポトーシスを誘導し、p38 経路が関与する可能性が示された。さらに C18 カルニチンにより細胞内 Reactive Oxygen Species (ROS)が増加した。次に、認知症精査入院患者から AD、軽度認知機能障害 (MCI)、健常群を抽出し、血清中のカルニチン分画と認知機能との関連を検討した。アシルカルニチン/C0 カルニチン濃度比との間で負の相関が認められたが、臨床的な意義については今後の検討が必要であると考えられた。

2 序文

2.1 背景

超高齢社会を迎え、認知症を有する高齢者が急激に増加し、大きな社会問題として注目されるようになった。認知症は、2012年厚生労働省研究班調査によれば65歳以上において462万人、有病率にして14%に及ぶと推計され、軽度認知障害（MCI）も400万人と推計されており、対策が急務である。認知症の原因疾患のうち、半数以上を占めるとされる Alzheimer 病（AD）は、糖尿病、高血圧、肥満、脂質異常症といった血管リスク保有数が多いほど有意に発症リスクが増加することが明らかになっている[1-4]。

Disease modifying therapy が存在しない現在、これらの生活習慣病を予防または適切に管理していくことが重要であり、予防介入としては中年期から週3回以上、40分以上に相当する有酸素運動が推奨されている[5-7]。AD における2大病理は、アミロイド β （ $A\beta$ ）蓄積による老人斑形成と、リン酸化タウタンパクによる神経原線維変化である。リン酸化タウタンパクと老

人斑形成は相互に作用し、神経細胞死、脳萎縮、アセチルコリン不足からシ
ナプス機能不全を来たし認知症の発症に至る[8,9].

AD 発症には多因子が関与しており、加齢、アポリポタンパク E 多
型などの遺伝的背景、高血圧・糖尿病などの生活習慣病がリスクとして知ら
れ、これらが相互作用していると理解されている[10-12]. 脂質の過酸化をは
じめとした酸化ストレスはその病態の一因を担っていると考えられている
[13-15]が、根本的な治療法がないのが現状である.

2.2 カルニチン

カルニチンは脂肪酸の輸送に関与し、ミトコンドリア機能を調節す
る。遊離カルニチンとそのエステル型であるアセチルカルニチン（C2 カルニ
チン；構造は後述）は虚血や加齢などのストレスに対して神経細胞保護的に
作用する[16].

2.2.1 生体内分布と役割

カルニチン (4-hydroxy-3-trimethylaminobutyric acid) はアミノ酸の一種 (4 級アミン) であり, その主な供給は, リジンとメチオニンから肝, 腎, 脳において生合成されるほか (25%), 食事摂取によって得られる (75%) (図 1) [17, 18]. カルニチンの体内プールのうち 98%は筋肉中に存在し, 血漿濃度の 70 倍とされるが, 肝や腎に存在する割合は 1%前後にすぎない[19]. カルニチンは血漿蛋白と結合せず, 体内カルニチンプールのうち 0.6%は細胞外液中に遊離カルニチン, およびカルニチンの β 位の水酸基に脂肪酸がエステル結合したアシルカルニチンとして存在する (図 2). カルニチンは肉や乳製品に多く含まれるが, 高齢になると摂取量不足などの影響でカルニチン摂取も減少する. 血液中のカルニチン値は大きく変化しないが, 骨格筋中の遊離およびアセチルカルニチンはともに年齢と強く関連して減少することが示されている[20]. 組織における C2 カルニチン値は 0.1~50 mM と幅があるが, 健常人 6 人を対象とし, 午前 12 時および午後 12 時に食事時間とする測定系で血

清 C0 カルニチンは $37 \mu\text{M}$ (午後 2 時)~ $28 \mu\text{M}$ (午後 8 時) と変動し, C2 カルニチンは $1.1 \mu\text{M}$ (午後 6 時) ~ $5.2 \mu\text{M}$ (午後 10 時)と遊離脂肪酸値との間に有意な正の相関をもって変動した[21]. 一方で, 11 人の健常人を対象とした試験では, C0 カルニチン, C2 カルニチンとも覚醒時のほうが睡眠中に比較して高い傾向があるが, 食事前後で両者とも変動を認めなかったとする報告もある[22].

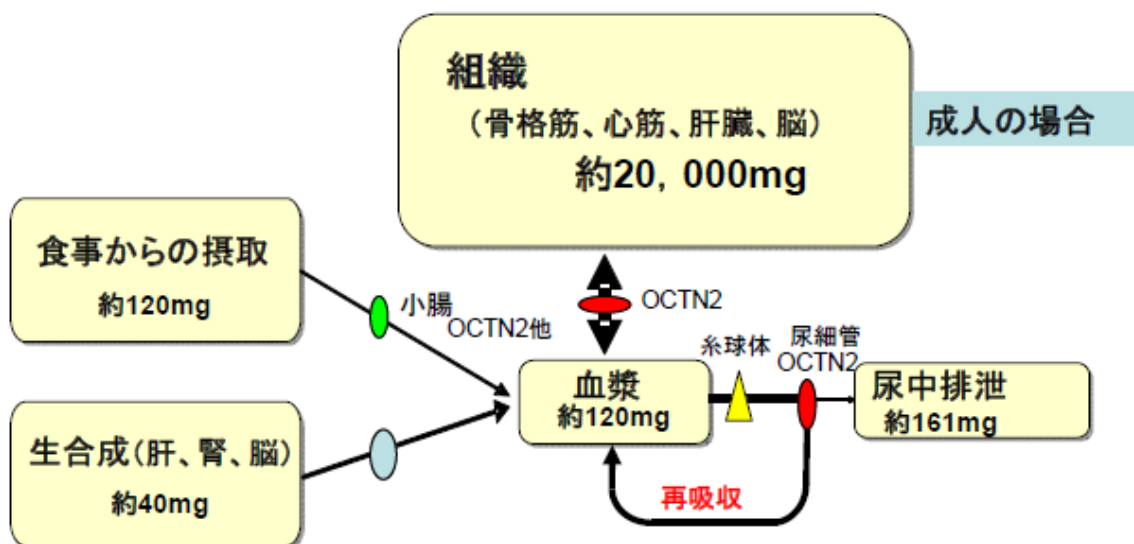
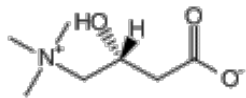


図 1: カルニチンの体内分布と代謝, 排泄 (文献[17]より一部改変)

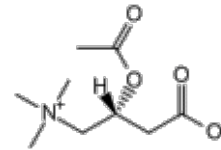
OCTN2: Organic cationic Transporter 2



分子式： $C_7H_{15}NO_3$

名称： L-カルニチン

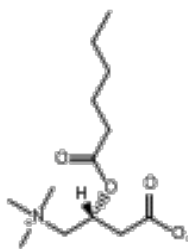
(C0 カルニチン)



分子式： $C_9H_{17}NO_4$

名称： アセチル-L-カルニチン

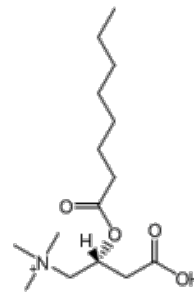
(C2 カルニチン)



分子式： $C_{13}H_{25}NO_4$

名称： ヘキサノイルカルニチン

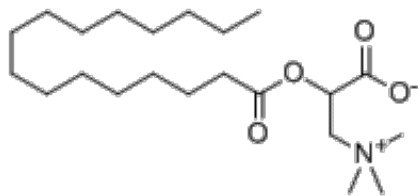
(C6 カルニチン)



分子式： $C_{15}H_{29}NO_4$

名称： オクタノイルカルニチン

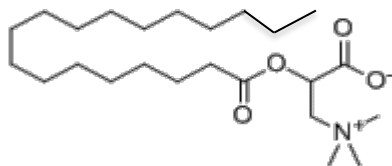
(C8 カルニチン)



分子式： $C_{23}H_{45}NO_4$

名称： パルミトイルカルニチン

(C16 カルニチン)



分子式： $C_{25}H_{49}NO_4$

名称： ステアロイルカルニチン

(C18 カルニチン)

図 2 : 主たるカルニチンの構造式

カルニチンの主たる機能は、①（長鎖）脂肪酸を β 酸化させるためにミトコンドリア内に輸送する担体としての機能と、②ミトコンドリア内に蓄積したアシル CoA をミトコンドリア外に輸送する機能である ([23, 24]; 図 3). そのほか、細胞膜を介した物質交換やエネルギーバランスの調整、細胞内遊離 CoA の調整、クエン酸回路の出発点であるピルビン酸の酸化に関与する [25, 26]. 長鎖脂肪酸は細胞質において ACS (acyl-CoA synthetase) により CoA と結合し、アシル CoA に活性化される. 長鎖脂肪酸はアシル CoA となることではじめてミトコンドリア外膜を通過することができ、細胞膜からトランスポータを介して取り込まれたカルニチンと CPT1 (carnitine palmitoyltransferase 1) の作用によって結合し、アシルカルニチンに転換される. こうしてミトコンドリア内膜を通過したアシルカルニチンはミトコンドリアマトリックス内で CPT2 (carnitine palmitoyltransferase 2) によって再びアシル CoA となり、 β 酸化を受けてアセチル CoA になることで TCA 回路に組み込まれる [27]. CPT2 活性は年齢とともに減少する [28]. 一方、OCTN2 (Organic cationic Transporter 2) はカルニチンの細胞内取り込みを調節しているために、CPT2

の機能発現に重要である[28].

カルニチンが欠乏すると長鎖脂肪酸のミトコンドリア内への輸送が低下する。その結果、脂肪酸の β 酸化による NADH₂ の産生や呼吸鎖による ATP の産生が低下し、組織の細胞内に中性脂肪が蓄積し、肝腫大やミオパチーを来す。一方、ミトコンドリア内のアセチル CoA は、CAT (carnitine acetyltransferase) の作用により、カルニチンと結合し、アセチルカルニチンとしてミトコンドリア外・細胞外に輸送される。

カルニチンの生体内での作用(カルニチン回路)

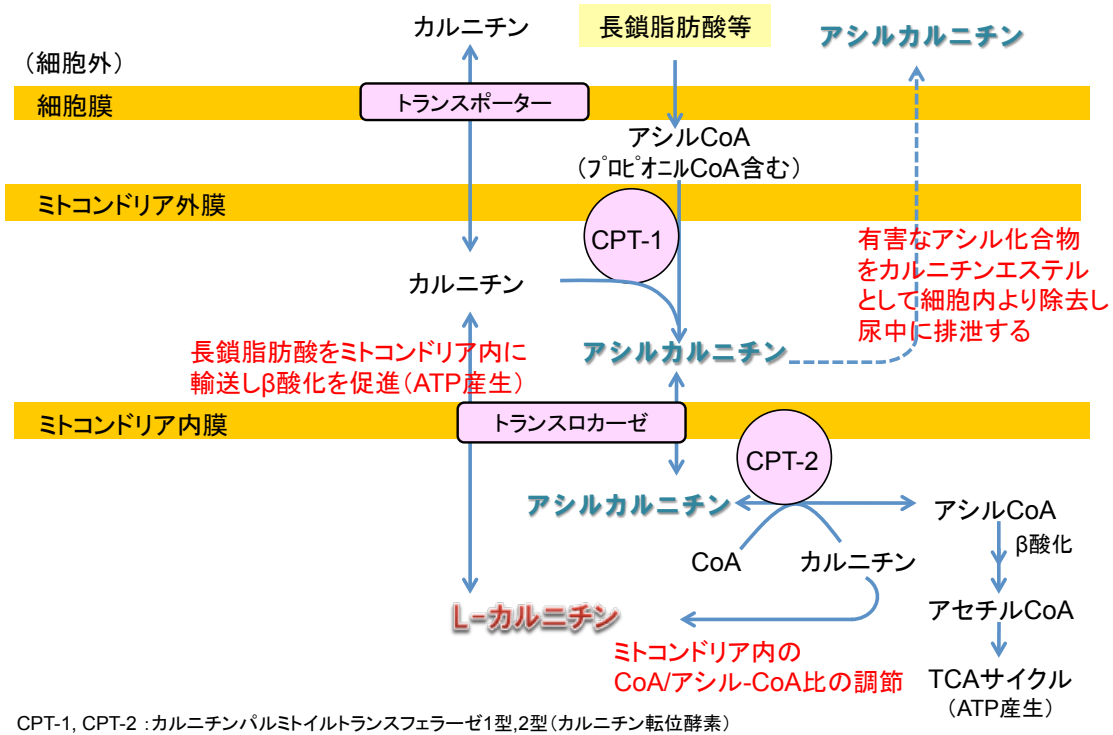


図 3 カルニチン回路, 生体内での作用 (文献[24]より一部改変)

2.2.2 脳における輸送と役割

脂肪酸はすべての組織でエネルギー源として利用される。しかし、

成人脳においてはグルコースが主たるエネルギー源であり、脂肪酸のβ酸化

によるエネルギー産生が寄与する割合は低いとされてきた。しかし近年、脂

肪酸もエネルギー源として脳で利用されることが報告され、総酸化エネルギー

のうち約20%がオクタノン酸によるものとされる[29]。カルニチンの血漿か

ら神経細胞への供給は Na ポンプ依存性であり[30, 31], 有機酸トランスポータである OCTN2 (Organic Cation Transporter 2)を介して脳血液関門を通過する[32-34]. カルニチンはその最短鎖エステル型であるアセチルカルニチン(C2カルニチン)として各組織に最も広く分布している[35]. 脳内におけるカルニチン濃度は末梢組織と比較して低いが, 脳内に最も高濃度で存在するのは視床下部である[36]. C2 カルニチン/C0 カルニチン比は脳において 1: 2 (心臓は 1: 4, 腎臓は 1: 10) と最も高い.

1998 年以來, いくつかのカルニチントランスポータが末梢組織に存在することが明らかとなった. C2 カルニチン合成酵素である carnitine acetyltransferase (CAT)はカルニチンの可逆的なアセチル化を触媒し, ミトコンドリア膜を介した酢酸, CoA, アセチル CoA の移動を調節している. 加齢に伴い, 前頭葉, 小脳におけるカルニチン含量が低下し, 小脳での CAT 活性が低下する[37]. CAT は海馬, 大脳基底核, 四丘体で高濃度に分布する一方, carnitine palmitoyltransferase (CPT)は視床下部で最も濃度が高い. カルニチン

の脳内での主要な役割の一つとして、アセチル CoA をミトコンドリアから細胞質に運搬し、アセチルコリンの合成に必要なアセチル基を供給することが挙げられる[38, 39].

