



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1929号
学位記番号	第1359号
氏名	Mona Ahmed Abdellatif Abdelhamid
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Probiotic Bifidobacterium breve MCC1274 Mitigates Alzheimer's Disease-Related Pathologies in Wild-Type Mice (野生型マウスにおいてビフィズス菌 MCC1274 の経口投与はアルツハイマー病に関連する病態を軽減する)</p> <p>Journal of Nutrients, DOI 10.3390/nu14122543, June 2022</p>
論文審査担当者	<p>主査： 松川 則之 副査： 斎藤 貴志, 飛田 秀樹</p>

Dissertation Summary

Background: Several studies provided strong evidence for the link between the gut microbiota and the brain through the microbiota-gut-brain axis. Therefore, any disruption or alteration in an individual's gut microbiota can affect the individual's behavior and cause psychiatric and neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Previous studies demonstrated that oral supplementation with *Bifidobacterium breve* MCC1274 (*B. breve* MCC1274) improved cognitive function in both an AD-like mouse model and mild cognitive impairment (MCI) subjects. Furthermore, recently, it has been reported that oral supplementation with *B. breve* MCC1274 for four months mitigated AD-like pathologies in App^{NL-G-F} mice overexpressing humanized A β with APP mutations (Swedish (NL), Beyreuther/Iberian (F), and Arctic (G)) without overexpressing APP, as indicated by a reduction in amyloidosis, attenuation of microglial activation, and improvement of synaptic plasticity in the hippocampus, which ultimately prevented memory impairment. These studies highlight the therapeutic potential of *B. breve* MCC1274 in preventing memory impairment and delaying the progression of AD. However, its effects on wild-type (WT) mice have not yet been explored.

Objective: In this study, we investigated the effects of orally supplemented *B. breve* MCC1274 on AD-related pathologies in WT mice, including its effects on A β levels, glial activation, synaptic protein levels, tau hyperphosphorylation, and cell proliferation by using two-month-old C57BL/6J.

Methods: Two-month-old C57BL/6J mice were assigned randomly into vehicle and probiotic groups: the vehicle group (n = 20) received saline and the probiotic group (n = 20) was supplemented with *B. breve* MCC1274 (1×10^9 cfu/6.25 mg/200 μ l saline/mouse) via oral gavage five times/week for four months. At the age of 6 months, soluble A β levels were determined by A β ELISA. Amyloid- β precursor protein and its processing enzymes were performed by Western blotting. Akt/GSK-3 β pathway was determined by Western blotting. Glial activity was evaluated by immunofluorescence staining and Western blotting. Total tau, AT-180 (p-Thr231), and AT8 (p-Ser202/Thr205) levels were performed by Western blotting. The neural activity was determined by the levels of synaptic proteins which was performed by Western blotting. Cell proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus was evaluated by immunofluorescence.

Results: In this study, we found that the oral supplementation of *B. breve* MCC1 274 significantly decreased soluble A β 42 levels in the hippocampal extracts of mice supplemented with probiotics compared to those of mice that received saline. However, soluble A β 40 levels in the hippocampus as well as soluble A β 40 and A β 42 levels in the cortex were not affected by probiotic supplementation. Moreover, oral supplementation of *B. breve* MCC1274 in WT mice reduces hippocampal PS1 protein levels through the Akt/GSK-3 β -dependent pathway, leading to a reduction in A β 42 generation. In addition, Akt activation inhibits GSK-3 β activation, which inhibits hippocampal tau hyperphosphorylation at T231, S202, and T205. Regarding to glial activation, we found that *B. breve* MCC1274 supplementation attenuates microglial activation only in the hippocampus, and does not

affect reactive astrocytes, through decreasing the protein level of Iba1 (a microglia marker) and Iba-positive cells in the hippocampus, but not in the cortex. While, the protein level of GFAP (an astrocyte marker) and GFAP-positive cells didn't affect by *B. breve* MCC1274 supplementation. In addition, *B. breve* MCC1274 supplementation increased the level of presynaptic protein like synaptotagmin (SYT), syntaxin, and synaptophysin (SYP) and postsynaptic protein like postsynaptic density 95 (PSD95) in the hippocampus indicating that *B. breve* MCC1274 supplementation increased the synaptic density. Moreover, *B. breve* MCC1274 supplementation does not affect cell proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus in the hippocampus. These results showed that *B. breve* MCC1274 supplementation collectively decreased soluble A β 42 and PS1 protein levels through the Akt/GSK-3 β signaling pathway, attenuated microglial activation, and inhibited tau phosphorylation, which might improve synaptic function. *B. breve* MCC1274 supplementation had similar potential therapeutic effects on both WT and App^{NL-G-F} mice, except for the difference in the underlying regulatory mechanism of *B. breve* MCC1274 supplementation-reduced A β generation and the impact on tau hyperphosphorylation.

