

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09305

研究課題名(和文) 神経毒性 Aβ oligomerの同定とこれを標的にした診断、治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of neurotoxic Aβ oligomers and development of therapy against them

研究代表者

瓦林 毅 (Kawarabayashi, Takeshi)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90186156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)モデルマウスでシナプスのlipid rafts分画にAbeta dimerが蓄積し、fyn/NMDA cascadeの誘発とリン酸化tauの蓄積が認められた。Abeta dimerは神経毒性Abetaの可能性がある。Abeta4-10産生組み換えダイズ蛋白を作製し、ADモデルマウスに経口投与した。脳TBS分画でAbeta oligomerの減少を認め、学習障害の改善、Abeta蓄積減少とmicrogliaの減少を認めた。ワクチンによる可溶性Abeta oligomerの減少はADの疾患修飾療法になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aβ dimers were accumulated in synaptic lipid rafts with increased fyn, phosphorylated NMDA receptors and phosphorylated tau in Alzheimer's disease (AD) model mice. Aβ dimers could be neurotoxic Aβ to induce fyn/NMDA cascade and phosphorylated tau. We generated a novel transgenic plant-based vaccine, a soybean storage protein containing Aβ4-10, named Aβ+. Aβ+ was administered orally to AD model mice. Spatial learning deterioration was prevented. Soluble Aβ oligomers were decreased. Aβ deposition and microglial activation was inhibited. Decrease of soluble Aβ oligomers by our vaccine could be a promising therapy for AD.

研究分野：神経内科

キーワード：Aβ oligomer Alzheimer's disease tau lipid rafts vaccine

## 1. 研究開始当初の背景

認知症は人口の高齢化と共に世界中で加速度的に増加して大きな社会問題となっている。認知症の原因疾患の約半分は、アミロイドβ蛋白(amyloid β protein: Aβ)からなる脳アミロイドとリン酸化 tau からなる神経原線維変化が蓄積するADである。近年の研究から、神経細胞を障害して tau 蓄積の引き金を引くのは不溶性の凝集した Aβ アミロイドではなく、可溶性の Aβ oligomer であることが示されている (Kayed R, et al., Science 2003)。Aβ oligomer をカニクイザルの脳内に打ち込むとシナプス障害のみならず AD 型の神経原線維変化までも再現できることが示されている (Lablans A, et al., J Neurosci 2014)。また神経細胞から分泌された Aβ oligomer が次の神経細胞に取り込まれて病変が脳内を広がって行くという脳内伝播が AD の進展機序として注目されている (Song HL, et al., Ann Neurol. 2014)。そのため Aβ oligomer は AD の病態修飾療法の標的として選択され、抗体療法や凝集阻害療法などさまざまな治療法の開発が多くの研究室で続けられている。

Aβ oligomer には低分子量の dimer, trimer, そして 12 mer や高分子量 oligomer, さらに protofibril などさまざまな形態が存在する。このうちの oligomer が神経障害に働くのかは、実験系や研究者によってその見解は分かれている。Aβ oligomer 標的療法が未だ十分な成果を上げられないのは標的とするべき神経障害性 Aβ oligomer が同定されていないのがその一因と考えられる。

細胞膜にはコレステロールと glycosphingolipid に富む membrane microdomain である lipid rafts が存在し、信号伝達などに関与する。我々は lipid rafts が Aβ の産生部位であることを世界で

初めて示し、lipid rafts のコレステロール量により Aβ 産生が制御されることを示した (Wahrle S, Kawarabayashi T, et al., Neurobiol Dis 2002)。lipid rafts が Aβ の産生部位であることはその後多くの研究から確認され、コンセンサスとなっている。さらに我々は lipid rafts が Aβ oligomer の初期蓄積部位であり、しかも AD モデルマウス Tg2576 で行動異常が出現する時期に一致してその蓄積が出現することを示した。Aβ oligomer の蓄積に引き続きリン酸化 tau も lipid rafts で蓄積を始めることを示し、これは AD 患者および超早期の AD である軽度認知障害患者脳においても認められた (Kawarabayashi T, et al., J Neurosci 2004)。最近 Aβ oligomer は GM1 ganglioside を介して細胞膜に結合することが示された。Aβ oligomer と GM1 ganglioside との結合を阻止すると Aβ oligomer によるシナプス伝達障害が予防されることから、膜結合型の Aβ が神経障害性 Aβ oligomer であることが示唆された (Hong S, et al., Neuron 2014)。

