

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 2 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790815

研究課題名（和文）ヒト生体試料のアミロイドβ蛋白オリゴマー形成への影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the effect of human living specimen on amyloid β-protein oligomerization

研究代表者

小野 賢二郎 (ONO KENJIRO)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：70377381

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病（AD）ではアミロイドβ蛋白（Aβ）のオリゴマーが注目されている。Photo-induced cross-linking of unmodified proteins 法を用いて、33 例の AD 患者と対照として 33 例の非認知症性疾患患者の脳脊髄液の Aβ のオリゴマー化に対する効果を検討した。脳脊髄液は Aβ 40 および Aβ 42 のオリゴマー化を抑制した。更に、脳脊髄液の Aβ オリゴマー化の抑制効果は、AD 患者の脳脊髄液が対照群よりも有意に弱かった。AD 患者は Aβ のオリゴマー化を促進する脳脊髄液環境を有しているものと推察された。

研究成果の概要（英文）：

Oligomers of the amyloid β-protein (Aβ) play an important role in Alzheimer's disease (AD). We investigated the effect of cerebrospinal fluid (CSF) from 33 patients with AD and 33 age-matched, non-demented controls on oligomerization of Aβ 40 and Aβ 42 using photo-induced cross-linking of unmodified proteins. CSF inhibited oligomerization of both Aβ 40 and Aβ 42. This inhibitory effect was significantly weaker in AD patients than in non-demented controls. Our results indicate that AD patients have a CSF environment favorable for Aβ oligomerization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脳神経疾患，認知症，アミロイドβ蛋白，オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の病態において、約 4.3-4.5kDa の分子量のアミロイドβ蛋白（Aβ）の凝集が、アルツハイマー病の発症機構に極めて重要な意義を有するものと考えられている（アミロイドカスケード仮説）

（Hardy and Selkoe, Science, 2002）。Aβ は細胞からの正常分泌産物で、正常人における脳脊髄液や血漿においても検出される（Haass et al., Nature, 1992）。アルツハイマー病では、Aβ の産生の増加や代謝、クリアランスの低下がアミロイド沈着とそれ

に付随する神経病理学的変化を引き起こすと考えられている (Du et al., Brain, 2003)。A β は、構造を変化させたモノマーからオリゴマー、そしてプロトファイブリルや成熟線維といった、より多量体に凝集することにより神経細胞毒性を獲得する (Hardy and Selkoe, Science, 2002)。近年、より早期の凝集段階であるオリゴマーに注目が集まっている。では、なぜ、正常人では、A β は異常凝集しないのだろうか？

2. 研究の目的

本研究は、アルツハイマー病における新たな診断法・治療法の開発に向けて、アミロイドオリゴマー形成に及ぼす生体試料 (脳脊髄液、血漿) の影響を解析し、アルツハイマー病に特異的な変化を調べる。さらに、生体試料中の抑制成分を同定する。

3. 研究の方法

(1) Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)法を主に用いて、AD患者と非認知症性疾患患者の脳脊髄液のA β 40およびA β 42のオリゴマー形成反応に対する影響を検討した。電気泳動および銀染色後にデンシトメトリーを行い、33例のAD患者と対照として年齢を適合させた33例の非認知症性疾患患者の脳脊髄液のA β のオリゴマー化に対する抑制効果を比較した。

(2) A β の線維化を抑制すると報告されている蛋白(アルブミン、免疫グロブリン、トランスサイレチン、アポプロテインJ、グルタチオン、ホモシスチン、システインC)、金属イオン(Cu、Zn、Fe)などをヒト脳脊髄液と同等の濃度に調整しA β オリゴマー化への影響をPICUP法により検討した。また電解質・ブドウ糖の影響を評価するため、それらをヒト脳脊髄液と同等に調整した人工髄液を作成し比較検討した。

(3) 脳脊髄液をProtease Kにて処理し、PICUP法におけるA β のオリゴマー化を抑制力の変化を評価した。脳脊髄液をフェノールクロロフォルム法で抽出し、それぞれの脂溶性・水溶性分画における抑制力を検討した。脳脊髄液を複数の遠心カラムで処理し、抑制物質の存在する分子量分画を評価した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて、分画毎に抑制力を評価した。さらに逆相クロマトグラフィー(RPC)を用いて更に精製を行った。

4. 研究成果

(1)ヒト脳脊髄液はA β 40およびA β 42の両者ともオリゴマー化を抑制した。更に、脳脊髄液のA β オリゴマー化の抑制効果はA β 40およびA β 42の両者において、AD患者の脳脊髄液が対照群よりも有意に弱かった。AD患者

