

令和元年6月27日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15553

研究課題名(和文) レーザー照射による認知症治療

研究課題名(英文) Therapy for dementia by free electron laser irradiation

研究代表者

中村 和裕 (NAKAMURA, KAZUHIRO)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：10327835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：私は近年、中赤外領域の特定の波長の光が凝集Abeta1-42ペプチドを解離させることを見出した。今回アルツハイマー型認知症4例の前頭葉の凍結ブロックを試料として、6ミクロンの波長の光を照射したところ、アミロイドベータ抗体のウェスタンブロットで、一部の症例で高分子量型のシグナルの移動度が照射によって変化した。このことは、モノマーではなく複雑な構造を持つアミロイドベータの構造が照射により変化した可能性を示唆する。しかしながら、全症例ではなく一部の症例のみに変化が見られたこと、毒性をもつ構造体が照射によって減弱したかわかっていないことから、今後、照射後の神経機能について解析を続ける予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドレベルでは、アミロイドベータ以外の他の複数の凝集体たんぱくが中赤外光によって解離を示している。現在までのウェスタンブロットを用いた解析では、アルツハイマー型認知症剖検脳におけるアミロイドベータの内、毒性を有する構造体を減少させたかどうかは不明である。しかし、今後の神経機能の解析によって、照射後の神経機能回復を示すデータが得られた場合には、この方法はアルツハイマー型認知症以外の他のアミロイドシスの組織の機能改善効果が期待できる方法となり得る可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is a devastating neurodegenerative disorder, for which effective treatments have not been explored. Previously, I reported that aggregated amyloid beta 1-42 peptide was dissociated by free electron laser irradiation. In this study, I studied if that is also the case for autopsy brain from Alzheimer-type dementia. I applied mid infrared light to frontal cortex blocks from the 4 cases. Then, I carried out western blot analysis. The signal pattern of high molecular weight form of amyloid beta rather than the monomer form was changed after the irradiation only in part of the cases. However, it is not known if the toxic form of amyloid beta was decreased after irradiation. I will continue the reearch by analysing neurological functions of the brain after irradiation.

研究分野：医工学

キーワード：赤外自由電子レーザー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病に対する治療法として、神経機能異常を標的としたときのシナプス伝達を増強する治療法は存在するが、神経細胞死に対する根治療法ははまだ確立されていない。原因たんぱくの生成、リン酸化等を標的とした治療研究が世界中で盛んに行われている。私は近年の研究成果で、Abeta1-42ペプチドを凝集させたものに対して、中赤外領域の特定の波長の光を照射することにより、凝集が解離することを見出した。具体的には、赤外顕微鏡を用いた解析で6ミクロンの波長の光特異的にベータシート構造を持つものの割合が低くなった。しかし、5ミクロン、7ミクロンの波長の光では効果が表れなかった。以上の成果はアミロイドベータペプチドを試料として用いた時のデータである。

### 2. 研究の目的

本研究では、次の段階として、アルツハイマー型認知症の患者さんの脳組織内の凝集したアミロイドベータの6ミクロンの波長の光による解離効果が得られるか調べることが目的とした。

### 3. 研究の方法

公益財団法人老年病研究所に保管してある剖検凍結脳の内、アミロイドベータ抗体(クローン 4G8)による免疫染色で老人斑が顕著に認められる4症例(81 101歳)の凍結前頭葉を研究に用いた。

照射装置は東京理科大学所有の赤外自由電子レーザー(IR-FEL)発生装置である。これは分子が持つ伸縮振動や変角振動に相当する中赤外領域(5(2000  $\text{cm}^{-1}$ ) ~ 14(714  $\text{cm}^{-1}$ )マイクロメートル)において波長を変えることができる高出力パルスレーザー光を発生する。

図1に示すように水平方向に出てくるレーザー光を反射させて、垂直方向へのレーザー光として脳ブロックあるいはPBS内で超音波により破碎した脳組織に対して6ミクロンの波長の光を照射した。照射後のサンプルとアミロイドベータ抗体を用いてウェスタンブロットを行った。PBS内で超音波により破碎した脳組織に照射したサンプルからは、2% SDSを含む溶液でたんぱくを調整し、脳ブロックに照射したサンプルからは、1% Tween20を含む溶液でたんぱくを調整した。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人老年病研究所、群馬大学、東京理科大学の倫理委員会の承認を得た。

