

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月11日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659170

研究課題名（和文）医療行為や食品等によるアルツハイマー病の伝播あるいは発症促進に関する研究

研究課題名（英文）Study on possible transmission of Alzheimer's disease with medical procedures and food

## 研究代表者

山田 正仁 (YAMADA MASAHITO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80191336

研究成果の概要（和文）：アミロイドβ蛋白（Aβ）あるいはそれ以外のアミロイド蛋白凝集体を投与することによってAβ凝集が促進されるかを検討した。Aβばかりでなく、αシヌクレイン蛋白、フィブロイン、セリシン、アクチン、カゼイン等の線維断片は試験管内でAβ40及びAβ42凝集を促進した（cross-seeding効果）。これらの蛋白凝集体はアルツハイマー病発症を促進する可能性があり、モデル動物への投与実験が進行中である。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) may be transmissible by seeding or cross-seeding effects of exogenous protein aggregates through medical procedures, food, and so on. The purpose of this study is to determine whether Aβ or non-Aβ aggregates promote Aβ aggregation in *in vitro* and *in vivo* AD models. We found that fibrillar fragments of α-synuclein, fibroin, sericin, actin, casein, as well as Aβ40 and Aβ42 promoted aggregation of Aβ40 and Aβ42 *in vitro*. An *in vivo* study with AD model mice to which the aggregates of these proteins were administered is ongoing to reveal possible induction of AD by these protein aggregates.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	540,000	3,240,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病、医療行為、食品、アミロイド、アミロイドβ蛋白、伝播

## 1. 研究開始当初の背景

Alzheimer病（AD）は脳のアミロイドβ蛋白（Aβ）蓄積を特徴とする。一方、脳に異常プリオン蛋白（PrP）が蓄積するプリオン病では、異常PrPが病態の中心となり伝播し、BSE牛の経口摂取による変異型Creutzfeldt-Jakob病（CJD）や硬膜移植後CJDなどの医療行為による医原性CJDが社

会問題となっている。PrPのみならずAβなどの蛋白凝集を本態とするAD等の疾患も、外来性の凝集蛋白がシードとして作用して宿主の蛋白のミスフォールドと凝集を引き起こすという共通の機序によって伝播する可能性がある。ADが手術等の医療行為や食品等を介して伝播あるいは発症促進することがあれば大きな問題となる。

## 2. 研究の目的

A $\beta$  あるいは A $\beta$  以外のアミロイド蛋白凝集体を外来性に投与することによって A $\beta$  凝集が促進されるか否かを、AD 試験管モデルおよび AD 動物モデルを用いて明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験管内 A $\beta$ 凝集系を用いた研究

A $\beta$  40、A $\beta$  42、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白 ( $\alpha$ S)、フィブリン (シルク蛋白)、セリシン (シルク蛋白)、アクチン、カゼイン、腓ラ島アミロイド蛋白 (IAPP) 凝集体の A $\beta$  凝集に対する seeding あるいは cross-seeding 効果をチオフラビン T 蛍光法 (ThT) および電子顕微鏡等を用いて試験管内 A $\beta$  凝集系で検討した。試験管内で形成させた各蛋白線維を超音波破碎したもの、あるいはオリゴマーをシードとして用いて、それらの A $\beta$  線維形成促進効果を評価した。また、A $\beta$  40、A $\beta$  42、 $\alpha$ S 凝集体の  $\alpha$ S 凝集に対する seeding あるいは cross-seeding 効果をチオフラビン S 蛍光法 (ThS) および電子顕微鏡等を用いて試験管内  $\alpha$ S 凝集系で上記と同様に検討した。

### (2) AD モデルマウスを用いた研究

A $\beta$  あるいはそれ以外の各種蛋白 (上記) の凝集体を AD モデルマウスに投与し (脳内、腹腔内、経口)、脳内の A $\beta$  凝集に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 試験管内 A $\beta$ 凝集系を用いた研究

