

〔報 文〕

海馬領域神経細胞の加齢変化に対する L-carnosine 経口投与の影響

黒崎瑠美子・木村修一

Effect of Oral Feeding of L-carnosine on the Age-Related Change of
Hippocampal Neurons in Mice

Rumiko KUROSAKI and Shuichi KIMURA

Carnosine (β -alanyl-L-histidine) is an endogenous dipeptide and is found in brain and other long-lived tissues of humans at concentrations as high as 20mM. It is demonstrated that carnosine has several functions, such as anti-ischemic activity, anti-glycation effect and membrane-protecting properties. In this study, we investigated the effect of L-carnosine on age-related histopathological and immunohistochemical alteration in glial fibrillary acidic protein (GFAP), Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein of the hippocampal CA1 sector in 7- and 40-week old mice. Histopathological observations showed that neuronal change of hippocampal CA1 neurons, which was observed in 40-week old mice, was preserved by carnosine treatment. Immunohistochemical stainings for GFAP and nNOS were unchanged in 40-week old mice. However, immunohistochemical stainings for eNOS and Cu/Zn-SOD increased in hippocampal cells of 40-weeks old mice compared with 7-week old mice. Additionally, GFAP immunopositive cells in carnosine treatment mice were increased compared with 7-week old mice. From these observations, we suggest that carnosine is effective on age-related neurodegeneration of hippocampal CA1 sector.

Key words: L-carnosine (L-カルノシン), hippocampus (海馬), neuron (神経細胞), immunohistochemistry (免疫組織化学)

1. 緒 言

カルノシン (β -alanyl-L-histidine) は、ヒトやその他哺乳類動物の脳や骨格筋に約20mMの濃度で存在するジペプチドで^{1,2)}、抗酸化作用や抗グリケーション作用^{3~5)}等が報告されている。哺乳類動物の生体内にはカルノシン合成酵素が存在し⁶⁾、エネルギー消費の高い骨格筋や脳組織で生成され、その代謝産物としてアンセリン (β -alanyl-L-methyl-L-histidine) が知られている。これらのヒスチジン含有ペプチドは鶏やマグロの筋肉組織からも抽出され、近年ではその抗酸化機能性成分への関心が高まっている。

そこで本研究では、カルノシンの脳神経細胞に対する抗酸化能を検討する目的で、マウスの海馬領域における病理組織染色及び免疫組織化学的解析を行った。海馬領域は通常の老化に伴う記憶や学習能力の低下に関与することが多くの研究により明らかにされており⁷⁾、酸化ストレスの影響を受けやすい部位である。本研究では、年齢の増加に伴う海馬領域神経細胞の変化に対するカルノシンの影響を検討した。

2. 実験方法

実験動物及び飼育条件

7週令及び40週令の雄性 C57/BL マウスを用いた。

我々は、これまでの研究において、C57/BL マウスを用いたドーパミン作動性神経活性低下と行動遅延が5週令マウスに比較し36週令マウスにおいて観察されたことを報告している⁸⁾。この報告結果をもとに、本研究において用いる動物の週令を決定した。動物は空調された飼育室の個別ケージで飼育し、MF 固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水を自由摂取とした。動物は次の4つのグループへ分別した。①7週令コントロール群、②40週令コントロール群、③40週令カルノシン低用量（1 mg/kg）投与群、そして④40週令カルノシン高用量（100mg/kg）投与群とした。カルノシン投与は、各々の投与量を2週間経口投与した。各群は3-4匹とした。

免疫組織化学試験

各群への投与終了後、マウスにペントバルビタール麻酔を行い、脳を摘出し、海馬部分を分画した。脳の組織標本切片を作製し、免疫組織染色した。免

疫組織染色は、phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4) で洗浄、0.3% hydrogen peroxide で処置後、さらに3回 PBS で洗浄し、30分のプレインキュベーションを行った。その後、anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP), anti-neuronal nitric oxide synthase (nNOS), anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS), anti-copper zinc super oxide dismutase (Cu/Zn-SOD) の各々の抗体でインキュベーションした後、二次抗体及び avidin-biotin peroxide complex と反応させた後、発色剤で視覚化した。ネガティブコントロールとして、各抗体を除去したのを用い、上記同様の方法で処理を行った。また、Cresyl violet 及び Hematoxylin & Eosin (H&E) による組織染色も行った。染色後、各切片の海馬 CA1 におけるスコアを hemisphere 毎に評価（0: no staining, 1: weak, 2: moderate, 3: intense）した。統計学的解析には Mann-Whitney U-test を行った。