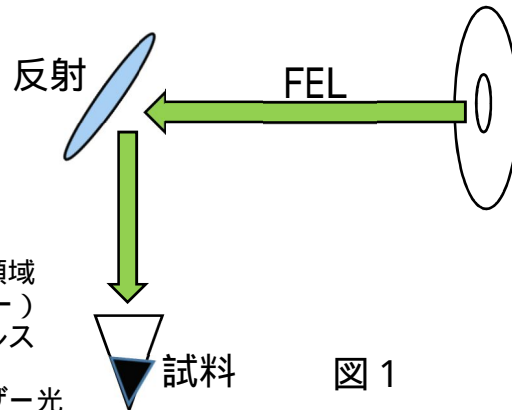


図 1

### 4. 研究成果

PBS内で超音波により破碎した脳組織は完全な液状試料となる。これを2本のチューブに分けて、1本には照射を行い、残りの1本は未照射とした。ウェスタンブロットで、4症例すべてで、アミロイドベータのモノマーに相当するシグナルと、高分子量型に相当するシグナルが検出された。症例1など一部の症例で、モノマーと高分子量型の量比が照射前後で変化した(図2)。

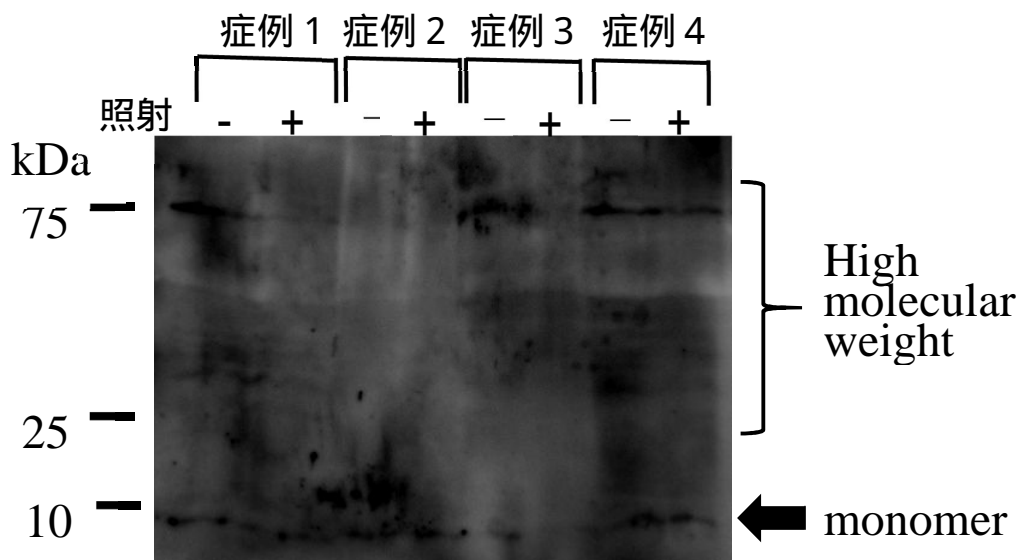


図2、破碎した脳組織に照射した試料のアミロイドベータ抗体ウェスタンブロット

液状試料においてモノマーと高分子量型の量比が照射前後で変化した症例1を用いて、より生体に近い条件として、次に、脳ブロックそのものに照射を行った。図3に示すように、照射サンプルにおいて、高分子量型のシグナルのパターンが照射後に変化していた。

