

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

アミロイドーシスに関する調査研究 分担研究報告書

Grape seed 由来ポリフェノールの A β 凝集抑制効果

研究分担者 小野賢二郎 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

共同研究者 Lap Ho*、Giulio M Pasinetti*、David B Teplow**、山田正仁***

* Department of Neuroscience Mount Sinai School of Medicine、

** Department of Neurology University of California at Los Angeles、

*** 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科)

研究要旨 最近の疫学的研究は、中等度のワイン摂取がアルツハイマー病(AD)の発症率を下げることを示唆している。我々は、その機序の一端を明らかにすることを試みた。円二色性分光法、光誘発架橋法、チオフラビン T 法、分子排斥クロマトグラフィー、電顕を用いてメガナチュラル(MN)の A β 凝集過程における影響を解析した。また、分化型 PC12 細胞を用いて MTT 及び LDH assay を用いて細胞毒性も検討した。MN は、成熟線維及びプロトフィブリル形成、オリゴマー形成、statistical coil から β -sheet への二次構造変換の全過程において抑制作用を有する事を発見した。また、MTT 及び LDH assay において MN により A β の細胞毒性が軽減することを確認した。我々の *in vivo* における報告と併せて MN が AD の予防及び治療薬開発に向けて有力な基本分子になることを示唆している。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の病態において、 β -アミロイド蛋白 (A β) の凝集・蓄積が AD の発症機構に重要な役割を果たしていると考えられている (アミロイドカスケード仮説)。従来、脳アミロイドとして蓄積する A β 線維 (fA β) が神経毒性を発揮すると考えられていたが、最近、可溶性オリゴマーの毒性に注目が集まっている。本研究では、中等度のワイン摂取が AD の発症率を下げるという最近の疫学的研究を背景にして、ブドウ種子由来ポリフェノールであるメガナチュラル (MN) の A β 凝集に対する作用の有無を検討することを目的とした。

B. 研究方法

MN の A β 40 及び A β 42 の凝集過程における影響を円二色性分光法 (2 次構造変換)、photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) (オリゴマー形成)、チオフラビン T 法 (fA β 形成)、分子排斥クロマトグラフィー (プロトフィブリル形成)、電顕 (形態学的観察) を用いて解析した。また、分化型 PC12 細胞を用いて MTT 及び LDH

assay を用いて A β による細胞毒性も検討した。

(倫理面への配慮)

問題なし。

C. 研究結果

MN は、fA β 形成反応を抑制するだけでなく、凝集過程のより早期の段階、すなわちプロトフィブリル形成、PICUP によるオリゴマー形成、さらには statistical coil から β -sheet への二次構造変換の全過程において抑制作用を有する事を発見した。また、MTT 及び LDH assay を用いて細胞毒性を検討したところ、凝集過程のあらゆる段階において A β 毒性が MN により軽減することを確認した。

D. 考察

本研究で MN が A β 凝集過程において早期の段階、すなわち、二次構造変換、オリゴマー形成、プロトフィブリル形成を抑制し、細胞毒性が軽減することを明らかにした。

最近、我々は、*in vivo* においても MN が A β オリゴマー形成抑制効果を有し、高次脳機能障害も

改善させることを明らかにした。

近年、フェノール骨格を有する化合物が α -synuclein や tau の凝集を抑制することも報告されているが、その機序としてオリゴマーを安定化させることが考えられており、 $A\beta$ に対してはオリゴマー形成自体を抑制する違った機序が考えられる。

E. 結論

MN は、AD の予防および治療薬開発に向けて有力な基本分子になる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ono K, Condrón MM, Teplow DB: Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14745-14750, 2009.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid- β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-565, 2009.
- 3) Zhao W, Wang J, Ho L, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM: Identification of antihypertensive drugs which inhibit amyloid- β protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 16:49-57, 2009.
- 4) Ho L, Chen LH, Wang J, Zhao W, Talcott ST, Ono K, Teplow D, Humala N, Cheng A, Percival SS, Ferruzzi M, Janle E, Dickstein DL, Pasinetti GM: Heterogeneity in red wine polyphenolic contents differentially influences Alzheimer's disease-type neuropathology and cognitive deterioration. *J Alzheimers Dis* 16:59-72, 2009.
- 5) Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Ikeda T, Yamada M: Anti-aggregation and fibril-destabilizing effects of sex hormones on α -synuclein fibrils in vitro. *Exp Neurol* 217:434-439, 2009.
- 6) 小野賢二郎、山田正仁：限局性アミロイドーシス—特に脳アミロイドーシスについて。血液フロンティア 19:1375-1379, 2009.

7) 小野賢二郎、山田正仁： $A\beta$ 凝集機序とその制御。医学のあゆみ 229: 405-408, 2009.

2. 学会発表

- 1) Ono K, Teplow DB, Condrón MM: The English (H6R) and Tottori (D7N) familiar Alzheimer disease mutations accelerate amyloid β -protein oligomerization and cytotoxicity. Neuroscience, Nanosymposium, Chicago, USA, 10.17-21, 2009.
- 2) Teplow DB, Ono K, Condrón MM: Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. Neuroscience, Nanosymposium, Chicago, USA, 10.17-21, 2009.
- 3) Pasinetti GM, Ksiezak-reding H, Yemul S, Ono K, Lobo J, Janle E, Ferruzzi M, Wang J, Teplow DB, Ho L: Grape seed polyphenolic extracts (GSPE) as a potential novel treatment in progressive supranuclear palsy: Experimental approaches and therapeutic implications. Neuroscience, Nanosymposium, Chicago, USA, 10.17-21, 2009.
- 4) 小野賢二郎：ワイン関連ポリフェノールのアルツハイマー病治療への可能性。大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪、7.13-14, 2009.
- 5) 小野賢二郎、Margaret M Condrón、Lap Ho、Giulio M Pasinetti、David B Teplow、山田正仁：Grape seed polyphenolic extract の $A\beta$ 凝集及び細胞毒性における効果。第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22, 2009.
- 6) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、山田正仁：女性ホルモンの α シヌクレイン蛋白凝集抑制作用。第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22, 2009.
- 7) 篠原もえ子、徳田隆彦、吉田光宏、笠井高士、小野賢二郎、中川正法、山田正仁：レビー小体型認知症とアルツハイマー病における脳脊髄液 α -シヌクレインの検討。第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22, 2009.
- 8) 島啓介、佐村木美晴、柳瀬大亮、篠原もえ子、駒井清暢、松成一朗、吉田光宏、小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病における後部帯状回・頭頂側頭葉萎縮と代謝低下。第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22, 2009.
- 9) 森永章義、浜口毅、島啓介、篠原もえ子、佐村

木美晴、柳瀬大亮、松成一朗、吉田光宏、小野賢二郎、山田正仁：Alzheimer 病早期診断における MRI, 脳血流 SPECT, FDG-PET, 脳脊髄液マーカーの比較. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

10) 小野賢二郎、Condrón M、Ho L、Pasinetti GM、Teplow DB、山田正仁：Grape seed polyphenolic extract の A β 凝集抑制効果. 第 28 回日本認知症学会学術集会、仙台、11.20-22、2009.

11) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、山田正仁：女性ホルモンは α -シヌクレイン蛋白凝集抑制作用および不安定化作用を有する. 第 28 回日本認知症学会学術集会、仙台、11.20-22、2009.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得（申請中を含む）

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

フェノール化合物のアルツハイマー病理予防効果

研究分担者 山田正仁 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)
 共同研究者 浜口 毅、小野賢二郎、村瀬篤史
 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学)

研究要旨 以前に我々が試験管内でアミロイドβ蛋白 (Aβ) 凝集抑制効果を有することを報告した5種類のフェノール化合物 (curcumin [Cur], ferulic acid [FA], myricetin [Myr], nordihydroguaiaretic acid [NDGA], rosmarinic acid [RA]) を、遺伝子改変アルツハイマー病 (AD) モデルマウス (Tg2576) に5カ月齢から10カ月間経口投与し、脳あるいは脳血管へのAβ沈着、脳内の可溶性および不溶性AβおよびAβオリゴマー濃度を検討した。脳へのAβ沈着は、コントロール群と比較してNDGA群およびRA群にて有意に減少していた ($P<0.05$)。脳血管へのAβ沈着は、何れの群もコントロールと差は無かった。RA群では、脳内可溶性Aβ濃度が有意に増加し ($P<0.01$)、不溶性Aβ濃度が有意に低下 ($P<0.05$)、Aβオリゴマー濃度が有意に低下 ($P<0.001$) していた。一方、NDGA群では、脳内可溶性・不溶性Aβ濃度はコントロールと差を認めず、Aβオリゴマー濃度が有意に増加していた ($P<0.05$)。Cur群とMyr群は、RA群と同様の脳内Aβ濃度の変化を認めたが、脳内へのAβ沈着は有意な変化を認めなかった。FA群については、脳内Aβ沈着および脳内Aβ濃度など何れの検討でも有意な差を認めなかった。RAは、脳内Aβ沈着だけでなく、AD発症に密接に関連していると考えられているAβオリゴマーも抑制しており、今回検討したフェノール化合物の中では最も予防効果が期待出来ることが示唆された。

A. 研究目的

アミロイドβ蛋白 (Aβ) 凝集抑制は、アルツハイマー病の新しい治療戦略として注目されている。我々は、様々なフェノール化合物が、試験管内でAβ凝集抑制効果を有することを報告してきた。生体内でも同様にフェノール化合物がAβ凝集抑制効果を有し、アルツハイマー型病理変化を予防しうるかを検討した。

(倫理面への配慮)

本実験は、金沢大学動物実験委員会の承認を得て行った。

B. 研究方法

遺伝子改変アルツハイマー病 (AD) モデルマウス (Tg2576) に5種類のフェノール化合物 (curcumin [Cur], ferulic acid [FA], myricetin [Myr], nordihydroguaiaretic acid [NDGA], rosmarinic acid [RA]) を5カ月齢から10カ月間経口投与し、脳あるいは脳血管へのAβ沈着、脳内の可溶性および不溶性AβおよびAβオリゴマー濃度を、フェノール化合物を投与しないコントロール群と比較した。

C. 研究結果

脳へのAβ沈着は、NDGA群およびRA群にて有意に減少していた ($P<0.05$)。Myr群においても、Aβ沈着が減少している傾向が見られたが、統計学的に有意なものでは無かった ($P=0.064$)。脳血管へのAβ沈着は、何れの群もコントロールと差は無かった。RA群では、脳内可溶性Aβ濃度が有意に増加し ($P<0.01$)、不溶性Aβ濃度が有意に低下 ($P<0.05$)、Aβオリゴマー濃度が有意に低下 ($P<0.001$) していた。一方、NDGA群では、脳内可溶性・不溶性Aβ濃度はコントロールと差を認めず、Aβオリゴマー濃度が有意に増加していた ($P<0.05$)。Cur群とMyr群は、RA群と同様の脳内Aβ濃度の変化を認めたが、脳内へのAβ沈着は有意な変化を認めなかった。FA群については、脳内Aβ沈着および脳内Aβ濃度など何れ

の検討でも有意な差を認めなかった。

D. 考察

これらの結果は、フェノール化合物、特に NDGA と RA の経口投与にて AD に特徴的な病理学的変化である脳内 A β 沈着を抑制できることを示している。しかし、脳内 A β の性状についての検討からは、それぞれの化合物の抑制機序が異なることが示唆された。RA は、脳内 A β 沈着だけでなく、AD 発症に密接に関連していると考えられている A β オリゴマーも抑制しており、今回検討したフェノール化合物の中では最も予防効果が期待出来ることが示唆された。逆に NDGA は、A β オリゴマーが増加しており、AD 予防という点では不適切な可能性があると思われた。Cur や Myr も A β オリゴマーを抑制しており、予防効果が期待できるのではないかと考えた。

E. 結論

フェノール化合物、特に RA は AD の発症予防効果が期待できる。今後、これらの結果をもとに臨床試験を行う必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi T, Morinaga A, Tsukie T, Kuwano R, Yamada M: A novel presenilin 1 mutation (L282F) in familial Alzheimer's disease. *J Neurol* 256:1575-1577, 2009.
- 2) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid β aggregation pathway. *Am J Pathol* 175:2557-2565, 2009.
- 3) Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Ikeda T, Yamada M: Anti-aggregation and fibril-destabilizing effects of sex hormones on α -synuclein fibrils in vitro. *Exp Neurol* 217:434-439, 2009.
- 4) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive lobar

intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Neurol*, in press.

- 5) Kojima Y, Sakai K, Ishida C, Asaka T, Hamaguchi T, Nozaki I, Fukushima K, Tsuchiya A, Kametani F, Yazaki M, Okino S, Yamada M: Hereditary rimmed vacuole myopathy showing interstitial amyloid deposition in muscle tissue. *Muscle Nerve* 40:472-475, 2009.
- 6) Noguchi-Shinohara M, Tokuda T, Yoshita M, Kasai T, Ono K, Nakagawa M, El-Agnaf OMA, Yamada M: CSF α -synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Brain Res* 1251:1-6, 2009.
- 7) Morinaga A, Ono K, Yamada M: New therapeutic strategy for amyloidosis. *Future Neurol* 4:287-289, 2009.
- 8) Hamaguchi T, Ono K, Yamada M: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*, in press.
- 9) 小野賢二郎、山田正仁：限局性アミロイドーシス—特に脳アミロイドーシスについて。血液フロンティア 19:1375-1379, 2009.
- 10) 山田正仁：アミロイドーシス UPDATE—はじめに—。医学のあゆみ 229:303, 2009.
- 11) 本崎裕子、山田正仁：トランスサイレチン(TTR)アミロイドーシス：家族性アミロイドーシス(FAP)の分子疫学。医学のあゆみ 229:357-362, 2009.
- 12) 小野賢二郎、山田正仁：A β 凝集機序とその制御。医学のあゆみ 229:405-408, 2009.
- 13) 廣畑美枝、山田正仁：脳アミロイドアングiopatchーの疫学と病態。医学のあゆみ 229:409-414, 2009.
- 14) 浜口 毅、山田正仁：アミロイドーシスの理解に必要な最新の基礎知識 20。医学のあゆみ 229:441-445, 2009.
- 15) 山田正仁：科学的根拠に基づく MCI 段階での AD 早期診断をめざして。Dementia Jpn 23:1-5, 2009.
- 16) 山田正仁：脳アミロイドアングiopatchー。Psychiatry Today 21:23-25, 2009.
- 17) 山田正仁：開発中の認知症治療薬—その有望性と将来展望—。Medical Practice 26:2047-2051, 2009.
- 18) 柳瀬大亮、山田正仁：アルツハイマー病の危険因子としての common diseases. Geriat Med

47:59-63, 2009.

19) 吉田光宏、山田正仁：脳アミロイドアンギオパチー：病態と診断の進歩．*医学のあゆみ* 231:445-451, 2009.