A $\beta$  40、A $\beta$  42のみを pH 7.5、37°C でインキュベートしたところ、ThT の蛍光値はラグタイムを伴うシグモイドカーブを描いて増加した (重合核依存性重合反応)。超音波破碎された A $\beta$  40、A $\beta$  42 線維あるいはオリゴマー (Fig. 1) を A $\beta$  40 および A $\beta$  42 凝集系に加えたところ、ThT の蛍光値は、ラグタイムなく速やかに増加した (seeding 効果) (Figs. 2 & 3)。

一方、超音波破碎された  $\alpha$ S 線維あるいは  $\alpha$ S オリゴマー (Fig. 1) を A $\beta$  40 および A $\beta$  42 凝集系に加えたところ、ThT の蛍光値は、A $\beta$  40、A $\beta$  42 線維を加えた反応以上に速く増加した (cross-seeding 効果) (Figs. 2 & 3)。

さらに、 $\alpha$ S のみをインキュベートしたところ、ThS の蛍光値はラグタイムを伴うシグモイドカーブを描いて増加したが (重合核依存性重合反応)、超音波破碎された  $\alpha$ S、A $\beta$  40 あるいは A $\beta$  42 線維あるいはオリゴマーを  $\alpha$ S 凝集系に加えたところ、ThS の蛍光値はラグタイムなく速やかに増加した (seeding 及び cross-seeding 効果) (Fig. 4)。

次に、超音波破碎されたフィブリン、セリシン、アクチン、カゼイン、IAPPセリシン (シルク)、アクチン、カゼイン、腓ラ島アミロイド蛋白の線維を、A $\beta$  40 および A $\beta$  42 凝集系に加えた所、ThT の蛍光値は、ラグタイムなく、速やかに増加した (seeding 効果)。Seeding 効果の強さは、A $\beta$  40、A $\beta$  42 とともにアクチン > セリシン  $\approx$  カゼイン  $\approx$  腓ラ島アミロイド蛋白 > フィブリンの順であった。

これらの *in vitro* の研究により、A $\beta$  自体のみならず、 $\alpha$ S のようなヒト脳内の存在している他の蛋白、さらにはフィブリン (シルク)、セリシン (シルク)、カゼイン (ミルク) などのシルクやミルクに含まれる外来性の蛋白が A $\beta$  凝集を促進することが明らかになった (cross-seeding 効果)。