Table 1. Intensity of cresyl violet and H&E staining and immunoreactivity against GFAP, Cu/Zn-SOD, nNOS and eNOS in the hippocampus CA1 region of C57/BL mice

	<i>Cresyl violet staining</i>	<i>H&E staining</i>
7 weeks	2.8±0.1*	2.9±0.1**
40 weeks (a)	1.8±0.2	1.9±0.1
40 weeks (b)	1.9±0.2	1.9±0.1
40 weeks (c)	2.5±0.2*	2.4±0.2*
	<i>GFAP immunostaining</i>	<i>Cu/Zn-SOD immunostaining</i>
7 weeks	1.5±0.2	0.6±0.1*
40 weeks (a)	1.8±0.2	1.3±0.3
40 weeks (b)	1.8±0.3	1.2±0.2
40 weeks (c)	2.2±0.2	0.8±0.1
	<i>nNOS immunostaining</i>	<i>eNOS immunostaining</i>
7 weeks	0.7±0.1	1.4±0.1*
40 weeks (a)	0.5±0.0	1.9±0.2
40 weeks (b)	0.7±0.1	1.9±0.2
40 weeks (c)	0.6±0.1	1.6±0.1

Data are given as means±S.E. (a); control treatment. (b); carnosine (1mg/kg) treatment. (c); carnosine (100mg/kg) treatment. Statistical significance was performed with F-test followed by Mann-Whitney U-test for non-parametric analysis (*p<0.05 compared with 40 weeks (a)).

3. 実験結果及び考察

Cresyl violet 及び H&E による組織染色

Cresyl violet 及び H&E 染色による結果を Fig.1 に示し、各画像のスコアを Table 1 に示した。7週令マウスの海馬 CA1 領域において形態学的な障害

は観察されなかったが、40週令マウスでは7週令マウスに比し、海馬 CA1 領域における錐体細胞 (Fig.1: arrow) の減損とグリア細胞 (Fig.1: arrow head) の増加が観察された。これに対し、カルノシン (100mg/kg) 投与群では海馬 CA1 錐体細胞の減損を抑制した (Fig.1)。脳神経細胞は年齢が高くな

