

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07863

研究課題名（和文）アルツハイマー病の医原性伝播の分子病態解明と予防法の開発

研究課題名（英文）Molecular mechanisms and prevention methods of Alzheimer's disease

研究代表者

濱口 毅（HAMAGUCHI, Tsuyoshi）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70452109

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、医療行為によるAlzheimer病(AD)病理学的変化のヒトからヒトへの伝播を予防するための方法を開発することである。合成A<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>ペプチドによるA<sub>β</sub>凝集体を試験管内凝集系での実験では、A<sub>1-40</sub>及びA<sub>1-42</sub>凝集体両方の凝集効果を不活化するには、135℃120分のオートクレーブが必要であった。ヒト剖検脳ホモジネートを135℃120分のオートクレーブの条件で不活化を行い、不活化した脳ホモジネートをADモデルマウス脳に接種したが、ADモデルマウスにはA<sub>β</sub>沈着を認め、生体内では135℃120分のオートクレーブが有効でない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

試験管内でA<sub>β</sub> seeding活性を不活化させるオートクレーブ条件を世界で初めて発見した。この条件は通常の医療機関で用いるオートクレーブ条件よりも高温で長時間であった。この条件で処理したヒトAD剖検脳ホモジネートをADモデルマウスでA<sub>β</sub> seeding活性を確認したが、生体内ではA<sub>β</sub> seeding活性が不活化出来ていなかった。AD病理学的変化のヒトからヒトへの伝播を予防するためには、オートクレーブ以外の方法を検討する必要があると考えられた。今後、AD病理学的変化のヒトからヒトへの伝播を予防する方法を開発するための研究を継続する必要がある。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop a method to prevent human-to-human transmission of Alzheimer's disease (AD) pathological changes due to medical intervention. In in vitro aggregation studies of A<sub>β</sub> aggregates with synthetic A<sub>1-40</sub> and A<sub>1-42</sub> peptides, autoclaving at 135 °C for 120 minutes was required to inactivate the seeding activities of both A<sub>1-40</sub> and A<sub>1-42</sub> aggregates. Human autopsy brain homogenate was inactivated by autoclaving at 135 °C for 120 minutes, and the inactivated brain homogenate was inoculated into AD model mouse brains. However, A<sub>β</sub> deposition was found in the brain of inoculated AD model mouse, which suggested that autoclaving may not be effective to prevent transmission of A<sub>β</sub> pathology among individuals.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：Alzheimer病 アミロイド 蛋白質 個体間伝播 医療行為 防御法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Alzheimer 病 (AD) は脳へのアミロイド タンパク質 (A $\beta$ ) の沈着を病理学的な特徴とするが、A $\beta$  病理は個体間を伝播することが動物実験で報告されており、研究開発代表者もこれまでにマウスやラットを用いた実験において A $\beta$  病理変化の個体間伝播を報告してきた (Hamaguchi T, et al. *Acta Neuropathol* 2012, Rosen RF, Hamaguchi T, et al. *J Neurochem* 2012, Eisele YS, Hamaguchi T, et al. *J Neurosci* 2014, Ye L, Hamaguchi T, et al. *Brain Pathol* 2015)。プリオン病では、医療行為 (ヒト屍体由来の硬膜移植や下垂体制剤の投与) に伴ってヒトからヒトに感染した医原性プリオン病が大きな問題となっており、わが国では硬膜移植後 Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) の多発が大きな問題となっている (Noguchi-Shinohara M, Hamaguchi T, et al. *Neurology* 2007, Nozaki I, Hamaguchi T, et al. *Brain* 2010, Hamaguchi T, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013, Ae R, Hamaguchi T, et al. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018)。重要なことには、異常プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) ばかりでなく、A $\beta$  病理も、成長ホルモン製剤投与や硬膜移植/脳外科手術によってヒトからヒトへの伝播の可能性が報告されている (Jaunmuktane Z, et al. *Nature* 2015, Hamaguchi T, et al. *Acta Neuropathol* 2016)。さらに、研究代表者のグループを含め世界各地から、小児期の脳外科手術後に若年で脳血管 A $\beta$  沈着 (脳アミロイドアンギオパチー: CAA) による脳出血を発症した例が報告されている (Jaunmuktane Z, et al. *Acta Neuropathol* 2018, Hamaguchi T, et al. *J Neurol Sci* 2019)。このように、A $\beta$  seeds を有するヒト屍体由来の硬膜あるいは A $\beta$  seeds で汚染された手術器具等による A $\beta$  伝播は現実のものとなっている (Yamada M, Hamaguchi T, Sakai K. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2019)。医療行為に起因する医原性 AD 病理の伝播を予防する有効な方法を確立することは喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、今後の医療行為による AD 病理学的変化のヒトからヒトへの伝播を予防するために、合成 A $\beta$  の試験管内線維形成実験やヒト脳ホモジネートの実験動物への接種等により A $\beta$  病理の個体間伝播の特性を解明し、伝播の予防法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、seed 活性を有する A $\beta$  線維と seed 活性を失った A $\beta$  線維の違いをチオフラビン T (thioflavine T: ThT) による線維化測定 (ThT 法)、電子顕微鏡、円偏光二色性 (circular dichroism: CD) スペクトル測定、高速原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いた 1 凝集体レベルの動態解析等により明らかにする。さらに、モデル動物脳および AD 患者剖検脳ホモジネートをモデルマウスに脳内接種した場合の A $\beta$  病理の個体間伝播の特性を明らかにし、同時に、脳ホモジネートをオートクレーブ等により不活性化処理することによって生体内でも A $\beta$  seed 活性が消失するかを解明する。

