

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19506

研究課題名(和文) 脳脊髄液中のアミロイド オリゴマー化抑制物質解明と早期診断・治療法開発の展開

研究課題名(英文) inhibitors of amyloid beta oligomerization in human cerebrospinal fluid

研究代表者

池田 篤平 (Ikeda, Tokuhei)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：30755773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脳脊髄液のAmyloid 蛋白に対するオリゴマー化抑制作用の原因物質の解明を行った。脳脊髄液を液体クロマトグラフィー(Size-exclusion column)で分注し、MS/MSで評価し、Angiotensin I、II、IIIの他、既知の蛋白の断片などの16種のペプチドの合成を行った。オリゴマー化の抑制力をPICUP法で評価し、Angiotensin I-IIIを含む11種のペプチドで抑制力をみとめ、A β の線維化に対する抑制力をThioflavin T法を用いて評価し、9種のペプチドで抑制力を認めた。これらの蛋白はAlzheimer病の発生機序の究明、治療法の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to identify inhibitors of amyloid (A β) oligomerization in human cerebrospinal fluid (CSF). CSF was fractionated using centrifugation through a column and size-exclusion high-performance liquid chromatography. Two CSF fractions had inhibitory effects on A β oligomerization, as determined using tandem mass spectrometry. We identified 16 peptides with the desired activity: Angiotensins I, II, and III, and known fragments of these peptides. Using photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP), we identified 11 peptides with A β oligomerization inhibitory activity, including Angiotensins I-III. Thioflavin T fluorescence was used to identify 9 peptides with A β fibrillation inhibitory activity, including Angiotensins I-III. The discovery of these peptides contributes to the investigation of the mechanism underlying Alzheimer's disease pathology and the development of therapeutic strategies for Alzheimer's disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：Alzheimer病 アミロイド オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病(AD)は認知症の過半数を占める代表的な疾患であり、高齢者人口の急増する我が国において大きな問題となっている。AD 患者の脳では、脳萎縮と共に Amyloid β (A β)蛋白を主成分とする老人斑やリン酸化タウ蛋白を主成分とする神経原線維変化の蓄積を示す。A β 蛋白の産生などに関わる遺伝子変異で家族性 AD を発症することなどから、現在、A β 蛋白の産生・凝集・沈着の過程が、AD の病態の最上流に位置するというアミロイドカスケード仮説(Hardy J et al. Science, 2002)が広く受け入れられてきた。更に、近年、A β 蛋白の凝集の過程において数個から数十個のモノマーが凝集したオリゴマーが高度の神経毒性を示すことが注目されている(Walsh DM et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007)。

これまで、我々はヒト脳脊髄液と、Photo-induced cross-linking of unmodified proteins(PICUP)法を用いて、ヒト脳脊髄液が A β 蛋白のオリゴマー化を抑制すること、AD 患者群で抑制力が弱いことを確認した(Ikeda T et al. J Alzheimer Dis, 2011)。ヒト脳脊髄液内には、A β 蛋白のオリゴマー化を抑制する蛋白質が存在することが示唆され、この物質が AD 病態に大きく寄与していると推察される。

2. 研究の目的

A β 蛋白のオリゴマー化を抑制する物質を同定することにより、AD 発症のメカニズムに迫るとともに、効果的な発症リスクの評価が可能となる。更には、外因物質ではない、元々生体が持つ生理的な物質を用いた AD の予防・治療薬の開発につながる。本研究は今日の超高齢化社会において、「認知症のない長寿」の実現に大きく寄与するものである。

3. 研究の方法

(1) ヒト脳脊髄液をプロテアーゼ K にて処理を行い、抑制力が変化するかを検討した。

(2) ヒト脳脊髄液を 3000Da、10000Da の遠心カラムにて分画に分けた。各々の分画に対し PICUP 法を用い、どの分画にオリゴマー化抑制作用を有するかを評価した。

(3) 液体クロマトグラフィー(HPLC)を Size exclusion column (Superdex peptide)を用いておこない、分画へわけた。それぞれの分画によるオリゴマー化抑制作用の評価について PICUP 法を用いて行った。

(4)抑制力の強い分画について、Tandem mass

spectrometry を使用し、蛋白の配列の同定を行った。同定されたペプチドについて、業者へ依頼し、98%の純度にて合成をおこなった。

(5) (4)で合成した蛋白について、溶解した後に、PICUP 法にて A β 蛋白をオリゴマー状態で固定し、SDS-PAGE および鍍銀染色を用いて、蛋白のオリゴマー化抑制作用について評価を行った。

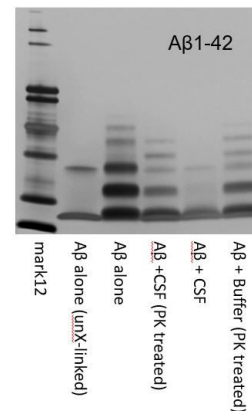
(6) (4)で合成した蛋白に対し、それぞれを A β 蛋白と混合し、線維化について Thioflavin T 法を用いて検討した。