はA β のオリゴマー化を促進する脳脊髄液環境を有しているものと推察された。

(2) A β の線維化を抑制すると報告されている上記の既知の蛋白、金属、更に人工髄液はヒト脳脊髄液ほどの抑制力をもたなかった。ヒト脳脊髄液はA β のオリゴマー化を抑制するが、その抑制は総蛋白濃度やA β の線維化を抑制すると報告されている蛋白や金属、更には電解質やブドウ糖など以外の因子によると考えられた。

(3) Protease Kにて処理することによってオリゴマー化の抑制力が低下していた。またフェニールクロロフォルム法にて水溶性分画が抑制力を持つことを確認した。遠心カラムを用いた実験では、3kDa以下の分画でオリゴマー化の抑制力をみとめた。さらにSECでの分画の1つに抑制力があることを確認した。RPCではflow through分画に抑制力を確認したが、カラムに吸着せず、それ以上の精製は行えなかった。以上より抑制物質が水溶性でタンパク質であり、3kDa以下であることが分かった。

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26件)

1. Gong B, Pan Y, Vempati P, Zhao W, Knable L, Ho L, Wang J, Sastre M, Ono K, Pasinetti GM. Nicotinamide riboside restores cognition through an up-regulation of PGC-1 α regulated BACE1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. 査読有, *Neurobiol. Aging*, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiol.aging.2012.12.005>
2. Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. 査読有, *J. Neurochem.* 122, 2012, 883-890, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07847.x.
3. Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiie Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid β -Protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. 査読有, *J. Biol. Chem.*, 287, 2012, 14631-14643, DOI:10.1074/jbc.M111.325456.
4. Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, Nihira T, Takasaki J, Teplow DB, Yamada M. Effect of melatonin on α -synuclein

- self-assembly and cytotoxicity. 査読有, *Neurobiol. Aging*. 33, 2012, 2172-2185, DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.015.
5. Ono K, Yamada M. Vitamin A and Alzheimer's disease. 査読有, *Geriatr. Gerontol. Int.* 12, 2012, 180-188, DOI: 10.1111/j.1447-0594.2011.00786.x.
 6. Hirohata M, Ono K, Takasaki JI, Takahashi R, Ikeda T, Morinaga A, Yamada M. Anti-amyloidogenic effects of soybean isoflavones in vitro: fluorescence spectroscopy demonstrating direct binding to A β monomers, oligomers and fibrils. 査読有, *Biochim. Biophys. Acta (Molecular Basis of Disease)*, 1822, 2012, 1316-1324, DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.05.006.
 7. Takahashi R, Ono K, Ikeda T, Akagi A, Noto D, Nozaki I, Sakai K, Asakura H, Iwasa K, Yamada M. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in familial amyloid polyneuropathy. 査読有, *Amyloid*, 19, 2012, 129-132, DOI: 10.3109/13506129.2012.691918.
 8. Wang J, Ferruzzi MG, Ho L, Blount J, Janle EM, Gong B, Pan Y, Gowda N, Raftery D, Arrieta-Cruz I, Sharma V, Cooper B, Lobo J, Simon J, Zhang C, Cheng A, Qian X, Ono K, Teplow DB, Pavlides C, Dixon R, Pasinetti G. Brain-Targeted Proanthocyanidin Metabolites for Alzheimer's Disease Treatment. 査読有, *J. Neurosci.* 11, 2012, 5144-5150, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6437-11.2012.
 9. Shima K, Samuraki M, Chen WP, Yanase D, Noguchi-Shinohara M, Takeda N, Ono K, Yoshita M, Miyazaki Y, Matsuda H, Yamada M, Matsunari I. Posterior cingulate atrophy and metabolic decline in early stage Alzheimer's disease. 査読有, *Neurobiol. Aging* 33, 2012, 2006-2017, DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.009.
 10. Sakai K, Ono K, Harada H, Shima K, Notoya M, Yamada M. Parkinson's disease showing progressive conduction aphasia. 査読有, *Neurol. Sci.* 33, 2012, 399-402, DOI: 10.1007/s10072-011-0751-9.
 11. Chen WP, Samuraki M, Shima K, Yanase D, Nozomi, Takeda N, Miyazaki Y, Ono K, Yoshita M, Nishimura S, Yamada M, Matsunari I. Effect of Age and Sex mismatched Normal Database on Diagnostic Performance of ¹⁸F-FDG PET for Alzheimer's Disease: The Ishikawa Brain Imaging Study. 査読有, *Nucl. Med. Commun.*, 32, 2011, 1128-1133, DOI: 10.1097/MNM.0b013e32834b43c2.
 12. Takasaki J*, Ono K*, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has antioligomerization effects on amyloid- β in vitro. 査読有, *J. Alzheimers. Dis.*, 27, 2011, 271-280 *equally contributed authors. DOI: 10.3233/JAD-2011-110455.
 13. Wang J, Ono K, Dickstein D, Arrieta-Cruz I, Zhao W, Qian X, Lamparello A, Ferruzzi MG, Pavlides C, Ho L, Hof P, Teplow DB, Pasinetti GM. Carvedilol as a potential novel agent for the treatment of Alzheimer's disease. 査読有, *Neurobiol. Aging*. 32, 2011, e1-e12, DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.004.
 14. Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Yamada M. (2011) Familial Parkinson disease mutations influence α -synuclein assembly. 査読有, *Neurobiol. Dis.* 43, 2011, 715-724, DOI:10.1016/j.nbd.2011.05.025.
 15. Morinaga A, Ono K, Takasaki J, Ikeda T, Hirohata M, Yamada M. Effects of sex hormones on Alzheimer Disease-associated β -amyloid oligomer formation in vitro. 査読有, *Exp. Neurol.* 228, 2011, 298-302, DOI:10.1016/j.expneurol.2011.01.011.
 16. Hirohata M, Ono K, Morinaga A, Ikeda T, Yamada M. Cerebrospinal fluid from patients with multiple system atrophy promotes in vitro α -synuclein fibril formation. 査読有, *Neurosci. Lett.* 491, 2011, 48-52, DOI:10.1016/j.neulet.2011.01.005.
 17. Ono K, Yamada M. Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. 査読有, *J. Neurochem.* 117, 2011, 19-28, DOI:10.1111/j.1471-4159.2011.07187.x.
 18. Sakai K, Ono K, Okamoto Y, Murakami H and Yamada M. Cervical flexion myelopathy in a patient showing apparent long tract signs: a severe form of Hirayama disease. 査読有, *Joint Bone Spine* 78, 2011, 316-318, DOI: 10.1016/j.jbspin.2010.12.008.
 19. Komatsu J, Ono K, Yanase D, Samuraki M, Shima K, Kuwano R, Matsunari I,