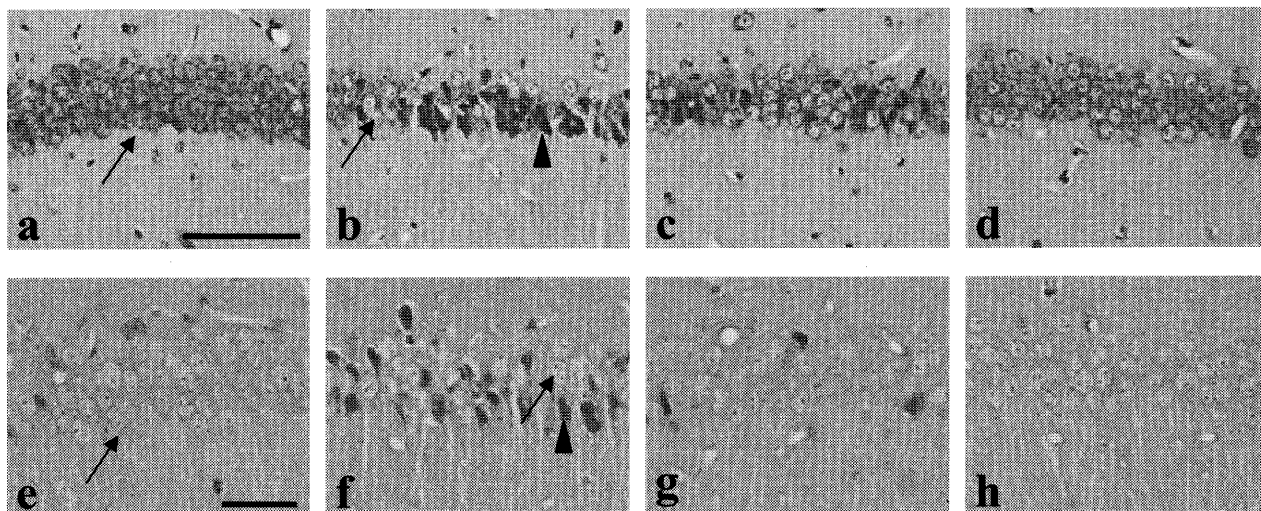


Figure 1. Representative microphotographs of cresyl violet (a-d) and H&E (e-h) staining in the hippocampus CA1 region of C57/BL mice. (a,e); 7 weeks old mice, (b,f); 40 weeks old mice, (c,g); 40 weeks old mice (carnosine 1mg/kg treatment), (d,h); 40 weeks old mice (carnosine 100mg/kg treatment). Arrow (↗): pyramidal cell. Arrow head (▲): glial cell. Bar (a-d)=100 μ m. Bar (e-h)=50 μ m.

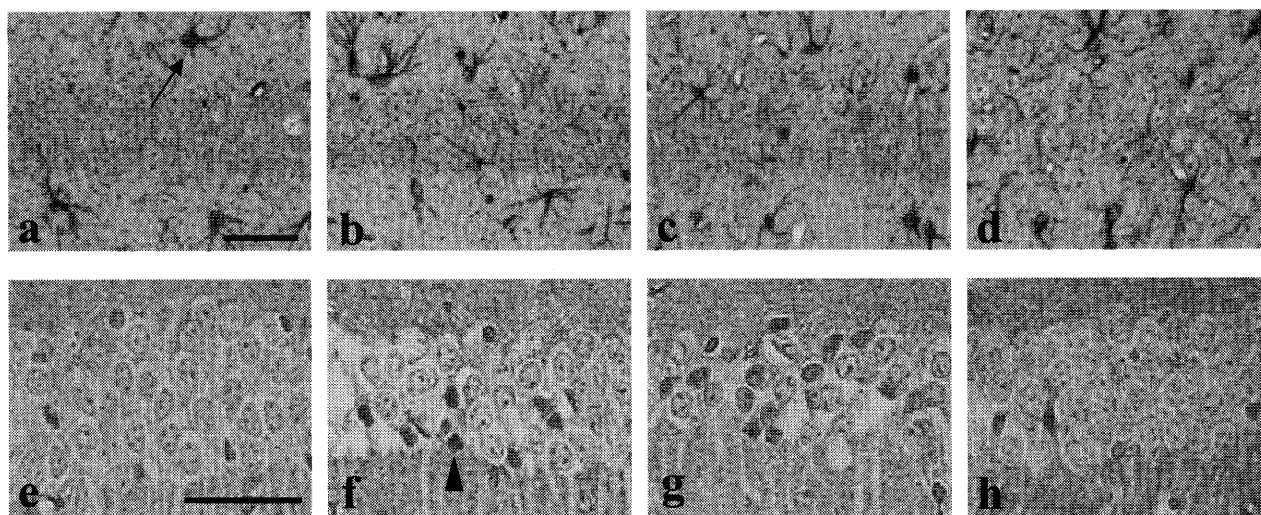


Figure 2. Representative microphotographs of GFAP (a-d) and Cu/Zn-SOD (e-h) immunostaining in the hippocampus CA1 region of C57/BL mice. (a,e); 7 weeks old mice, (b,f); 40 weeks old mice, (c,g); 40 weeks old mice (carnosine 1mg/kg treatment), (d,h); 40 weeks old mice (carnosine 100mg/kg treatment). Arrow (↗): astrocyte. Arrow head (▲): glial cell. Bar (a-d)=50 μ m. Bar (e-h)=50 μ m.

るに従い変性・脱落し、代わってグリア細胞が増加することが知られており、学習や記憶を司る海馬や大脳皮質における神経脱落により Alzheimer 病などの神経疾患が発症する^{9,10}。本研究においても加齢に伴う神経細胞の減衰が観察されたが、カルノシンの投与により抑制されたことが示された。