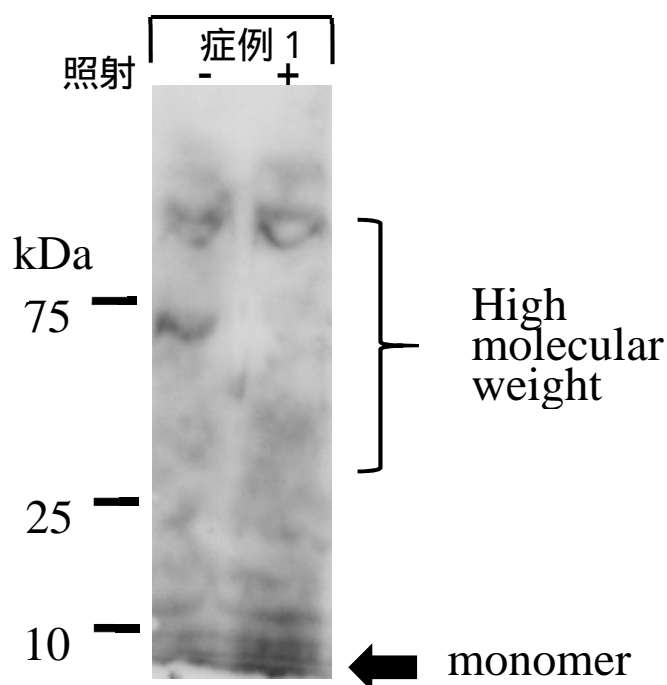


図3、脳ブロックに照射した試料のアミロイドベータ抗体ウェスタンブロット

ウェスタンブロットにおいて、高分子量型のシグナルの移動度が照射によって、変化したことは、モノマーではなく複雑な構造を持つアミロイドベータの構造が照射により変化した可能性を示唆する。しかしながら、全症例ではなく一部の症例のみに変化が見られたこと、また、この変化がアミロイドベータの毒性減弱を反映するか不明であること、を考慮したとき、さらなる解析が必要である。

私は近年、凝集 Abeta1-42 ペプチドに対して、6 ミクロンの波長の光はアミロイドを認識するコンゴレッドのシグナルを減弱させ、また、電顕解析の結果、6 ミクロンの波長の光は fibril, protofibril の構造を解離させることを発表した(下記文献2)。実験可能で、同様の意味を持つ解析として、アミロイド化したたんぱくを定量する解析がアルツハイマー型認知症の剖検脳に対しても必要である。また、神経様細胞内のポリグルタミン凝集体に照射を行うと、ポリグルタミン凝集体による突起伸長抑制が解除されることを見出した(下記文献1)。同様に、照射後の神経細胞の機能解析がアルツハイマー型認知症の剖検脳に対しても必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1 Mohara M, Kawasaki T, Owada R, Imai T, Kanetaka H, Izumi SI, Tsukiyama K, Nakamura K. Restoration from polyglutamine toxicity after free electron laser irradiation of neuron-like cells. *Neurosci Lett*. 査読有、685, 2018, 42-49. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.031.

2 Kawasaki T, Yaji T, Ohta T, Tsukiyama K, Nakamura K. Dissociation of  $\beta$ -Sheet Stacking of Amyloid Fibrils by Irradiation of Intense, Short-Pulsed Mid-infrared Laser. *Cell Mol Neurobiol*. 査読有、38, 2018, 1039-1049. doi: 10.1007/s10571-018-0575-8.

3 Kawasaki T, Ohori G, Chiba T, Tsukiyama K, Nakamura K. Picosecond pulsed infrared laser tuned to amide I band dissociates polyglutamine fibrils in cells. *Lasers Med Sci*. 査読有、31, 2016, 1425-1431. doi: 10.1007/s10103-016-2004-x.

[学会発表](計 2件)

1 Kawasaki T, Yaji T, Ohta T, Tsukiyama K and Nakamura K. (2018) Targeting beta-sheet stacking of Alzheimer's amyloid beta peptide by mid-infrared free-electron laser. *Alzheimers Research UK conference*. London, UK. March 20-21.

2 Kawasaki T, Yaji T, Ohta T, Tsukiyama K and Nakamura K. (2017) Amyloid beta Imaging using mid-IR Free Electron Laser. International Symposium on Imaging Frontier 2017 (ISIF 2017) Katsushika Campus, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan. July 8-9.

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：川崎平康

ローマ字氏名：KAWASAKI, TAKAYASU

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：研究推進機構総合研究院

職名：研究員

研究者番号(8桁)：00363268

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。