2.2.3 カルニチンと認知症

ミトコンドリア機能不全や酸化ストレス状況下において、カルニチンが神経細胞に対して保護作用を示すことが知られるようになり、パーキンソン病や AD といった神経変性疾患においても保護的に働く可能性が示唆された[40]. AD 患者の脳は、タンパク、脂質、DNA に対する過剰な酸化ストレスにさらされている. AD の主要な病理のひとつである A β は過酸化脂質の産生を誘導し、神経細胞のアポトーシスに関与するとされる. 前述のように C2 カルニチンは脳内に豊富に分布しているが、アセチル CoA がミトコンドリア内膜を通過する際、アセチルコリン産生を促進し[38]、コリン過剰状態においてはカルニチンがアセチルコリン合成を促進することが培

養細胞系で確認されている[39]. C2 カルニチンの神経伝達物質としてのコリン作動性は明らかではないが, シナプス後膜に対する作用はなく[41], microdialysis を用いた検討において, C2 カルニチンが尾状核および海馬においてアセチルコリン放出を促進することから, シナプス前膜に対する作用が想定されている[42]ため, 認知症治療薬としての可能性が 1980 年代に検討されてきた. MCI~早期 AD 患者を対象にした 21 のランダム化比較試験のメタ解析によれば, C2 カルニチン 1.5~3 g/day の経口投与によってプラセボ群と比較して, Clinical Global Impression of Change (CGI-CH)や神経心理検査成績が3ヶ月以上にわたり改善した[43]. 軽度~中等度の認知症あるいは MCI 患者を対象にした 16 の無作為二重盲検試験無作のメタ解析では, C2 カルニチン 1-3 g /day を投与すると, 24 週時点までの MMSE, clinical global impression においては改善を示すが, それ以降 (~52 週) では改善を認めなかった [44]. また, 認知症患者におけるおよび脳脊髄液中血中の C0 カルニチン, アシルカルニチンを測定した検討では, 血中 C0 カルニチンは AD 群

において健常群より有意に低値であった。一方、脳脊髄液中 C0 カルニチン /アシルカルニチン比は AD で高値となる傾向を示したものの、脳脊髄液中濃度と血中濃度の間に相関はなかった。脳脊髄液中の C0 カルニチン、アシルカルニチンはともに健常群と比較して有意差を認めず、認知症の発症年齢、有病期間や重症度とも関連はなかった [45]。アシルカルニチンの神経細胞障害作用ならびに C2 カルニチン および C0 カルニチンによる神経細胞保護的作用の可能性については、これまでに以下に示す報告がある。

2.2.4 アポトーシスとの関連

Oxygen glucose deprivation を行ったラット海馬スライスにおいて C0 カルニチン補充を行うと、遊離カルニチン低下、アシルカルニチン上昇、CPT1 および CPT2 の低下をレスキューし、TUNEL staining で検出されるアポトーシスが抑制された[46]。また Jurkat cell において、C0 カルニチンは Fas ligation 惹起性のアポトーシス(caspase3,7,8 発現)を抑制する一方で、C16 カルニチン

はすべての caspase 活性を上昇させ、アポトーシスを誘導した[47]. ラット海馬の初代神経細胞において、C2 カルニチン (50 μM)は serum deprivation, NMDA, A β (25-35)による細胞障害を減少させた[48].

2.2.5 酸化ストレスとの関連

Sprague-Dawley Rat において、C2 カルニチン投与により、抗酸化反応が増強し、低圧/低酸素誘発性の海馬 CA1 神経細胞に対する障害が軽減し、記憶障害を改善したとする報告がある[49]. 大脳皮質神経細胞を用いた系において、C2 カルニチン (75 μM)および α -lipoic acid (LA; 50 μM)の co-treatment により HNE(4-Hydroxy-2-nonenal; 不飽和脂肪酸の過酸化物質)による酸化ストレスが低減され、この作用は PI3K/Akt 経路, ERK1/2 経路の活性化を介することが示されている[50].

2.2.6 *In vivo* の検討

ラットに C2 カルニチンを 2 週間投与すると, GSK-3 β (tau タンパクの過剰リン酸化に関与) 活性化に拮抗することによって WT/GFX 誘発性の空間認知が改善され, 海馬における c-Fos, synapsin I といった記憶に関連するタンパク発現が増強された[51]. 16 ヶ月齢の F-344 ラットに 6 ヶ月間 C2 カルニチンを投与すると, T-maze タスクにおける長期記憶が改善した[52]. C2 カルニチンは Okadaic Acid 誘発性のタウの過剰リン酸化を抑制し, ラットにおいて空間記憶を改善した[53]. また, C2 カルニチンがアミロイド断片による神経毒性を緩和し[54, 55], ApoE4 Transgenic マウスに C2 カルニチン + LA を 5 ヶ月投与すると 12 ヶ月齢時の water maze における空間認知能力が改善することが報告されている[56].

以上から, C2 カルニチンは抗酸化作用あるいはアポトーシス経路の抑制により細胞死に対して保護的に作用し, 長鎖アシルカルニチンはアポトーシス誘導など介して細胞障害的に働くことが想定される. 神経系に対しては, C0 カルニチンあるいは C2 カルニチンが保護的に作用することが示唆さ

れているが、一方で長鎖アシルカルニチンの作用については検討がなされて
いない。従って、アシルカルニチン分画による作用の差異も含めて、アシル
カルニチンの神経系細胞への作用を検討するに至った。

3 目的

神経系培養細胞を用いた系において、カルニチン分画（C0 カルニチン、アシルカルニチン）に注目し、これらの神経細胞への作用および、それらの分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

また、東京大学医学部附属病院老年病科もの忘れ精査入院患者において、血清カルニチン分画を測定し、認知機能に関する神経心理学的検査との関連を検討する。

4 方法

4.1 材料

培養細胞を使用した基礎医学的検討では、マウス neuroblastoma 由来の Neuro-2a 細胞 (American Type Culture Collection: ATCC, CCL-131®) を用いた。試薬は L-carnitine hydrochloride (C0 カルニチン; C0283, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 短鎖アシルカルニチンとして Acetyl-L-Carnitine (C2 カルニチン; A6706, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), DL-Hexanoyl Carnitine, (C6 カルニチン; H2132, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 中鎖アシルカルニチンとして Octanoyl Carnitine (C8 カルニチン; 0605/50, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), Lauroyl-L-Carnitine (C12 カルニチン; CR25305, Crystal Chem Inc., Illinois, USA), 長鎖アシルカルニチンとして Myristoyl-L-Carnitine (C14 カルニチン; CR31535, Crystal Chem Inc., Illinois, USA), Palmitoyl-L-Carnitine (C16 カルニチン; CR22536, Crystal Chem Inc., Illinois, USA), Stearoyl-L-Carnitine (C18 カルニチン; CR 18537, Crystal Chem Inc., Illinois, USA) をそれぞれ滅菌蒸留水に溶解し, stock solution として 10^{-2} M に調製した。

培養液は DMEM high glucose (4.5 g/L glucose, D6429, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

に 10 % fetal bovine serum, penicillin/ streptomycin を添加したものを使用した。

4.2 アッセイ

細胞生存率の測定には MTS assay として, CellTiter 96® AQueous One

Solution Cell Proliferation Assay (G3581, Promega, Madison, USA)を用いた。MTS

テトラゾリウム化合物が生細胞の代謝活性のあるデヒドロゲナーゼによって

生物学的に還元され, 組織培養液中に可溶性発色性のホルマザン産物に変換

されることを利用している。細胞刺激終了時に培地の 1/5 量に相当する溶液を

加え, 37°C にて 1 時間インキュベートした。120 μ L を 96well plate に移し,

490 nm における吸光度を測定することで, 陰性コントロールに対する百分率

を求め細胞生存率とした。細胞毒性の測定には Cytotoxicity Detection Kit®

MK-401(TaKaRa, Osaka, Japan)を使用した。培養上清 100 μ L につき等量の反

応混合液 (Catalyst : Dye solution= 1:45<容量比>で要事調製) を加え, 室温遮

光下で 30 分間インキュベートした後に 490 nm における吸光度を測定した。

各測定値から培地に含まれる FBS 由来の LDH 放出バックグラウンドを差し引き、陰性コントロールに対する比率を細胞障害の指標とした。

4.3 アシルカルニチンの細胞毒性評価

アシルカルニチンとして C2, C6, C8, C12, C14, C16, C18 カルニチンを用い、これらの細胞傷害性を検討するために次の実験を行った。Neuro-2a 細胞を 24 well plate に 1×10^4 cells/well で播種後、37°C、48 時間培養を行い、各濃度に調製したアシルカルニチン各分画を、10, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ M の各濃度で添加し 37°C、6 時間培養した。この培養上清を LDH assay に、培養上清を取り除いたのちに MTS reagent を混合した新鮮な DMEM に培地交換し、MTS assay を行った。

4.4 タンパク抽出

Neuro-2a 細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well で DMEM にて巻き込み, 48 時間後に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % Deoxycholic acid, 0.1% SDS) に Protease inhibitor cocktail 錠 (complete Mini®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) および Phosphatase inhibitor cocktail 錠 (PhosSTOP®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を各々 1 錠ずつ溶解した Lysis buffer (4°C以下) を調整し, 各ウェルに 150 μ L 加えセルスクレーパーで回収後, 15,000rpm にて 15 分遠心分離し, その上清をタンパク溶解液として回収した. 各サンプルのタンパク濃度は Pierce® BCA Protein Assay Kit (#23227, Thermo scientific, Illinois, USA) を用いて測定した.

4.5 SDS-PAGE および Western-Blot 法

1 サンプルあたり, タンパク量として 10 μ g を使用し, Sample buffer (0.05 M Tris-HCl; pH 6.8, 2 % SDS, 6 % 2-mercaptoethanol, 10 % glycerol, bromophenol blue) を加え, 95°C にて 5 分間加熱処理後, SDS-polyacryl amide gel (和光純薬工業株式会

社, 大阪, 日本)で 20 mA 定電流で電気泳動し, 分離したタンパクを Polyvinildene difluoride 膜 (fluoroTrans® 0.2 μ m, Pall Corporation, New York, USA)に転写した.

その後 5% skim milk を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った. 5% skim milk にて希釈した 1 次抗体 (Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185); #4668 Rabbit monoclonal IgG; 1:1000; Cell Singnaling Technology, Inc, Danvers, USA, SAPK/JNK; #9258 Rabbit monoclonal IgG; 1:2000; Cell Singnaling Technology, Inc, Danvers, USA, Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182); #4511 Rabbit monoclonal IgG 1:1000; Cell Singnaling Technology, Inc, Danvers, USA, p38 MAPK; #8690 Rabbit monoclonal IgG 1:1000; Cell Singnaling Technology, Inc, Danvers, USA, beta-tubulin; T4026 mouse monoclonal IgG; 1:5000; SIGMA-ALDRICH, Missouri, USA) , beta-actin (#3700 Mouse monoclonal IgG; 1:5000; Cell Singnaling Technology, Inc, Danvers, USA)を振盪しながら 4℃で一晩反応させた後, TBST で各 10 分間 3 回洗浄を行った. TBST で希釈した二次抗体 ; Horseradish-Peroxidase labeled, Anti-rabbit IgG, Anti-mouse IgG (1:5000; Amersham, Buckinghamshire, Great Britain) を室温で振盪しながら 1 時間反応させたのち, TBST

にて 10 分間 3 回洗浄した。タンパクの発現は enhanced chemiluminescence detection system (ECL Prime®: GE Healthcare, Buckinghamshire, Great Britain)法によって発光させ、Amersham Hyperfilm ECL® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Great Britain)にて検出した。

4.6 MAPK 阻害剤を用いた検討

JNK Inhibitor II (SP600125, Cat#420119, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), p38 inhibitor (SB203580, Cat# 559398, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)を DMSO に溶解して 10^{-2} M stock solution を調製し, C18 カルニチン添加の 1 時間前に final 10^{-6} M になるよう pre-treatment を行った。

4.7 アポトーシスの検出

Cell Death Detection ELISA PLUS (Cat# 1774425, Roche, Mannheim, Germany)を用い, ヒストンおよび DNA に対してそれぞれ特異性の高いマウス

モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法に基づき，細胞溶解液中の細胞質分画内に存在するヌクレオソームを検出することを測定原理としている．405 nm を対照として，490 nm にてプレートリーダーにて吸光度を測定し，陰性コントロールとしての DMSO に対する分光度の比をもって，C18 カルニチン，MAPK 阻害剤を添加した際のアポトーシスの変化を検出した．

4.8 Reactive Oxygen Species (ROS)の検出

Neuro-2a 細胞を 1×10^4 cells/well で 24 well プレートにまきこみ，48 時間後に FBS free の DMEM に DCFH-DA 試薬(OxiSelect® Intracellular ROS Assay Kit, catalog STA-342-T, Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA)を最終濃度 1 mM で混合したものに交換し，遮光して 1 時間インキュベートした．培地を取り除き，PBS wash ののち，新鮮な DMEM に交換し，C18 カルニチン刺激 ($60 \mu\text{M}$)を行った．過酸化水素 (H_2O_2) 1 mM を陽性コントロールとし，遮光し，経時的に緑色蛍光にて細胞内 ROS 産生を蛍光顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE,

Osaka, Japan) にて観察した.

4.9 患者母集団

平成 23 年 7 月から平成 25 年 2 月の期間に当科に認知症精査目的で入院し、同意を得られた患者 116 名を母集団とした。下記診断基準により、解析は認知機能正常群、軽度認知機能障害 (MCI) 群、AD 群のみを抽出し、早朝空腹時に静脈採血を行い、酵素サイクリング法 (日本 SRL) により血清総カルニチン、C0 カルニチンを測定した。アシルカルニチンは総カルニチンより C0 カルニチンを引いた値を用いた。年齢、性別、BMI を算出し、簡易認知機能検査 (長谷川式簡易知能スケール: HDS-R[57], Mini Mental State Examination: MMSE[58]) とカルニチン分画との関連を解析した。なお、本研究は東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認を経て遂行され (承認番号 G-2933)、患者 (認知症などの疾患により患者本人の意思が確認できない場合は患者家族) の書面による同意を得た上で行った。血清総カルニチン、お

よび C0 カルニチン濃度は酵素サイクリング法によって測定した（測定委託先：(株)ビー・エム・エル）。測定原理としては、カルニチンをデヒドロカルニチンに酸化するカルニチン脱水素酵素(CDH)と、チオ NAD⁺および NADH の 2 種の補酵素を組み合わせ、CDH の逆反応を利用して NADH により還元することでデヒドロカルニチン量を一定に保ち、チオ NADH の生成速度を測定することでカルニチン濃度を求める（図 4）[59]。本法は、① 除たんぱく操作が不要、② 検体中の共存物質であるビリルビン、ヘモグロビンなどの干渉を受けない、③ 高感度で、低濃度（5 μM）のカルニチンでも良好な再現性を示す、④ 検量曲線検量曲線は 200 μM まで直線性が認められる、などの利点をもつ。

