

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461267

研究課題名(和文)食品や化粧品に含まれる蛋白による脳 アミロイドシスの促進に関する研究

研究課題名(英文) A study on propagation of cerebral b-amyloidosis with protein contained in foods and cosmetics

研究代表者

濱口 毅 (Hamaguchi, Tsuyoshi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：70452109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、試験管内でアミロイドbの線維化を促進することを確認しているカゼイン、フィブロイン、セリシン、アクチンなどの食品あるいは化粧品由来のペプチドが、生体内でもアミロイドbの線維化を促進するかを検討することを目的としている。試験管内で線維化したカゼイン、アクチンの線維をモデルマウスの脳および腹腔内に接種し、接種1年後に解剖して脳へのアミロイドbの沈着程度を検討した。カゼイン線維を脳内に接種したマウスの一部では、脳血管にアミロイドbの沈着を認めた。

研究成果の概要(英文)：We reported that casein, fibroin, siren, and actin, which are contained in foods or cosmetics, could promote amyloid b protein fibril formation in vitro. The objective of this study is to investigate whether the fibrils of these peptides can promote cerebral b-amyloidosis in vivo. We made the fibrils of casein and actin in vitro, and injected them into Alzheimer's disease (AD) model mouse brain. Furthermore, intraperitoneal injection was also performed. One year after the injections, we evaluated amyloid b protein (Ab) deposition in the mice brain. We found a little Ab deposition on the blood vessels in AD model mice injected casein into the brain. We will continue to evaluate Ab deposition of the mice brains.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 化粧品 食品 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病 (Alzheimer's disease: AD) の発症には、アミロイドβ蛋白 (amyloid β: Aβ) が凝集線維化し、脳に沈着することが大きな役割を果たしている。Aβは全ての人を持っている蛋白であるが、その Aβが凝集線維化して脳に沈着する原因は現在のところ分かっていない。試験管内の Aβの凝集線維化メカニズムは、他のアミロイドを形成する蛋白と同様に、核依存性重合モデルによって説明できる^{1,2}。このモデルは、Aβモノマーの中に核となる少量の線維化された Aβが入ると、自然に Aβモノマーが線維化していくというものである。この核依存性重合モデルによる凝集線維化は、モノマーと核となる少量の線維化された蛋白が異なるでも起こることが報告されており、異なる蛋白が互いに反応して試験管内³⁻⁶や生体内⁷で凝集線維化が起こることが報告されている。申請者を含む研究グループはこれまで、この核依存性重合モデルを用いて試験管内で Aβが凝集線維化を起こす実験系を確立し、Aβが脳に沈着する原因を解明することを目的に様々な研究を行い、Aβの凝集を阻害する様々な物質を報告してきた⁸⁻¹¹。それらの研究を進めていくうちに、食品や化粧品に含まれる、カゼイン、フィブロイン、セリシン、アクチンといったアミロイド形成可能な蛋白が、試験管内にて Aβ凝集を促進することを見出した¹²。カゼインはほ乳類の母乳に含まれる蛋白で、牛乳には 80%、ヒト母乳には 20-45%含まれている。フィブロインおよびセリシンは絹に含まれる蛋白で、補助食品や化粧品といったヒトが摂取するものに含まれている。アクチンは筋肉に含まれる蛋白で、食肉に含まれている。これらの蛋白を摂取することによって、脳への Aβ沈着が促進されるとすると、食品や化粧品が AD 発症や症状進行の原因となっている可能性があり、社会的にも非常に大きな問題となる可能性がある。

近年、脳に沈着した Aβをマウスの脳内や腹腔内に接種すると、プリオン病におけるプリオン蛋白と同様に、脳への Aβ沈着が促進されるということが報告されている¹³⁻¹⁵。申請者はこの実験系の第一人者である Jucker 教授のもとで研究を行い、マウスを用いた研究にて、脳内に Aβを注入すると、脳への Aβ沈着を促進し、その Aβ沈着が脳全体に広がることを報告した¹³⁻¹⁵。