- Yamada M. Imaging Findings of Familial Dementia with a Tau R406W Mutation. 査読有, *Acta Neurol. Berg.* 111, 2011, 374-375, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368988>
20. Furukawa Y, Iwasa K, Ono K and Yamada M. Fisher syndrome associated with immune thrombocytopenic purpura. 査読有, *Intern. Med.* 50, 2011, 631-633, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422692>
21. Morinaga A, Ono K, Ikeda T, Ikeda Y, Shima K, Shinohara M, Samuraki M, Yanase D, Yoshita M, Mastunari I, Yamada M. A comparison of the diagnostic sensitivity of MRI, CBF-SPECT, FDG-PET, and cerebrospinal fluid biomarkers for detecting Alzheimer's disease in a memory clinic. 査読有, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 30, 2010, 285-292, DOI: 10.1159/000320265.
22. Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. 査読有, *J. Alzheimers. Dis.* 22, 2010, 653-661, DOI: 10.3233/JAD-2010-101074.
23. Ono K, Condran MM, Teplow DB. Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid β -protein assembly and toxicity. 査読有, *J. Biol. Chem.* 285, 2010, 23186-23197, DOI: 10.1074/jbc.M109.086496.
24. Ikeda T, Ono K, Elashoff D, Margaret C, Noguchi-Shinohara M, Yoshita M, Teplow DB, Yamada M. Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes amyloid β -Protein oligomerization. 査読有, *J. Alzheimers. Dis.* 21, 2010, 81-86, DOI: 10.3233/JAD-2010-100075.
25. Sakai K, Ono K, Ohta K, Yamada M. Progression of cerebrovascular lesions in pneumococcal meningitis. 査読有, *Intern. Med.* 49, 2010, 1261-1262, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558962>
26. Hamaguchi T, Ono K, Yamada M. Curcumin and Alzheimer's disease. 査読有, *CNS Neurosci. Ther.* 16, 2010, 285-297, DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00147.x
- [学会発表] (計 24 件)
1. 小野賢二郎, Lei Li, 高村雄策, 吉池裕二, 池田篤平, 西条寿夫, 高島明彦, David B Teplow, Michael G Zagorski, 山田正仁. フェノール化合物は特異的結合によって A β オリゴマー形成及びシナプス毒性を抑制する, 第 31 回日本認知症学会学術集会, 2012 年 10.26-28 日, つくば国際会議場 (茨城県)
 2. 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 高橋良一, 池田篤平, 森永章義, 山田正仁. イソフラボンの β アミロイド蛋白モノマー・オリゴマー・線維への作用の検討, 第 31 回日本認知症学会学術集会, 2012 年 10.26-28 日, つくば国際会議場 (茨城県)
 3. Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A inhibits A β oligomerization *in vitro*, 第 35 回日本神経科学大会 Neuroscience 2012, 2012 年 9 月 18-21 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
 4. Ono K. Low order-oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. Neuroscience Seminar in University of British Columbia, 2012.7.17, University of British Columbia (Canada)
 5. Ono K, Takasaki J, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β *in vitro*. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012, 2012.7.14-19, Vancouver Convention Center (Canada)
 6. Hirohata M, Ono K, Takasaki J, Yamada M. Anti-Amyloidogenic Effects of Isoflavones *In Vitro*: Fluorescence Spectroscopy Demonstrating Direct Interactions Between Isoflavones and A β s. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2012, 2012.7.14-19, Vancouver Convention Center (Canada)
 7. 小野賢二郎. 有機化合物に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発, 第 54 回日本老年医学会学術集会 ノバルティス老化および老年医学研究基金受賞講演, 2012 年 6 月 28-30 日, 東京国際フォーラム (東京都)
 8. 小野賢二郎, 高崎純一, 吉池裕二, 廣畑美枝, 池田篤平, 森永章義, 高島明彦, 山田正仁. ビタミン A による A β オリゴマー形成抑制効果, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22-25 日, 東京国際フォーラム (東京都)