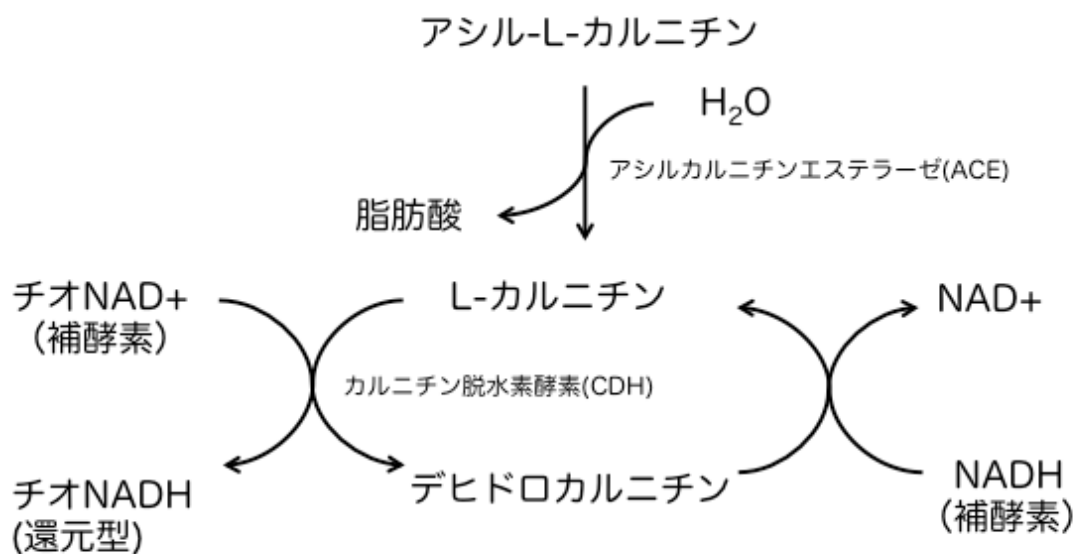


図 4 酵素サイクリング法の測定原理 (文献[59]より一部改変)

さらに、各群から偏りのないよう任意に抽出した（健常群 N=27, AD 群 N= 16, MCI 群 N= 6, 計 49 名）の凍結血清を NPO 法人 タンデムマス・スクリーニング普及協会（島根大学医学部医学部小児科内）に提出し、タンデムマス分析（MS/MS; MS =mass spectrometry）による血清アシルカルニチン分画測定を行い、認知機能との関連を検討した。なお、MS/MS は、直列に接続された質量分析器を用いて、その間に衝突活性化室をもつ装置である[60]。分析対象となる試料に高電圧など高エネルギーを与えることでイオン化させ、

質量電荷比に応じて分離・検出する方法で、1台目のMSにおいて特定の質量数のイオンのみを選択して衝突活性化室に導き、不活性ガスと衝突させ、その結果生じた二次的なプロダクトイオンを2台目のMSで検出することを測定原理としている。なお、既存のバイオマーカーである髄液 A β 40 および 42、リン酸化 tau、総 tau の測定や筋肉量、体脂肪率の測定は実験計画の段階で含まれておらず、実施していない。

4.10 診断

各群の病型診断について、MCI は Petersen らによる診断基準：A. 主観的なもの忘れの訴えがある、B. 年齢に比し記憶力が低下（記憶検査で平均値の 1.5SD 以下）、C. 日常生活動作は正常、D. 全般的な認知機能は正常、E. 認知症は認めない、に拠った[61]。AD は NIA-AA ワーキンググループによる probable AD の診断基準[62]に拠った。具体的には、認知症の診断基準に加えて、次の A~D を満たすこと：A. 潜行性の発症、B. 明らかな認知機

能低下の病歴, C. 以下 a, b いずれかの認知機能低下が明らか; a. 記憶の低下, b. 記憶以外の低下として①言語症状 (特に語想起の障害), ②視空間認知の障害, ③実行機能障害, D. 血管性認知症, レビー小体型認知症, 前頭側頭型認知症, 意味性失語, 進行性非流暢性失語, 神経疾患, 内科疾患, 認知機能に影響を及ぼす薬剤の内服などの特徴を有しない, である.

4.11 統計解析

基礎実験の統計解析には StatView for Windows (version 5.0, SAS Institute Inc., North Carolina, USA)を用いて ANNOVA post hoc analysis を行い, 平均 \pm S.E.で示した. 臨床データ解析には JMP (version 11.0.0, SAS Institute Inc., North Carolina, USA)を用いた.

5 結果

5.1 基礎的検討

アシルカルニチンの分画(C0, C2, C6, C8, C12, C14, C16, C18 カルニチン)に注目して培養細胞生存に与える影響を検討することにした。神経系培養細胞を用いてアシルカルニチンを添加したことによる細胞生存率, 細胞毒性の検討, これらに関わるシグナル経路, MAPK 阻害薬を用いた機能的意義についても解析を行った。

5.1.1 アシルカルニチンの細胞傷害性 (図 5, 6, 7, 8)

対陰性コントロール (NC) 比で示すように, MTS assay, LDH assay を用いた 3 時間および 6 時間作用による Neuro-2a 細胞への生存率の検討では, 短鎖・中鎖アシルカルニチンは神経細胞障害性を示さなかったが, 長鎖アシルカルニチンでは側鎖の炭素数が増加するほど細胞障害性が有意に増加した (図 5, 6)。中鎖～長鎖アシルカルニチンの濃度変化による細胞障害性の検討では (図 7, 8), 3 時間, 6 時間いずれの作用時間においても長鎖カルニチンではより低濃度から細胞障害性

が強く認められ、その障害性は濃度依存的であった。

5.1.2 アシルカルニチン分画によるアポトーシスへの影響 (図 9)

短鎖, (C2 カルニチン), 中鎖 (C8 カルニチン), 長鎖 (C14, C16, C18

カルニチン) を $60 \mu\text{M}$ で 24 時間作用させた際のアポトーシスへの影響を Cell

Death Detection ELISA にて検討した。C16, C18 カルニチンでは陰性コントロ

ールと比較し有意にアポトーシスが誘発された。

5.1.3 C18カルニチンによる細胞内シグナル伝達への影響(図 10, 11, 12, 13)

長鎖カルニチンが神経細胞において細胞障害, およびアポトーシス

を有意に増加させたため, 関与する細胞内シグナルの解析を行った。長

鎖アシルカルニチンとして C18 カルニチンを Neuro-2a 細胞に作用させた

際の MAPK 経路に与える影響を cell lysate を用いた Western blotting を用

いて検出した。C18 カルニチン $60 \mu\text{M}$ を 1, 3, 6, 24 時間作用させ, 経時

的に p38 および JNK のリン酸化を検討した。この時系列においては p38, JNK とともに 1 時間の時点でのリン酸化が最大となった。次に、各カルニチン分画を 60 μ M の濃度で 1 時間, 3 時間, 6 時間作用させると, 短鎖および中鎖アシルカルニチンには p38 JNK リン酸化は変化しなかったが, 長鎖アシルカルニチンでは C16, C18 カルニチンが有意に p38, JNK のリン酸化を亢進させた (図 11, 12, 13)

5.1.4 MAPK 阻害薬を用いた検討

5.1.4.1 細胞障害性への影響 (MTS assay, LDH assay; 図 14, 15)

p38 阻害薬である SB20358, JNK 阻害薬である SP600125 を pretreat した 1 時間後に C18 カルニチン 60 μ M を投与すると, SB20358 群では C18 カルニチンによる 3 時間後の細胞障害性が部分的に抑制された。一方, SP600125 では細胞障害性を抑制することができなかった。SB20358, SP600125 の単独投与では細胞障害に影響は認めなかった。

5.1.4.2 アポトーシスへの影響 (Cell Death Detection ELISA; 図 16)

C18 カルニチン投与によって誘導されたアポトーシスは SB20358 の pretreat 群で部分的に抑制され, SP600125 では抑制されなかった. 阻害剤単独投与ではアポトーシスに変化を認めなかった.

5.1.5 C18 カルニチンによる細胞内 ROS 産生 (図 17)

陽性コントロールとして過酸化水素 (1 mM) を投与し, Neuro-2a 細胞において細胞内 ROS 産生が増加することを確認した. C18 カルニチン投与から 15 分の時点で細胞内 ROS 産生が亢進し, 1 時間でピークとなり, 2 時間の時点まで残存した.

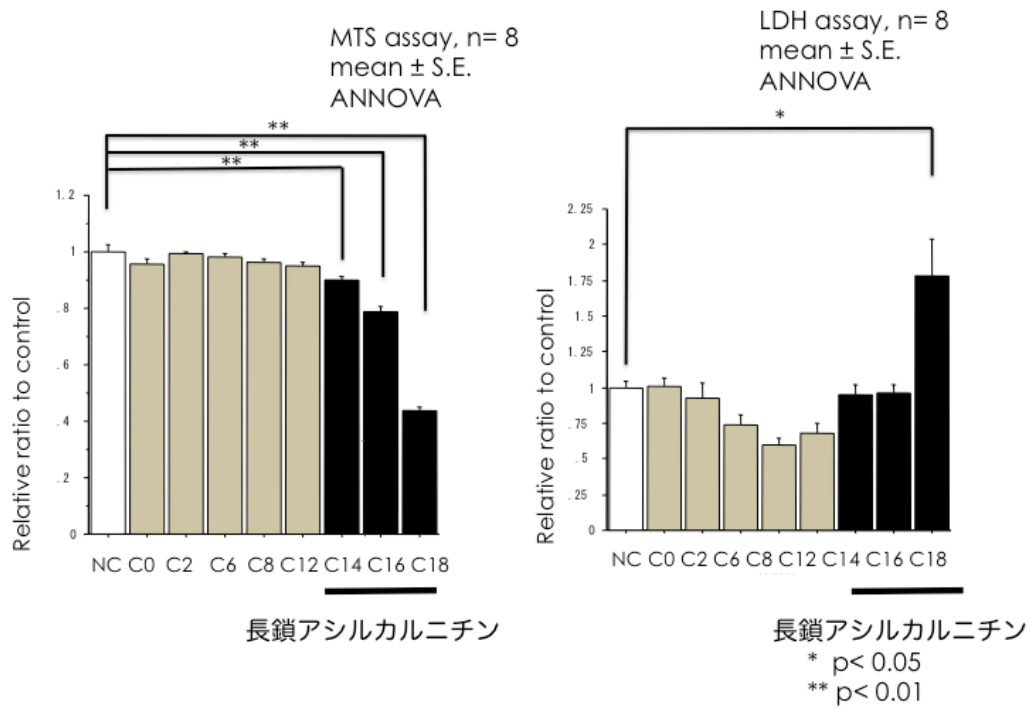


図 5 Neuro-2a 細胞にアシルカルニチン分画を 3 時間作用させた際の MTS, LDH assay (対 NC(陰性コントロール)比, n= 8)

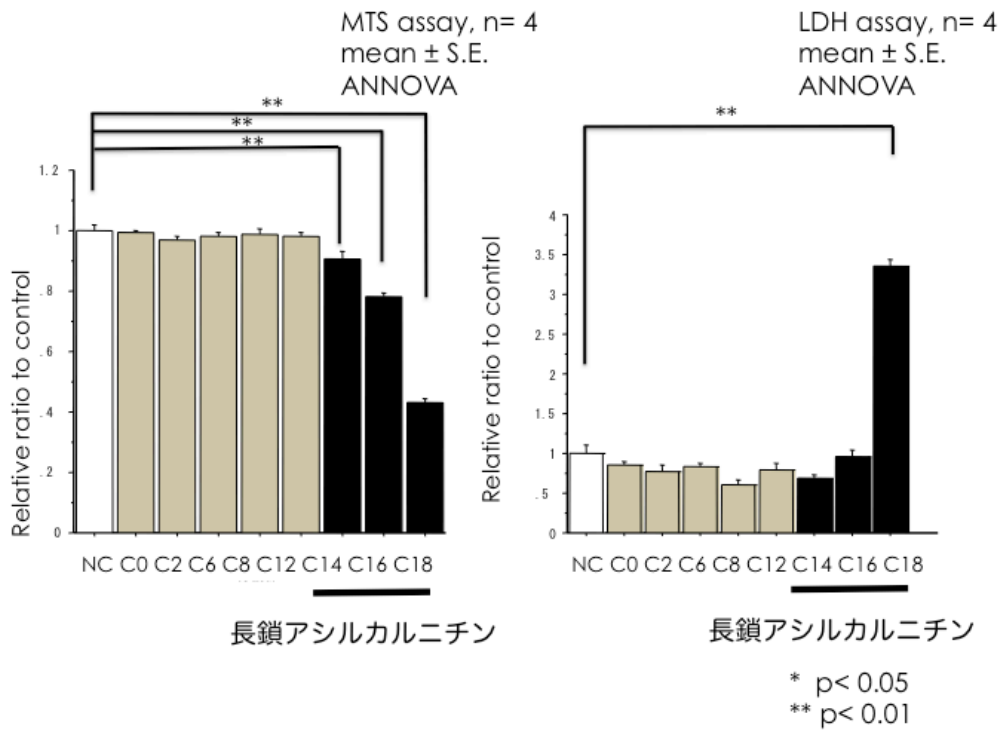


図 6 Neuro-2a 細胞にアシルカルニチン分画を 6 時間作用させた際の MTS, LDH assay (対 NC(陰性コントロール)比, n= 4)

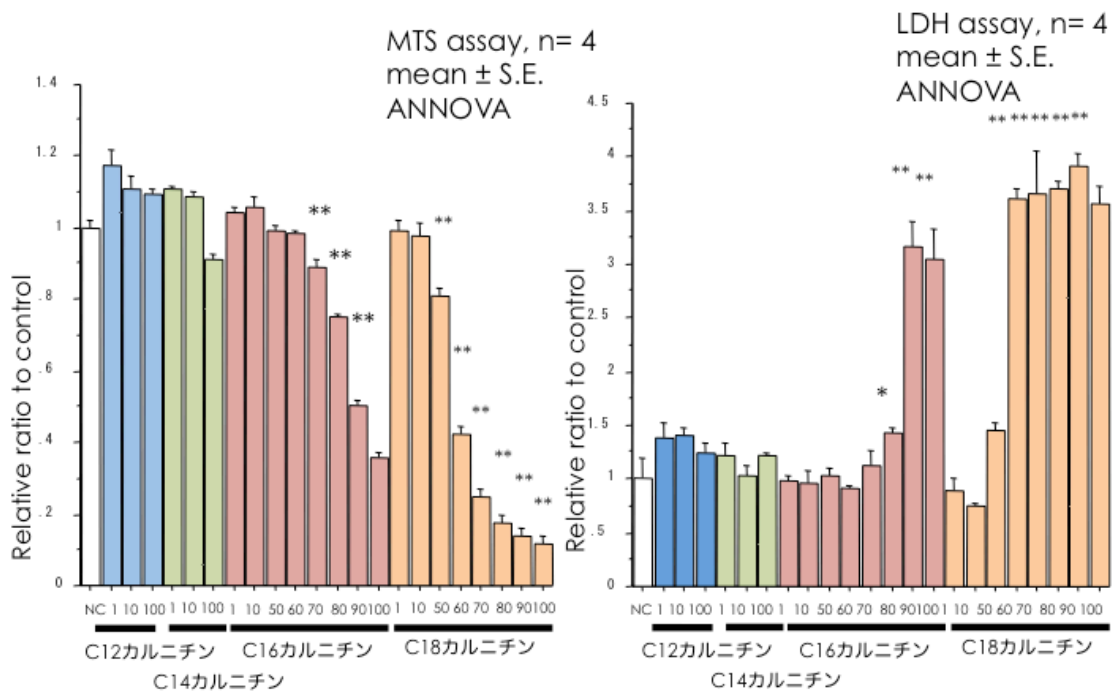


図 7 長鎖アシルカルニチンの Neuro-2a 細胞障害における濃度依存性 (3 時間)

