

平成 30 年 6 月 11 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：15K09306

研究課題名(和文) Alzheimer病の病態修飾薬の開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development and clinical application of disease modifying drug for Alzheimer's Disease

研究代表者

東海林 幹夫 (Shoji, Mikio)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：60171021

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)：認知症の多くを占めるアルツハイマー病(AD)の病態解明と治療法開発およびその臨床応用のための基礎的研究を行った。新たに開発したAbetaエピトープを発現する遺伝子組み換えダイズ食品を用いて、AD動物モデルで経口免疫を行った。Abeta特異抗体の産生が見られ、Morris水迷路試験で記憶障害の予防効果があり、Abeta oligomer蓄積とアミロイド斑出現は抑制されていた。出血や炎症などの副作用はみられなかった。病態修飾薬として有望な結果が得られた。弘前家系の構成員は285名であり、43人が発症し、発症年齢は平均48歳、経過は10年であり、女性でより長いことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia. To clarify the pathogenesis and development of disease modified drugs (DMD) of AD, we studied effects of oral immunization of recombinant soybean consisting of Abeta epitope (Abeta+) in AD model mice TgCRND8. Induction of anti-Abeta antibodies, prevention of memory decline and Abeta plaque accumulation. Abeta oligomer was also suppressed. No adverse reactions were observed. Thus, Abeta+ is promising DMT. In study of Hirosaki Family, we found 43 AD patients out of total 285 family members, mean onset age is 48 years of Age and duration is about 10 years.

研究分野：神経内科学

キーワード：認知症 Alzheimer病 脳アミロイド Abeta 認知機能 病理 ELISA Western blot

1. 研究開始当初の背景

認知症の多くを占めるアルツハイマー病 (AD) の最も重要な病態は A β amyloidosis と引き続いて誘発される Tauopathy と考えられる。A β amyloidosis の研究では 1) γ -secretase による A β 生成機序と代謝・輸送機序と 2) 家族性 AD の遺伝子変異による A β 42 の増加作用が明らかとなり、3) より上流の病態として可溶性 A β oligomer によるシナプス障害が提案された。また、4) モデル動物を用いた病態修飾薬の開発、5) ADNI, DIAN, API などの家族性 AD 家系の共同体研究によって、アミロイド PET や CSF バイオマーカーの世界標準化が行われ、AD 発症の自然経過が明らかにされた。発症の 25 年前から A β amyloidosis が始まり、15 年前から Tauopathy が誘発され、MCI を経過して AD dementia を発症する。従って、現在の AD 研究の焦点は、新たに開発された病態修飾薬によって確実な治験対象コホートに超早期に予防介入することによって、AD 発症の予防可能性の検討に移っている。

2. 研究の目的

本研究では 1) 新たな病態修飾薬 (A β 1-10 エピトープを発現する遺伝子組み換えダイズ食品 A β + による経口免疫) を 2) 新たに開発した動物モデルによる予防介入評価システム (TgCRND8 マウスの Morris 水迷路長期連続 10 日試験) で検証し、3) 弘前における家族性 AD の大家系 (PSEN1 H163R, 7 世代 285 例) の経過観察研究を組織して国際共同研究への参加を行う。

3. 研究の方法

(1) 大豆 11S グロブリンの 3 カ所に A β の Th2 刺激部位 4-10 を挿入した A β + を設計し発現させた。この、A β 4-10 配列は収獲した A β + の 12.7% が A β 4-10 で、大豆

への発現では 870 mg/g の高発現を得られた。AD モデル動物 (TgCRND8 マウス) に A β + またはコントロール A β - (大豆のみ) 1mg を 3 月齢から cholera toxin subunit B 10 μ g と共に週 1 回ゾンデで経口投与を開始し、14 ヶ月齢まで継続した。水迷路試験はマウスの海馬依存性視空間ワーキング記憶の検査法としてよく使われているが、本研究では各月齢のマウスで連続 10 日間の水迷路試験を毎月初めに行い、統計的な有意差を評価した。各群 10 匹以上を検索する必要があるため膨大な行動評価の検討が必要で、遊泳距離、潜時、移動速度、四分割による探索行動の検討を 14 ヶ月齢まで毎月連続して行った。

TgCRND8 および対照マウス脳から可溶性の異なる分画としてルーチンに使用される TBS, SDS, ギ酸による連続抽出をおこない、各分画の A β 40, A β 42, A β oligomer を測定し、A β amyloidosis 予防効果を検証した。脳組織のパラフィン包埋切片を作成し、A β 蓄積、副作用などの病学的変化、Iba1 免疫染色によるミクログリア出現に検討を加えた。ELISA および Western blot を用いて、モデルマウス脳に蓄積した A β monomer から高分子 A β oligomer まで検討を加えた。