2. 研究の目的

試験管内で Aβの線維化を促進することを報告しているカゼイン、アクチン、フィブロイン、セリシンといった食品や化粧品由来の蛋白質のアミロイド線維が、生体内でも脳への Aβ沈着を促進するかについて検討を行うこと。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの線維化

カゼイン、フィブロイン、セリシン、アクチンのペプチドを 37°C の PBS 内に 4 週間振盪し、線維化を行った。線維化の程度については、1 週毎にチオフラビン T 法にて線維化の程度を定量し、4 週間後には電子顕微鏡で線維化について評価を行った。線維化されたそれぞれのペプチドは、超音波にて破碎し、使用するまで -80 °C にて保存した。

(2) AD モデルマウス

今回の研究は内因性の Aβ沈着が 13-15 ヶ月で始まる APP 遺伝子改変マウスである R1.40 マウスを用いて実験を行った。R1.40 マウスは、申請者が現在金沢大学で繁殖中である。申請者は、この R1.40 マウスの脳に Aβを含む脳ホモジネートを注入し、1 年後に Aβ沈着が脳皮質および海馬全体に広がっていたことを報告した¹⁵。更に、腹腔内に投与したところ投与 10 ヶ月後には脳 Aβ沈着が始まることを確認した¹⁶。

(3) 作成したペプチドの線維または PBS (コントロール) の R1.40 マウス脳への注入

麻酔が十分にかかった R1.40 マウスをマウス脳固定器に固定し、ハミルトンシリンジを用いて作成したペプチドの線維または PBS (コントロール) を両側の海馬 (2.5 μ l) およびその上部の皮質 (1.0 μ l) にゆっくりと注入した。注入した傷口は縫合し、麻酔から覚醒するまで観察をした。

(4) 作成したペプチドの線維または PBS (コントロール) の R1.40 マウス腹腔内への注入

R1.40 マウスの腹腔内に 1ml の作成したペプチドの線維または PBS (コントロール) を 1 週間おきに 4 回注入した。

(5) 結果の解析

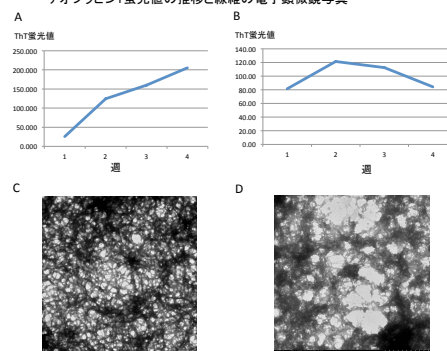
脳および腹腔内への注入の 1 年後に R1.40 マウスの脳を解析した。採取した脳を半切し、左半球は病理学的検討に、右半球は生化学的検討に用いた。病理学的検索を行うためにパラフィンに包埋した左半球は、5 μ m の厚さに薄切し A β に対する抗体である 4G8 を用いて免疫組織化学的検討を行った。免疫組織学的検討では脳実質への A β 沈着程度や脳血管への A β 沈着程度を光学顕微鏡にて観察した。また、凍結した右半球については ホモジネートし、その上清に含まれる A β をウェスタンブロットにて検討する。

4. 研究成果

(1) ペプチドの線維化

チオフラビン T 法では、カゼインは週毎にチオフラビン T 蛍光値の上昇を認めた (図 1A)。アクチンもチオフラビン T 蛍光値の上昇を認めたが、2 週目をピークに低下した (図 1B)。セリシンとフィブロインは、チオフラビン T 蛍光値の上昇を認めなかった。電子顕微鏡による観察では、カゼインおよびアクチンについてはアミロイド線維が豊富に観察できた。しかし、セリシンとフィブロインについてはアミロイド線維を観察できず、今回の条件では線維化されなかったと考えた。