20) 山田正仁：原発性（AL）アミロイドーシスに伴うニューロパチーをどう治療するか．岡本幸市、棚橋紀夫、水澤英洋（編）*EBM 神経疾患の治療 2009-2010*, 中外医学社, 東京, pp462-467, 2009.

21) 山田正仁、石田千穂：脳アミロイドアンギオパチー．篠原幸人、小川 彰、鈴木則宏、片山泰朗、木村彰男（編）*脳卒中治療ガイドライン 2009*, 協和企画, 東京, pp261-262, 2009.

2. 学会発表

1) 池田芳久、吉田光宏、町谷知彦、山田正仁、初坂奈津子、樋口正法、賀戸 久：アルツハイマー病(AD)における開閉眼自発脳磁場の検討．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

2) 小野賢二郎、コンドロン マーガレット、ホラップ、パシネッティ ジュリオ、テプロフ デービッド、山田正仁：Grape seed polyphenolic extract の A β 凝集及び細胞毒性における効果．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

3) 篠原もえ子、徳田隆彦、吉田光宏、笠井高士、小野賢二郎、中川正法、山田正仁：レビー小体型認知症とアルツハイマー病における脳脊髄液 α シヌクレインの検討．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

4) 島 啓介、佐村木美晴、柳瀬大亮、篠原もえ子、駒井清暢、松成一朗、吉田光宏、小野賢二郎、山田正仁：アルツハイマー病における後部帯状回・頭頂側頭葉萎縮と代謝低下．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

5) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、山田正仁：女性ホルモンの α シヌクレイン蛋白凝集抑制作用．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

6) 廣畑美枝、小野賢二郎、森永章義、池田篤平、山田正仁：女性ホルモンは α -シヌクレイン蛋白凝集抑制作用および不安定化作用を有する．第 28 回日本認知症学会学術集会、仙台、11.20-22、2009.

7) 森永章義、浜口 毅、島 啓介、篠原もえ子、佐村木美晴、柳瀬大亮、松成一朗、吉田光宏、小

野賢二郎、山田正仁：Alzheimer 病早期診断における MRI, 脳血流 SPECT, FDG-PET, 脳脊髄液マーカーの比較．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

8) 柳瀬大亮、島 啓介、松成一朗、佐村木美晴、陳 偉萍、矢嶋一賀、吉田光宏、山田正仁：中年期および老年期における高血圧と脳ブドウ糖代謝の検討．第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

脳脊髄液 tau は脳 tau 蓄積と相関する

研究分担者 東海林幹夫 弘前大学医学部脳神経内科
 共同研究者 瓦林毅、若佐谷保仁、渡辺有希子、渡辺光法、高村歩美、松原悦朗
 弘前大学医学部脳神経内科

研究要旨 AB アミロイドは細胞内リン酸化 tau 蓄積を促進して NFT 形成を誘発するが、その効果は迅速で強力とは考えられなかった。Tauopathy の NFT 形成および神経細胞死には oxidative stress, apoptosis, mitochondria 機能, inflammation, cell cycle signal の biological pathway が関与していた。このうち既知の遺伝子として Apolipoprotein D の増加と doublecortin の低下を蛋白レベルで確認した。Tauopathy における CSF tau の上昇は脳不溶性 tau 増加および NFT 蓄積を反映すると考えられた。

A. 研究目的

Alzheimer 病(AD)では amyloid β protein (A β) oligomer によるシナプス障害が記憶障害の最も重要な因子である。動物レベルで変異 tau 過剰発現が神経原線維変化(NFT)と神経細胞死を再現することが示されている。一方、AD の免疫治療では脳アミロイドを解除しても NFT と神経細胞死、認知症の進展は阻止できない。これらのことは、A β 蓄積による NFT 形成促進と NFT による神経細胞死の機序の解明が必要であることを示している。本研究では脳アミロイドと NFT を再現する double transgenic mouse を大量に長期間追跡して A β による NFT 形成促進機序を再検討するとともに、NFT による神経細胞死に関連する因子を網羅的に検討した。また、AD の診断マーカーとしての CSF tau の上昇機序についても検討を加えた。

B. 研究方法

- 1) Tg2576 と TgTauP301L を掛け合わせて 2xTg Tau+/-APP+/-, 1xTgTau+/-APP-/-, 1xTgTau-/-APP+/-, Tau-/-APP-/- の 4 種類の genotype のマウスを作製した。この多数匹を長期間追跡検討して、脳アミロイド、NFT 出現の統計的解析を行った。
- 2) NFT と神経細胞死が著明な TgTauP301L と tauP301L のみ蓄積する TgTauP301L における発現遺伝子群を oligonucleotide array expression analysis (Affymetrix Mouse Genome 430 2.0) で比較解析した。

有意に変化した遺伝子群のうち AD および tauopathy との相関が知られているもので蛋白レベルでの発現を検討した。

3) TgTauP301L マウス(n=38, 5-30 月齢)と NonTg littermate (n=10, 1-29 月齢)で CSF tau をヒト tau 特異 ELISA (Innogenetics)で測定した。脳パラフィン切片で tau の免疫染色および Gallyas-Braak 染色を行い、マウス脳を Tris buffer (TS), sarkosyl buffer で連続抽出し、TS 可溶性分画と sarkosyl 不溶性分画で western blotting を行い、可溶性 tau および不溶性 tau を半定量した。脳脊髄液 tau と脳可溶性 tau および不溶性 tau, 神経原線維変化(NFT)の有無との相関を検討した。

(倫理面への配慮)

研究に当たっては、弘前大学動物実験倫理規定に従った。動物愛護や遺伝子組み換えに関する法律や取り決めに遵守した。

C. 研究結果

1) 発現したヒト tau の経時的検討では 2xTg Tau+/-APP+/- と 1xTgTau+/-APP-/- で著変を認めなかった。リン酸化 tau の経時的検討では 23 月齢と高齢になって 2xTg Tau+/-APP+/- で 1xTgTau+/-APP-/- に比べて蓄積の促進が認められ、生化学的にも脳の Sarkosyl 不溶性分画にリン酸化 tau 増加を認めた。一方、2xTg Tau+/-APP+/-

と 1xTgTau^{-/-}APP^{+/-}の比較では、tau 発現の有無で Aβ 蓄積に差を認めなかった。よって Aβ 蓄積は高齢になってリン酸化 tau の蓄積を誘発するが、tau による Aβ 蓄積促進は認めなかった。

23 月齢の 2xTg Tau^{+/-}APP^{+/-}では Neurofibrillary pretangles, neuropil thread, Glial fibrillary pretangles, 白質や脳アミロイド周囲の dystrophic neurite などのリン酸化 tau 陽性蓄積が認められ、1xTgTau^{+/-}APP^{-/-}に比べて細胞内のリン酸化 tau 蓄積が有意に増加した(p<0.01)。以上の検討から、Aβ 蓄積による NFT 誘発機序は細胞内リン酸化 tau 蓄積を増加することによるが、その作用は決して迅速で強力なものではないと思われた。

2) NFT 形成と神経細胞死に関わる因子の網羅的解析では、NFT 形成と神経細胞死には oxidative stress, apoptosis, mitochondria 機能, inflammation, cell cycle signal 遺伝子群の有意な変動を認めた。既知の 18 遺伝子に 2 倍以上の発現増加と、9 遺伝子に 0.5 倍以下の発現低下を検出し、その中で、AD や tauopathy に関連があるとされている Apolipoprotein D と doublecortin について免疫染色と western blot で検討し、NFT, 神経細胞死のある TgTauP301L において Apolipoprotein D の増加と doublecortin の低下を蛋白レベルで確認した。