A β + 経口免疫を行った CRND8 マウスの腸管リンパ節、脾臓、血液から得られた培養リンパ球に A β + 抗原刺激を行い、上清に増加するサイトカイン種を測定し、ELISA でマウス血液中の産生された抗体力価を検討した。鉄染色および通常の病理学的検索で脳出血および脳実質、脳血管の炎症所見、全身の病理変化の出現に検討を加えた。

(2) 弘前大学神経内科もの忘れ外来に通院する弘前 AD 家系 (PSEN1 H163R) は江戸時代から続く大家系である。家系構成員の追加情報・病歴調査を行った。それ

ぞれに家族歴，理学・神経学的検査，ルーチン血液検査，生理学的検査，X-線学的検査を行った後に，遺伝学的検査の行われていない方に対してはガイドラインに準拠して，書面による同意の後に採血を行い ApoE genotype，APP, PSEN1 の遺伝学的検査を行った．一部は同意を得て脳脊髄液・血液 Aβ40/42，tau/リン酸化 tau の ELISA による測定とアミロイド PET が撮像された．DIAN 国際観察共同体研究に本邦から参入した．

4．研究成果

(1) Aβ+ による経口免疫では，Aβ ペプチドに対する抗 Aβ 抗体力価の有意な増加とマウス血清による人 AD 脳の免疫染色で脳アミロイド特異な抗体の存在を確認した．Aβ+ 免疫マウスから得られた脾臓を培養し，Aβ+ で刺激すると thymidine 取り込み亢進と IL-2，IL-10, IL12 の有意な増加を認め，Aβ+ による液性/細胞性免疫が成立していることを確認した．

(2) Morris 水迷路試験では，Aβ+ 投与 21 週目から有意な Escape Latency と Path length の低下の抑制が見られ，この効果は 57 週まで有意に持続した．Aβ+ は AD モデルマウス TgCRND8 における認知機能低下を予防可能であった．

(3) TgCRND8 マウス脳では 13 週から脳アミロイドが蓄積し，増加した．TBS，SDS，Formic Acid の連続分画の Western blot 解析では様々な溶解性を有する Aβ monomer から高分子 Aβ oligomer が回収された．

(4) Aβ+ と Aβ- における脳 Aβ 蓄積の経時的变化を ELISA で測定すると，Aβ40，Aβ42 monomer に有意な変化は無かったが，Aβ oligomer の ELISA で有意な低下が Aβ+ 群で確認された．

(5) Western blot による解析では，低分子 Aβ oligomer の蓄積抑制が確認された．

(6) Aβ アミロイド蓄積の経時的組織学的検討では，diffuse plaque の有意な抑制が確認された．

(7) APP 代謝や脳出血，ミクログリオシスなどの副作用の検討では，いずれも神経障害性の副作用は起こらないことを明らかにした．以上より，新たな病態修飾薬として Aβ+ が有望である事を解明し，国際学会発表を行い，雑誌に投稿中である．

(8) 弘前 AD 家系の解析については，すべての構成員の発症と非発症および経過を解析した．構成員は 285 名であり，このうち 43 人が発症し，発症年齢は平均 48 歳，経過は 10 年であり，女性でより長いことを確認した．遺伝子カウンセリング，バイオマーカーのシステムを確立し，国際的な DIAN 研究との共同研究を開始できた．

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 6 件)

1. Kawarabayashi T, Nakamura T, Seino Y, Hirohata M, Mori F, Wakabayashi K, Ono S, 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 査読有り
2. 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 rhabdomyolysis. Neurology and Clinical Neuroscience. 2018; 6(2): 39-41 査読有り
3. Miki Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino Y, Kijima H, Shoji M, Mori A, Yamashita C, Hatano T, Hattori N, Wakabayashi K.

Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2017 May;32(5):799-800. 査読有り

4. Harigaya Y, Matsukawa T, Fujita Y, Mizushima K, Ishiura H, Mitsui J, Morishita S, Shoji M, Ikeda Y, Tsuji S. A novel GBE1 mutation in a Japanese family with adult polyglucosan body disease. *Neurol Genet* April 2017 vol. 3 no. 2 e138. 査読有り
5. Furukawa K, Tomita N, Uematsu D, Okahara K, Shimada H, Ikeda M, Matsui T, Kozaki K, Fujii M, Ogawa T, Umegaki H, Urakami K, Nomura H, Kobayashi N, Nakanishi A, Washimi Y, Yonezawa H, Takahashi S, Kubota M, Wakutani Y, Ito D, Sasaki T, Matsubara E, Une K, Ishiki A, Yahagi Y, Shoji M, Sato H, Terayama Y, Kuzuya M, Araki N, Kodama M, Yamaguchi T, Arai H. Randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial of Yokukansan for neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2017 Feb; 17(2): 211-218. 査読有り
6. Ueno Y, Nagaoka M, Nakamura T, Abe N, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Increases in plasma A β 40 levels and the A β 40/42 ratio in patients with diabetes mellitus and dementia. *Hirosaki Medical J* 2016; 66: 110-119 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