さらに、これらの蛋白シードが A $\beta$  に結合して A $\beta$  凝集を促進する結合部位や機序について、NMR 等を用いて解析を進めている。

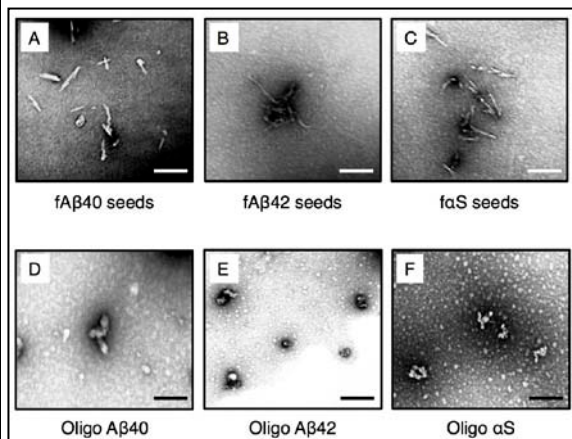
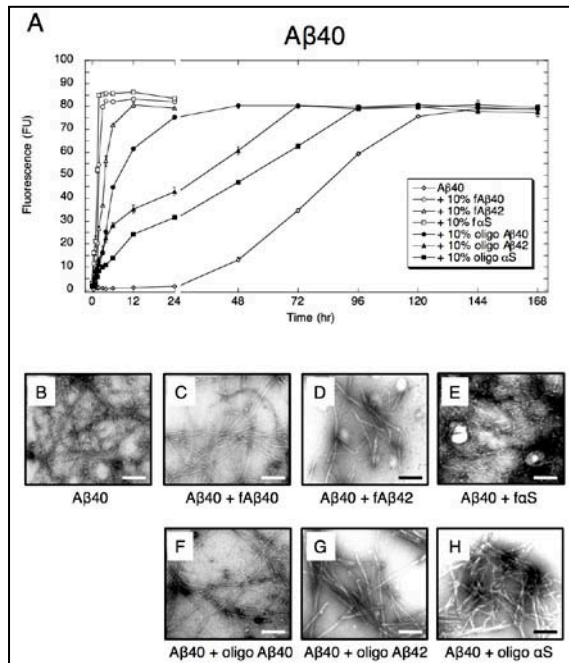
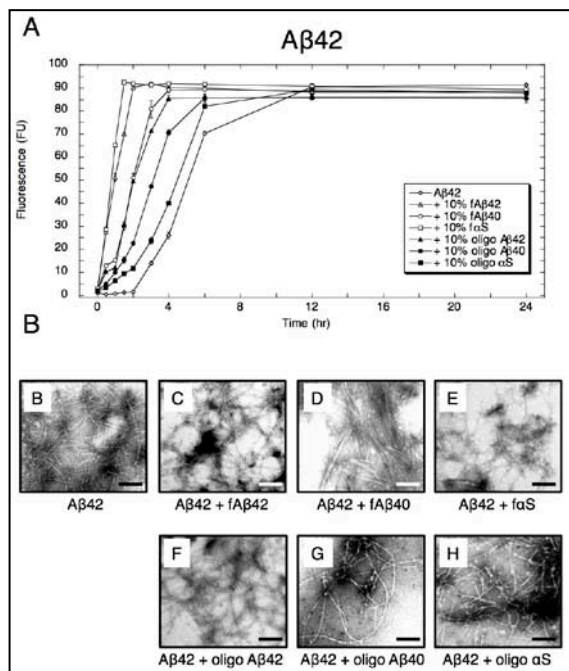


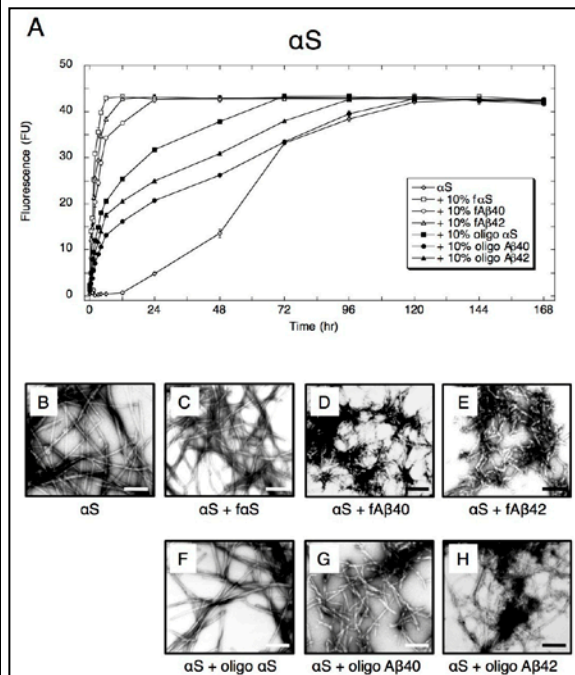
Fig. 1. Morphology of sonicated fibrils and oligomers of A $\beta$  40, A $\beta$  42, and  $\alpha$ S. EM was used to determine the morphologies of fA $\beta$  40 (A), fA $\beta$  42 (B), f $\alpha$ S (C), oligo A $\beta$  40 (D), oligo A $\beta$  42 (E), and oligo  $\alpha$ S (F). Scale bars indicate 100 nm.