3) TgTauP301L の CSF 中にヒト tau が検出された。CSF tau の値は大きな個体差を認めたが、NFT 蓄積マウスで増加を認めた。NFT のないマウスでは CSF tau と脳不溶性 tau との間に相関は認めなかったが、NFT 蓄積マウスでは脳不溶性リン酸化 tau の増加に相関して CSF tau の増加を認めた。

TgTauP301L マウスでは CSF 中に中枢神経系特異ヒト Tau の増加を認めた。加齢とともに脳の可溶性 tau は減少し、CSF tau も減少した。加齢と共に不溶性 tau 蓄積は増加した。NFT 蓄積のないマウスでは CSF tau の量と不溶性 tau 蓄積とは相関を認めなかった。しかし NFT 蓄積のあるマウスでは CSF tau の増加を認めた。

D. 考察

Aβ の脳内蓄積が NFT を誘発することを多数例を用いた検討から統計学的に確認し、その機序として細胞内リン酸化 tau 蓄積促進が考えられた。しかし、その効果は presenilin-1 の Aβ 促進効果などと比べると弱く、効果発現には時間がかかった。

Tauopathy において NFT 出現と神経細胞死には phenotypic variation が存在し、tau 発現以外の biological pathway の関与が想定されていたが、今回我々は oligonucleotide array expression analysis を用いてこの pathway を初めて明らかにした。今後これらの pathway を明らかにすることにより、NFT および神経細胞死の機序の解明と治療法の開発につながるものと考えられた。

Tauopathy における CSF tau の上昇は脳不溶性 tau 増加および NFT 蓄積を反映すると考えられた。

E. 結論

1. Aβ アミロイドは細胞内リン酸化 tau 蓄積を促進して NFT 形成を誘発するが、その効果は迅速で強力とは考えられなかった。
2. NFT 形成と神経細胞死の出現には oxidative stress, apoptosis, mitochondria 機能, inflammation, cell cycle signal が関与している。
3. CSF tau は脳不溶性 tau 増加および NFT 蓄積を反映する。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M: Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human α -synuclein A30P+A53T transgenic mice with α -synuclein pathology. *Brain Res* 1250:232-241, 2009.
- 2) Ono K, Ikemoto M, Kawarabayashi T, Ikeda M, Nishinakagawa T, Hosokawa M, Shoji M, Takahashi M,

Nakashima M: A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human α -synuclein A30P+A53T transgenic mice. *Parkinsonism Relat Disord* 15:649-654, 2009.

3) Wakasaya Y, Watanabe M, Tomiyama M, Suzuki C, Jackson M, Fujimuro M, Kimura T, Seino Y, Kawarabayashi T, Yamamoto-Watanabe Y, Matsubara E, Shirahama I, Takamura A, Nakahata N, Shoji M: An unusual case of chronic relapsing tetanus associated with mandibular osteomyelitis. *Intern Med* 48:1311-1313, 2009.

4) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 19:48-57, 2009.

2. 学会発表

1) Shoji M: Recent advances of Alzheimer disease research: diagnosis and therapy. The 2009 International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia, Okayama, Dec.11-12, 2009.

2) Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Seino Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E, Shoji M: Accumulation of protein in lipid rafts in mouse models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2009, the Society for Neuroscience, 39th Annual Meeting, Chicago, Oct.17-21, 2009.

3) Miyagawa T, Iwata A, Kowa H, Kawarabayashi T, Shoji M, Tsuji S, Momose T, Kojima Y: The clinical characterization of the Japanese pedigree of FAD with PS1 H163R mutation. Alzheimer's Association 2009 International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), Vienna, Jul.11-16, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

脳内 A β 蓄積予測診断法の開発

研究分担者 東海林幹夫 弘前大学大学院医学研究科 脳研神経内科学講座*
 共同研究者 高村歩美、瓦林 毅、松原 悦朗
 弘前大学大学院医学研究科 脳研神経内科学講座

研究要旨 アルツハイマー病(AD)と軽度認知障害(MCI)、無症候健常者の超早期(発症前)診断目的のバイオマーカー開発を目的に、メラトニン経口負荷試験の有用性をアルツハイマー病モデルマウスで検証した。脳内に A β 沈着を認めるアルツハイマー病モデルマウスにおいては、その脳内蓄積を反映し、認知機能が正常な段階でも血液中 A β 排泄を指標が認められ、メラトニン経口負荷試験は脳内沈着 A β のサロゲートマーカーとして有望と考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)は、少子超高齢化社会が目前に迫った我が国において、根本的治療が切望される代表的疾患である。しかしながら客観的証拠に基づいた診断指標はなく、早期治療介入や新規治療法開発への大きな障害となっている。いかに AD に移行する前段階で患者を抽出し、根本治療導入までの期間短縮と介護予防推進を図るかが研究の焦点である。我々はメラトニン投与での発症予防研究(J Neurochem, 2003)の過程で、記憶障害が発症し、老人斑が沈着を開始はじめ、その出現が顕著となる段階で、メラトニン経口投与後に血液中 A β が増加することを見いだした。本年度は記憶障害の出現や老人斑形成に先行して脳に A β が蓄積している段階であれば、メラトニン経口負荷で血液中 A β が増加し、この検出が AD 発症予測に有用であるどうかを検証する。

B. 研究方法

AD モデルマウス(Tg2576)の4ヶ月齢(発症前マウス:記憶障害なし、老人斑なし)から0.5mg/mlのメラトニンと vehicle 投与を開始し、4ヶ月齢、6ヶ月齢(発症後マウス:記憶障害あり、老人斑なし)、8ヶ月齢(発症後マウス:記憶障害あり、老人斑出現開始)、12ヶ月齢(発症後マウス:記憶障害あり、老人斑あり)の各月齢で血液中 A β x-40、A β x-42 を ELISA にて評価した。

(倫理面への配慮)

研究に当たっては、当該施設の倫理委員会の承認を得て、動物愛護や遺伝子組み換えに関する法律や取り決めを遵守した。

C. 研究結果

- ①アルツハイマー病モデルマウス Tg2576 にメラトニン経口投与(0.5mg/kg)すると、記憶障害が発症し、脳内アミロイド沈着(老人斑)を認める8ヶ月(8M)と12ヶ月(12M)では、vehicle投与群に比較して、血液中 A β x-40 と A β x-42 モノマーが脳内 A β 蓄積を反映して増加した。
- ②記憶障害のみを発症し、脳内アミロイド沈着(老人斑)のない6ヶ月(6M)でも、脳内 A β 蓄積を反映して、血液中 A β x-40 と A β x-42 モノマーが増加した。
- ③記憶障害発症も脳内アミロイド沈着(老人斑)もない4ヶ月(4M)でも、脳内で早期から蓄積を開始する A β x-42 モノマーが血液中で増加した。
- ④いずれの月齢においても脳内可溶性 A β x-40 と A β x-42 の蓄積は認めなかった。

D. 考察

今回の検討から、メラトニン経口負荷後に血液中に排泄される血液中 A β の検出は脳内 A β 沈着症例を効率よく反映するサロゲートマーカーになりうるとの傍証が得られた。さらに脳内に脳内

可溶性 Aβ_x-40 と Aβ_x-42 の蓄積をきたさぬことも明らかとなり、脳外排泄系の評価として有用であることも明らかとなった。

メラトニンは幸い眠気以外の副作用の報告はなく、睡眠障害の治験においては少数例の母集団の検討ながら認知症改善効果も確認されており、ヒトでの経口負荷試験にも期待がふくらむ転である。

しかしながら、今後メラトニン経口負荷試験をヒトへと臨床応用するためには、至適メラトニン経口負荷日数と採血時間、至適負荷用量の検証を AD モデルマウスにて検証し、より詳細な施行プロトコール作成が急務である。

E. 結論

本年度の研究から、メラトニン経口負荷試験はアルツハイマー病や軽度認知障害発症予備軍検出に有用な可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M: Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human α -synuclein A30P+A53T transgenic mice with α -synuclein pathology. *Brain Res* 1250:232-241, 2009.
- 2) Ono K, Ikemoto M, Kawarabayashi T, Ikeda M, Nishinakagawa T, Hosokawa M, Shoji M, Takahashi M, Nakashima M: A chemical chaperone, sodium 4-phenylbutyric acid, attenuates the pathogenic potency in human α -synuclein A30P+A53T transgenic mice. *Parkinsonism Relat Disord* 15:649-654, 2009.
- 3) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular Aβ deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 19:48-57, 2009.