免疫組織化学的検討

GFAP 抗体を用いた免疫染色結果を Fig.2(a-d) に示した。GFAP 陽性アストロサイト (Fig.2: arrow) は、7週令マウスの海馬 CA1 領域において発現し、突起の染色性も観察された。40週令マウスにおいても、GFAP 陽性アストロサイトの免疫染色性が、7週令マウスと同様に観察された。カルノシン (1 mg/kg 及び 100mg/kg) 投与群においてもアストロサイトの免疫染色性が観察され、40週令マウスと比べて変化は観察されなかった (Table 1)。げっ歯類とヒトにおける正常脳では、加齢とともに活性化したアストロサイトとミクログリアの増加との間に関連があり、さらに、in situ hybridization を用いた研究により GFAP をコードする mRNA の加齢に伴う増大が、海馬の分子層において特に顕著にみられたとしている¹¹。また、その他多くの報告にお

いても、加齢はグリア細胞数の増加と関連があることが示唆され、老齢脳の大脳皮質では20%のアストロサイト数の増加がみられるとしている^{12,13}。本研究結果では、7週令に比較し40週令における GFAP 免疫染色性の変化が観察されなかった。したがって、さらに年齢の高い動物における検討も今後の課題である。一方、カルノシン (100mg/kg) 投与群における GFAP 免疫染色性は、7週令群に比較し増大が観察され ($p < 0.03$)、40週令マウスよりも活性化したことが考えられた。この現象の理由は未だ明らかではないが、アストロサイトはグルタミンやその前駆体であるグルタメート、システイン、グリシンの合成や放出による神経細胞の保護に寄与していることが示唆されている^{14,15}。さらに GFAP-null マウスを用いた報告¹⁶ では、wild-type マウスよりも脳虚血に対する感受性が高く、アストロサイトが脳虚血に対する保護作用を担っている可能性が示唆されている。これらの報告より、アストロサイトは脳神経細胞の保護機能に重要な役割を担っていることが考えられる。本研究では、Cresyl violet 及び H&E 染色によりカルノシン (100mg/kg) 投与による神経細胞の保護が観察された。このカルノシンによる神経保護効果は、アストロサイトの活

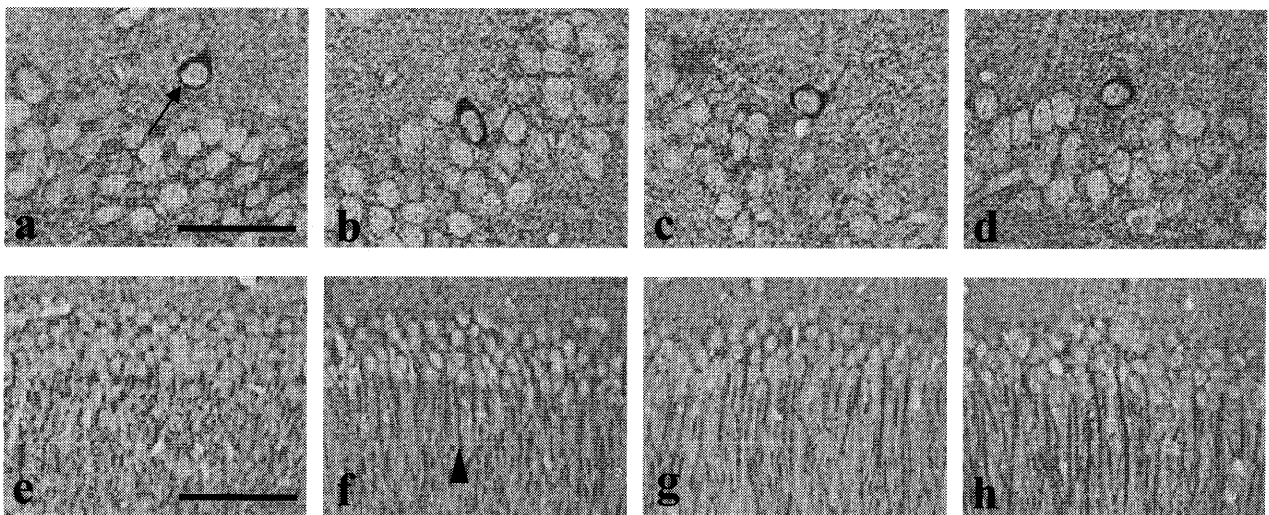


Figure 3. Representative microphotographs of nNOS (a-d) and Cu/Zn-SOD (e-h) immunostaining in the hippocampus CA1 region of C57/BL mice. (a,e); 7 weeks old mice, (b,f); 40 weeks old mice, (c,g); 40 weeks old mice (carnosine 1mg/kg treatment), (d,h); 40 weeks old mice (carnosine 100mg/kg treatment). Arrow (↖): nNOS-immunopositive cell. Arrow head (▲): eNOS-immunopositive cell. Bar (a-d)=50µm. Bar (e-h)=50µm.

