

## トピックス

## 認知機能障害モデル動物に対するガラクトース投与の相反する効果

## Contradictory effects of D-galactose on animal models for cognitive dysfunction

## はじめに

D-ガラクトースは代表的なグルコースエピマーの単糖である。ガラクトースは糖タンパク質や糖脂質の形で生体内に広く存在しており、さらにガラクトースとグルコースの二糖である乳糖は乳汁中に含まれ乳児のエネルギー源として重要である<sup>1)</sup>。このようにガラクトースは構成糖として生理的な活性をもつことが知られている。一方で、マウスやラットへの高用量ガラクトースの皮下投与、腹腔内投与といった非経口投与は酸化ストレスの上昇、老化促進、認知機能の低下といった有害な作用を引き起こすことが示されている<sup>2)3)</sup>。これまでにガラクトース投与により促進される老化モデル動物を用いた老化促進メカニズムの解明や抗老化成分の探索など、様々な試験が行われている<sup>4)</sup>。他にも、食餌(25%以上のガラクトース含有食)や飲水(10~12.5%ガラクトース溶液)による高用量のガラクトース経口投与は白内障モデルの作出にも使用されている<sup>5)6)</sup>。このようにガラクトースは生体に有害な影響を与えることが示される一方で、近年では高用量のガラクトースの経口投与が散発性アルツハイマー(sAD)モデル動物に対して認知機能の改善効果を持つなど、治療的な作用も報告され始めている<sup>7)8)</sup>。本稿ではガラクトース投与による老化促進メカニズムと、sADモデル動物で観察された認知機能改善効果のメカニズムに着目し、ガラクトースの一見矛盾した生理活性機構について紹介する。

## ガラクトース投与による脳内酸化ストレス誘導と老化促進作用

高用量のガラクトース投与が老化を促進させる機序のひとつとして、複数の経路による酸化ストレスの増大が提唱されている。通常、食品から摂取される用量(湿重量でブロッコリー:6.8 mg/100 g, トマト:23 mg/100 g 程度含有)で摂取されたガラクトースは吸収後、主に肝臓のルロワール経路によってUDP-ガラク

トース、UDP-グルコースを経由してグルコースに代謝される<sup>9)10)</sup>。一方、50 mg/kg/day を超える高用量の非経口ガラクトース投与により生体内のガラクトース濃度が上昇した場合、ガラクトースはルロワール経路に加えて、①過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の発生を伴うガラクトースオキシダーゼによる酸化、②アルドースレダクターゼによるガラクトチオールへの変換、③グリケーションによる終末糖化産物の生成、という経路をたどる<sup>3)4)</sup>。アルドースレダクターゼによる経路では、ガラクトチオールの蓄積が浸透圧ストレスを介してミトコンドリア電子伝達系の活性を低下させて、ミトコンドリアの機能不全や活性酸素種の産生を誘導する<sup>3)</sup>。このような機序により生成した酸化ストレスや終末糖化産物の蓄積、ミトコンドリアの損傷により老化の促進と加齢性疾患が引き起こされると考えられている<sup>2)3)11)</sup>。ガラクトース投与による老化の促進は様々な臓器で引き起こされるが、特に脳においては、神経細胞の炎症や変性、アポトーシス、そして認知障害を引き起こすことが報告されている<sup>4)12)-16)</sup>(図1)。

高用量のガラクトース投与による老化促進モデルは抗老化成分の探索・評価を行う研究に活用されている。このモデルのメリットには、遺伝子組換え動物の作出といった時間のかかる準備が不要であること、ガラクトースの入手と投与が容易であること、比較的短期間で表現型が現れること、意図しない症状が少ないことなどが挙げられる<sup>4)</sup>。このモデルを用いた抗老化成分の探索研究が広く行われている一方で、ガラクトースの投与により老化が誘導される機序の詳細は未だ十分に解明されていない<sup>12)-15)</sup>。ガラクトース投与による老化誘導モデルは投与方法、対象とする動物種、投与量や投与期間によって老化誘発の程度に差があることが示されている<sup>3)17)</sup>。特にSadigh-Eteghad<sup>17)</sup>らは、ガラクトース投与による老化促進モデルを用いた研究を横断的に解析することにより、行動試験において脳機能の低下が確認できる条件(~50 mg/kg/day)と、酸化ストレス除去能を有するスーパーオキシドデスムターゼ