2. 学会発表

- 1) Shoji M: Recent advances of Alzheimer disease research: diagnosis and therapy. The 2009 International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia, Okayama, Dec.11-12, 2009.
- 2) Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Seino Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E, Shoj M: Accumulation of protein in lipid rafts in mouse models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2009, the Society for Neuroscience, 39th Annual Meeting, Chicago, Oct.17-21, 2009.
- 3) Miyagawa T, Iwata A, Kowa H, Kawarabayashi T, Shoji M, Tsuji S, Momose T, Kojima Y: The clinical characterization of the Japanese pedigree of FAD with PS1 H163R mutation. Alzheimer's Association 2009 International Conference on Alzheimer's disease (ICAD), Vienna, Jul.11-16, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

アンジオテンシン受容体拮抗薬のアミロイドβ産生への影響とメカニズム

研究分担者 水澤英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科学)

共同研究者 三條伸夫、金海峰、堀匠、渡邊睦房

同 上

研究要旨 近年、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の投与によるマウス脳内アミロイドβの減少や認知機能の改善やアミロイドβのオリゴマー形成抑制効果などが報告されているがメカニズムに関する詳細は不明である。文献的考察から、それらの現象の作用機序として中枢性アンジオテンシン受容体への直接作用は否定的であった。培養細胞を用いた実験では、臨床用量から推測される薬物濃度では細胞毒性やAβ産生への影響は認められなかった。臨床との関連性から乖離した高濃度を用いる必要があったが、わが国で用いられている全6種類のARBおよびその活性体の全てを培養細胞を用いて解析した結果、高濃度においてAβ産生への影響に一定の傾向が認められ、活性体への変換型ARBの不活体(未変換型)でAβ産生を減少させる傾向を認めた。このことより臨床で用いられる用量で中枢神経系でのAβ産生に変化が起きる可能性はほとんど無いが、各ARBは高濃度で培養液中のAβ量を変化させており、その構造上の特性がAβ産生に影響を与えている可能性が推測された。このことはアミロイドの産生・クリアランスを介したアルツハイマー病の創薬研究において、新たな方向性を示唆している可能性がある。

A. 研究目的

近年、一部のARBの投与によるマウス脳内アミロイドβ(Aβ)の減少や認知機能の改善(JCI 117, 3393-3402, 2007)、Aβのオリゴマー形成抑制効果(JAD 16, 49-57, 2009)、アルツハイマー病モデルマウスにおける認知機能低下の抑制効果(Hypertension 54, 782-787, 2009)、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ活性化作用(BBRC 375, 446-449, 2008)などが報告されているがメカニズムに関する詳細は不明である。また、これらの実験結果は実際に臨床でARBを高血圧患者に投与している医師の実感に合致しているとは言い難いと思われる。これらの問題を解決すべく、我々は、昨年度の当研究班研究報告にてアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)3種類(valsartan, losartan, olmesartan)の培養細胞におけるAβ産生への影響を報告し、今年度は新たに提供を受けることができたtelmisartan、irbesartan、および購入したcandesartanのAβ産生への影響を培養細胞で検討し、わが国で用いられている全6

種類のARBを比較したデータから推測されるメカニズムについて考察した。

B. 研究方法

まず、各ARBのインタビュー・フォームを基にそれぞれの薬理学的特徴を調査し、これまでの報告における使用方法と考察に関して検討した。次に培養細胞を用いた負荷実験として、それぞれ適当な濃度で、野生型、あるいはスウェーデン型遺伝子変異を有するアミロイド前駆蛋白(wtAPP、およびsweAPP)を安定発現しているHEK293細胞の培養液を無血清にした後に添加し、一定時間経過した後に培養液を回収した。培養液のLDHアッセイにより細胞毒性の確認をし、毒性を示さない最大濃度までの培養液中のAβ40およびAβ42の濃度をELISA法にて測定した。データの表示においては全6種類のARBをAからFの記号で表記し、活性(変換)型と不活(未変換)型を有するARBに関しては活性型には「+」を付記し「A+」のように記載し、不活型には「-」を付記することとし

た。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験であり該当しない。

C. 研究結果

各ARBの薬理学的特徴のうち実験に際して注意すべき項目を表1にまとめた。これらの項目のうち、「蛋白結合率」は培養細胞を用いた実験における培養液の組成への影響を、また、「生体利用率」「活性体への変換」「脳移行性」に関しては実験動物を用いた場合の効果のメカニズムの考察などにおいて重要な要素と思われたが、それらの項目に関する考察をしている論文はほとんど見られなかった。血漿中の薬物濃度に対する脳移行性を考慮すると、これまでに報告されているARBの脳細胞への影響は中枢のアンジオテンシン受容体を介した作用の可能性は否定して良いと思われる。それ以外の受容体や蛋白質への結合を介する可能性に関してはデータが無いため推測できなかった。

培養細胞を用いた実験における細胞毒性に関しては、A+/-は1000 μ M、Bは2000 μ M、C-は5 μ M、C+は500 μ M、Dは100 μ M、E-は100 μ M、E+は1000 μ M、Fでは500 μ M以下の濃度で各々LDHアッセイによる細胞毒性が認められなかった(図1)。

上記濃度までの濃度で測定した培養液中のA β 量の変化では高濃度において、6種類のARBのうちA β 40の増加がA-、D、Fに認められ、A β 40の減少がC-、E-に認められた(図2)。また、A β 42の増加がA-、D、Fに、A β 42の減少がB、C-、E-に認められた(図3)。A β 40、A β 42共に変化を認めなかったのはA+、C+、E+であった。以上の結果より、活性体への変換をおこさない薬剤はA β を増加させる傾向があり、活性体への変換をおこす薬剤では活性体でA β 産生への影響はなく、不活体でA β の産生を減少させる傾向が認められた。

D. 考察

本研究は臨床用量から推測される薬物濃度を大幅に超過した濃度で行っているため、臨床との関連性を示すものではないが、上記の結果より、活性体への変換をおこさない薬剤はA β を増加させる傾向があり、活性体への変換をおこす薬剤で

は活性型でA β 産生への影響はなく、不活型でA β の産生を減少させる傾向を認めた。逆に、表1の結果と我々の実験結果を併せて考えると、これまでに報告されている動物実験の論文で用いられているような実験系や臨床で用いられている薬剤量では、経口摂取したARBが血液脳関門を通過して神経細胞へ有効に作用し、A β 産生やクリアランスに影響を与える可能性はほとんど無いことが明らかとなった。このことは通常の臨床現場でARBを処方している医師が実感している印象に合致していると思われた。