#### (1) 合成 A $\beta$ 線維の試験管内 seed 活性のオートクレーブ処理による変化に関する ThT 法、電子顕微鏡、CD スペクトル測定を用いた解析

合成 A $\beta$  の試験管内凝集系において、合成 A $\beta$  から形成した A $\beta$  線維断片の seed 活性を消失させるオートクレーブ処理の条件を ThT 法で詳細に検討する。ThT 法の結果に基づきで選択したオートクレーブ処理の条件を用いて A $\beta$  線維を処理した場合の、オートクレーブ処理前後の A $\beta$  線維の構造について ThT 法、電子顕微鏡、CD スペクトル測定によって比較する。この研究では、オートクレーブ処理によって A $\beta$  線維の構造がどのように変化するかを確認することで、A $\beta$  線維の seed 活性に重要な A $\beta$  線維構造を明らかにし、処理条件を最適化する。

#### (2) 合成 A $\beta$ 線維 seed のオートクレーブ処理による試験管内 A $\beta$ 線維形成の構造動態の変化に関する高速 AFM を用いた解析

世界最速の高速 AFM を用いてオートクレーブ処理をした合成 A $\beta$  線維断片、およびオートクレーブ処理していない A $\beta$  線維断片を seeds として合成 A $\beta$  線維を形成させる場合の構造動態の違いを比較する。

#### (3) マウス及びヒト脳ホモジネートの生体内での A $\beta$ 線維 seed 活性とオートクレーブ処理による変化についての研究

十分に加齢し脳に A $\beta$  が十分沈着している AD モデルマウス脳と病理学的に AD と診断されているヒト AD 凍結脳を、合成 A $\beta$  線維の A $\beta$  線維 seed 活性が消失する条件のオートクレーブ処理を行う。オートクレーブを行った脳ホモジネートとオートクレーブを行っていない脳ホモジネートを AD モデルマウス脳に接種し、接種 1 年後に AD モデル脳について病理学的に A $\beta$  沈着程度を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 合成 A $\beta$ 線維の試験管内 seed 活性のオートクレーブ処理による変化に関する ThT 法、電子顕微鏡、CD スペクトル測定を用いた解析