1. Takumi Nakamura, Mikio Shoji, Factors affecting plasma A β levels in IHP Project and second year follow. Annual meeting of American Academy of Neurology, Boston, April 23, 2017
2. Mikio Shoji, Naoko Nakahata, Tomoyo

Shirato, Sakiko Narita, Takumi Nakamura, Seino Yusuke, Mie Hirohata, Takeshi Kawarabayashi, DIAN-Japan HUGSM 710 site, Hirosaki, Japan, 2017 DIAD Family Conference, London, July 15, 2017

3. Yusuke Seino, Sakiko Narita, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Takeshi Kawarabayashi and Mikio Shoji, Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in neurological diseases. London, 2017 DIAD Family Conference, July 15, 2017
4. Takeshi Kawarabayashi, Sakiko Narita, Takeshi Kawarabayashi, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Yusuke Seino, and Mikio Shoji, Induction of Phosphorylated Tau and Fyn-NMDA Receptor Transduction Pathway by A β 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. Kaoru Sato, Takumi Nakamura, Mie Hirohata, Naoko Nakahata, and Mikio Shoji, A β oligomers in synaptic lipid rafts induce phosphorylated tau and impair signal transduction. Neuroscience 2017, the Society for Neuroscience, 47th Annual Meeting, Washington D.C, Nov 11-15, 2017
7. Takumi Nakamura, Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Naoko Nakahata, Sakiko Narita, Mikio Shoji, Ippei Takahashi, Shigeyuki Nakaji, Plasma A β levels are

- correlated with cognitive and motor functions in Iwaki Health Promotion Project. 68th Annual Meeting of American Academy of Neurology, Vancouver, Apr 15-21, 2016 発表 Apr 20
8. Takeshi Kawarabayashi, Takumi Nakamura, Yasuhito Wakasaya, Mikio Shoji. Induction of phosphorylated tau in synapse by accumulation of A β 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 日
 9. 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 日
 10. Masayuki Orikasa, Takeshi Kawarabayashi, Yasuhito Wakasaya, Takumi Nakamura, Naoko Nakahata, Mikio Shoji. CSF and plasma biomarkers for diagnosing dementia in outpatient clinic. Alzheimer's Association International Conference, AAIC 2016, Tronto, Canada, July 24-28, 2016 発表 July 24
 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, 46th Annual Meeting, San Diego, Nov 12-16, 2016 発表 Nov 13.
 12. Mikio Shoji. Biomarkers of Vascular dementia Theme 1: Diagnosing Vascular Cognitive Disorders. 7th World

Congress of the International Society for Vascular Behavioral and Cognitive Disorders. Tokyo Fashion Town ,Tokyo September 17, 2015

13. 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, 45th Annual Meeting, Chicago, Nov 17-21, 2015.

〔図書〕(計 4 件)

1. 東海林幹夫, 最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング シリーズ 2 最新精神・神経遺伝医学研究と遺伝カウンセリング】(第 2 章)精神・神経疾患の遺伝医学研究・診療各論 アルツハイマー病. 遺伝子医学 MOOK (1349-2527)別冊最新精神・神経遺伝医学研究と遺伝カウンセリング pp118-124, 2017
2. 東海林幹夫, Alzheimer 型認知症, Alzheimer 型認知症の診断基準は何か? 認知症疾患診療ガイドライン 2017 医学書院 東京 pp206-213
3. 東海林幹夫, 認知症疾患, 神経内科学テキスト改訂 4 版(江藤文夫, 飯島節編集)南江堂, 東京, pp320-340, 2017
4. 東海林幹夫, 脳アミロイドーシス. 最新アミロイドーシスのすべて. 診療ガイドライン 2017 と Q&A, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp220-225, 2017

〔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：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h-shinnai.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林 幹夫 (Mikio Shoji)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：60171021

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

瓦林 毅 (Takeshi Kawarabayashi)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90186156

中村 琢洋 (Takumi Nakamura)

弘前大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：80744193

(4) 研究協力者

無し ()