

論文の内容の要旨

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

超高齢社会を迎えるわが国において、認知症を有する高齢者は462万人（有病率14%）、軽度認知障害（MCI）も400万人と推計され、増加の一途を辿っている。その予防や早期診断を含めた対策が社会的急務となっている。原因疾患のうちアルツハイマー病（AD）が最多であり、その発症には加齢、アポリポタンパクE多型、高血圧、糖尿などの多因子が関与しており、過酸化脂質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。

カルニチンは4級アミンであり、供給源は生合成のほか、大部分は食餌からの摂取により得られる。脂肪酸代謝に必須であり、その主たる機能は脂肪酸を β 酸化させるためにミトコンドリアに輸送することと、ミトコンドリア内に蓄積したアシルCoAを細胞外に輸送することである。体内では遊離カルニチン（C0カルニチン）、およびC0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、大部分が筋肉に存在する。アシルカルニチン分画ではアセチルカルニチン（C2カルニチン）が最も血清中濃度が高い。

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報告されている。一方、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、長鎖アシル

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ことにした。

本研究は、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、こ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明らかにする。

培養細胞系において、アシルカルニチンが神経細胞死を誘導する可能性について、その分子メカニズムも含めて検討した。マウス neuroblastoma 由来の Neuro-2a 細胞において、長鎖アシルカルニチンの一種である C18 カルニチンは濃度依存的に 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、長鎖アシルカルニチンにより、DNA fragmentation (ELISA)で示される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 細胞に対してアポトーシスを介して細胞障害を来すことが示唆されたため、関与する細胞内シグナルについて検討した。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、p38 および JNK 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、MTS, LDH

アッセイで示される細胞障害, およびアポトーシスが部分的に抑制された. 一方, JNK 阻害薬では細胞障害およびアポトーシスに対する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. DCFH-DA アッセイを用いた系において, 長鎖アシルカルニチンによって細胞内 Reactive oxygen species (ROS) 産生が増加することが示された.

平成 23 年 7 月から平成 25 年 2 月の期間, 認知症精査のため東京大学医学部附属病院老年病科に入院した患者のうち同意の得られた 116 名から 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 (総カルニチン, アシルカルニチン, 遊離カルニチン) を測定し, 改訂版長谷川式簡易知能スケール (HDS-R), Mini Mental State Examination (MMSE) との関連を検討した. また, 一部の患者血清を用いて, アシルカルニチン分画をタンデムマス解析にて測定委託した. その結果, 血清カルニチン, アシルカルニチン単独では認知機能との間で相関を認めなかったが, 血清アシルカルニチン/C0 カルニチン濃度比と HDS-R, および MMSE との間で弱いながら統計学的に有意な負の相関が認められた. 酵素サイクリング法およびタンデムマス解析で測定したカルニチン分画は良好な相関を示したが, タンデムマス解析の結果からは認知機能と長鎖アシルカルニチン値, アシルカルニチン/C0 カルニチン比ともに有意な相関は認められなかった. C2 カルニチンを用いた指標においても同様であった. また, 認知機能別の 2 群間比較においても, アシルカルニチン/C0 カルニチン比は有意差がなかった.

本研究結果から, カルニチン分画の中でもアシルカルニチンは神経系において長鎖分画ほど細胞障害性が強く, p38 経路に関与することで細胞毒性を発揮する可能

性が示された。長鎖アシルカルニチンにより ROS 産生が亢進したが、細胞死への関与については今後の検討が必要と考えられた。

一方、臨床的検討では、血清アシルカルニチン/C0 カルニチン濃度比と認知機能は統計学的には有意な相関を示したがその相関は弱く、今後脳脊髄液サンプルでの測定、症例数を増加させた検討や経時的検討を含めた調査が必要である。タンデムマス解析によるアシルカルニチン分画測定によって得られる認知機能に関連する新たな指標は得られにくいと考えられた。

本研究により、神経系細胞に対して、長鎖アシルカルニチンは p38 を介した細胞障害性を示した。臨床的にはアシルカルニチン/C0 カルニチン比と認知機能との関連性が示唆されたが、認知症や認知機能低下に対する予測・関連因子の 1 つとしての意義は今後の検討が必要である。