そのような状況を踏まえた上で全6種類のARBおよびその活性体の全てを解析した結果について考察する。まずARBは大きく分けて、変換型と非変換型の2種類に分類され(図4)、特徴として①Biphenyl-tetrazolが基本骨格で各薬剤で側鎖が異なる、②変化群では腸管からの吸収をよくするため、エステル結合により側鎖を延長しておく、吸収後にカルボン酸体(活性体)となるように工夫している、③側鎖にカルボン酸がある方がアンジオテンシン受容体への結合能が強い傾向があるなどが挙げられる(図5)。我々の実験ではARBの培養細胞におけるA β 産生への影響には、このARBの構造的な差異に基づいて、一定の傾向があることが明らかとなった。特に脳アミロイドシスとの関連で重要と思われるA β 産生の減少が確認できたARBの不活体(未変換体)はその構造上の特性として、①ARBの基本構造であるbiphenyl-tetrazoleを有していることと、②エステル結合を挟んで両側に比較的大きな側鎖があるという特徴を有していた(図6)。これらの薬剤の作用メカニズムとして、すでに報告されているインスリン分解酵素(IDE)、エンドセリン変換酵素(ECE)-1、ネプリライシン(NEP)活性への影響、PPAR γ 活性への影響、 α -、 β -、 γ -セクレターゼ活性への影響、APP発現量への影響などを検索し、より作用の強い側鎖構造を発見することができればアミロイドの産生やクリアランスを介したアルツハイマー病の創薬研究において、新たな方向性が示唆される可能性がある。

E. 結論

培養細胞におけるA β 産生への高濃度ARBの影

響として、A β 産生を減少させる ARB の不活体はその構造的特性が関与している可能性があり、アミロイドの産生やクリアランスを介したアルツハイマー病の創薬研究において、新たな方向性を示唆している可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Jin H, Sanjo N, Uchihara T, Watabe K, St. George-Hyslop P, Fraser PE, Mizusawa H: Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, in press.

2. 学会発表

1) 金 海峰、三條伸夫、渡辺睦房、水澤英洋、内原俊記：培養細胞内全長型 Presenilin1 の役割. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

2) 三條伸夫、金海峰、水澤英洋：内因性 Aph-1 の代謝経路の解明. 第 50 回日本神経学会総会、仙台、5.20-22、2009.

3) Sanjo N, Jin H, Uchihara T, Watabe K, Mizusawa H: Protective effect of endogenous PS1 holoprotein under ER stress condition. The 12th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Wien, Austria, Jul.10-16, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

	Telmisartan	Losartan	Candesartan	Valsartan	Olmesartan	Irbesartan
	ミカルディス	ニューロタン	アロフレス	テイオハン	オルメテック	アハプロ/イルベタン
蛋白結合率	99.6	98.7	99.5	95	99.6	96.6
生体利用率	30-69	33	34-56	25	25.6	60-90
活性型への変換	なし	EXP3174	candesartan	なし	RNH6270	なし
PPAR γ 活性	+					
脳移行性* (対血漿)	~1/4 (24h)	~1/130 (1h)	~1/100 (30min-24h)	~1/50 (1h)	1/25~1/100 (max 8h)	1/6~1/60 (2h-4h)

(* : インタビュー・フォームより単回投与時データ)