Aβ oligomer の神経毒性機序についてはまだ定説がない。シナプスにおいては細胞膜の受容体と結合して神経毒性を起こすと考えられている。数種類の受容体が候補に挙げられているが、lipid rafts に存在する cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) が最も有力視されている。我々は Aβ oligomer が sortilin と結合して p75<sup>NF</sup> を介した apoptosis を起こすことを示した (Takamura R, Kawarabayashi T, et al., Life Sci 2012)。Aβ oligomer の神経毒性を解明する上で受容体の同定が重要な課題になっている。

## 2. 研究の目的

AD モデルマウスを用いて神経毒性 Aβ oligomer およびその受容体を同定し、神経毒

性発現機序を解明する。さらに神経毒性Aβ oligomer を標的にしたAD 治療法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

AD モデルマウスを用いて学習障害出現時の脳 Aβ oligomer 変化, シナプス蛋白, 神経伝導系の網羅的解析から神経障害性 Aβ oligomer の候補を選択する Epitope mapping および mass spectrometry によりその同定を行う。Aβ oligomer に対するワクチン治療を開発し, Aβ oligomer 減少の有無とそれによる学習障害, 神経保護作用の有無を検討する。

### 4. 研究成果

Aβ発現マウスTg2576のTBS, SDS, ギ酸分画, シナプトゾーム分画を経時的に作製して, Aβ oligomer, tau, tau oligomer, シナプス関連蛋白および信号伝達系の変化を検討した。学習障害の出現する6月齢からlipid raftsにAβ dimerが蓄積し, 加齢と共に増加した。Lipid raftsにおいてAβ dimerは細胞型prion蛋白と複合体を形成していた。Tyrosine kinaseであるfynの増加が認められ, fynによってリン酸化されたNMDA受容体subunit 2Bの増加が認められた。また, リン酸化tauおよびtau oligomerが蓄積することが示された。これらの変化はシナプス分画においても認められ, 特にシナプスのlipid rafts分画においてAβ dimerの増加によるfyn, リン酸化NMDA受容体の増加, リン酸化tauの増加が認められた。以上の検討からAβ dimerはシナプスのlipid raftsにおいてfyn-NMDA系の活性化やリン酸化tauの増加を介して神経毒性を示すと考えられた。

AB4-10の3分子を連続して発現するAβ産生組み換えダイズ蛋白を作製し, マウスに cholera toxin subunit Bと共に経口免疫することでAbeta oligomerを認識する抗体を産生することを確認した。ADモデルマウスTgCRMD8に9週から最長で57週まで毎週1mgの(Aβ 組み換えダイズ(Aβ+)と対照としてダイズ蛋白の

み(Aβ-)を投与し, 4週毎にMorris水迷路試験を行った。行動実験後に解剖し, 半脳はTBS, SDS, ギ酸で連続抽出してAbetaを解析した。半脳はパラフィン切片を作製し, 抗Aβ抗体による免疫染色を行った。21週からAβ+投与マウスでAβ-投与マウスに比べて学習障害の改善を認め, その改善は57週まで認められた。Aβ monomerの変化は認めなかったが, TBS分画でAβ oligomerの減少を認めた。脳Aβ蓄積とmicrogliosisはAβ+投与マウスで減少した。免疫療法の副作用として問題となっている脳髄膜炎や微小出血は認められなかった。Aβ産生組み換えダイズ蛋白による経口免疫療法はAbeta oligomerを減少させ, 安全で有効なADの疾患修飾療法になりうると考えられた。

### 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 8件)

1. Seino Y, Nakamura T, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Hayashi YK, Okubo M, Nishino I, Shoji M, Case of elderly-onset multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency with a novel ETFDH mutation shows progressive muscle weakness and rhabdomyosis. Neurology and Clinical Neuroscience. Epub ahead of print (査読有)
2. Kawarabayashi T, Nakamura T, Seino Y, Hirohata M, Mori F, Wakabayashi K, Harigaya Y, Shoji M, Disappearance of MRI imaging signals in a patient with neuronal intranuclear inclusion disease. J Neurol Sci 2018; 388(1): 1-3 (査読有)
3. 瓦林毅 東海林幹夫, アルツハイマー病治療薬開発 抗アミロイド抗体治療。日本臨床増刊号 実施診療のための最新認知症学 76 (増刊号 1) 230-237, 2018 (査読無)