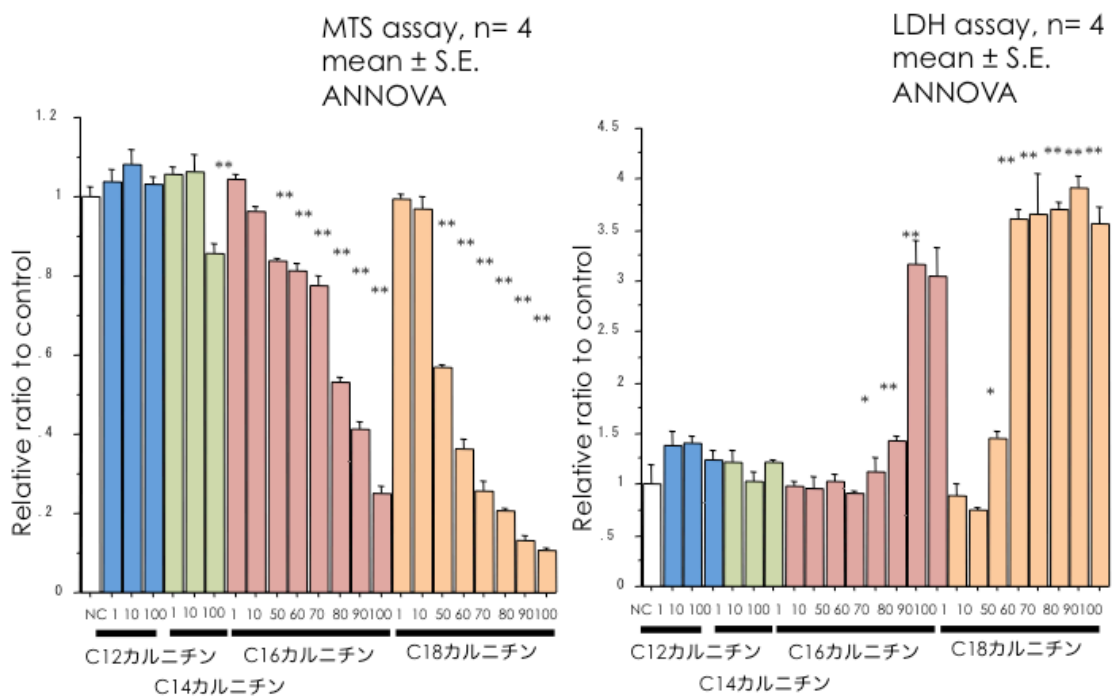


図 8 長鎖アシルカルニチンの Neuro-2a 細胞障害における濃度依存性 (6 時間)

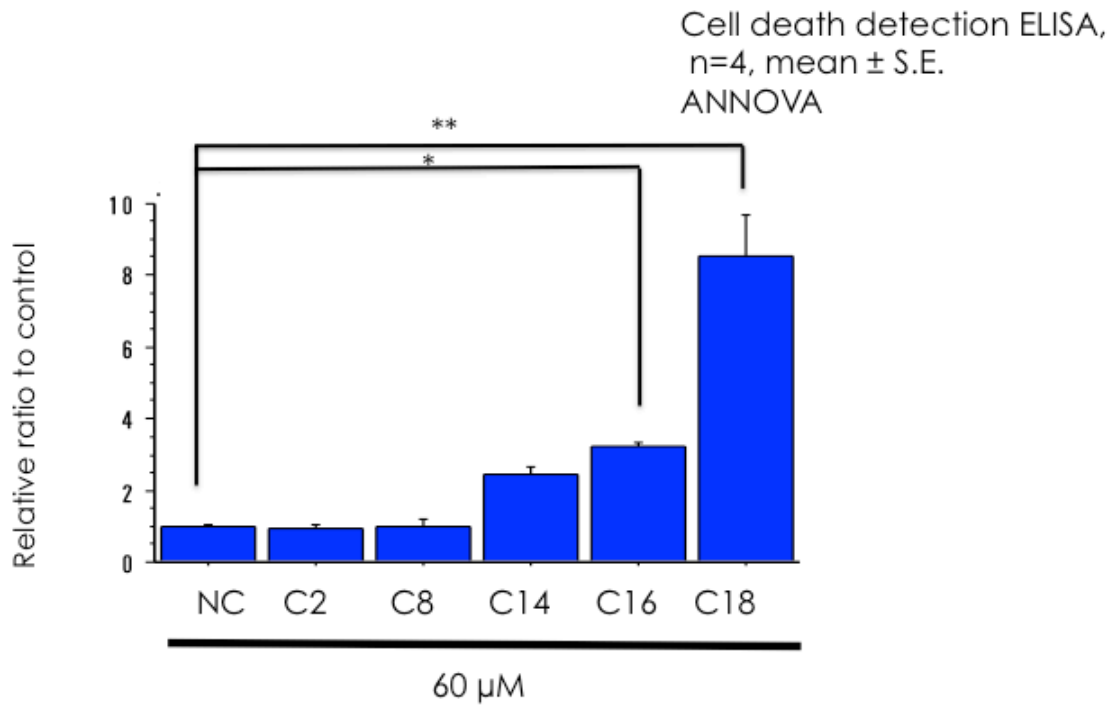


図9 アシルカルニチン分画によるアポトーシスへの影響 (24時間)

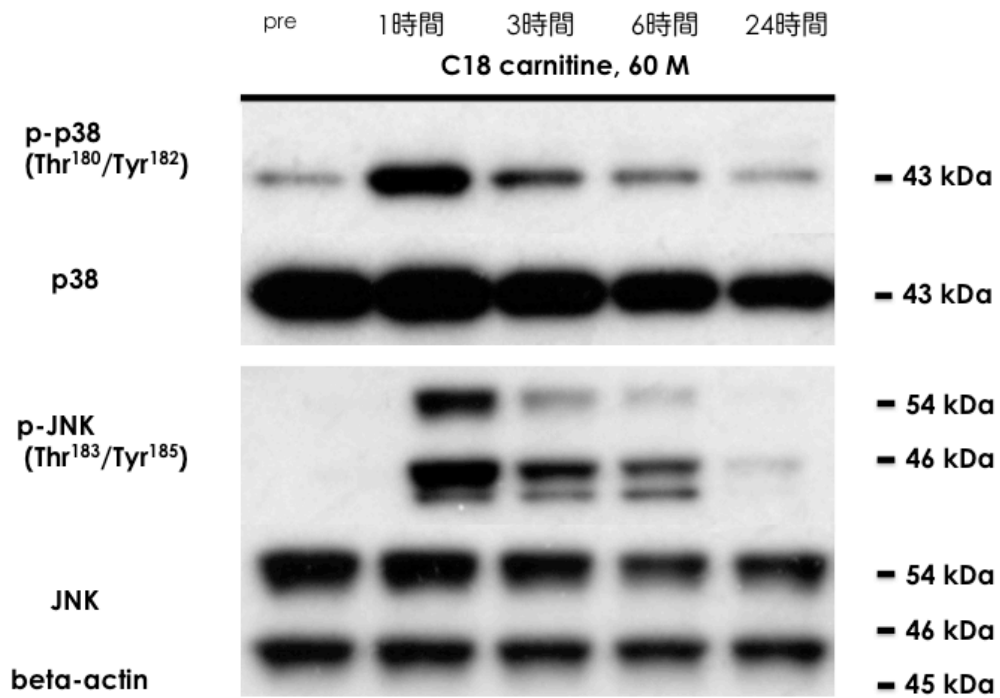


図10 C18カルニチン作用によるMAPKの経時的変化(n=3, representative data)

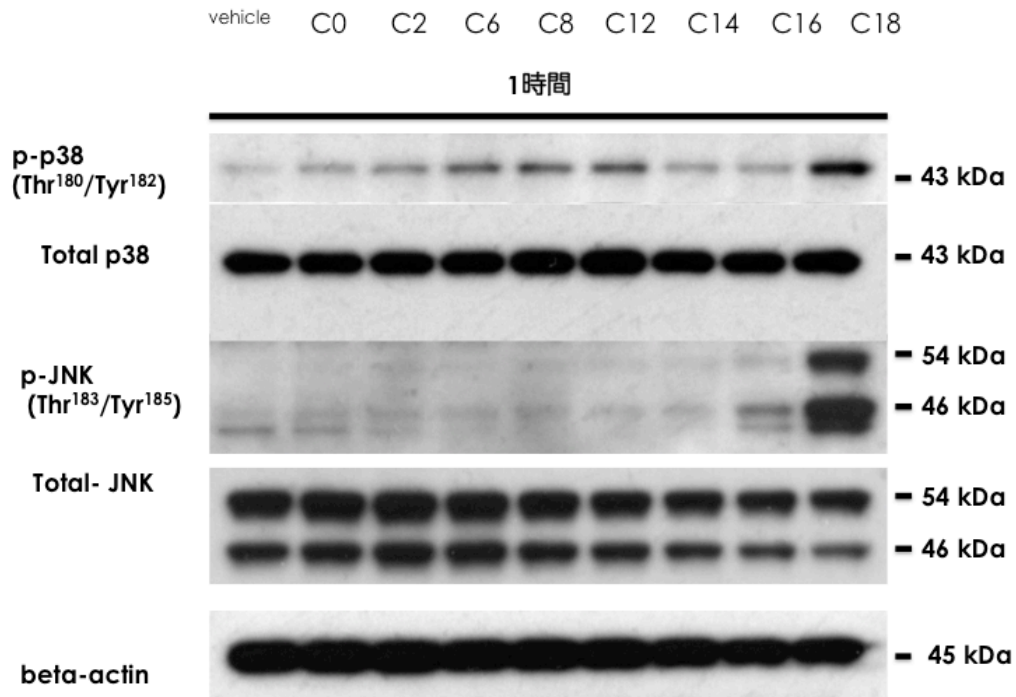


図 11 アシルカルニチン分画による MAPK の変化 (1 時間) (n=3, representative data)

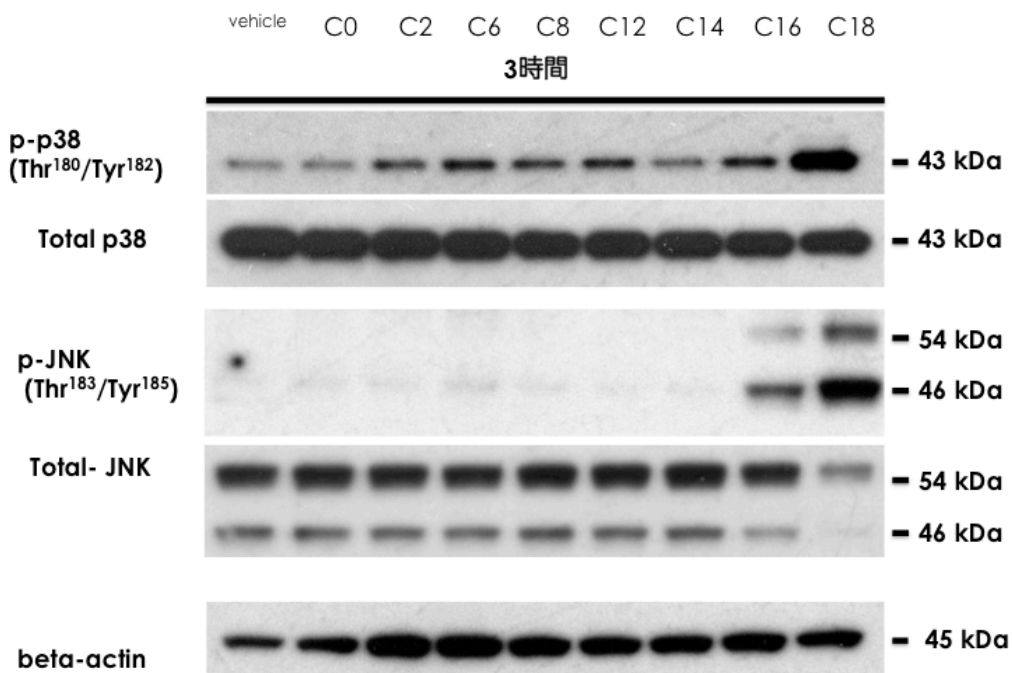


図 12 カルニチン分画による MAPK の変化 (3 時間 ; n=3, representative data)

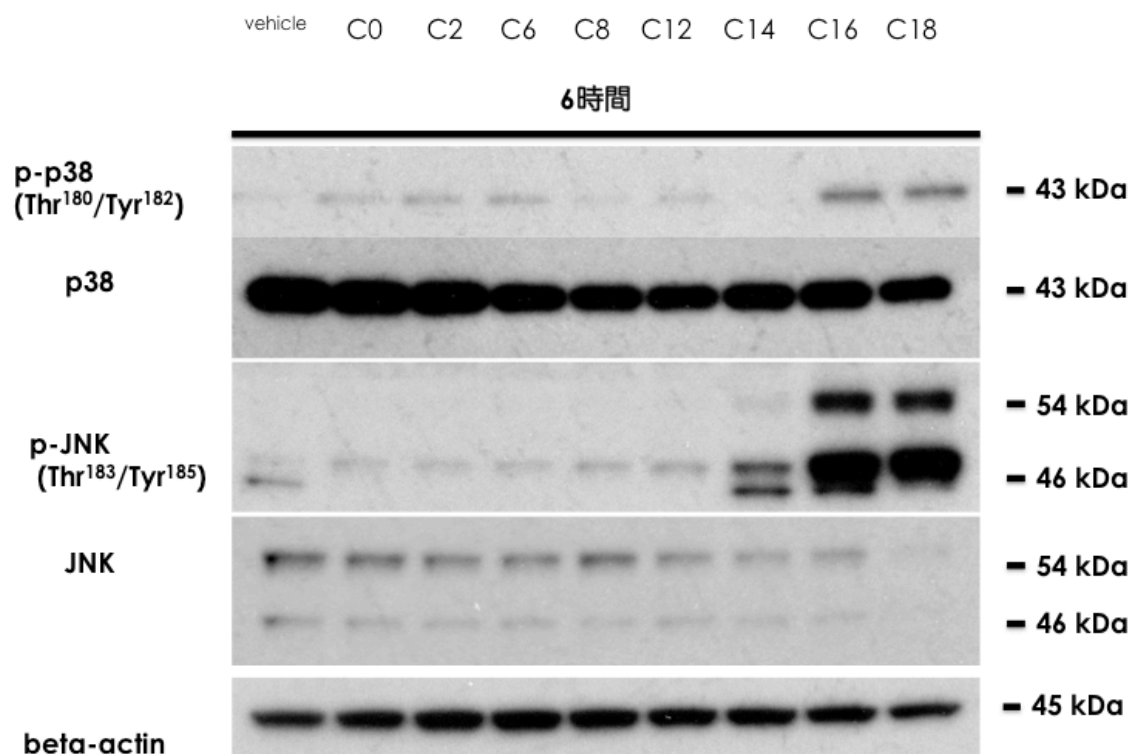
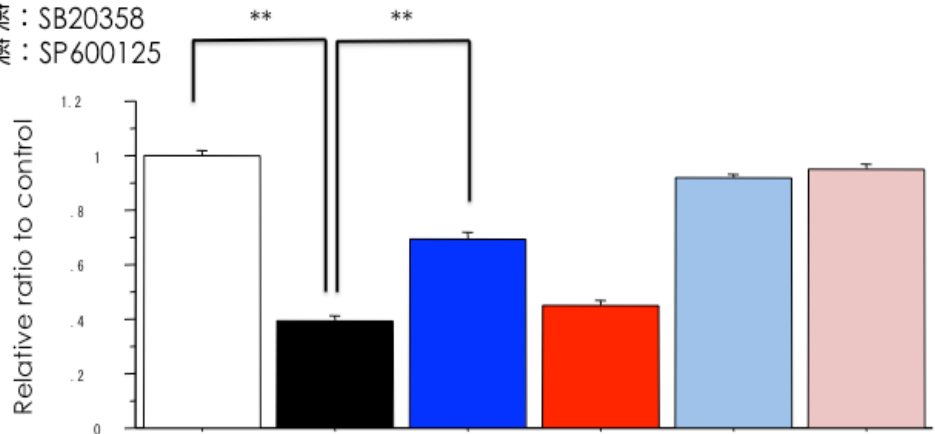