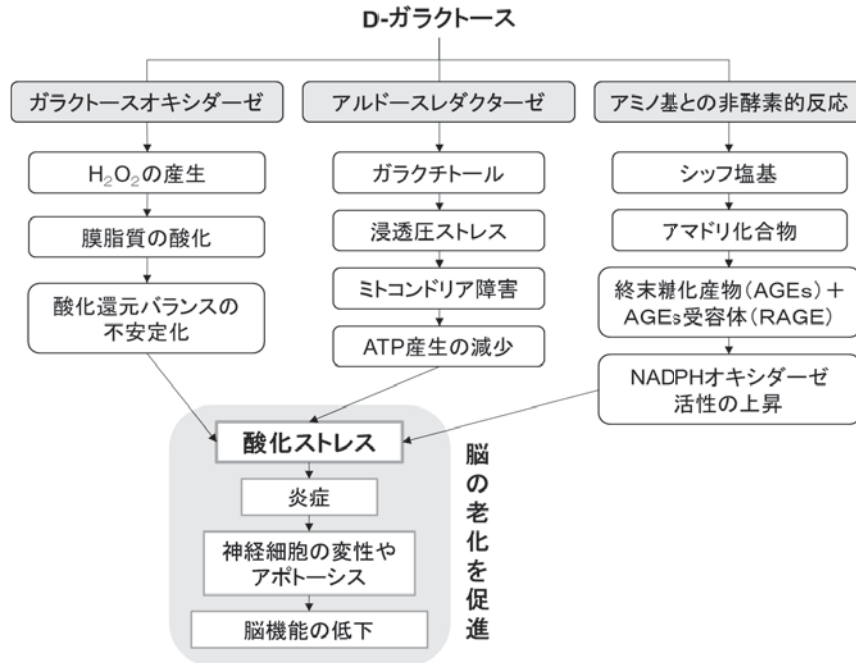


図1 高用量のガラクトース投与は酸化ストレスを誘導し、脳の老化を促進する(文献3より作成)

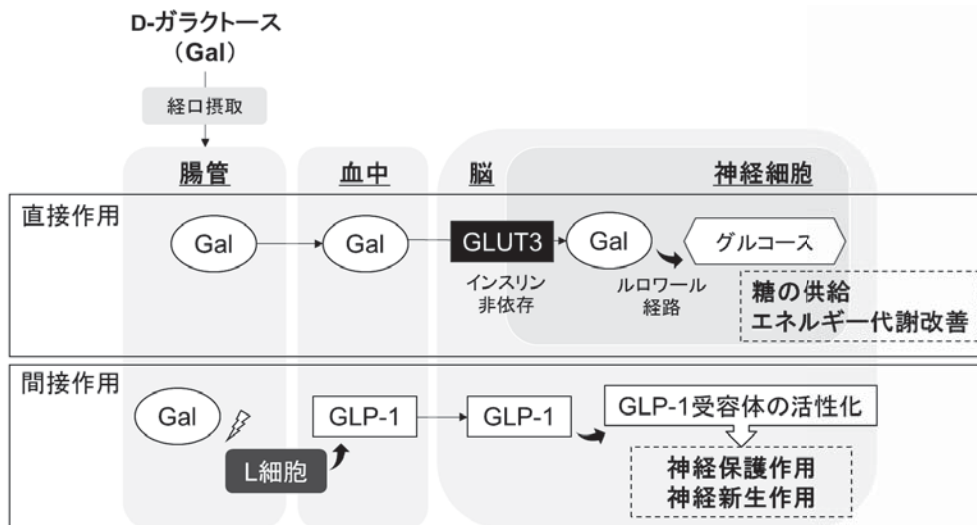


図2 ガラクトースの経口投与がsADモデルにおいて脳神経保護的な作用を及ぼす直接的・間接的なメカニズム(文献8より作成)