4. 瓦林毅 東海林幹夫, 進歩する認知症治療 - 認知症疾患治療ガイドラインの話題も含めて - Alzheimer 型認知症治療の現状. Geriatric Medicine 55(6) 615-619, 2017 (査読無)
5. 瓦林毅 東海林幹夫, 認知症 発症前治療のために解明すべき分子病態は何か? 創薬・発症前治療への挑戦 進行中のアルツハイマー病臨床試験および予防介入試験 実験医学 35 (12) 2166-2173, 2017 (査読無)
6. 瓦林毅 東海林幹夫, 遺伝が関与する認知症 -主な認知症と遺伝子との関連について レビー小体型認知症. 認知症の最新治療 7(2) 74-80, 2017 (査読無)
7. Ueno Y, Nagaoka M, Nakamura T, Abe N, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Increases in plasma Aβ40 levels and the Aβ40/42 ratio in patients with diabetes mellitus and dementia . Hirosaki Medical J 2016; 66: 110-119 (査読有)
8. 瓦林毅 東海林幹夫, 認知症の血液・髄液診断マーカー . Mebio 32(6) 36-45, 2015 (査読無)

[学会発表](計 27件)

1. 瓦林毅, 成田早希子, 佐藤薫, 中村琢洋, 廣畑絵美, 清野祐輔, 中畑直子, 東海林幹夫 Aβ oligomer はシナプスの lipid rafts で tau を誘発する 第36回日本認知症学会学術集会 金沢 2017年11月24-26日
2. 中畑直子, 成田早希子, 中村琢洋, 清野祐輔, 廣畑美枝, 瓦林毅, 東海林幹夫, 中野重之, 地域健診における軽度認知障害スクリーニング検査の有用性の検討 第36回日本認知症学会学術集会 金沢 2017年11月24-26日
3. Takeshi Kawarabayashi, Sakiko Narita, Kaoru Sato, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Naoko Nakahata, and Mikio

Shoji Aβ oligomers in synaptic lipid rafts induce phosphorylated tau and impair signal transduction. Neuroscience 2017, the Society for Neuroscience, 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Washington D.C, Nov 11-15, 2017

4. Takeshi Kawarabayashi, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Yusuke Seino, and Mikio Shoji, Induction of Phosphorylated Tau and Fyn-NMDA Receptor Transduction Pathway by Aβ Oligomers in Synapse. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Sep 16-21, 2017
5. Yusuke Seino, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Takeshi Kawarabayashi, Mikio Shoji, Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in neurological diseases. World Congress of Neurology, Kyoto Sep 16-21, 2017
6. 瓦林毅, 中村琢洋, 清野祐輔, 廣畑美枝, 中畑直子, 成田早希子, 東海林幹夫, 岩木健康増進プロジェクト検診における軽度認知障害スクリーニング検査 VasCog Japan 虎ノ門ヒルズ 2017年8月5日
7. 瓦林毅, 成田早希子, 中村琢洋, 若佐谷保仁, 中畑直子, 東海林幹夫, Aβ oligomer によるシナプス障害の解析. 第35回日本認知症学会学術集会 東京国際フォーラム 2016年12月1-3日
8. 中村琢洋, 瓦林毅, 若佐谷保仁, 中畑直子, 東海林幹夫, 高橋一平, 中路重之, 血漿アミロイドβの影響因子の解析. 第35回日本認知症学会学術集会 東京国際フォーラム 2016年12月1-3日
9. 中畑直子, 成田早希子, 中村琢洋, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, 高橋一平, 中路重之, 地域におけるMCI診断の試み～アンケート結果の検討～. 第35回日本認知症学会学術集会 東京国際フォーラム