図 13 カルニチン分画による MAPK の変化 (6 時間 ; n=3, representative data)

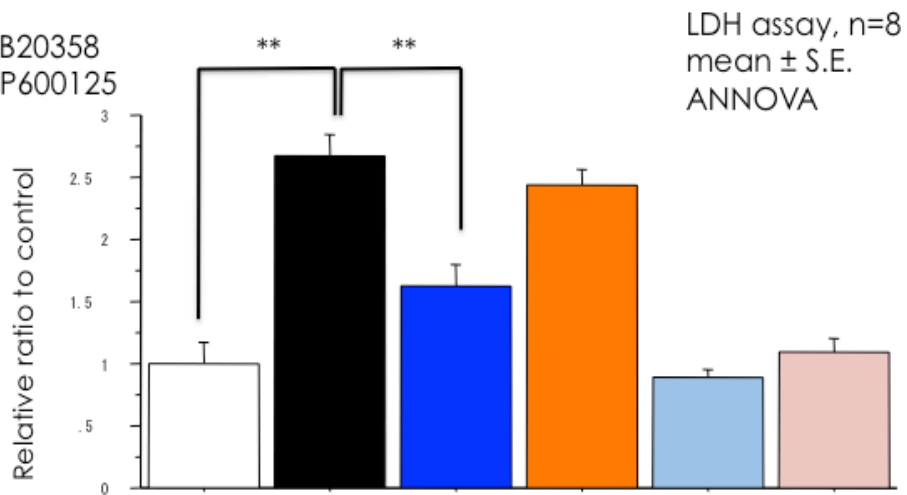
p38阻害薬：SB20358
 JNK阻害薬：SP600125



	濃度	①	②	③	④	⑤	⑥
C18カルニチン	60 μM	-	+	+	+	-	-
SB20358	10 ⁻⁶ M	-	-	+	-	+	-
SP600125	10 ⁻⁶ M	-	-	-	+	-	+

図 14 MAPK 阻害薬による細胞障害の変化 (MTS assay ; 3 時間)

p38阻害薬：SB20358
 JNK阻害薬：SP600125



C18カルニチン	60 μM	-	+	+	+	-	-
SB20358	10 ⁻⁶ M	-	-	+	-	+	-
SP600125	10 ⁻⁶ M	-	-	-	+	-	+

図 15 MAPK 阻害薬による細胞障害の変化 (LDH assay ; 3 時間)

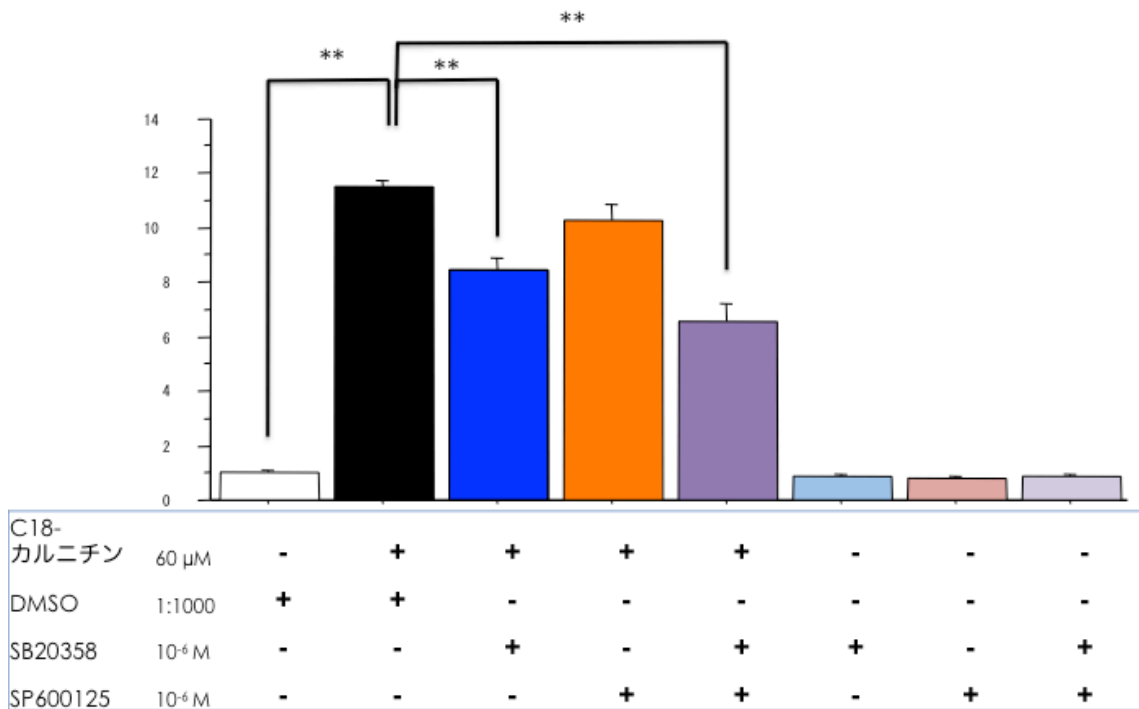


図 16 MAPK 阻害薬によるアポトーシスの変化 (Cell Death Detection ELISA ; 24 時間)

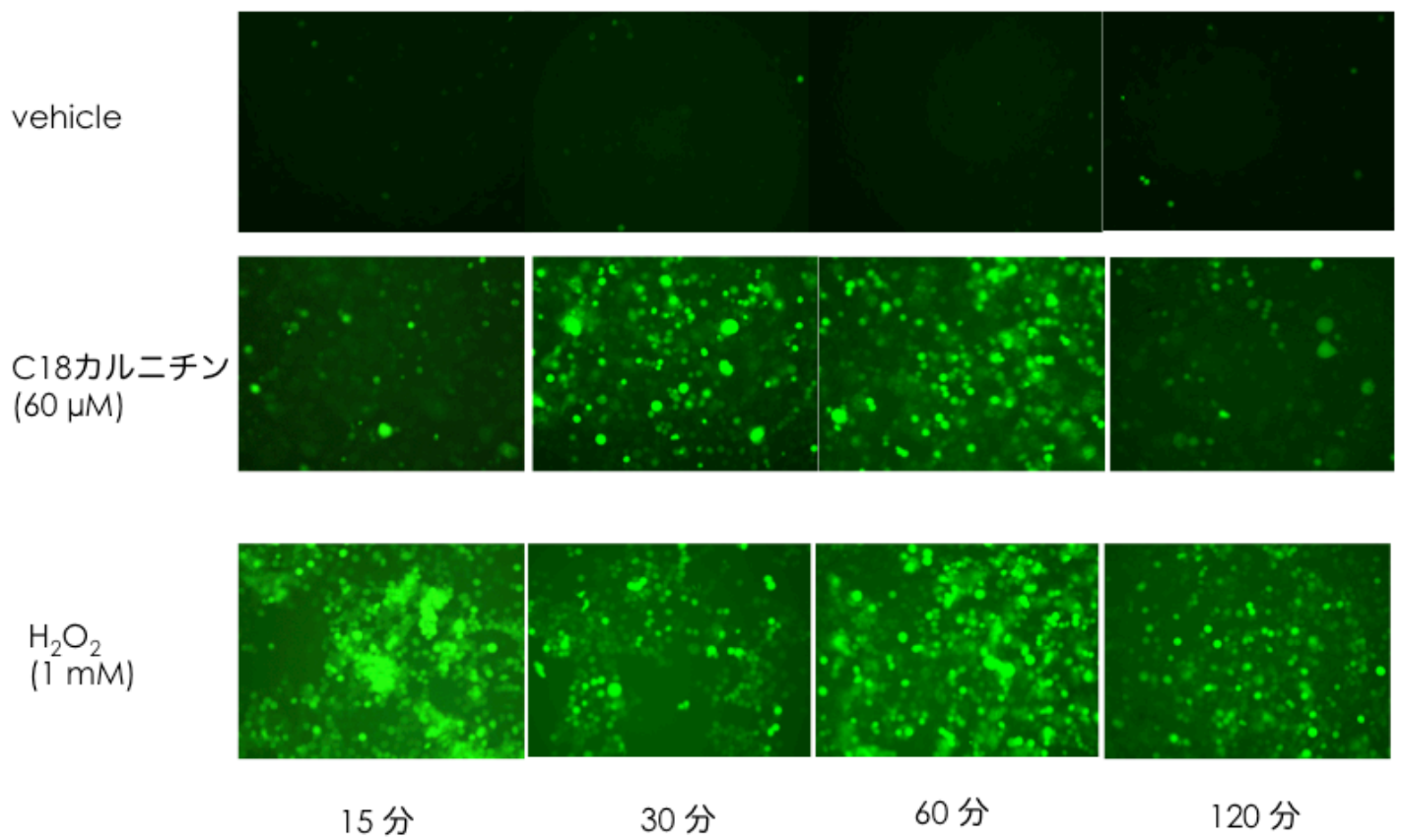


図 17 C18 カルニチンによる ROS 産生の経時的変化

5.2 臨床的検討

5.2.1 患者背景 (表 1)

全患者 116 名から認知機能正常群, MCI, AD 群を抽出し, 解析対象となった総数は 90 名であり, 診断別の内訳を表 1 に示す.

5.2.2 血清カルニチン濃度 (表 2)

酵素サイクリング法にて測定した早朝空腹時採血における血清カルニチン濃度は下記の通りである. 性別間に有意差は認めなかった.

5.2.3 タンデムマス解析によるカルニチン分画測定 (表 3, 図 18)

凍結血清保存されていた患者のうち, 49 名においてアシルカルニチンのタンデムマス解析による測定を行った. 各分画の度数分布および, 酵素サイクリング法とタンデムマス解析による測定値の相関を示す. 全分画中もっとも濃度が高いのは C0 カルニチンであり, アシルカルニチン分画中では C2 カルニチンが最も濃度が高く, 長鎖アシルカルニチンはいずれも C2 カルニチンと比較するとごく微量であった.

5.2.4 酵素サイクリング法によるアシルカルニチン値とタンデムマス解析による各アシルカルニチン分画総和の相関 (図 19)

酵素サイクリング法によるアシルカルニチン値 (縦軸) はタンデムマス解析において C2~C18 分画の総和 (横軸) に相当すると考えられ、これらの測定値の相関を検討した。Pearson's Correlation Coefficient = 0.9367 と両者は良好な相関を示した。

5.2.5 酵素サイクリング法による血清中カルニチン濃度と認知機能の相関 (表 4, 図 20)

酵素サイクリング法による血清中総カルニチン, C0 カルニチン, アシルカルニチン値単独と認知機能にいずれも有意な相関を認めなかった。一方で, 血清中アシルカルニチン/C0 カルニチン比は, 認知機能: HDS-R と $R = -0.272$, MMSE と $R = -0.259$ に示されるように弱いながらも統計学的には有意な負の相関を示した。

5.2.6 タンデムマス解析によるアシルカルニチン分画と認知機能の相関
(表 5)

タンデムマス解析を実施したサンプルにおいては、C0 カルニチン、C2 カルニチン、C0+C2 カルニチン、アシルカルニチン/C0 カルニチン比、長鎖アシルカルニチン/C0 カルニチン比、長鎖アシルカルニチン/C2 カルニチン比、長鎖アシルカルニチン/C0+C2 カルニチン比のいずれの指標を用いても、HDS-R、MMSE で表される認知機能と有意な相関は認められなかった。

5.2.7 認知機能別のアシルカルニチン/C0 カルニチン比 (図 21, 22)

臨床的にカットオフとされる HDS-R 得点 20/21, MMSE 得点 23/24 によって 2 群に分けた群間比較で、アシルカルニチン/C0 カルニチン比 (酵素サイクリング法)、アシルカルニチン総和/C0 カルニチン比 (タンデムマス解析) はいずれも有意差を認めなかった。

性別 (男/ 女)	25/65
平均年齢(歳 ± S.D.)	79.1 ± 6.6
BMI (kg/m ² ± S.D.)	21.8 ± 3.6
病型(人数)	AD (51) MCI (28) normal (11)
HDS-R (点 ± S.D.) (/30)	20.3 ± 6.3
MMSE (点 ± S.D.) (/30)	22.4 ± 5.1