性化によってもたらされることが示唆された。

nNOS, eNOS, Cu/Zn-SOD 抗体を用いた免疫染色結果を Fig.2(e-h), 3(a-h) に示した。海馬 CA1 領域の nNOS の免疫染色性 (Fig.3: arrow) には変化は観察されず、カルノシンの効果も確認されなかった。しかし、eNOS 免疫染色性 (Fig.3: arrow head) は、7 週令マウスに比し 40 週令マウスで増加を示した。La Porta¹⁷⁾ は、海馬における NOS 活性が老齢動物において増大し、nNOS mRNA 発現も老齢動物で増加したことを報告している。しかし、Cha¹⁸⁾ は、30-50% の nNOS 免疫反応性の減少が老齢ラットの大脳皮質と海馬領域で観察されたとしている。また、Jesko¹⁹⁾ は、老齢ラットの海馬において nNOS 発現が減少したとしながらも、nNOS 活性は老齢ラットで高くなったと報告している。このように、加齢に伴う nNOS 発現については、未だ統一した見解がなされていない。本研究においても、海馬領域の nNOS 免疫染色性が非常に弱いので、より定量的な検討が必要であると考えられる。一方、eNOS は血管内皮に局在し、海馬の錐体細胞に多く局在していることが報告されている²⁰⁾。老齢ラットの海馬領域における eNOS 発現は減少することが報告されている²¹⁾。また、eNOS 依存性の NO 合成は、血圧調整に関与し、ヒトの高血圧では低下していることが報告されている^{22,23)}。本研究結果では、40 週令において 7 週令に比し eNOS 免疫染色性は増大し、カルノシンの投与による影響も観察されなかったことから、カルノシンの eNOS 活性に対する影響を検討するには、さらに年齢の高い動物を用いることが有効であると考えられた。一方、Cu/Zn-SOD 免疫染色性は、7 週令マウスの海馬 CA1 領域において主に錐体細胞に観察され、グリア細胞にも弱く発現がみられた。40 週令マウスでは、Cu/Zn-SOD 陽性グリア細胞 (Fig.2: arrow head) の増大がみられ、この増大をカルノシン 100mg/kg 投与群において抑制する傾向が観察された (Table 1)。加齢に伴って、動物の有する抗酸化能は変化すると考えられるが、SOD についての報告ではほとんどが不変あるいは減少するというものであり、必ずしも結果は一致していない²⁴⁾。本研究における

Cu/Zn-SOD 免疫染色性は、40 週令マウスのグリア細胞で増大している。これは加齢に伴う神経細胞の脱落とグリア細胞の増大に比例する反応であることが考えられるが、さらなる検討が必要である。一方、カルノシン投与群においては、加齢に伴う Cu/Zn-SOD 免疫染色性の増大を抑制する傾向が観察された。カルノシンには free radical scavenging 機能や細胞膜保護作用、虚血に対する神経保護作用があることが報告されており^{3, 25~27)}、本研究結果と一部一致する結果となった。カルノシンは、free radical の除去に働き、神経細胞保護効果を有することが示唆された。

4. 要 約

内因性抗酸化物カルノシンの神経細胞保護効果を検討する目的で、7 週令及び 40 週令マウスを用いて、脳内海馬 CA1 領域における病理組織及び免疫組織化学的解析を行った。その結果、7 週令マウスに比較し 40 週令マウスの海馬 CA1 領域では、神経細胞の脱落が観察され、eNOS や Cu/Zn-SOD 免疫染色性の増加も確認された。これに対し、40 週令マウスに 2 週間のカルノシン (100mg/kg) を投与した群では、40 週令コントロールマウスにみられた神経細胞の脱落が抑制されたことが確認された。また、カルノシン投与による GFAP 陽性アストロサイトの活性増大と Cu/Zn-SOD 活性抑制傾向が観察された。カルノシンはアストロサイトの活性化と free radical scavenging 機能により、海馬領域の神経細胞を保護することが示唆されるが、その詳細なメカニズム解明にあたってはさらなる検討が必要である。

5. 文 献

- 1) Boldyrev AA, Formazyuk VE and Sergienko VI. Biological significance of histidine-containing dipeptides with special reference to carnosine: chemistry, distribution, metabolism and medical applications. *Sov Sci Rev D Physicochem Biol* 13, 1-60 (1994).
- 2) Quinn PR, Boldyrev AA and Formazyuk VE. Carnosine: its properties, functions, and potential therapeutic applications. *Mol Aspects Med* 13, 379-444 (1992).