**Fig. 2. Cross seeding effects of Aβ40 with Aβ42 or αS.** (A) ThT binding. A 25-μM Aβ40 solution was incubated without (◇) or with 10% (v/v) fAβ40 (○), fAβ42 (△), fαS (□), cross-linked oligomers (oligo) of Aβ40 (●), Aβ42 (▲), or αS (◻). Binding is expressed as the mean fluorescence (FU) ± S.E. (B-H) Aβ40 assembly morphology. EM was used to determine the morphologies of assemblies of Aβ40 without (B) or with fAβ40 (C), fAβ42 (D), fαS (E), oligo Aβ40 (F), oligo Aβ42 (G), or oligo αS (H). Scale bars indicate 100 nm.



**Fig. 3. Cross seeding effects of Aβ42 with Aβ40 or αS.** (A) ThT binding. A 25-μM Aβ42 solution was incubated without (◇) or with 10% (v/v) fAβ42 (○), fAβ40 (△), fαS (□), oligo Aβ42 (▲), oligo Aβ40 (●), or oligo αS (◻). Binding is expressed as the mean fluorescence (FU) ± S.E. (B-H) Aβ42 assembly morphology. EM was used to determine the morphologies of assemblies of Aβ42 without (B) or with fAβ42 (C), fAβ40 (D), fαS (E), oligo Aβ42 (F), oligo Aβ40 (G), or oligo αS (H). Scale bars indicate 100 nm.



**Fig. 4. Cross seeding effects of αS with Aβ40 or Aβ42.** (A) ThS binding. A 25-μM αS solution was incubated without (◇) or with 10% (v/v) fαS (○), fAβ40 (△), fAβ42 (□), oligo αS (●), oligo Aβ40 (▲), or oligo Aβ42 (◻). Binding is expressed as the mean fluorescence (FU) ± S.E. (B-H) αS assembly morphology. EM was used to determine the morphologies of assemblies of αS without (B) or with fαS (C), fAβ40 (D), fAβ42 (E), oligo αS (F), oligo Aβ40 (G), or oligo Aβ42 (H). Scale bars indicate 100 nm.

(2) ADモデルマウスを用いた研究

上記の各種蛋白凝集体が投与された時に、脳内におけるAβ凝集に影響するか否かを評価するのに最適なモデルとして、海外共同研究者であるチュービンゲン大学の Jucker 教授と共同で、R1.40 マウスをブリードしホモ接合体マウスを準備した。さらに、2013年3

月、金沢大学動物実験委員会及び遺伝子組換え実験安全委員会から、本実験に関する承認を得て、実験を開始した。

(1)の *in vitro* で cross-seeding 効果がみられた蛋白シーズを脳内、腹腔内、経口投与し、脳内 A $\beta$  凝集への影響、学習機能等への影響を検討する。もし、モデル動物で発症促進効果がみられるようであれば、医療行為、食品、化粧品等に含まれるアミロイドあるいはアミロイド様蛋白が AD のリスクである可能性を考え、大規模な疫学的研究を計画する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① 浜口 毅、山田正仁：脳  $\beta$  アミロイドーシスの伝播。 *Dementia Japan* 27:38-44, 2013. 査読無

② Ono K., \* Takahashi R., \* Ikeda T., Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid  $\beta$ -protein and  $\alpha$ -synuclein. *J Neurochem* 122:883-90, 2012. \*Equally contributed. 査読有

DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07847.x.

③ 浜口 毅、山田正仁： $\beta$  アミロイドの propagation による進展。 *Current Therapy* 30:336-340, 2012. 査読無

[学会発表] (計 1 件)

① 浜口 毅、山田正仁：脳  $\beta$  アミロイドーシスの propagation. 第 30 回日本認知症学会学術集会 (招待講演)、2011 年 11 月 11 日、タワーホール船堀 (東京都)

[図書] (計 1 件)

1. 山田正仁 (編著) アミロイドーシスー診療のすべて。医歯薬出版、東京、2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 正仁 (YAMADA MASAHITO)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号：80191336

### (2) 研究分担者

小野 賢二郎 (ONO KENJIRO)  
金沢大学・附属病院・講師  
研究者番号：70377381