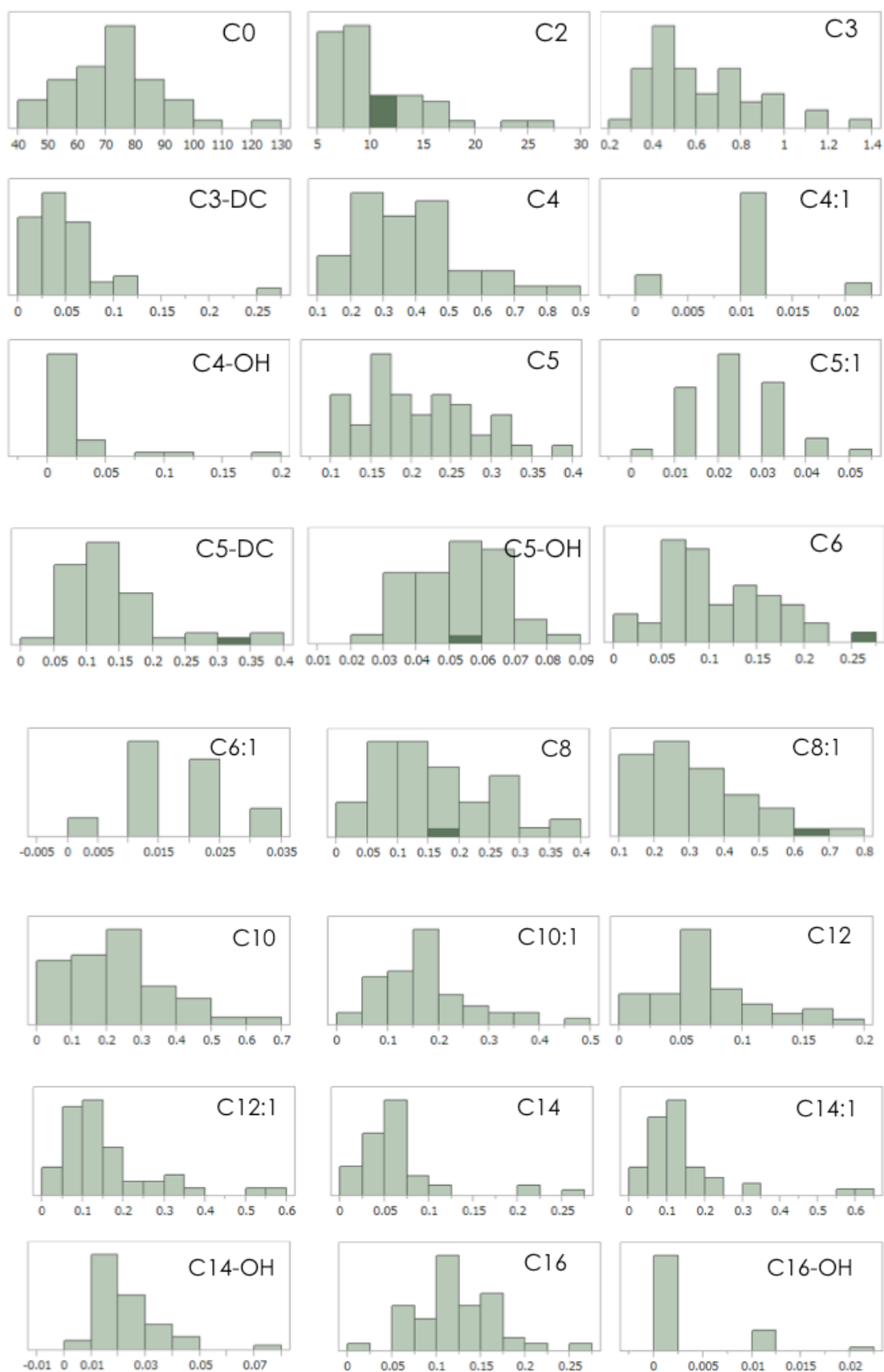
表 1 患者背景

	総カルニチン ($\mu\text{mol/L}$)	C0カルニチン ($\mu\text{mol/L}$)	アシルカルニチン ($\mu\text{mol/L}$)
男性 (n= 25)	62.9 ± 15.5	52.0 ± 12.5	10.9 ± 4.8
女性 (n= 65)	58.1 ± 9.1	48.8 ± 7.4	9.3 ± 3.4

表 2 血清総カルニチン, C0 カルニチン, アシルカルニチン値 (mean ± S.D. $\mu\text{mol/L}$) ;

分画	mean	± S.D.	分画	mean	± S.D.	分画	mean	± S.D.
C0	72.85	15.66	C8:1	0.313	0.137	C18-OH	0.0006	0.002
C2	10.46	4.62	C10	0.228	0.138	C18:1-OH	0.005	0.005
C3	0.622	0.24	C10:1	0.169	0.090			
C3-DC	0.047	0.039	C12	0.070	0.041			
C4	0.37	0.16	C12:1	0.152	0.116			
C4:1	0.0093	0.0048	C14	0.063	0.049			
C4-OH	0.023	0.030	C14:1	0.133	0.115			
C5	0.204	0.068	C14-OH	0.018	0.012			
C5:1	0.022	0.010	C16	0.119	0.044			
C5-DC	0.136	0.074	C16-OH	0.002	0.005			
C5-OH	0.048	0.013	C16:1-OH	0.014	0.010			
C6	0.106	0.056	C18	0.046	0.015			
C6:1	0.015	0.008	C18:1	0.161	0.054			
C8	0.155	0.089	C18:2	0.074	0.027			

表 3 タンデムマス解析によるカルニチン分画 (mean ± S.D, $\mu\text{mol/L}$)



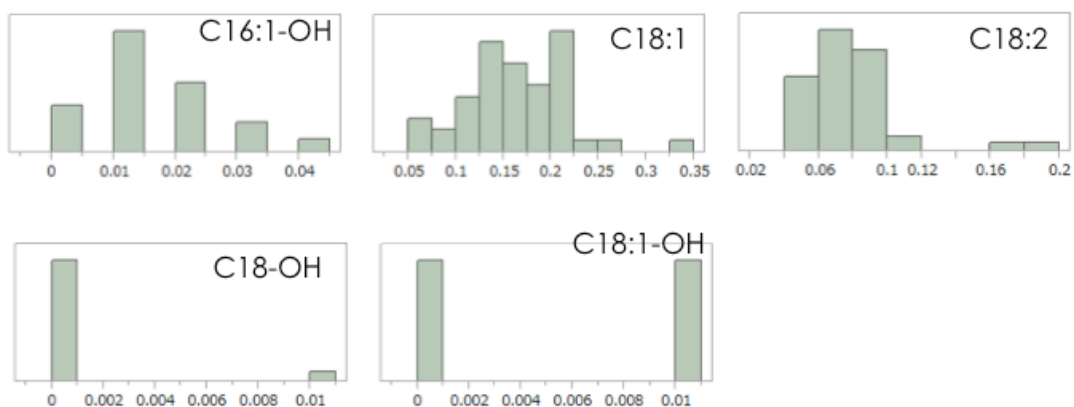
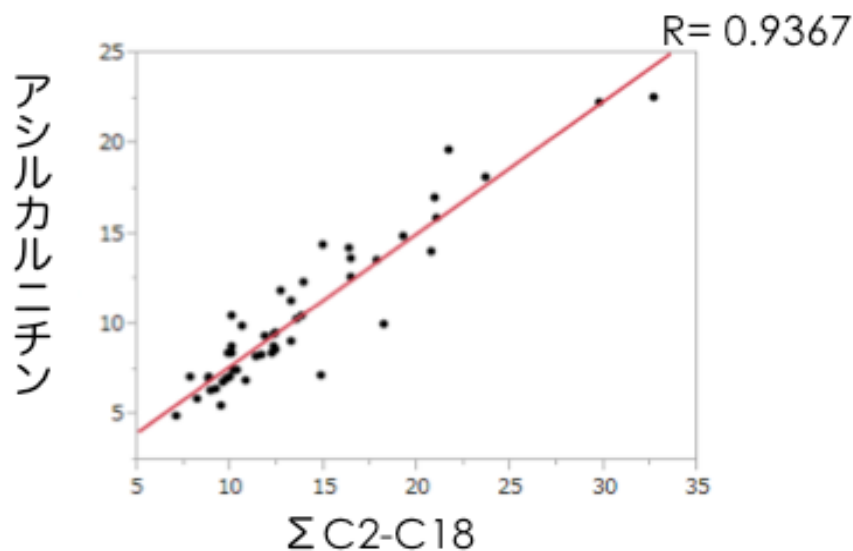


図 18 タンデムマス解析による各分画の度数分布（横軸:濃度 $\mu\text{mol/L}$, 縦軸:度数）



$$\Sigma \text{C2-C18} : \text{アシルカルニチン総和} = \text{C2} + \text{C4} + \text{C5} + \text{C6} + \text{C8} + \text{C10} + \text{C12} + \text{C14} + \text{C16} + \text{C18}$$

R: Pearson Correlation Coefficient

図 19 酵素サイクリング法（縦軸: $\mu\text{mol/L}$ ）とタンデムマス解析によるアシルカルニチン分画総和（横軸: $\mu\text{mol/L}$ ）の相関

	総 カルニチン	C0 カルニチン	アシル カルニチン	アシルカルニチン/ C0カルニチン
HDS-R	0.117	0.194	-0.130	-0.251 *
MMSE	0.051	0.138	-0.190	-0.289**

表 4 血清カルニチン分画と認知機能の相関係数表

Pearson correlation coefficient, *p<0.05, ** p<0.01

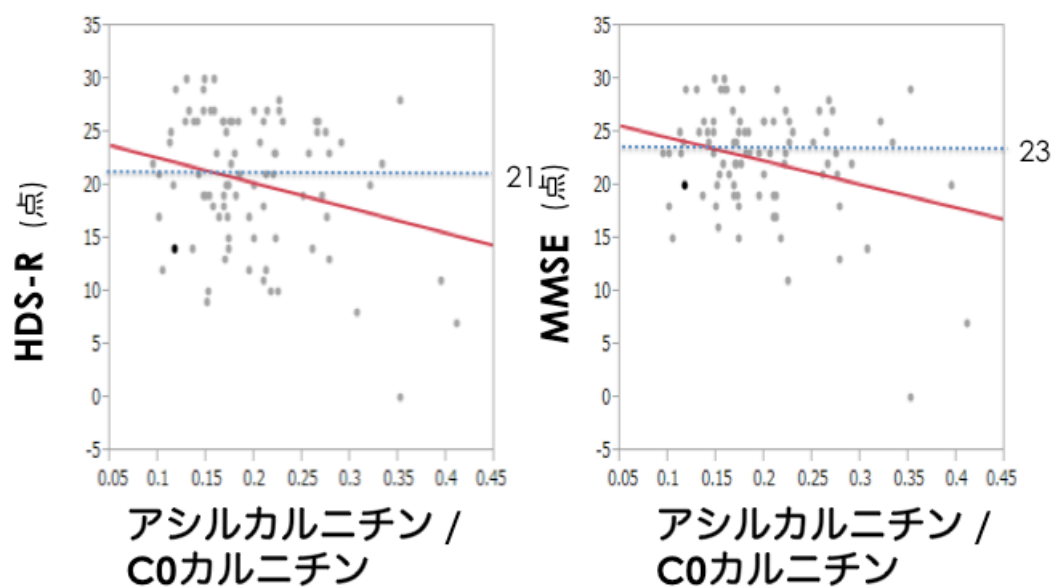


図 20 血清アシルカルニチン/C0 カルニチン比と HDS-R, MMSE 得点

	C0	C2	C0+C2	$\frac{\Sigma C2-C18}{/C0}$	$\frac{\Sigma C14-18}{/C0}$	$\frac{\Sigma C14-C18}{/C2}$	$\frac{\Sigma C14-C18}{/C0+C2}$
HDS-R	-0.030	-0.180	-0.069	-0.159	-0.147	-0.025	-0.128
MMSE	-0.122	-0.288	-0.173	-0.195	-0.166	0.058	-0.138

$\Sigma C2-C18$: アシルカルニチン総和 =
 $C2+C4+C5+C6+C8+C10+C12+C14+C16+C18$

$\Sigma C14-C18$: 長鎖アシルカルニチン総和 = $C14+C16+C18$

表 5 タンデムマス解析によるアシルカルニチン分画と認知機能の相関係数表

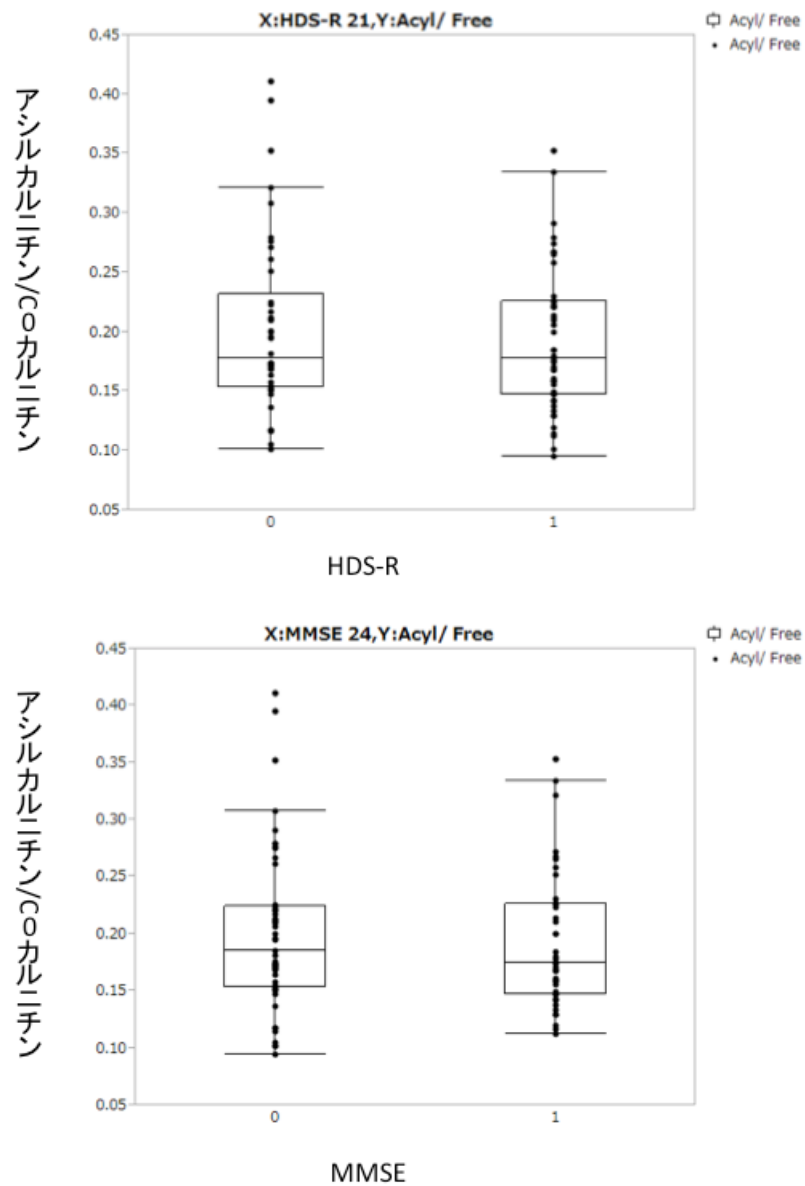


図 21 アシルカルニチン/C0 カルニチン比認知機能別の群間比較<酵素サイクリング法> (0: HDS \leq 21, MMSE \leq 23, 1: HDS-R \geq 22, MMSE \geq 24)