- ム 2016年12月1-3日
10. 成田早希子, 瓦林毅, 中村琢洋, 若佐谷保仁, 中畑直子, 東海林幹夫, 脳アミロイドアンギオパチーのマウスモデルを用いた検討. 第35回日本認知症学会学術集会 東京国際フォーラム 2016年12月1-3日
  11. Takeshi Kawarabayashi, Sakiko Narita, Takumi Nakamura, Yasuhito Wakasaya, Naoko Nakahata, Mikio Shoji, Early induction of phosphorylated tau in synapse from APP transgenic mice. Neuroscience 2016, the Society for Neuroscience, 46<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, Nov 12-16, 2016
  12. Masayuki Orikasa, Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Takumi Nakamura, Naoko Nakahata and Mikio Shoji, CSF and Plasma Biomarkers for Diagnosing Dementia in Outpatient Clinic. Alzheimer's Association International Conference, Toronto, Jul 24-27, 2016
  13. Takeshi Kawarabayashi, Takumi Nakamura, Yasuhito Wakasaya, Mikio Shoji, Induction of phosphorylated tau in synapse by accumulation of A $\beta$  oligomers. 第57回日本神経学会学術大会 神戸国際会議場 2016年5月18-21日
  14. Takumi Nakamura, Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Mikio Shoji, Plasma amyloid beta levels are correlated with cognitive and motor functions. 第57回日本神経学会学術大会 神戸国際会議場 2016年5月18-21日
  15. Takumi Nakamura, Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Naoko Nakahata, Sakiko Narita, Mikio Shoji, Ippei Takahashi, Shigeyuki Nakaji, Plasma A levels are correlated with cognitive and motor functions in Iwaki Health Promotion Project. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of American Academy of Neurology, Vancouver, Apr 15-21, 2016
  16. Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Takumi Nakamura, Naoko Nakahata, Mikio Shoji Induction of phosphorylated tau in synapse from AD model mice. Neuroscience 2015, the Society for Neuroscience, 45<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago, Nov 17-21, 2015
  17. 瓦林毅 シンポジウム 認知症研究のブレークスルーとモデル動物 マウスモデルを用いた A $\beta$  oligomer 毒性の検討. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森 2015年10月2-4日
  18. 瓦林毅, 中村琢洋, 仲田崇, 若佐谷保仁, 中畑直子, 東海林幹夫 A $\beta$  oligomer の神経毒性の検討. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森 2015年10月2-4日
  19. 中畑直子, 中村琢洋, 仲田崇, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫 地域住民におけるもの忘れ検査の取り組み. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森 2015年10月2-4日
  20. 若佐谷保仁, 中村琢洋, 仲田崇, 中畑直子, 瓦林毅, 東海林幹夫 進行性核上性麻痺の各臨床型における臨床的特徴と治療成績. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森 2015年10月2-4日
  21. 仲田崇, 瓦林毅, 中畑直子, 中村琢洋, 若佐谷保仁, 東海林幹夫 神経疾患における脳脊髄液および血液バイオマーカーの検討. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森

- 2015年10月2-4日
22. 中村 琢洋, 瓦林 毅, 若佐谷 保仁, 中畑直子, 高橋一平, 中路重之, 東海林幹夫 大集団における血液 Aβ 測定; 岩木健康増進プロジェクトを通して. 第34回日本認知症学会学術集会 リンクステーションホール青森 2015年10月2-4日
23. 仲田崇, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 中村琢洋, 中畑直子, 東海林幹夫 神経疾患診断における脳脊髄液および血漿バイオマーカーの検討. VAS-COG2015 TOKYO 東京ファッションタウン 2015年9月19日
24. 若佐谷保仁, 瓦林毅, 中村琢洋, 仲田崇, 中畑直子, 東海林幹夫 進行性核上性麻痺の各臨床型における特徴と治療成績. VAS-COG2015 TOKYO 東京ファッションタウン 2015年9月19日
25. Takeshi Kawarabayashi Aβ oligomers: appearance, accumulation, memory disturbance and therapy 第56回日本神経学会学術大会 朱鷺メッセ 2015年5月20-23日
26. 若佐谷 保仁, 中村 琢洋, 仲田 崇, 瓦林毅, 東海林 幹夫 進行性核上性麻痺の各臨床型における臨床的特徴と治療成績 日本神経学会 第56回日本神経学会学術大会 朱鷺メッセ 2015年5月20-23日
27. 仲田 崇, 瓦林 毅, 中村琢洋, 若佐谷保仁, 東海林幹夫 神経疾患における脳脊髄液および血液バイオマーカーの検討 第56回日本神経学会学術大会 朱鷺メッセ 2015年5月20-23日

〔図書〕(計 1件)

瓦林毅, 東海林幹夫, 前頭側頭型認知症の診断と治療 神経内科外来シリーズ/もの忘れ外来 丸木雄一編 メジカルビュー社 2016, 192-204

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.h-shinnai.jp/study02/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瓦林 毅 (KAWARABAYASHI, Takeshi)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 90186156

### (3) 連携研究者

東海林 幹夫 (SHOJI, Mikio)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 60171021

中村 琢洋 (NAKAMURA, Takumi)  
弘前大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80744193