9. 高橋良一, 小野賢二郎, 池田篤平, 赤木明生, 能登大介, 野崎一朗, 坂井健二, 朝倉英策, 岩佐和夫, 山田正仁. 家族性アミロイドポリニューロパチーの凝固・線溶異常, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22-25 日, 東京国際フォーラム (東京都)
 10. 廣畑美枝, 小野賢二郎, 高崎純一, 森永章義, 池田篤平, 山田正仁. NSAIDs は β アミロイド蛋白オリゴマー形成抑制作用およびシーディング抑制作用を有する, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 22-25 日, 東京国際フォーラム (東京都)
 11. 小野賢二郎, David B Teplow, 山田正仁. English (H6R) 及び Tottori 型 (D7N) 変異アミロイド β 蛋白の凝集および細胞毒性, 第 30 回日本認知症学会学術集会, 2011 年 11 月 11-13 日, タワーホール船堀 (東京都)
 12. 小野賢二郎. アルツハイマー病 β アミロイド蛋白凝集機構解明から予防・治療薬開発へ, 第 54 回日本神経化学大会ミニラントンセミナー, 2011 年 9 月 28 日, 瑠璃光 (石川県)
 13. 小野賢二郎, David B Teplow, 山田正仁. English (H6R) 及び Tottori (D7N) 型変異がアミロイド β 蛋白の凝集および細胞毒性に与える影響, 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14-17 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 14. Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, Nihira T, Takasaki J, Teplow DB, Yamada M. Effect of melatonin on α -synuclein self-assembly and cytotoxicity. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2011, 2011. 7. 16-21, Expo in Porte de Versailles (France)
 15. Ono K. Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. Neuroscience Seminar in University of Groningen, 2011. 7. 15, University of Groningen (Netherlands)
 16. 小野賢二郎, David B Teplow, 山田正仁. English (H6R) 及び Tottori (D7N) 変異アミロイド β 蛋白の凝集および細胞毒性, 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18-20 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
 17. 小野賢二郎. 神経変性疾患 (特にアルツハイマー病、パーキンソン病) の予防・治療薬開発, 平成 22 年度昭和大学医学部同窓会学術講演会, 2010 年 11 月 28 日, 昭和大学医学部 (東京都)
 18. Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in the tmht mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience Nanosymposium 2010, 2010. 11. 13-17, San Diego Convention Center (USA)
 19. 小野賢二郎. A β 凝集機構解明から予防・治療薬開発へ, 第 29 回日本認知症学会学術集会, 2010 年 11 月 5-7 日, ウィンクあいち (愛知県)
 20. 小野賢二郎, David B Teplow, 山田正仁. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers, 第 29 回日本認知症学会学術集会, 2010 年 11 月 5-7 日, ウィンクあいち (愛知県)
 21. 小野賢二郎, David B Teplow, Margaret M Condon, 山田正仁, アミロイド β 蛋白オリゴマーの構造及び毒性相関の解析, 第 33 回日本神経科学大会 Neuro2010, 2010 年 9 月 2-4 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
 22. Ono K, Teplow DB, Condon MM. Structure-neurotoxicity analysis of amyloid β -protein oligomers. International Conference on Alzheimer's Disease 2010, 2010. 7. 10-15, Hawaii Convention Center (USA)
 23. 小野賢二郎. 有機化合物に焦点を当てたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発, 京都大学農学研究科大学院特別講義, 2010 年 6 月 21 日, 京都大学 (京都)
 24. 小野賢二郎, Margaret M Condon, David B Teplow, 山田正仁. アミロイド β 蛋白オリゴマーの構造-毒性相関, 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20-22 日, 東京国際フォーラム (東京都)
- [その他]
ホームページ等
<http://neurology.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし