

令和元年6月28日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06498

研究課題名(和文) NSAIDsによるA $\beta$ 、Sオリゴマー形成抑制作用、および伝播抑制作用の検討研究課題名(英文) NSAIDs inhibit forming oligomers and fibrils by binding to the structure of  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein protein aggregates

研究代表者

廣畑 美枝 (Hirohata, Mie)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50806552

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)：解析したNSAIDsの一部は、濃度依存性にA $\beta$ オリゴマーおよびSオリゴマー形成阻害作用を示し、既形成オリゴマーを核としたA $\beta$ 線維とS線維の伸長を阻害した。三次元蛍光スペクトラム解析では、一部のNSAIDsとSモノマー・Sオリゴマー・S線維間での強い分子間相互作用を新規に発見した。特にNSAIDsとSオリゴマーとの間で著しい相互作用がみとめられた。この結果は、NSAIDsとA $\beta$ モノマー・A $\beta$ オリゴマー・A $\beta$ 線維間での分子間相互作用と類似するものであった。NSAIDsは、パーキンソン病およびアルツハイマー病の発症予防薬および病態修飾薬の有力な候補分子となる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、NSAIDsはアルツハイマー病およびパーキンソン病の予防薬および病態修飾薬の有力な候補分子となる可能性があることが示唆された。この分野の検討は、これまで国際的にも報告がなく、NSAIDsとの分子間相互作用に基づいたアルツハイマー病およびパーキンソン病の病態修飾薬を開発する上でも極めて重要な貢献ができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The oligomeric forms of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) or  $\alpha$ -synuclein (S) play a critical role in the development of Alzheimer's disease (AD) or Parkinson's disease (PD). Epidemiological studies have revealed that therapeutic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) reduces the risk of developing AD and PD. We show that NSAIDs have anti-oligomerization and anti-fibrillization effects on A $\beta$  (1-40), A $\beta$  (1-42) and S in vitro at physiological pH and temperature, by using nucleation-dependent polymerization monitored by thioflavin fluorescence, atomic force microscopy, electron microscopy, and photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) followed by SDS-PAGE. Three-dimensional fluorescence spectroscopic analyses demonstrated that some NSAIDs interacted with A $\beta$ s or S oligomers. We speculated that NSAIDs inhibit forming oligomers and fibrils by binding to the structure of their aggregates. NSAIDs could be key molecules for the preventive agents for AD and PD.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：ケミカルバイオロジー 蛋白凝集 アミロイド シヌクレイン オリゴマー 分子間相互作用 アルツハイマー病 パーキンソン病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病およびパーキンソン病の患者脳の神経病理学的特徴は、それぞれ神経細胞外の  $\beta$  アミロイド蛋白 ( $A\beta$ ) と、神経細胞内の  $\alpha$  シヌクレイン蛋白 ( $\alpha S$ ) の凝集・沈着である。 $A\beta$  および  $\alpha S$  の凝集過程ではともに、核となる小凝集体 (オリゴマー) の形成が律速段階となり、続いて線維構造が伸長形成され、伝播していく病態が推察されている。また、 $A\beta$  のオリゴマーは強い細胞毒性を示すことが知られ (*Walsh et al., Biochemical Society Transactions 2002*)、同様に  $\alpha S$  オリゴマーの神経毒性も報告されている (*Danzer et al., J Neurosci 2007*)。このため、アルツハイマー病およびパーキンソン病のいずれの疾患においても、オリゴマーの形成を制御することが、疾患の進行抑制および発症予防する上で最も重要な課題と考えられている。近年の疫学研究、およびモデル動物を用いた実験的検討においては、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗アルツハイマー病効果 (*Pinnen et al., Arch Pharm., Weinheim, 2011*) および抗パーキンソン病効果 (*Gao et al., Neurology, 2011; Chen et al., Ann Neurol, 2005; Hernán et al., Neurology, 2006*) が明らかにされてきたが、NSAIDs がどのように効果を及ぼすのかの詳細な機序は未だ解明されていない。

申請者らはこれまで NSAIDs が  $A\beta$  および  $\alpha S$  凝集の線維形成過程を抑制し、形成された  $A\beta$  および  $\alpha S$  線維を不安定化することを報告してきた (*Hirohata et al., Neuropharmacology, 2008; Hirohata et al., Neuropharmacology, 2005*)。また、複数の有機化合物が  $A\beta$  凝集過程に及ぼす凝集抑制効果とその分子相互作用について、三次元蛍光スペクトラム解析などの手法を用いて明らかにしてきた (*Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012; Hirohata et al., Biochemistry, 2007*)。

### 2. 研究の目的

当研究では、NSAIDs が (a) 線維形成よりさらに前段階の  $A\beta$  および  $\alpha S$  オリゴマーの凝集形成過程に及ぼす効果、(b)  $A\beta$  および  $\alpha S$  オリゴマーを重合核とした線維伸長伝播過程に及ぼす効果、(c) その作用機序について  $A\beta$  または  $\alpha S$  オリゴマーと NSAIDs の分子間相互作用を三次元蛍光スペクトラム解析などの手法を用いて明らかにする。また、NSAIDs による (d) これらの効果と作用機序について申請者の既報告 (*Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012; Hirohata et al., Neuropharmacology, 2008; Hirohata et al., Biochemistry, 2007; Hirohata et al., Neuropharmacology, 2005*) および本研究で追試したデータをもとに  $A\beta$  と  $\alpha S$  蛋白種について比較検討を行う。さらに、NSAIDs が (e)  $A\beta$  および  $\alpha S$  蛋白種による神経細胞毒性の抑制効果を有するかを検討する。

これらの検討により、NSAIDs によるアルツハイマー病およびパーキンソン病発症病態の予防・進行抑制の可能性を解明することを目的とする。この分野の検討は、これまで国際的にも報告がなく、NSAIDs との相互作用に基づいたアルツハイマー病およびパーキンソン病の病態修飾薬を開発する上で極めて重要な貢献ができると考えた。

### 3. 研究の方法

#### 概要：

Photo-induced cross-linking of unmodified proteins 法による生体条件下での  $A\beta(1-40)$ 、 $A\beta(1-42)$ 、 $\alpha S$  の各々のモノマーあるいは凝集体 (オリゴマーおよび線維) 生成モデルを用いた。10 種の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) を濃度、温度などの各種条件を生体条件に標準化した後にこの系に投与し、オリゴマー生成、凝集抑制作用および伝播抑制作用の有無について検討した。Western blot、銀染色および電子顕微鏡あるいは原子間力顕微鏡を用いて検討を行った。

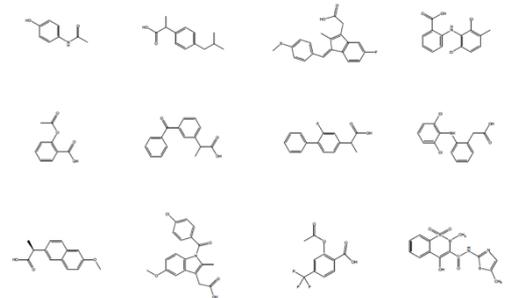
次に、それらの作用機序の解明のために  $A\beta(1-40)$ 、 $A\beta(1-42)$ 、 $\alpha S$  のモノマーあるいは凝集体 (オリゴマーおよび線維) と NSAIDs との分子間相互作用について検討した。

さらに、NSAIDsがA $\beta$ (1-40)、A $\beta$ (1-42)、 $\alpha$ Sの各々の蛋白種のオリゴマー生成、凝集抑制作用および伝播抑制作用に及ぼす効果と分子間相互作用について申請者の既報告 ([Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012](#); [Hirohata et al., Neuropharmacology, 2008](#); [Hirohata et al., Biochemistry, 2007](#); [Hirohata et al., Neuropharmacology, 2005](#)) および当研究で追試したデータをもとにA $\beta$ と $\alpha$ S蛋白種について比較検討を行った。

**非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) :**

Acetaminophen, ibuprofen, acetylsalicylic acid を含む 10 種類以上について検討を行った (図 1)

図 1. NSAIDs 構造式



**A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S :**

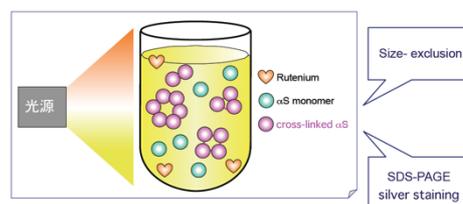
3 種類のモノマーは研究用試薬を r-peptide 社(USA)より購入した。緩衝液 (pH 7.4, 0°C) で凝集させないように溶解した ([Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012](#); [Hirohata et al., Neuropharmacology, 2008](#)).

**オリゴマー形成過程の解析 :**

A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S を生体条件下でオリゴマー化させる試験管内モデル photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)を用いた (図 2; [Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012](#)). 具体的には、試験管内で可視光を 1 秒間照射して金属イオン触媒によって、A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S の各モノマーを架橋させてオリゴマーを形成する系を用いた。形成されたオリゴマーの分子種と分子量分布は sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)/銀染色および抗 A $\beta$  抗体, 抗  $\alpha$ S 抗体による western blot で確認した。凝集体の形態およびサイズ分布は電子顕微鏡あるいは原子間力顕微鏡を用いて半定量的解析をさらに加えた。これらのオリゴマー生成系を用いて、各種 NSAIDs をそれぞれ生体濃度で追加投与し、オリゴマー形成過程における抑制・促進効果、および形成された分子種・分子量に検討を加えた。

図 2. 試験管内オリゴマー架橋モデル

Photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP)



**オリゴマーを重合核とした線維伸長凝集・伝播過程の解析 :**

PICUP にて作成した A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S の各オリゴマーを NSAIDs で前処理した後に、重合核として生体条件下試験管内凝集モデルに添加した (図 3; [Hirohata et al., 2008. Neuropharmacology](#)). さらに、A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S モノマーと共に pH 7.4, 37°C でインキュベーションして線維の伸長凝集を促進させた。凝集したオリゴマー分布は、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), 銀染色で確認した。凝集体量はチオフラビン T または S を用いて分光蛍光定量した(図 4; [チオフラビン蛍光定量解析](#)). 凝集体の形態およびサイズ分布は電子顕微鏡あるいは原子間力顕微鏡を用いて無作為に 5 視野以上を撮影し、統計学的に評価した。

図3. 試験管内線維伸長凝集モデル

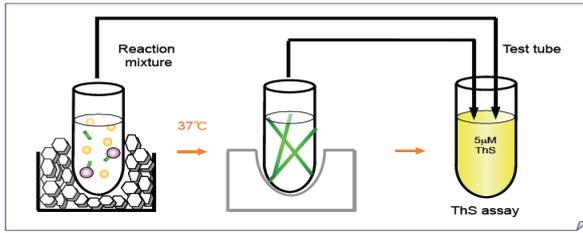
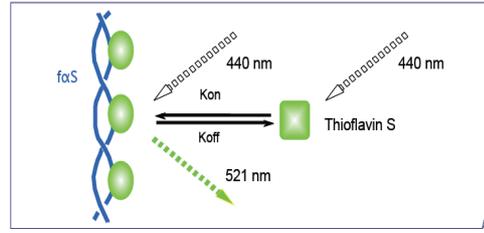


図4. チオフラビン蛍光定量解析



分子間相互作用の検討：

三次元蛍光スペクトラム解析, circular dichroism (CD) spectroscopy 等の手法を用いて, A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42),  $\alpha$ S の各分子種 (モノマー・オリゴマー・線維) と NSAIDs との分子間相互作用の詳細な解析を行った (Hirohata et al, *Biochim Biophys Acta*, 2012).

倫理面への配慮： 問題なし。

4. 研究成果

解析したNSAIDsの一部において, 濃度依存性に $\alpha$ Sオリゴマー凝集抑制がみとめられた (図5). さらに抑制がみられたNSAIDsにおいて,  $\alpha$ S線維伸長凝集の抑制がみとめられた (図6). その形態学的観察においては,  $\alpha$ S凝集体形成の抑制が確認された (図7A, 7B). さらに三次元蛍光スペクトラム解析では, 一部のNSAIDs分子と $\alpha$ Sモノマー・オリゴマー・線維間で分子間相互作用がみとめられた (図8, 図9). 特にオリゴマーとの著しい相互作用がみとめられた (図9).

図5

Effects of NSAIDs on oligomer formation of  $\alpha$ S assembled by PICUP, followed by SDS-PAGE and silver staining.

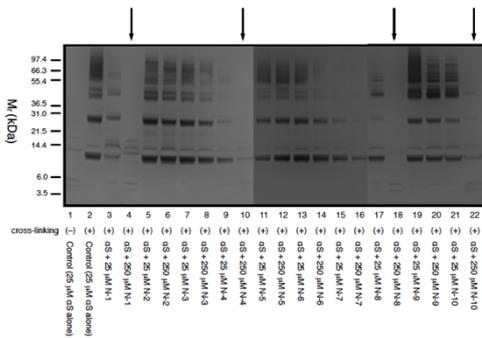


図6

$\alpha$ S fibril formation with  $\alpha$ S seeds assembled by PICUP with or without NSAIDs, monitored by ThS assay.

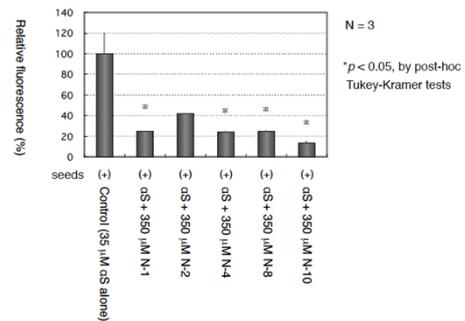


図7A

AFM images of  $\alpha$ S aggregates formed with  $\alpha$ S seeds assembled by PICUP with or without NSAIDs.

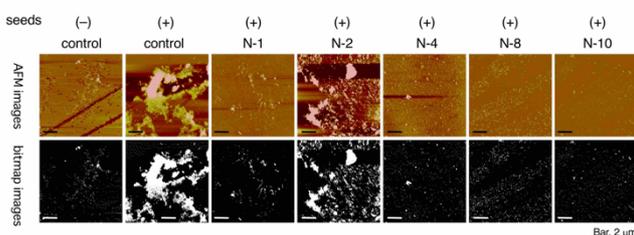


図7B

Semi-quantitative analyses of AFM images.

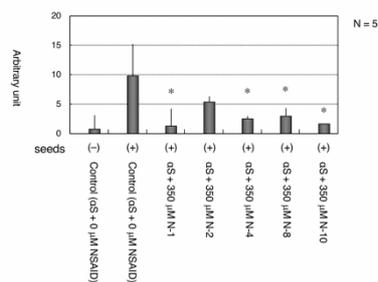


図8

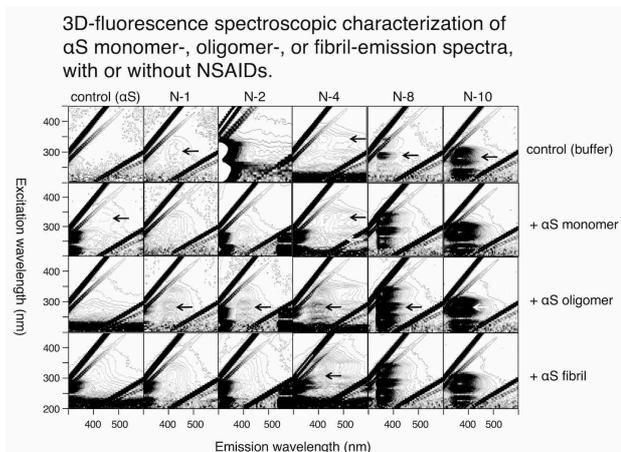
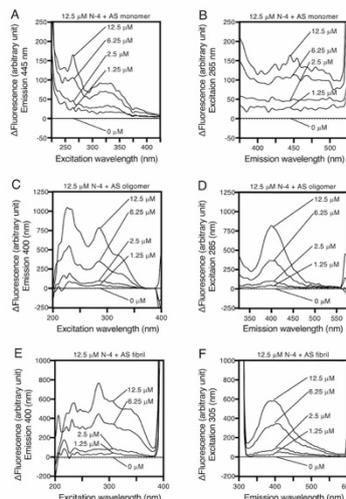


図9

Δfluorescence excitation spectra of αS monomer, oligomer or fibril, in the presence of N-4.



筆者らは、これまでに生体条件下試験管内αS重合モデルおよびαS線維伸長凝集モデル、さらにαS線維不安定化モデルを用いて、NSAIDsの抗パーキンソン病効果を報告してきた (*Hirohata et al., 2008. Neuopharmacology*)。本研究では新たに一部のNSAIDsが濃度依存性にαSオリゴマー凝集を抑制するばかり

でなく、αSオリゴマーを重合核としたαS線維伸長凝集（伝播）過程を抑制することを明らかにした。

また、αSモノマー・オリゴマー・線維の3D蛍光スペクトラムを初めて報告した（図8）。凝集抑制作用を示したNSAIDsは、αSモノマー・オリゴマー・線維（なかでも特にオリゴマー）に対する直接的な相互作用を及ぼすことで、αS凝集を抑制ことが示唆された。

以上より、解析したNSAIDsの一部は、αSオリゴマー凝集阻害作用および線維伸長凝集（伝播）阻害作用を有する。その機序作用は、NSAIDs分子とαSモノマー・オリゴマー・線維（特にオリゴマー）との直接的な分子間相互作用によるものと考えられた。NSAIDsは抗パーキンソン病薬の候補分子となる可能性がある。

当研究の成果は、申請者の既報告 (*Hirohata et al., Biochim Biophys Acta, 2012; Hirohata et al., Neuopharmacology, 2008; Hirohata et al., Biochemistry, 2007; Hirohata et al., Neuopharmacology, 2005*) との比較検討を加えて、NSAIDsがAβ(1-40)、Aβ(1-42)αSの各々の蛋白種のオリゴマー生成、凝集抑制作用および伝播抑制作用に及ぼす効果と分子間相互作用の報告として、学術誌に投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

- 1) Kawarabayashi T, Terakawa T, Takahashi A, Hasegawa H, Narita S, Sato K, Nakamura T, Seino Y, Hirohata M, Baba N, Ueda T, Harigaya Y, Kametani F, Maruyama N, Ishimoto M, St George-Hyslop P, Shoji M. Oral Immunization with Soybean Storage Protein Containing Amyloid-β 4-10 Prevents Spatial Learning Decline. *J Alzheimers Dis.* 2019 Jun 6. [in press]
- 2) Seino Y, Nakamura T, Kawarabayashi T, Hirohata M, Narita S, Wakasaya Y, Kaito K, Ueda T, Harigaya Y, Shoji M. Cerebrospinal Fluid and Plasma Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimers Dis.* 68:395-404, 2019.
- 3) Preische O, Schultz SA, Apel A, Kuhle J, Kaeser SA, Barro C, Gräber S, Kuder-Buletta E, LaFougere C, Laske C, Vöglein J, Levin J, Masters CL, Martins R, Schofield PR, Rossor MN, Graff-Radford NR, Salloway S, Ghetti B, Ringman JM, Noble JM, Chhatwal J, Goate AM, Benzinger TLS, Morris JC, Bateman RJ, Wang G, Fagan AM, McDade EM, Gordon BA, Jucker M; Dominantly Inherited Alzheimer Network; Allegri R, Amtashar F, Bateman R, Benzinger T, Berman S, Bodge C, Brandon S, Brooks W, Buck J, Buckles V, Chea S, Chhatwal J, Chrem P, Chui H, Cinco J, Clifford J, Cruchaga C, D'Mello M, Donahue T, Douglas J, Edigo N, Erekin-Taner N, Fagan A, Farlow M, Farrar A, Feldman H, Flynn G, Fox N, Franklin E, Fujii H, Gant

C, Gardener S, Ghetti B, Goate A, Goldman J, Gordon B, Graff-Radford N, Gray J, Gurney J, Hassenstab J, Hirohara M, Holtzman D, Hornbeck R, DiBari SH, Ikeuchi T, Ikonovic S, Jerome G, Jucker M, Karch C, Kasuga K, Kawarabayashi T, Klunk W, Koeppe R, Kuder-Buletta E, Laske C, Lee JH, Levin J, Marcus D, Martins R, Mason NS, Masters C, Maue-Dreyfus D, McDade E, Montoya L, Mori H, Morris J, Nagamatsu A, Neimeyer K, Noble J, Norton J, Perrin R, Raichle M, Ringman J, Roh JH, Salloway S, Schofield P, Shimada H, Shiroto T, Shoji M, Sigurdson W, Sohrabi H, Sparks P, Suzuki K, Swisher L, Taddei K, Wang J, Wang P, Weiner M, Wolfsberger M, Xiong C, Xu X. Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. Nat Med. 25:277-283, 2019.

4) Seino Y, Nakamura T, Hirohata M, Kawarabayashi T, Okushima T, Shoji M. Severe Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Ameliorated following High-dose (3 g/kg) Intravenous Immunoglobulin Therapy. Intern Med. 58:855-859, 2019.

5) Hirohata M, Shoji M. Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)-Japan. 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology. Clinical Neurology 58:S43. HT-01-1, 2018.

6) 廣畑美枝, 東海林幹夫: 常染色体優性家族性アルツハイマー病 (優性遺伝性アルツハイマー病). 精神科, 33:311-318, 2018.

7) Nakamura T, Kawarabayashi T, Seino Y, Hirohata M, Nakahata N, Narita S, Itoh K, Nakaji S, Shoji M. Aging and *APOE-ε4* are determinative factors of plasma Aβ42 levels. Ann Clin Transl Neurol. 5:1184-1191, 2018.

8) 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. 388:1-3. 2018.

#### 〔学会発表〕 (計 8 件)

1) Hirohata M. NSAIDs inhibit forming oligomers and fibrils by binding to the structure of α-synuclein aggregates. 第 60 回日本神経学会学術集会 (一般演題ポスター)、大阪、2019.5.23

2) 廣畑美枝. 第 4 回 DIAN-Japan 患者さんと御家族の会 in 弘前 (Hirosaki710 施設), 弘前大学医学部健康未来イノベーションセンター、弘前、2019.2.9

3) 廣畑美枝. セッション 1: 研究 DIAN-Japan について. Novartis Alzheimer's Disease Symposium 東北・北海道～次世代を担う先生方と認知症を考える～、仙台、2018.11.11

4) 廣畑美枝. DIAN-Japan 患者さんと御家族の会 in 弘前 (Hirosaki710 施設)の実施状況の報告。第 2 回日本 DIAN 家族会議、東京、2018.9.16

5) Hirohata M. Large scale multicenter studies of dementia, The Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN)-Japan. 第 59 回日本神経学会学術集会 (ホットトピックス 01)、札幌、2018.5.24

6) 廣畑美枝. 第 3 回 DIAN-Japan 患者さんと御家族の会 in 弘前 (Hirosaki710 施設), 弘前大学医学部コミュニケーションセンター、弘前、2018.1.21

7) Shoji M, Nakahata N, Shirato T, Narita S, Nakamura T, Seino Y, Hirohata M, Kawarabayashi T. DIAN-Japan HUGSM 710 site, Hirosaki, Japan, 2017 DIAD Family Conference, London, July 15, 2017

8) Seino Y, Narita S, Nakamura T, Hirohata M, Kawarabayashi T, Shoji M. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in neurological diseases. London, 2017 DIAD Family Conference, July 15, 2017

#### 〔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〕

1) 廣畑美枝. 光誘導 αS オリゴマー架橋モデルを用いて NSAIDs による抗パーキンソン病効果を解明する. 平成 29 年度弘前大学若手・新任研究者支援事業成果報告会. 弘前大学、弘前、2018.3.1

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者: —

(2) 研究協力者氏名 (ローマ字氏名): 東海林 幹夫 (Mikio Shoji), 佐藤 薫 (Sato Kaoru)

※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。