Conclusion: Overall, this study and the previous studies support the idea that oral supplementation with *B. breve* MCC1274 has a beneficial effect on multiple AD therapeutic targets.

*Describe the aims, methods used and results of the research within 1000 words.

論文審査の結果の要旨

背景：アルツハイマー病病態の鍵分子であるアミロイドβ (Aβ) はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から2つのプロテアーゼ(β及びγセクレターゼ)切断により産生され、細胞外に沈着することで神経細胞死を引き起こす。また、タウタンパク質の過剰リン酸化によって生じる神経原線維変化、神経細胞やシナプスの減少に加えて、グリア細胞の活性化、炎症などが見られ、これらが相まって認知機能障害を引き起こしていると考えられている。

近年、ヒトとアルツハイマー病モデルマウスを用いた研究では、腸内細菌の組成(腸内細菌叢)が認知機能に影響することが報告されている。また、いくつかのプロバイオティクスをアルツハイマー病モデルマウスに摂取させると認知機能の改善が見られるが、アルツハイマー病病態に影響する分子メカニズムは不明である。以前、我々はアルツハイマー病モデルマウスである APP knock-in (APP-KI)マウスにビフィズス菌 MCC1274 を摂取させると、Aβ産生や沈着を低下させること、海馬でのミクログリアの活性化を抑制させることで記憶障害を予防することを見出した。一方、多くのアルツハイマー病患者は遺伝子異常を有さない孤発例であることから、野生型マウスにおけるビフィズス菌 MCC127 のアルツハイマー病病態への機能解析は重要と考えた。今回、野生型マウスにビフィズス菌 MCC1274 を4か月間経口投与し、アルツハイマー病に関連する病態を解析した。

方法：2ヶ月齢の野生型マウスにビフィズス菌 MCC1274 を4ヶ月間経口投与した。記憶機能は、新規物体認識テストを使用して評価した。Aβ レベル、グリア細胞活性、リン酸化タウレベル、シナプスタンパク質レベル、および海馬における細胞増殖は、Aβ-ELISA 法、免疫組織化学染色法、免疫蛍光染色法、ウエスタンブロッティング法、BrdU 染色法によって評価した。

結果：コントロール群に比べてビフィズス菌 MCC1274 投与群では、①認知機能の改善、②脳内の可溶性 Aβ42 レベルの低下、③海馬における PS1 レベルの低下、④海馬におけるリン酸化 Akt および非活性型のリン酸化 GSK3β レベルの増加、⑤海馬におけるリン酸化タウタンパク質レベルの低下、⑥海馬におけるシナプスタンパク質レベルの増加、⑦海馬におけるミクログリア細胞数およびそのタンパク質のレベルの低下が見られた。しかし、海馬で増殖している細胞数に変化は見られなかった。

考察および結論：ビフィズス菌 MCC1274 は、①海馬での PS1 レベルを低下させることで可溶性 Aβ42 レベルを低下、②リン酸化 Akt および非活性型のリン酸化 GSK3β レベルを増加させることで PS1 レベルとリン酸化タウタンパク質レベルを低下、③ミクログリアの活性化の抑制は Aβ42 レベルが低下することで引き起こすことが示された。今回の結果から野生型マウスでは、ビフィズス菌 MCC1274 を摂取することでアルツハイマー病に関連する病態(Aβ42 産生、タウタンパク質のリン酸化、ミクログリアの活性化)を軽減する可能性が示された。

ビフィズス菌 MCC1274 摂取は発症前にアルツハイマー病に関連する病態を軽減させることでアルツハイマー病を予防することや進行を遅らせることができる可能性があることを示しており、意義があると考えられる。

学位審査：

申請者による約 20 分間の研究内容のプレゼンテーション後に、主査松川から、アルツハイマー病の臨床症状は何か、アミロイドカスケード仮説以外にアルツハイマー病分子病態を説明する考え方など合計 6 つの質問、第一副査斎藤教授から、ビフィズス菌 MCC1274 投与によって Aβ レベル低下、活性化グリア細胞レベルの低下効果の脳皮質と海馬の差異の理由は何か、ビフィズス菌 MCC1274 投与によって野生型マウスでは PS1 レベルが低下しているが APP-KI マウスでは増加している理由は何かなど合計 7 つの質問、第二副査飛田教授からは、実験に使用したマウスの餌の成分は何か、ビフィズス菌 MCC1274 投与によって腸内細菌叢の変化はあったのか、RIPA buffer に含まれている各試薬の役割は何かなど合計 9 つの質問がなされた。これらの質問に対して、申請者は、返答に窮する質問もあったものの、おおむね適切に回答し、研究内容ならびにその背景等を十分に理解していると判断できた。本論文は今後のアルツハイマー病治療薬開発に重要な指針を示す内容である。よって、申請者には、博士(医学)を授与されるにふさわしいと結論した。