(SOD)への影響を確認する条件(100~125 mg/kg/day)では最適なガラクトース投与量が異なっている可能性があることを示している。このことから、ガラクトース投与による老化促進モデルは簡便ではあるものの、評価対象によっては注意深く試験をデザインする必要があるといえる。

**脳室内ストレプトゾトシン投与により誘導される散発性アルツハイマーモデル動物を対象としたガラクトース投与による脳機能改善効果**

先述のガラクトース投与による認知機能低下作用とは対照的に、Knezovic<sup>8)</sup>らの研究ではガラクトースの経口投与は脳室内ストレプトゾトシン(STZ)投与によ

り誘発した散発性アルツハイマー病 (sAD) モデル動物に対して治療的な効果を持つことを示している。脳室内への STZ 投与により sAD を誘導したラットに 200 mg/kg/day の用量でガラクトースを 2 か月間飲水投与した結果、STZ 単独処理群と比較して STZ+ガラクトース共処理群では、モリス水迷路試験においてプラットフォーム発見時間が短縮すること、受動回避試験において暗箱忌避時間が延長することを明らかにしており、学習能力ならびに記憶能力の改善を示唆する結果となっている<sup>8)</sup>。筆者らはこのメカニズムについて、以下に示す二つの仮説を提唱している (図 2)。

#### ①ガラクトースによる直接的な糖代替作用

STZ の投与は膵臓  $\beta$  細胞への毒性による I 型糖尿病モデルの作出が有名であるが、本試験で使用した手法は膵臓を標的とした投与方法 (腹腔内あるいは静脈内投与) とは異なり、ラット脳室へ直接投与することによって学習能力と記憶能力の低下を誘導している。この機序として、脳室内 STZ 投与により酸化ストレスや神経炎症の上昇、脳内でのエネルギー代謝の減少、アミロイド  $\beta$  やタウタンパク質の蓄積といった、アルツハイマー様の変化が引き起こされることが知られている<sup>18)-22)</sup>。このうち、脳内エネルギー代謝が減少する機序については、正常時ではインスリン刺激によりグルコーストランスポーター 4 (GLUT4) が細胞膜上へトランスポレーションすることにより脳細胞内への糖取り込みが上昇するが、脳室内への STZ 投与によりインスリン抵抗性が誘導されて GLUT4 のトランスポレーションが低下して十分に機能しなくなることが原因の一つと考えられている<sup>8)23)</sup>。一方で、脳細胞ではグルコースとガラクトースのトランスポーターである GLUT3 も発現しており、インスリン非依存的な糖取り込みを担っている<sup>23)</sup>。脳内にもルロワール経路が存在していることから、脳室内 STZ 投与により誘発される sAD モデルラットにガラクトースを投与した場合は、GLUT3 を介して脳細胞内にガラクトースが取り込まれ、これがルロワール経路を介してグルコースに変換されて利用されることにより、低グルコース・低エネルギー状態が改善されるというスキームが想定される<sup>1)24)25)</sup>。

#### ②ガラクトースの経口摂取による間接作用

ガラクトース投与による老化促進モデルの作出では、皮下注射や腹腔内投与といった経口投与以外の投与経路が用いられる場合が多い<sup>12)-16)</sup>。一方で、sAD モデル動物における認知機能の有意な改善はガラク

トースの経口投与の実験系において観察された<sup>8)</sup>。この要因には、ガラクトースの経口摂取によるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 分泌促進が脳機能改善に関与した可能性も挙げられる。ガラクトースの経口摂取は小腸下部の L 細胞からインクレチンの一種である GLP-1 の分泌を誘導することが報告されている<sup>26)</sup>。GLP-1 の機能は膵臓へのインスリン分泌増強作用が知られているが、近年の研究から神経保護作用をもつことも明らかになってきている<sup>27)-29)</sup>。血中に分泌された GLP-1 は脳血液関門を通過するという報告もあり、ガラクトースの摂取によって分泌された GLP-1 が脳機能の改善効果に寄与するという可能性が考察されている<sup>30)</sup>。また、Knezovic<sup>8)</sup>らの試験で用いられているガラクトースの投与量 (200 mg/kg/day) は経口投与以外の投与経路では毒性が現れるような高用量ではあるものの、経口で投与した今回の検討では明らかな毒性は観察されなかったとしている。経口で摂取されたガラクトースは小腸にて吸収された後に門脈血に入り、肝臓でルロワール経路によってグルコース変換されることにより、経口投与以外の投与方法と比較して血液中のガラクトース濃度上昇が抑えられて有害事象の出現が回避された可能性が考えられる<sup>1)</sup>。