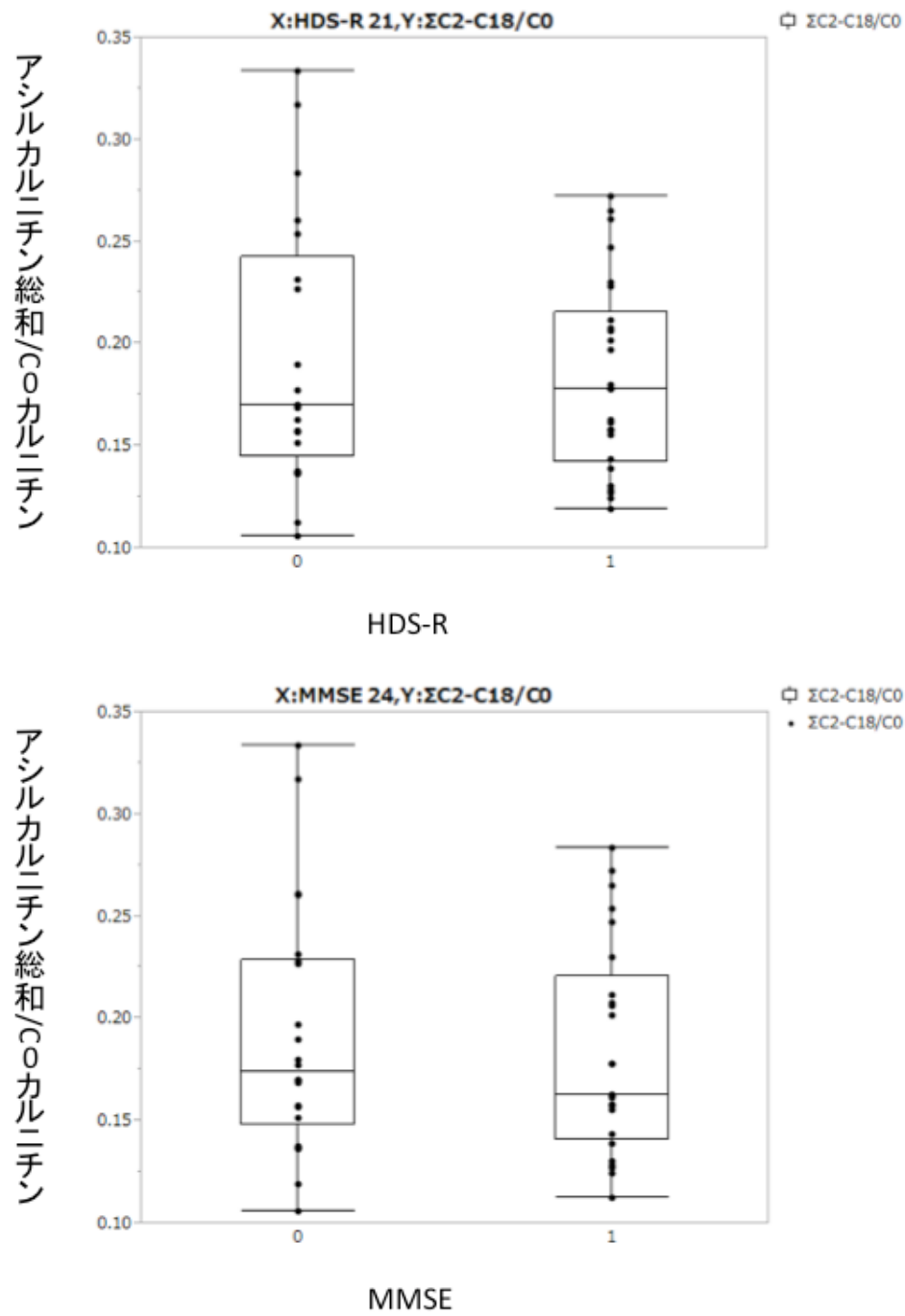


図 22 アシルカルニチン総和/C0カルニチン比認知機能別の群間比較<タ
ンデムマス解析> (0 : HDS \leq 21, MMSE \leq 23, 1: HDS-R \geq 22, MMSE \geq
24)

6 考察

本研究における基礎的検討においては、長鎖アシルカルニチンが濃度依存的に MTS assay で示される細胞生存率を低下させ、LDH assay で示される細胞毒性を上昇させ、長鎖であるほどより低濃度で強い細胞障害性を示した。また、長鎖(C16, C18)アシルカルニチンにより、アポトーシスが誘導された。一方で C0 カルニチン、短鎖・中鎖アシルカルニチンは細胞障害性を示さず、アポトーシスの誘導も認められなかった。長鎖アシルカルニチンが Neuro-2a 細胞に対して細胞障害を来することが示されたため、関与する細胞内シグナルについて検討したところ、C18 カルニチンにより p38, JNK のリン酸化が亢進し、1 時間を最大に投与 6 時間後までリン酸化が亢進していた。一方、短鎖および中鎖カルニチン投与ではこれらのリン酸化に変化は認められなかった。MAPK のリン酸化が細胞障害に関与するかどうか検討するため、阻害剤添加による検討を行った。p38 阻害薬の投与により C18 カルニチンによる細胞障害およびアポトーシスが部分的に抑制された。一方、JNK 阻害薬では抑制効果が認められなかった。これらのことから C18 カルニチンによる細胞障害およびアポトーシスの誘導には p38 活性化の

関与が示唆された。また、C18 カルニチン投与により細胞内 ROS 産生が亢進したが、細胞死に直接関与するかどうかは今後の検討が必要である。ROS 産生について、加齢に関連した酸化ストレスやミトコンドリア機能不全が抗酸化薬と C2 カルニチンの投与で改善した報告[63, 64]があり、TEMPOL, MitTEMPO といった抗酸化薬で pretreat したのち、cell lysate を用いて Western blotting による検討を行ったが、抗酸化薬による p38, JNK のリン酸化は変化しなかった(データ未掲載)。このことから C18 カルニチンによる細胞内 ROS 産生の亢進は MAPK とは独立した事象である可能性が高いが、抗酸化剤の選択などを含め検討すべき課題である。

Neuro-2a を使用した妥当性について、Neuro-2a はマウス神経堤由来の neuroblastoma から樹立された培養細胞であり、内因性アミロイド前駆タンパク (APP) を持ち AD の病態解析に関する基礎研究において広く用いられている[65-68]。本研究でも認知症、その中でも最も頻度の高い AD の背景病理に即した A β 分泌やリン酸化タウの検出研究を計画していたため、本細胞株を採用した。

McCoin らは、筋細胞にアシルカルニチン分画を添加し IL-6 放出や細胞内カルシウム濃度を上昇させることで細胞死を誘発させ、その経路に JNK, p38 が関与していることを報告しており[69, 70], 本研究の結果と一致する。今回神経細胞特異的かつ AD の背景病理に関連する A β 分泌, リン酸化タウタンパクの変化といった検討も行ったが、信頼性の高い検出可能な実験系としては確立できなかった。長鎖アシルカルニチンの作用は神経細胞特異的というよりも筋細胞を含めた普遍的な作用があると推察される。

このように、アシルカルニチンは神経系において酸化ストレス防御能低下, アポトーシス誘導などを介して神経細胞死を誘導する可能性が考えられる。その一方で, C0 カルニチンはアシルカルニチンの細胞外シャトリングに働くことで細胞内濃度を低下させ、神経細胞死を抑制する可能性が既報より示唆されるが、本研究結果からは C0 カルニチンに明らかな保護効果が認められなかった。また、アシルカルニチンは認知症や認知機能低下に関連する指標である可能性が考えられる一方で、血中に存在するカルニチン量は体内カルニチンプールの 1%前後に過ぎないため、既報を鑑みても

[45], 血清カルニチン分画濃度が脳内におけるカルニチンレベルを反映しているかは不明である。タンデムマス解析の結果からも明らかなように, 長鎖アシルカルニチンは血中に微量しか存在せず, 今回実験系で用いた濃度が非生理的であることは否めない。低濃度での検討では, Mutomba らは $1\mu\text{M}$ の C16 カルニチンにより caspase-3 発現が亢進し[71], Rutcowsky らも RAW264.7 細胞を用いた検討により, $5\mu\text{M}$ の長鎖アシルカルニチンが cyclooxygenase-2 などの炎症に関与する形質の発現が亢進したことを報告している[72]。一方, 高濃度では細胞膜の破綻を来し, 細胞内カルシウム濃度や炎症性サイトカインの発現を亢進させる報告から [69, 70], 濃度範囲によって作用が異なる可能性が考えられる。

血清中にカルニチン分画が検出され, 脳組織中にも分布することが知られているものの, その生理的・病的役割ならびに認知機能との関連性は明らかにされていなかった。臨床的検討により, 血清総カルニチン, C0 カルニチン, アシルカルニチン濃度単独では認知機能と有意な相関を認めず, 血清アシルカルニチン/C0 カルニチン比が認知機能と弱いながらも負の相関を示した。基礎的検討の結果からは長鎖アシルカ

ルニチンと認知機能が負の相関を示すことが予想されたが，探索的にタンデムマス解析を提出した 90 名中 49 名の解析結果においては長鎖アシルカルニチン単独，長鎖アシルカルニチン総和/C0 カルニチン比と認知機能に有意な相関は認めなかった．元来体組成などの交絡因子の調整ができていなかったことのほか，タンデムマス解析を提出したサンプル抽出の際に偏りがあったことは否めず，提出するサンプル数を増加する検討の余地はあると考えられる．また前述のように血中 C0 カルニチンが AD 群で優位に低値であったとする既報[45]を考慮し，本集団でタンデムマス解析を実施したサンプルのうち，C0 カルニチン値について AD 群，MCI 群，健常群の群間比較を行ってみたが，有意差を認めなかった（データ非掲載）．文献[45]では AD 群で有意差はなかったものの低体重傾向で，かつ BMI が有意に低値であったことを報告しており，カルニチンの経口摂取量が影響している可能性が推察されているが，本検討においては AD 群と他の 2 群間で体重および BMI にいずれも有意差を認めなかった．したがって，このことが群間に有意差を認めなかった原因の一つになり得る．

酵素サイクリング法とタンデムマス解析によるアシルカルニチン分画の測定

は良好な相関を示したが（図 19）、認知機能別の 2 群間比較比較において、いずれの測定方法によっても有意差を認めなかった（図 21, 22）。また、前述のように、C2 カルニチンの神経細胞保護および AD に対する短期的な認知機能改善効果の報告があることから、1) C2 カルニチン単独、2) C0+C2 カルニチン和、3) 長鎖カルニチン総和/C2 カルニチン比、4) (長鎖カルニチン総和)/(C0+C2 カルニチン)比と HDS-R, MMSE の相関を各々検討したが（表 5）、いずれも有意な相関を認めなかった。これらのことより、タンデムマス解析は実施できる施設も限られており、費用的な面を考慮しても本研究の結果からは認知機能と相関する指標は得られにくいと考えられる。今後サンプル数の増加や、脳脊髄液サンプルでの測定を検討したい。

アシルカルニチン/C0 カルニチン比を算出することではじめて認知機能との間に相関を認めた点について、ここに“Carnitine insufficiency”の概念を引用したい[73]。クエン酸回路、 β 酸化などの種々の代謝に必須である遊離 CoA の濃度は限定的であり、カルニチンの重要な生理作用のひとつとして、細胞内アシル CoA/遊離 CoA 比の調節がある。先天代謝異常症や虚血、肥満などで代謝中間体の有機酸や脂肪酸が蓄積する

と、ミトコンドリア内でアシル CoA が増加し、遊離 CoA が消費されてしまう。アシル CoA にはピルビン酸脱水素酵素複合体をはじめとする様々な酵素に対する阻害作用を持つが[73]、十分量のカルニチンが存在すればアシル CoA からアシル基をカルニチンに転移することができ、結果としてアシルカルニチンは細胞外へ排出される。すなわちアシルカルニチン/C0 カルニチン比はアシル CoA/遊離 CoA を反映していることになる。近年透析、慢性肝疾患、急性心不全増悪といった病態でアシルカルニチン/C0 カルニチン比が上昇する報告が増えており[74-76]、今回の基礎的検討では細胞内 CoA の定量には至らなかったが、今後の検討課題としたい。

本研究により、カルニチン分画の中でもアシルカルニチン/C0 カルニチン比と認知機能との関連性が示唆されるとともに、認知症や認知機能低下に対する予測・関連因子の1つとして血清カルニチン分画比の測定の有用性や可能性は今後期待される場所である。

本研究では対象者の体組成評価に関して BMI を指標として用いたため、筋肉量をはじめとする体組成とカルニチンレベルとの相関について検討できていない。

さらに、認知症の進行や認知機能の変化と血清カルニチン分画濃度との関連性に関して、血液サンプルのみならず、脳脊髄液サンプルを用いて既存のマーカーと併せて経時的・縦断的な調査をすることも重要と考えられる。

また、本研究における基礎的検討においては、今回の培養細胞を主体とした実験に加えて、今後海馬由来初代神経細胞を用いた検討や、アシルカルニチンをはじめとするカルニチン分画をマウスに投与した際の Morris-water-maze test などで行われる空間認知能力の評価について進めていきたい。

本研究により、神経系培養細胞における長鎖アシルカルニチンの細胞障害性が示唆された。高齢入院患者における血清アシルカルニチン/CO カルニチン比と認知機能および間には負の相関が認められ、今後、高齢者の認知症・認知機能低下に関連する因子のひとつとして、酵素サイクリング法によるカルニチン分画比の測定が候補になり得る可能性が示され、ひいてはこの分野における研究推進や臨床応用につながることを期待される。

7 引用文献

1. Ott, A., R.P. Stolk, F. van Harskamp, H.A. Pols, A. Hofman, and M.M. Breteler, *Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study*. *Neurology*, **53**: p. 1937-1942, 1999.
2. Ninomiya, T., T. Ohara, Y. Hirakawa, D. Yoshida, Y. Doi, J. Hata, S. Kanba, T. Iwaki, and Y. Kiyohara, *Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama study*. *Hypertension*, **58**: p. 22-28, 2011.
3. Peters, R., N. Beckett, F. Forette, J. Tuomilehto, R. Clarke, C. Ritchie, A. Waldman, I. Walton, R. Poulter, S. Ma, M. Comsa, L. Burch, A. Fletcher, C. Bulpitt, and H. investigators, *Incident dementia and blood pressure lowering in the Hypertension in the Very Elderly Trial cognitive function assessment (HYVET-COG): a double-blind, placebo controlled trial*. *Lancet Neurology*, **7**: p. 683-689, 2008.
4. Tomoko Kurata, H.K., Kazunori Miyazaki, *Statins have therapeutic potential for the treatment of Alzheimer's disease, likely via protection of the neurovascular unit in the AD brain*. *Journal of the Neurological Sciences*, **322**: p. 59-63, 2012.
5. Barnard, N.D., A.I. Bush, A. Ceccarelli, J. Cooper, C.A. de Jager, K.I. Erickson, G. Fraser, S. Kesler, S.M. Levin, B. Lucey, M.C. Morris, and R. Squitti, *Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging*, **35 Suppl 2**: p. S74-78, 2014.
6. Erickson, K.I., A.M. Weinstein, and O.L. Lopez, *Physical activity, brain plasticity, and Alzheimer's disease*. *Archives of Medical Research*, **43**: p. 615-621, 2012.
7. Hotting, K. and B. Roder, *Beneficial effects of physical exercise on*

- neuroplasticity and cognition*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, **37**: p. 2243-2257, 2013.
8. Selkoe, D.J., *Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein*. Annual Review of Neuroscience, **17**: p. 489-517, 1994.
 9. Selkoe, D.J., *Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease*. Annual Review of Cell Biology, **10**: p. 373-403, 1994.
 10. Amaducci, L.A., L. Fratiglioni, W.A. Rocca, C. Fieschi, P. Livrea, D. Pedone, L. Bracco, A. Lippi, C. Gandolfo, G. Bino, and et al., *Risk factors for clinically diagnosed Alzheimer's disease: a case-control study of an Italian population*. Neurology, **36**: p. 922-931, 1986.
 11. Goate, A.M., J.A. Hardy, M.J. Owen, A. Haynes, L. James, M. Farrall, M.J. Mullan, P. Roques, and M.N. Rossor, *Genetics of Alzheimer's disease*. Advances in Neurology, **51**: p. 197-198, 1990.
 12. Shalat, S.L., B. Seltzer, C. Pidcock, and E.L. Baker, Jr., *Risk factors for Alzheimer's disease: a case-control study*. Neurology, **37**: p. 1630-1633, 1987.
 13. Lovell, M.A., W.D. Ehmann, S.M. Butler, and W.R. Markesbery, *Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease*. Neurology, **45**: p. 1594-1601, 1995.
 14. Palmer, A.M. and M.A. Burns, *Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease*. Brain Research, **645**: p. 338-342, 1994.
 15. Pappolla, M.A., R.A. Omar, K.S. Kim, and N.K. Robakis, *Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease*. American Journal of Pathology, **140**: p. 621-628, 1992.
 16. Virmani, A. and Z. Binienda, *Role of carnitine esters in brain neuropathology*. Molecular Aspects of Medicine, **25**: p. 533-549, 2004.
 17. Stanley, C.A., *Carnitine deficiency disorders in children*. Annals of the New