合成 A $\beta$  1-40 及び A $\beta$  1-42 ペプチドによる A $\beta$  凝集体を試験管内凝集系で作成し、それらの A $\beta$  凝集体を 105 $^{\circ}$ C5 分から 135 $^{\circ}$ C120 分までの様々な条件によるオートクレーブ処理を行った。ThT 法によって A $\beta$  凝集体の線維形成を継続的に観察し、異なる条件によるオートクレーブ処理における A $\beta$  凝集体の線維形成の変化を比較した。A $\beta$  凝集体の線維形成は、オートクレーブの処理時間が長く、温度が高いほど抑制された。A $\beta$  1-40 凝集体は 115 $^{\circ}$ C5 分あるいは 105 $^{\circ}$ C60 分で線維形成促進効果が消失したが、A $\beta$  1-42 凝集体はそれらの条件では線維形成促進効果を消失することは出来ず、線維形成促進効果消失に 135 $^{\circ}$ C120 分のオートクレーブ処理を必要とした。さらに、オートクレーブ処理前後における A $\beta$  凝集体の構造変化を ThT 法、CD スペクトル測定で検討したところ、オートクレーブ処理によって A $\beta$  凝集体のシート構造の割合が減少していた。電子顕微鏡による評価では、オートクレーブによって線維状の A $\beta$  凝集体の長さが短くなった。以上の試験管内の実験の結果からは、オートクレーブによって A $\beta$  凝集体の長さが短くなり、シート構造の割合が減少することで凝集効果が低下すると考えられた。

(2) 合成A 線維seedのオートクレーブ処理による試験管内A 線維形成の構造動態の変化に関する高速AFMを用いた解析

高速AFMを用いて、オートクレーブ処理前後におけるA 凝集体の凝集効果の変化を比較したところ、135°C120分のオートクレーブ処理でA 1-42凝集体の線維伸長速度が低下した。

(3) マウス及びヒト脳ホモジネートの生体内でのA 線維seed活性とオートクレーブ処理による変化についての研究

上記(1)、(2)の結果から、A 1-40及びA 1-42凝集体両方の凝集効果を不活化するには、135°C120分のオートクレーブが必要であった。オートクレーブは、A 病理の個体間伝播を予防する方法として有用である可能性があると考えた。脳実質や脳血管のA 沈着の程度が異なるヒト剖検脳ホモジネートをADモデルマウス脳に接種したところ、A 沈着がほとんど無いヒト剖検脳ホモジネートが、他の脳実質や脳血管のA 沈着を認めるヒト剖検脳ホモジネートと比較して有意に脳A 病理変化の伝播効率が高かった。さらに、その脳A 病理変化の伝播効率は脳ホモジネート内に含まれるA オリゴマー/A モノマーの比に有意に正の相関を示した。このことは、脳にA 病理変化をほとんど認めない症例も医療行為などで個体間伝播する可能性があり、その個体間伝播にはA オリゴマーが重要な役割を果たしていることを示唆していると考えた。ヒト剖検脳ホモジネートを135°C120分のオートクレーブの条件で不活化を行い、不活化した脳ホモジネートをADモデルマウス脳に接種したが、ADモデルマウスにはA 沈着を認め、生体内では135°C120分のオートクレーブが有効でない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakano Hiroto, Hamaguchi Tsuyoshi, Ikeda Tokuhei, Watanabe Nakayama Takahiro, Ono Kenjiro, Yamada Masahito	4. 巻 160
2. 論文標題 Inactivation of seeding activity of amyloid protein aggregates in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 499 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamaguchi Tsuyoshi, Ono Kenjiro, Yamada Masahito	4. 巻 47
2. 論文標題 Transmission of Cerebral -Amyloidosis Among Individuals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2469 ~ 2477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03566-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hamaguchi T, Yamada M.
2. 発表標題 Evidence of A $\beta$ propagation in human and animal models.
3. 学会等名 第61回日本神経病理学会総会学術研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 正仁  (YAMADA Masahito)  (80191336)	金沢大学・医学系・協力研究員    (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野 賢二郎  (ONO Kenjiro)  (70377381)	金沢大学・医学系・教授    (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関