#### おわりに

ガラクトースは投与経路、用量、対象となる動物が異なると認知機能に与える影響が逆転するケースが存在する。本稿で例示したように、健常モデル動物では認知機能が低下し、STZ 誘発性 sAD モデルでは認知機能が改善する。この一見矛盾した作用の背景には sAD に特有な糖取り込み様式の変化がガラクトースの作用に影響を与える他、投与経路の違いによる動態や代謝経路の違いが要因となっている可能性がある。即ち、高用量のガラクトースは生体に有害な作用を持つ一方で、特定の条件下では生体に保護的な作用をもつ可能性がある。しかしながら、ガラクトース投与による保護効果については未だに報告が少なく、知られざるガラクトースの効果や、その効果の対象となる病態は明らかではない。また、ガラクトース投与による老化促進モデルにおいても実験条件の違いによって老化や酸化ストレスの程度が大きく変化することから、ガラクトースの生体に与える影響は極めて複雑である可能性が推察される。今後ガラクトース摂取による生理機能についてさらに多方面からの知見が深まることに期待する。

**Key words:** D-galactose, oxidative stress, cognitive dysfunction, senescence, animal model

Laboratory of Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Waka Okada, Yusuke Ohsaki, Hitoshi Shirakawa

東北大学大学院農学研究科 栄養学分野

岡田 和花, 大崎 雄介, 白川 仁

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2024.1.23 受付)