表 1 我が国で使用されている ARB

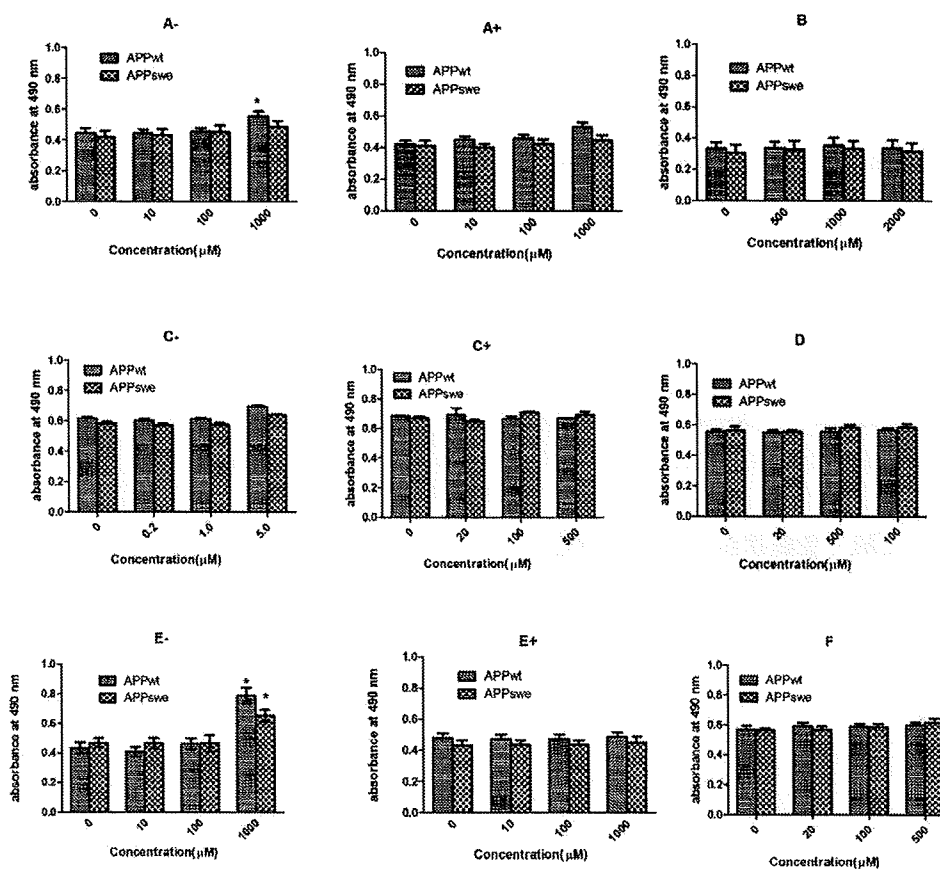


図 1 各 ARB の LDH アッセイ

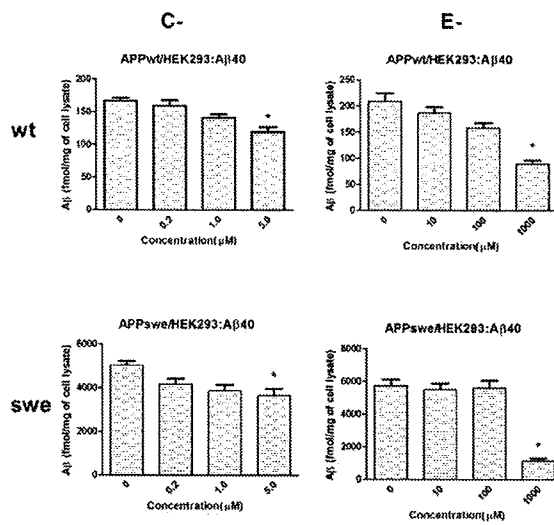


図2 アミロイドβ40を減少させるARB

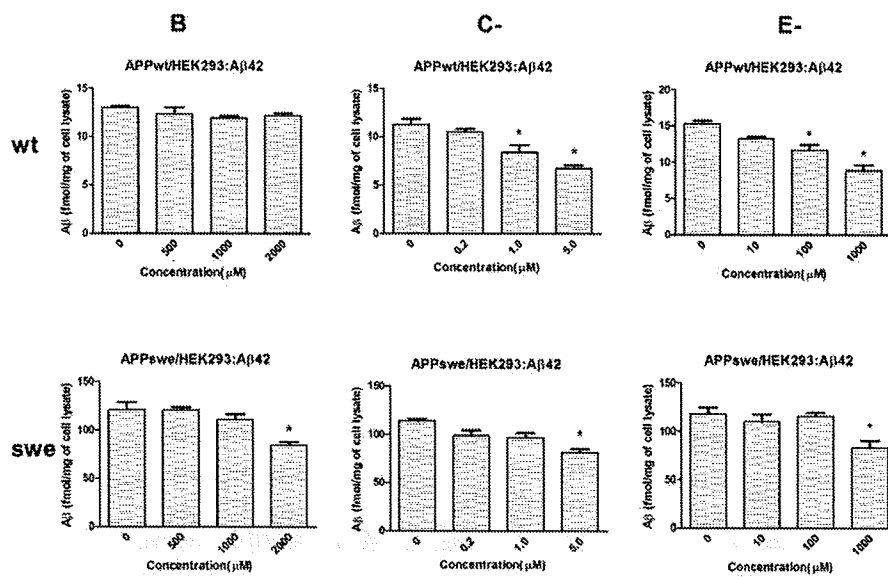


図3 アミロイドβ42を減少させるARB

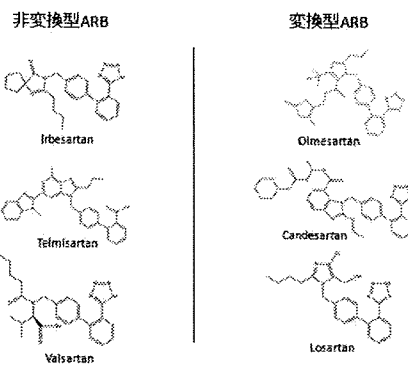
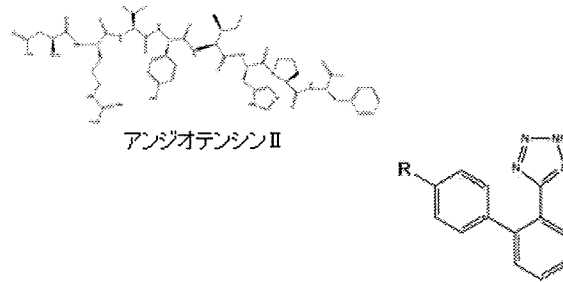
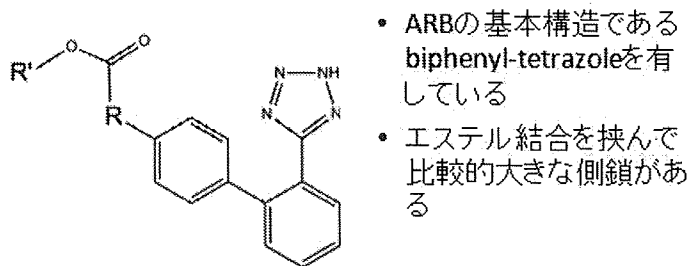


図4 各ARBの構造式



- Biphenyl-tetrazolが基本骨格で各薬剤で側鎖が異なる
- 変化群では腸管からの吸収をよくするため、エステル結合により側鎖を修飾している。
- 側鎖内にカルボン酸がある方が受容体結合能が強い

図5 ARBの基本構造



- ARBの基本構造である biphenyl-tetrazoleを有している
- エステル結合を挟んで比較的大きな側鎖がある

図6 アミロイドβ産生減少薬剤の特徴

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
 アミロイドーシスに関する調査研究班 分担研究報告書

酸化ストレスはプレセニン1の発現増加を介して A β 産生を促進する

研究分担者 玉岡 晃 筑波大学臨床医学系神経内科

共同研究者 織田彰子*、**、荒木亘**

*筑波大学臨床医学系神経内科、**国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨 酸化ストレスは、アルツハイマー病態の中心的因子であるアミロイド β 蛋白(A β)との密接な関連が指摘されている。また、A β 産生に関わるプロテアーゼである β セクレターゼと γ セクレターゼ(プレセニン1(PS1)複合体)が、脂質ラフトと呼ばれる膜ドメインに局在し、そこでA β が優先的に産生されることが示唆されている。本研究では、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞および Swedish 変異型アミロイド前駆体蛋白を過発現する SH-SY5Y 細胞に、酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA)を負荷し、これらのセクレターゼの発現変化およびA β 分泌の変化について検討した。EA 負荷により、PS1 mRNA、脂質ラフトの PS1 蛋白、A β 分泌が増加し、抗酸化物質である N-acetylcystein によりこれらの増加は抑制された。酸化ストレスは、PS1 mRNA 発現増加を介して脂質ラフトの PS1 蛋白を増加させ、A β 産生を促進させる可能性が考えられた。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease;AD)患者の脳では、病初期から酸化ストレスマーカーや活性酸素種の増加が認められること、また、酸化ストレスが AD 病態の中心的因子であるアミロイド β 蛋白(A β)を増加させることが指摘されている。また、酸化ストレスが AD 病態、特に A β の増加に関与していることも示唆されている。A β はアミロイド前駆体蛋白(APP)が β セクレターゼ(BACE1)と γ セクレターゼ(プレセニン1(PS1)複合体)により二段階の切断を受けて生成する。また、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールとスフィンゴ脂質に富む膜ドメインにこれらのセクレターゼが局在しており、A β が脂質ラフトで優先的に産生されることが示唆されている。最近、酸化ストレスによるこれらのセクレターゼの発現変化が報告されてきているが、その詳細はまだ不明である。

前年度、我々は酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA)を用い、酸化ストレスによる PS1 の発現増加および脂質ラフトの PS1 蛋白増加を報告した。今年度は、PS1 の発現変化に加え A β 産生の変化についても検討し、AD 病態における酸化ストレスの役割の解明に寄与することを目

的とした。

B. 研究方法

1. 酸化ストレスによる BACE1 および γ セクレターゼ複合体の変化

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞および Swedish 変異型アミロイド前駆体蛋白を過発現する SH-SY5Y 細胞(SH-swAPP 細胞)に、酸化ストレス物質である Ethacrynic acid (EA) を 30 μ M、20 時間負荷し、細胞内蛋白質の変化をウエスタンブロット解析で検討した。

SH-SY5Y 細胞を EA で処理した後、1%CHAPS を含むバッファーで処理し、蔗糖密度勾配遠心法により分画し、各画分をウエスタンブロット解析した。

2. 酸化ストレスによる PS1 蛋白増加に対する抗酸化物質の効果

SH-SY5Y 細胞を抗酸化物質である N-acetylcystein (NAC) 2mM で 8 時間前処理した後、EA (30 μ M)を NAC (2mM)と共に負荷した。細胞内蛋白質および蔗糖密度勾配遠心法により得られた脂質ラフト画分をウエスタンブロット解析した。

3. 酸化ストレスによる PS1 mRNA の変化と、抗酸化物質の効果

SH-SY5Y 細胞を EA (30 μ M) で 16 時間処理し、細胞中の PS1 mRNA レベルを RT-PCR 法および real-time PCR 法で測定した。次に、細胞を NAC (2mM) で前処理後、EA を NAC と共に負荷し、PS1 mRNA レベルを測定した。