- York Academy of Sciences, **1033**: p. 42-51, 2004.
18. Hoppel, C.L., Davis, A.T, *Inter-tissue relationships in the synthesis and distribution of carnitine*. Biochem Soc Trans., **14**: p. 673-674, 1986.
 19. Brass, E.P., *Supplemental carnitine and exercise*. American Journal of Clinical Nutrition, **72**: p. 618S-623S, 2000.
 20. Costell, M., J.E. O'Connor, and S. Grisolia, *Age-dependent decrease of carnitine content in muscle of mice and humans*. Biochemical and Biophysical Research Communications, **161**: p. 1135-1143, 1989.
 21. E. De Palo, R.G., C. Crivellaro, C. De Palo, C. Scandellari, *Plasma Carnitine and Acetyl-Carnitine Levels at Different Times of the Day*. Clinical Physiology and Biochemistry, **5**: p. 95-102, 1987.
 22. Rebuzzi A.G., S.G., Lanza G.A., Amico C., Natale A., Lucente M., Manzoli U., *Rhythm of carnitine levels in serum and urine of normal subjects*. Drugs Exptl. Clin. Res., **15**: p. 43-46, 1989.
 23. Pons, R. and D.C. De Vivo, *Primary and secondary carnitine deficiency syndromes*. Journal of Child Neurology, **10 Suppl 2**: p. S8-24, 1995.
 24. 山口清次, *L-カルニチン*. 小児内科, **33**: p. 964-967, 2001.
 25. Di Donato, S., *Human defects of β -oxidation: Clinical and molecular aspects*. Mitochondrial Disorders in Neurology., ed. A. Schapira, Dimauro, S. 1994, Butterworth-Heinemann: Oxford.
 26. Hopper, C., *The physiological role of carnitine*. L-carnitine and its Role in Medicine: From Function to Therapy, ed. R. Ferrari, Dimauro, S., Sherwood, G. 1992, London: Academic Press.
 27. Jogl, G., Y.S. Hsiao, and L. Tong, *Structure and function of carnitine acyltransferases*. Annals of the New York Academy of Sciences, **1033**: p. 17-29, 2004.
 28. Karlic, H., A. Lohninger, C. Laschan, A. Lapin, F. Bohmer, M. Huemer, E. Guthann, E. Rappold, and M. Pfeilstocker, *Downregulation of carnitine*

- acyltransferases and organic cation transporter OCTN2 in mononuclear cells in healthy elderly and patients with myelodysplastic syndromes*. Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), **81**: p. 435-442, 2003.
29. Ebert, D., R.G. Haller, and M.E. Walton, *Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Journal of Neuroscience, **23**: p. 5928-5935, 2003.
30. Virmani, M.A., R. Conti, A. Spadoni, S. Rossi, and E. Arrigoni-Martelli, *L-carnitine uptake into primary rat cortical cultures: interaction with GABA*. Brain Research: Molecular Brain Research, **25**: p. 105-112, 1994.
31. Wawrzenczyk, A., A. Sacher, M. Mac, M.J. Nalecz, and K.A. Nalecz, *Transport of L-carnitine in isolated cerebral cortex neurons*. European Journal of Biochemistry, **268**: p. 2091-2098, 2001.
32. Kido, Y., I. Tamai, A. Ohnari, Y. Sai, T. Kagami, J. Nezu, H. Nikaido, N. Hashimoto, M. Asano, and A. Tsuji, *Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier*. Journal of Neurochemistry, **79**: p. 959-969, 2001.
33. Inano, A., Y. Sai, H. Nikaido, N. Hasimoto, M. Asano, A. Tsuji, and I. Tamai, *Acetyl-L-carnitine permeability across the blood-brain barrier and involvement of carnitine transporter OCTN2*. Biopharmaceutics and Drug Disposition, **24**: p. 357-365, 2003.
34. Wu, X., W. Huang, P.D. Prasad, P. Seth, D.P. Rajan, F.H. Leibach, J. Chen, S.J. Conway, and V. Ganapathy, *Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **290**: p. 1482-1492, 1999.
35. Shug, A.L., M.J. Schmidt, G.T. Golden, and R.G. Fariello, *The distribution and role of carnitine in the mammalian brain*. Life Sciences, **31**: p. 2869-2874, 1982.

36. Bresolin, N., L. Freddo, L. Vergani, and C. Angelini, *Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function*. *Experimental Neurology*, **78**: p. 285-292, 1982.
37. Makar, T.K., A.J. Cooper, B. Tofel-Grehl, H.T. Thaler, and J.P. Blass, *Carnitine, carnitine acetyltransferase, and glutathione in Alzheimer brain*. *Neurochemical Research*, **20**: p. 705-711, 1995.
38. Dolezal, V. and S. Tucek, *Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices*. *Journal of Neurochemistry*, **36**: p. 1323-1330, 1981.
39. Wawrzencyk, A., K.A. Nalecz, and M.J. Nalecz, *Synergistic effect of choline and carnitine on acetylcholine synthesis in neuroblastoma NB-2a cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**: p. 354-359, 1994.
40. Beal, M.F., *Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease*. *Annals of Neurology*, **53 Suppl 3**: p. S39-47; discussion S47-38, 2003.
41. Ghelardini, C., N. Galeotti, M. Calvani, L. Mosconi, R. Nicolai, and A. Bartolini, *Acetyl-L-carnitine induces muscarinic antinociception in mice and rats*. *Neuropharmacology*, **43**: p. 1180-1187, 2002.
42. Imperato, A., M.T. Ramacci, and L. Angelucci, *Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats*. *Neuroscience Letters*, **107**: p. 251-255, 1989.
43. Montgomery, S.A., L.J. Thal, and R. Amrein, *Meta-analysis of double blind randomized controlled clinical trials of acetyl-L-carnitine versus placebo in the treatment of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease*. *International Clinical Psychopharmacology*, **18**: p. 61-71, 2003.
44. Hudson, S. and N. Tabet, *Acetyl-L-carnitine for dementia*. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003158, 2003.
45. Juan Carlos Rubioa, F.d.B., Jose □ Antonio Molina, *Cerebrospinal fluid carnitine levels in patients with Alzheimer's disease*. *Journal of Neurological*

- Sciences, **155**: p. 192-195, 1998.
46. Rau, T.F., Q. Lu, S. Sharma, X. Sun, G. Leary, M.L. Beckman, Y. Hou, M.S. Wainwright, M. Kavanaugh, D.J. Poulsen, and S.M. Black, *Oxygen glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures results in alterations in carnitine homeostasis and mitochondrial dysfunction*. PloS One, **7**: p. e40881, 2012.
 47. Martha C. MutombaaY, H.Y., *Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine*. FEBS Letters, **478**: p. 19-25, 2000.
 48. G. Forloni, N.A., and S. Smiroldo, *Neuroprotective Activity of Acetyl-L-Carnitine: Studies In Vitro*. Journal of Neuroscience Research, **37**: p. 92-96, 1994.
 49. Barhwal, K., S.K. Hota, V. Jain, D. Prasad, S.B. Singh, and G. Ilavazhagan, *Acetyl-l-carnitine (ALCAR) prevents hypobaric hypoxia-induced spatial memory impairment through extracellular related kinase-mediated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 phosphorylation*. Neuroscience, **161**: p. 501-514, 2009.
 50. Abdul, H.M. and D.A. Butterfield, *Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease*. Free Radical Biology and Medicine, **42**: p. 371-384, 2007.
 51. Jiang, X., Q. Tian, Y. Wang, X.W. Zhou, J.Z. Xie, J.Z. Wang, and L.Q. Zhu, *Acetyl-L-carnitine ameliorates spatial memory deficits induced by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C*. Journal of Neurochemistry, **118**: p. 864-878, 2011.
 52. Barnes, C.A., A.L. Markowska, D.K. Ingram, H. Kametani, E.L. Spangler, V.J. Lemken, and D.S. Olton, *Acetyl-l-carnitine. 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes*. Neurobiology of Aging, **11**: p. 499-506, 1990.

53. Yin, Y.Y., H. Liu, X.B. Cong, Z. Liu, Q. Wang, J.Z. Wang, and L.Q. Zhu, *Acetyl-L-carnitine attenuates okadaic acid induced tau hyperphosphorylation and spatial memory impairment in rats*. *Journal of Alzheimer's Disease*, **19**: p. 735-746, 2010.
54. Virmani, M.A., V. Caso, A. Spadoni, S. Rossi, F. Russo, and F. Gaetani, *The action of acetyl-L-carnitine on the neurotoxicity evoked by amyloid fragments and peroxide on primary rat cortical neurones*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **939**: p. 162-178, 2001.
55. Dhitavat, S., D. Ortiz, T.B. Shea, and E.R. Rivera, *Acetyl-L-carnitine protects against amyloid-beta neurotoxicity: roles of oxidative buffering and ATP levels*. *Neurochemical Research*, **27**: p. 501-505, 2002.
56. Shenk, J.C., J. Liu, K. Fischbach, K. Xu, M. Puchowicz, M.E. Obrenovich, E. Gasimov, L.M. Alvarez, B.N. Ames, J.C. Lamanna, and G. Aliev, *The effect of acetyl-L-carnitine and R-alpha-lipoic acid treatment in ApoE4 mouse as a model of human Alzheimer's disease*. *Journal of the Neurological Sciences*, **283**: p. 199-206, 2009.
57. 加藤伸司, 下垣光, 小野寺敦志, 長谷川一夫, *改訂長谷川式簡易知能評価 (HDS-R)の作成*. *老年精神医学雑誌*, **2**: p. 1339-1347, 1991.
58. 森悦郎, 三谷洋子, 山鳥重, *神経疾患患者における日本語版 Mini-Mental-State テストの有用性*. *神経心理学*, **1**: p. 82-89, 1985.
59. 尚澄, 津慶加., *血中カルニチンの測定法*. *臨牀透析*, **16**: p. 167-173, 2000.
60. 一考, 重陽.畑.郁.稲., *タンデムマス・スクリーニングにおける非誘導体化分析*. *日本マス・スクリーニング学会誌*, **21**: p. 207-212, 2011.
61. Petersen, R.C., G.E. Smith, S.C. Waring, R.J. Ivnik, E.G. Tangalos, and E. Kokmen, *Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome*. *Archives of Neurology*, **56**: p. 303-308, 1999.
62. McKhann, G.M., D.S. Knopman, H. Chertkow, B.T. Hyman, C.R. Jack, Jr., C.H. Kawas, W.E. Klunk, W.J. Koroshetz, J.J. Manly, R. Mayeux, R.C. Mohs, J.C.

- Morris, M.N. Rossor, P. Scheltens, M.C. Carrillo, B. Thies, S. Weintraub, and C.H. Phelps, *The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease*. *Alzheimers Dement*, **7**: p. 263-269, 2011.
63. Liu, J., H. Atamna, H. Kuratsune, and B.N. Ames, *Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **959**: p. 133-166, 2002.
64. Ames, B.N., *The metabolic tune-up: metabolic harmony and disease prevention*. *Journal of Nutrition*, **133**: p. 1544S-1548S, 2003.
65. LePage, K.T., R.W. Dickey, W.H. Gerwick, E.L. Jester, and T.F. Murray, *On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies*. *Critical Reviews in Neurobiology*, **17**: p. 27-50, 2005.
66. Gopal Thinakaran, D.B.T., Robert Siman, Barry Greenberg, Sangram S. Sisodia, *Metabolism of the "Swedish" Amyloid Precursor Protein Variant in Neuro2a (N2a) Cells*. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**: p. 9390-9397, 1996.
67. Tomita, T., K. Maruyama, T.C. Saido, H. Kume, K. Shinozaki, S. Tokuhiro, A. Capell, J. Walter, J. Grunberg, C. Haass, T. Iwatsubo, and K. Obata, *The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**: p. 2025-2030, 1997.
68. Tomita, T., S. Tokuhiro, T. Hashimoto, K. Aiba, T.C. Saido, K. Maruyama, and T. Iwatsubo, *Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid beta peptides. Inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of Abeta42*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: p.

- 21153-21160, 1998.
69. McCoin, C.S., T.A. Knotts, K.D. Ono-Moore, P.J. Oort, and S.H. Adams, *Long-chain acylcarnitines activate cell stress and myokine release in C2C12 myotubes: calcium-dependent and -independent effects*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, **308**: p. E990-E1000, 2015.
 70. Requero, M.A., F.M. Goni, and A. Alonso, *The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study*. Biochemistry, **34**: p. 10400-10405, 1995.
 71. Mutomba, M.C., H. Yuan, M. Konyavko, S. Adachi, C.B. Yokoyama, V. Esser, J.D. McGarry, B.M. Babor, and R.A. Gottlieb, *Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine*. FEBS Letters, **478**: p. 19-25, 2000.
 72. Rutkowsky, J.M., T.A. Knotts, K.D. Ono-Moore, C.S. McCoin, S. Huang, D. Schneider, S. Singh, S.H. Adams, and D.H. Hwang, *Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, **306**: p. E1378-1387, 2014.
 73. Stumpf, D.A., W.D. Parker, Jr., and C. Angelini, *Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome*. Neurology, **35**: p. 1041-1045, 1985.
 74. Murphy, W.J., A. Steiber, G.C. Connery, J. Carder, L. Spry, and C. Hoppel, *Altered carnitine metabolism in dialysis patients with reduced physical function may be due to dysfunctional fatty acid oxidation*. Nephrology, Dialysis, Transplantation, **27**: p. 304-310, 2012.
 75. Sirolli, V., C. Rossi, A. Di Castelnuovo, P. Felaco, L. Amoroso, M. Zucchelli, D. Ciavardelli, C. Di Ilio, P. Sacchetta, S. Bernardini, A. Arduini, M. Bonomini, and A. Urbani, *Toward personalized hemodialysis by low molecular weight amino-containing compounds: future perspective of patient metabolic fingerprint*. Blood Transfusion. Trasfusione del Sangue, **10 Suppl 2**: p. s78-88, 2012.

76. Zhou, L., Q. Wang, P. Yin, W. Xing, Z. Wu, S. Chen, X. Lu, Y. Zhang, X. Lin, and G. Xu, *Serum metabolomics reveals the deregulation of fatty acids metabolism in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**: p. 203-213, 2012.

8 謝辞

東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座

秋下雅弘

小川純人

江頭正人

小島太郎

孫輔卿

亀山祐美

大田秀隆

野村和至

山田容子

石井伸弥

木棚究

秋好沢諭

矢可部満隆

田宮寛之

七尾道子

石田友紀

石川里紗

横山菜穂子

笹川広子

諸氏に御礼申し上げます。