(7) Angiotensin I、II、III について、Alzheimer 病患者と正常対象者の脳脊髄液中の濃度を測定し、比較を行った。

4. 研究成果

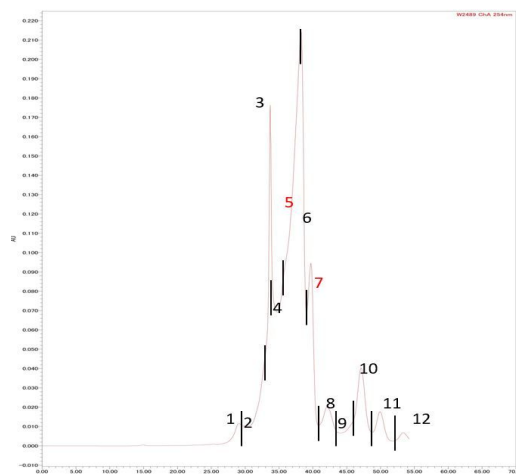
(1) ヒト脳脊髄液をプロテアーゼ K で処理し、PICUP 法にてオリゴマーが抑制作用が消失していることを確認した。

よって、抑制物質はタンパク質(もしくはペプチド)と考えられた。

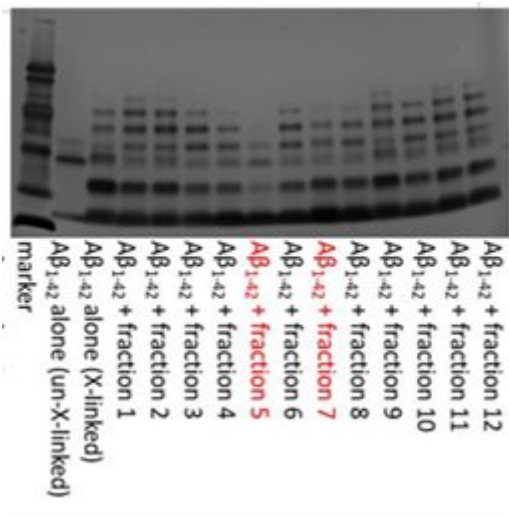


(2) 脳脊髄液を 3000Da、10000Da の遠心カラムを用いて、6 分画に分けた上で、PICUP 法を用いて抑制力を評価した。いずれも 3000Da 以下が入った分画にて A β 蛋白に対するオリゴマー化抑制作用を認めた。

(3) ヒト脳脊髄液の 3000Da 以下の分画に対して、HPLC(Size exclusion chromatography; Superdex peptide)を用い、下図のように分画に分けた。



それぞれの分画と Aβ 蛋白を混合し、PICUP 法にて、オリゴマー化抑制作用を評価したところ、分画 5 および 7 にて強い抑制力を認めた。



(4) Tandem mass spectrometry を用いて、蛋白のアミノ酸配列を検討した。そのうち、既知の配列としては、Angiotensin I、Angiotensin II、Angiotensin III であり、そのほかは既知の蛋白の断片等であった。業者に依頼を行い、これらを蛋白合成し、98%以上の純度で精製をおこなった。合成については、下記の 16 配列の合成に成功した。

(5) 上記のアミノ酸に対して、Aβ 蛋白と混合し PICUP 法にてオリゴマー抑制力の評価を行った。

下表の 11 種のペプチドで抑制力を認めた。

(6) Aβ 蛋白とこれらペプチドを混合し、Thioflavin T 法を用いて、線維化の抑制作用を検討した。

下表のごとく、9 種のペプチドにて抑制力を認めた。

Name	Molecular weight	Oligomer inhibition	Fibrillation inhibition
Angiotensin I	1295.5667	+	+
Angiotensin II	1045.6769	+	+
Angiotensin III	930.5352	+	+
Peptide-1	1297.7421	+	
Peptide-2	956.5005		+
Peptide-3	1191.6118	+	
Peptide-4	1057.5524	+	+
Peptide-5	1087.5673	+	
Peptide-6	1028.5582	+	+
Peptide-7	1067.5356		+
Peptide-8	1000.538	+	+
Peptide-9	2209.8713		
Peptide-10	1045.4338		
Peptide-11	929.3881	+	
Peptide-12	1012.4293	+	
Peptide-13	1165.4592		+

なお、結果については、さらに複数回行い確認する必要がある。

(7) ELISA 法を用いて、AD および非 AD 患者のヒト脳脊髄液の、Angiotensin I, II, III の濃度測定をおこない、比較することによって、Angiotensin I, II, III の関与を証明しようと考えた。ELISA kit を用いて測定を行ったが、濃度が低いこと、他蛋白による阻害と考えられる測定系が不安定であり、比較を行うことができなかった。

Angiotensin を含んだこれらのペプチドは濃度の測定が困難で、これらのペプチドのいずれが最もアルツハイマー病の発症のポイントになっているのかは不明である。しかし、いずれも生体内で発見された抑制物質であり、今後の治療法の検討に有用な情報であると考えられる。

今後、それぞれの抑制作用の大小について、さらに検討を行い、その中でも既知の物質である Angiotensin について、さらに動物実験などもふくめて検討を行っていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 篤平 (IKEDA, Tokuhei)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号: 30755773

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

山田 正仁(YAMADA, Masahito)

金沢大学・医学系・教授

小野 賢二郎(ONO, Kenjiro)

昭和大学・医学部・教授