4. 酸化ストレスによる A β 分泌の変化と、抗酸化物質の効果

SH-swAPP 細胞を EA (30 μ M) で 24 時間処理し、培養上清中の A β 40, A β 42 レベルをサンドイッチ ELISA 法で測定した。次に、細胞を NAC (2mM) で前処理後、EA を NAC と共に負荷し、培養上清中の A β レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

問題なし

C. 研究結果

1. 酸化ストレスによる BACE1 および γ セクレターゼ複合体の変化

SH-SY5Y 細胞, SH-swAPP 細胞に EA を負荷した場合、酸化ストレスマーカーの heme-oxygenase-1 (HO-1) の蛋白発現が誘導された。同時に、PS1 蛋白レベルの有意な増加が観察された。しかし、他の γ セクレターゼ複合体因子(ニカストリン, APH-1, PEN-2) や BACE1 蛋白レベルには変化が認められなかった。

γ セクレターゼ複合体因子および成熟型 BACE1 蛋白は、主に脂質ラフト画分に局在していた。EA 負荷により、脂質ラフト画分の PS1 蛋白レベルの有意な増加が認められたが、他の γ セクレターゼ複合体因子や BACE1 蛋白レベルは変化しなかった。

2. 酸化ストレスによる PS1 蛋白増加に対する抗酸化物質の効果

NAC により、EA 負荷による細胞内および脂質ラフト画分の HO-1 蛋白の増加が抑制された。同時に、PS1 蛋白の増加が抑制された。

3. 酸化ストレスによる PS1 mRNA の変化と、抗酸化物質の効果

EA 負荷した SH-SY5Y 細胞において、PS1 mRNA レベルが有意に増加した。また、NAC により、EA 負荷による PS1 mRNA レベルの増加が抑制された。

4. 酸化ストレスによる A β 分泌の変化と、抗酸化物質の効果

EA 負荷により、A β 40 が約 2 倍、A β 42 が約 1.5 倍に増加した。また、NAC により、EA 負荷による A β レベルの増加が抑制された。

D. 考察

我々は本研究において、酸化ストレス刺激が神経系細胞の β , γ セクレターゼおよび A β 分泌に及ぼす影響について検討した。そして SH-SY5Y 細胞を酸化ストレス物質である EA で処理した場合に、細胞内および脂質ラフト内の PS1 蛋白の増加、PS1 mRNA の増加を観察した。また、SH-swAPP 細胞を EA で処理した場合にも、同様な細胞内 PS1 蛋白増加と共に、A β 分泌が増加することを観察した。そしてこれらの増加は抗酸化物質である NAC により抑制されることを観察した。これらの結果は、酸化ストレスが PS1 mRNA 発現増加を介して脂質ラフトの PS1 蛋白レベルを増加させ、その結果 A β の産生が促進される可能性を示唆している。A β はまた、酸化ストレスを誘導することが知られており、悪循環を形成する可能性が考えられ、抗酸化物質による AD 治療の可能性が示唆される。

E. 結論

酸化ストレス物質である EA 負荷により、PS1 mRNA, 脂質ラフトの PS1 蛋白, A β 分泌が増加し、抗酸化物質である NAC によりその増加は抑制された。酸化ストレスは、PS1 の発現増加を介して脂質ラフトの PS1 蛋白を増加させ、その結果 A β 産生が促進される可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oda A, Tamaoka A, Araki W: Oxidative stress up-regulates presenilin 1 in lipid rafts in neuronal cells. *J Neurosci Res*, in press.
- 2) Hirohata M, Yoshita M, Ishida C, Ikeda S-I, Tamaoka A, Kuzuhara S, Shoji M, Ando Y, Tokuda T, Yamada M: Clinical features of non-hypertensive

lobar intracerebral hemorrhage related to cerebral amyloid angiopathy. *European J of Neurology*, in press.

3) Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H: TDP-43 M337V Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis in Japan. *Intern Med*, in press.

4) Nakamura Y, Nakamagoe K, Kawachi Y, Hosaka A, Mukai H, Chiba S, Ohtsuka F, Tamaoka A: Intravascular large B cell lymphoma with neurological symptoms diagnosed on the basis of a senile angioma-like eruption. *BMJ Case Reports*, March 26, 2009.

5) Nakamagoe K, Watanabe M, Takeda T, Mizutani T, Tamaoka A: Parkinsonism with organophosphate poisoning. *BMJ Case Reports*, August 13, 2009.

6) Nakamagoe K, Tamaoka A: Cerebral single photon emission computer tomography in thalamic lacunar infarction presenting with amnesia. *BMJ Case Reports*, September 28, 2009.

7) Nakamagoe K, Furuta J, Shioya A, Tamaoka A: A case of vitiligo vulgaris showing a pronounced improvement after treatment for myasthenic gravis. *BMJ Case Reports*, December 9, 2009.

8) Saitoh Y, Ogawa M, Naito Y, Komatsuzaki Y, Tagaya H, Arima K, Tamaoka A, Kitamoto T, Murata M: Discordant clinicopathological phenotypes in a Japanese kindred of fatal familial insomnia. *Neurology* 74:86-89, 2010.

9) Yokota O, Tsuchiya K, Arai T, Yagishita S, Matsubara O, Mochizuki A, Tamaoka A, Yoshida H, Terada S, Ishizu H, Kuroda S, Akiyama H: Clinicopathological characterization of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions and Pick's disease. *Acta Neuropathol* 117:429-444, 2009.

10) Araki W, Kume H, Oda A, Tamaoka A, Kametani

F: IGF-1 promotes β -amyloid production by a secretase-independent mechanism. *Biophys Biochem Res Commun* 380:111-114, 2009.

11) 玉岡 晃: 認知症の薬物治療の実際. *Medical Practice* 26:2095-2098, 2009.

12) 玉岡 晃: アルツハイマー病の治療薬について教えてください. *Modern Physician* 30:187-191, 2009.

13) 富所康志、玉岡 晃: BRI 遺伝子変異に伴う家族性認知症—典型的老人斑に乏しい、あらたな Alzheimer 病のモデル—. *医学のあゆみ* 229: 415-420, 2009.

14) 玉岡 晃: 認知症臨床の実際. *MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY* 28:3-7, 2009.

2. 学会発表

1) 玉岡 晃: 認知症の診断と治療の実際. 平成 22 年度日本内科学会生涯教育講演会、大阪、2.7、2010.

2) 玉岡 晃: 認知症の診断と治療の実際. 2009 年度老人性認知症研修会、伊勢原、11.26、2009.

3) 富所康志、玉岡 晃、Jorge Ghiso: 典型的老人斑を欠く病理学的非典型アルツハイマー病 Iowa 家系脳における可溶性 A β 分子の N-/C-末端側の不均一性. 第 28 回日本認知症学会、仙台、11.21、2009.

4) 織田彰子、荒木亘、玉岡 晃: 酸化ストレスは脂質ラフトのプレセニン 1 発現を増加させ、A β 産生を促進する. 第 28 回日本認知症学会、仙台、11.21、2009.

5) 荒木 亘、久米 秀明、織田 彰子、本木 和美、玉岡 晃: β セクレターゼの脂質ラフト局在と shedding のパルミチル化による制御. 第 28 回日本認知症学会、仙台、11.21、2009.

6) 玉岡 晃: 高度アルツハイマー病の診断と治療. ひたちなか認知症講演会、ひたちなか、11.11、2009.

7) Tomidokoro Y, Tamaoka A, Holton JL, Lashley T, Rostagno A, Revesz T, Ghiso J: Pyroglutamate formation at the N-termini of ABri molecules in familial British dementia is not restricted to the central nervous system. Annual meeting of Society for