- 3) Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC and Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2175-9 (1988).
- 4) Hipkiss AR and Chana H. Carnosine, a protective anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 863-8 (1998).
- 5) Hipkiss AR, Michaelis J and Syrris P. Non-enzymic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Letts* **371**, 81-5 (1995).
- 6) Kalyanker DD and Meister A. Enzymatic synthesis of carnosine and related β -alanyl and γ -aminobutyryl peptides. *J Biol Chem* **234**, 3210-18 (1959).
- 7) Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F and Heller RE. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* **45**, 223-52 (1995).
- 8) Kurosaki R, Akasaka M, Michimata M, Matsubara M, Imai Y and Araki T. Effects Ca^{2+} antagonists on motor activity and the dopaminergic system in aged mice. *Neurobiol Aging* **24**, 315-9 (2003).
- 9) Grandy CL and Craik FI. Changes in memory processing with age. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 224-31 (2000).
- 10) Sharps MJ and Gollin ES. Memory for object locations in young and elderly adults. *J Gerontol* **42**, 336-41 (1987).
- 11) Prolla TA and Mattson MP. Molecular mechanisms of brain aging and neurodegenerative disorders: lessons from dietary restriction. *Trends Neurosci* **24**, 21-31 (2001).
- 12) Cotrina ML and Nedergaard M. Astrocytes in the aging brain. *J Neurosci Res* **67**, 1-10 (2002).
- 13) Rozovsky I, Finch CE and Morgan TE. Age-related activation of microglia and astrocytes: in vitro studies show persistent phenotypes of aging, increased proliferation and resistance to down-regulation. *Neurobiol Aging* **19**, 97-103 (1998).
- 14) Dringen R, Pfeiffer B and Hamprecht B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* **19**, 562-9 (1999).
- 15) Wang XF and Cynader MS. Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione. *J Neurochem* **74**, 1434-42 (2000).
- 16) Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, Shimada K and Hallenbeck JM. High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1040-4 (2000).
- 17) La Porta CA and Comolli R. Age-dependent modulation of PKC isoforms and NOS activity and expression in rat cortex, striatum and hippocampus. *Exp Gerontol* **34**, 863-74 (1999).
- 18) Cha CI, Uhm MR, Shin DH, Chung YH and Baik SH. Immunocytochemical study on the distribution of NOS-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Neuroreport* **9**, 2171-4 (1998).
- 19) Jesko H, Chalimoniuk M and Strosznajdar JB. Activation of constitutive nitric oxide synthase and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem Int* **42**, 315-22 (2003).
- 20) Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A and Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4214-8 (1994).
- 21) Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL and Bilkey DK. Hippocampal nitric oxide synthase and arginase and age-associated behavioral deficits. *Hippocampus* **15**, 642-55 (2005).
- 22) Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B and Scherrer U. Insulin resistance, hyperlipidemia and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **104**, 342-5 (2001).
- 23) Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J and Benjamin N. Basal nitric oxide synthase in essential hypertension. *Lancet* **349**, 837-42 (1997).
- 24) Danh HC, Benedetti MS and Dostert P. Differential changes in superoxide dismutase activity in brain and liver of old rats and mice. *J Neurochem* **40**, 1003-7 (1983).
- 25) Benzi G and Moretti A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* **19**, 77-101 (1995).
- 26) Stvolinsky SL, Kukley ML, Matejovicova M, Tkac I and Boldyrev AA. Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* **19**, 45-56 (1999).
- 27) Stvolinsky S, Kukley M, Dobrota D, Mezesova V and Boldyrev A. Carnosine protects rats under global ischemia. *Brain Res Bull* **53**, 445-8 (2000).

(くろさき るみこ 食物科学科)
(きむら しゅういち 生活機構研究科)