## 文 献

- 1) Cohn R.M. & Segal S. (1973) Galactose metabolism and its regulation. *Metabolism* **22**, 627–642
- 2) Yanar K., Aydın S., Çakatay U., Mengi M., Buyukpınarbaşı N., Atukeren P., Sitar M.E., Sönmez A. & Uslu E. (2011) Protein and DNA Oxidation in Different Anatomic Regions of Rat Brain in a Mimetic Ageing Model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **109**, 423–433
- 3) Shwe T., Pratchayasakul W., Chattipakorn N. & Chattipakorn S.C. (2018) Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. *Exp Gerontol* **101**, 13–36
- 4) Azman K.F. & Zakaria R. (2019) d-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology* **20**, 763–782
- 5) Patterson J.W. (1954) Hyperglycemia and Galactose Cataracts. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **177**, 541–543
- 6) Ji L., Li C., Shen N., Huan Y., Liu Q., Liu S. & Shen Z. (2015) A simple and stable galactosemic cataract model for rats. *Int J Clin Exp Med* **8**, 12874–12881
- 7) Salkovic-Petrisic M., Osmanovic-Barilar J., Knezovic A., Hoyer S., Mosetter K. & Reutter W. (2014) Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male Wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology* **77**, 68–80
- 8) Knezovic A., Osmanovic Barilar J., Babic A., Bagaric R., Farkas V., Riederer P. & Salkovic-Petrisic M. (2018) Glucagon-like peptide-1 mediates effects of oral galactose in streptozotocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **135**, 48–62
- 9) Frey P.A. (1996) The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *The FASEB Journal* **10**, 461–470
- 10) Gross K.C. & Acosta P.B. (1991) Fruits and vegetables are a source of galactose: Implications in planning the diets of patients with Galactosaemia. *J Inherit Metab Dis* **14**, 253–258
- 11) Cebe T., Atukeren P., Yanar K., Kuruç A.I., Ozan T., Kunbaz A., Sitar M.E., Mirmaroufzibandeh R., Aydın S. & Çakatay U. (2014) Oxidation scrutiny in persuaded aging and chronological aging at systemic redox homeostasis level. *Exp Gerontol* **57**, 132–140
- 12) Banji O.J.F., Banji D. & Ch K. (2014) Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food and Chemical Toxicology* **74**, 51–59
- 13) Kumar A., Dogra S. & Prakash A. (2009) Effect of carvedilol on behavioral, mitochondrial dysfunction, and oxidative damage against D-galactose induced senescence in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **380**, 431–441
- 14) Prakash A. & Kumar A. (2013) Pioglitazone alleviates the mitochondrial apoptotic pathway and mito-oxidative damage in the D-galactose-induced mouse model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **40**, 644–651
- 15) Ullah F., Ali T., Ullah N. & Kim M.O. (2015) Caffeine prevents D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. *Neurochem Int* **90**, 114–124
- 16) Wu D., Lu J., Zheng Y., Zhou Z., Shan Q. & Ma D. (2008) Purple sweet potato color repairs D-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins. *Neurobiol Learn Mem* **90**, 19–27
- 17) Sadigh-Eteghad S., Majdi A., McCann S.K., Mahmoudi J., Vafae M.S. & Macleod M.R. (2017) D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. *PLoS One* **12**, e0184122
- 18) Salkovic-Petrisic M., Osmanovic-Barilar J., Brückner M.K., Hoyer S., Arendt T. & Riederer P. (2011) Cerebral amyloid angiopathy in streptozotocin rat model of sporadic Alzheimer's disease: a long-term follow up study. *J Neural Transm* **118**, 765–772
- 19) Knezovic A., Osmanovic-Barilar J., Curlin M., Hof P.R., Simic G., Riederer P. & Salkovic-Petrisic M. (2015) Staging of cognitive deficits and neuropathological and ultrastructural changes in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **122**, 577–592
- 20) Sharma M. & Gupta Y.K. (2001) Intracerebroventricular injection of streptozotocin in rats produces both oxidative stress in the brain and cognitive impairment. *Life Sci* **68**, 1021–1029
- 21) Agrawal R., Tyagi E., Shukla R. & Nath C. (2011) Insulin receptor signaling in rat hippocampus: A study in STZ (ICV) induced memory deficit model. *European Neuropsychopharmacology* **21**, 261–273
- 22) Salkovic-Petrisic M., Knezovic A., Hoyer S. & Riederer P. (2013) What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* **120**, 233–252
- 23) McNay E.C. & Pearson-Leary J. (2020) GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol* **323**, 113076
- 24) Roser M., Josic D., Kontou M., Mosetter K., Maurer P. & Reutter W. (2009) Metabolism of galactose in the brain and liver of rats and its conversion into glutamate and other amino acids. *J Neural*

- Transm* **116**, 131–139
- 25) Seatter M.J., Kane S., Porter L.M., Arbuckle M.I., Melvin D.R. & Gould G.W. (1997) Structure – Function Studies of the Brain-Type Glucose Transporter, GLUT3: Alanine-Scanning Mutagenesis of Putative Transmembrane Helix VIII and an Investigation of the Role of Proline Residues in Transport Catalysis. *Biochemistry* **36**, 6401–6407
- 26) Herrmann C., Göke R., Richter G., Fehmann H.-C., Arnold R. & Göke B. (1995) Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulin-Releasing Polypeptide Plasma Levels in Response to Nutrients. *Digestion* **56**, 117–126
- 27) Müller T.D., Finan B., Bloom S.R., D’Alessio D., Drucker D.J., Flatt P.R., Fritsche A., Gribble F., Grill H.J., Habener J.F., Holst J.J., Langhans W., Meier J.J., Nauck M.A., Perez-Tilve D., Poci A., Reimann F., Sandoval D.A., Schwartz T.W., Seeley R.J., Stemmer K., Tang-Christensen M., Woods S.C., DiMarchi R.D. & Tschöp M.H. (2019) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* **30**, 72–130
- 28) During M.J., Cao L., Zuzga D.S., Francis J.S., Fitzsimons H.L., Jiao X., Bland R.J., Klugmann M., Banks W.A., Drucker D.J. & Haile C.N. (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* **9**, 1173–1179
- 29) Candeias E.M. (2015) Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide. *World J Diabetes* **6**, 807
- 30) Kastin A.J., Akerstrom V. & Pan W. (2002) Interactions of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) with the Blood-Brain Barrier. *Journal of Molecular Neuroscience* **18**, 07–13