図1. カゼインとアクチンの試験管内での線維化におけるチオフラビンT蛍光値の推移と線維の電子顕微鏡写真



(2) 作成したペプチドの線維の AD モデルマウス脳内および腹腔内への注入

カゼインとアクチンについて、AD モデルマウスの脳内および腹腔内に注入を行った。コントロールとしての溶媒注入も含めると、脳内は 30 匹、腹腔内は 17 匹のマウスに行った。年齢・性別を揃えた多くのマウスを必要としたため、AD モデルマウスの繁殖に少し時間を要した。

(3) AD モデルマウス脳の解析

AD モデルマウスの繁殖に少し時間を要したため、計画は少し遅れ気味となったが、脳内投与・腹腔内投与ともに予定通り注入から 1 年後に AD モデルマウスを解剖してその脳の評価を行った。現在、カゼインの脳内投与を行った AD モデルマウスの結果が出始めているが、脳実質への A β 沈着は認めないが、脳血管への A β 沈着を認めている。今後、解剖したマウスの免疫染色を更に進めて検討を行っていく予定である。

<引用文献>

- Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell 1993;73:1055-1058.
- Lomakin A, Chung DS, Benedek GB, Kirschner DA, Teplow DB. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. Proc Natl Acad Sci U S A

- 1996;93:1125-1129.
3. O'Nuallain B, Williams AD, Westermark P, Wetzel R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. *J Biol Chem* 2004;279:17490-17499.
 4. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid beta-protein and alpha-synuclein. *J Neurochem* 2012;122:883-890.
 5. Yagi H, Kusaka E, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y. Amyloid fibril formation of alpha-synuclein is accelerated by preformed amyloid seeds of other proteins: implications for the mechanism of transmissible conformational diseases. *J Biol Chem* 2005;280:38609-38616.
 6. Waxman EA, Giasson BI. Induction of intracellular tau aggregation is promoted by alpha-synuclein seeds and provides novel insights into the hyperphosphorylation of tau. *J Neurosci* 2011;31:7604-7618.
 7. Johan K, Westermark G, Engstrom U, Gustavsson A, Hultman P, Westermark P. Acceleration of amyloid protein A amyloidosis by amyloid-like synthetic fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2558-2563.
 8. Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid-beta aggregation pathway. *Am J Pathol* 2009;175:2557-2565.
 9. Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. Anti-amyloidogenic therapies: strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1538-1552.
 10. Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 2010;16:285-297.
 11. Ono K, Hamaguchi T, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:575-586.
 12. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid beta-protein aggregation. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:646-653.
 13. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, et al. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 2006;313:1781-1784.
 14. Eisele YS, Obermuller U, Heilbronner G, et al. Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* 2010;330:980-982.
 15. Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of Abeta seeds, and not age per se, is critical to the initiation of Abeta deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 2012;123:31-37.
 16. Eisele YS, Fritschi SK, Hamaguchi T, et al. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral beta-amyloidosis. *J Neurosci* 2014;34:10264-10273.
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 4 件)
1. Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, Naiki H, Sanjo N, Mizusawa H, Yamada M. Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid amigopathy. *Acta Neuropathol* 2016; 132: 313-315. 査読あり
 2. Ye L, Hamaguchi T, Fritschi SK, Eisele YS, Obermüller U, Jucker M, Walker LC. Progression of seed-induced A β deposition within the limbic connection. *Brain Pathol* 2015; 25: 743-752. 査読あり
 3. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada

M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842: 646-653. 査読あり

4. Eisele YS*, Fritschi SK*, Hamaguchi T*, Obermüller U, Föger P, Skodras A, Schäfer C, Odenthal J, Heikenwalder M, Staufenbiel M, Jucker M. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral β -amyloidosis. *J Neurosci* 2014; 34: 10264-10273 *equally contributed. 査読あり

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

濱口 毅 (HAMAGUCHI Tsuyoshi)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：70452109

(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
削除：平成 27 年 7 月 28 日

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