

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591524

研究課題名（和文） 抗 β アミロイドオリゴマー抗体による神経細胞保護機構の検討研究課題名（英文） The efficacy of anti- $A\beta$ oligomer antibody to the toxicity of $A\beta$ to neuronal cells

研究代表者

林 要人（HAYASHI YOSHIHITO）

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20295223

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー型認知症の原因物質として β アミロイド（ $A\beta$ ）があり、線維化前の $A\beta$ オリゴマーがシナプスの障害を引き起こし、認知機能を低下させる。このため抗 $A\beta$ オリゴマー抗体による神経細胞保護効果を検討した。抗 $A\beta$ オリゴマー抗体を $A\beta$ を添加した培養液に同時に添加し培養細胞に対して細胞保護効果があるものか検証した。抗 $A\beta$ オリゴマー抗体を添加した細胞群では生存率が上昇した。毒性を低下させる原因について検討し、フリーラジカル産生抑制と神経細胞毒性に関与する NMDA 受容体の量的変化を検討した。抗 $A\beta$ オリゴマー抗体の増加に伴い NMDA 受容体量は減少する傾向が認められ、関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）： The most popular type of dementia is Alzheimer's disease(AD). The cause of AD is thought that amyloid beta protein ($A\beta$) cleaved from amyloid precursor protein(APP) which is expressing on the neuronal cell membranes has neurotoxicity and induce neuronal cell death. Recently some researchers found the soluble oligomer form had toxicity to the synapses and induce cognitive decline. We thought that anti-oligomer antibody has neuroprotective effect. We investigated the mechanisms of neuroprotective effect of anti-oligomer antibody against neuronal cells from $A\beta$ toxicity. We investigated whether or not anti-oligomer antibody reduce the amount of free radical formation when $A\beta$ aggregate themselves. The amount of free radical formation was reduced compared with control solution. The viability of PC12 cells was higher when culture medium was added anti-oligomer antibody with $A\beta$. We found some changes of amount of NMDA receptor in PC12 when added $A\beta$ to culture medium with anti-oligomer antibody. We did not confirm whether the effect of anti-oligomer antibody against NMDA receptor was direct or indirect effect. We thought that there are some relations between two properties.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：アルツハイマー型認知症 β アミロイド オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

現在先進国特に日本では高齢化社会が現実的な社会問題となっている。高齢化社会では認知症になる可能性は高くなり、現在の社会構造では健全な老年者が病弱な老年者を介護しなければならないという状況となっている。認知症の看護は介護する家族にとって負担が大きくできるだけ社会資源を利用して生活をしなければ成り立たなくなっている。認知症の原因としては最も大きな割合を占めるものはアルツハイマー型認知症(AD)でありその原因物質としては脳内に蓄積するβアミロイド(Aβ)が有力な原因物質として同定されている。これまでの研究からAD脳では神経細胞からβセクレターゼおよびγセクレターゼによって切り出されたAβが細胞外にて凝集し、線維化し、アルツハイマー型認知症の病理所見である老人斑を形成する。その形成過程において神経細胞に対する毒性が出現すると考えられている。これまでの毒性についてはAβが線維化したのものに対する細胞毒性がとりだたされてきた。しかし、線維化される前の可溶性Aβの状態であるオリゴマーにおける状態がシナプスの障害を生じ始め神経に対して毒性を発揮すると考えられ始めた。そしてそれらが進行し、認知機能を低下させるということが注目されるようになった。最も毒性が高いとされるオリゴマーの状態に対する治療法がADの進行や発症を抑制するものになる可能性があると考えられる。このためオリゴマー抗体を用いて神経細胞保護機構について検討するに至った。

2. 研究の目的

βアミロイドの中でも特に細胞毒性の高いと考えられるAβオリゴマーに対する抗Aβオリゴマー抗体を用いて神経細胞保護におけるメカニズムの検討を行うことである。

3. 研究の方法

1)

抗βアミロイドオリゴマー抗体によるフリーラジカル産生抑制による神経細胞保護効果: βアミロイド1-40 (PEPTIDE INSTITUTE)を100uM/10mMPBS、および0~20ng/mlの抗βアミロイドオリゴマー抗体(millipore, USA)を添加したサンプルを作成し37°C恒温槽にて、暗所にてインキュベートする。

0, 24, 48, 72, 96時間後に各サンプルより50ulずつ採取しHydrogen Peroxide / Peroxidase Assay Kit (Invitrogen)を用いて蛍光光度計を用いて産生されたH₂O₂を測定した。

またAβおよび抗Aβオリゴマー抗体を前実験同濃度に調整した培養液(7%FBS, 7%HS

lug/ml streptomycin, lug/ml penicillin/DMEM)にてPC12細胞(96wellplateに10⁵個/well, 各群n=6)を37°C, 10%CO₂ incubatorにて培養し、96時間後にWST-8 (SEIKAGAKU KOUGYOU)を10ul/well添加し吸光度測定を行い生存率を測定した。

2)

NMDA受容体に対する影響の検討、抗アポトーシス蛋白Bcl2発現量の検討

72時間インキュベートした細胞は1mlの1mM EDTA(pH7.4)を含む0.32M mannitolで氷上にてホモジナイズし、4°Cにて1000gにて10分間遠心した。採取されたタンパクはBio-Rad DC protein assayを用いてタンパク量を測定した。各サンプル10ugにつき同じ用量のSDS sample buffer (4%SDS, 20% glycerol, 2% beta-mercaptoethanol (pH6.8) 100mM Tris-HCl)を加え5分間煮沸した。サンプルを分離するための電気泳動は一次元Tris-SDS-PAGE (4.5%stacking gel, 6% separating gel)を行った。ゲル上のタンパクは0.2mmニトロセルロース膜に転写した。その後、ニトロセルロース膜は10分間non-fat dry milk(PBS-T溶液; 1%Tween20含有)にてブロッキングを行い抗NMDA-R1抗体0.5ug/ml (Chemicon, USA)と2時間反応させた。その後Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Chemicon, USA)と20分間反応させ、洗浄後enhanced chemiluminescence (Amersham, USA)を用いて可視化した。

また、抗アポトーシス蛋白であるBcl2の発現については抗Bcl2抗体(Santa Cruz, USA)を用い上記cell lysateを4-12%gradient gelにて同量泳動し2次抗体にはHorseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgGと20分間反応させ、洗浄後enhanced chemiluminescence (Amersham, USA)を用いて可視化した。

3)

AβによるPC12細胞の壊死性変化の割合を調べるためPropidium iodide (PI)による蛍光染色を施行した。10穴のガラスプレートに細胞が10³個/wellになるように細胞を捲き実験Iと同様の培養液にて96時間培養し、10mMPBSにて調整したPI溶液(5ug/ml)で染色し蛍光顕微鏡下にて陽性細胞数の計測を行った。

4. 研究成果

1) ①

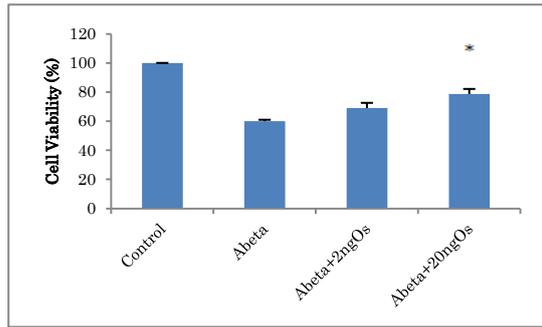


図 1. β アミロイドおよび抗 A β オリゴマー抗体による PC12 細胞の生存率は上昇した。抗オリゴマー抗体量の増加に伴い生存する細胞数は増加した。* < 0.05

②

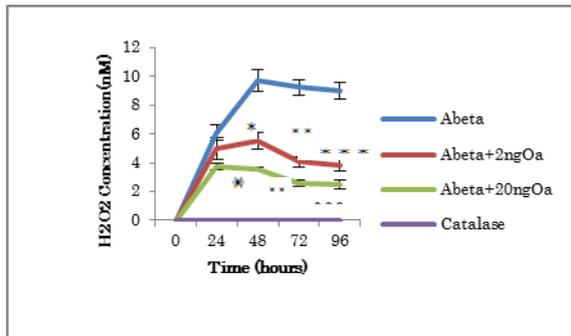


図 2. β アミロイドおよび抗オリゴマー抗体による H₂O₂ 産生は抗体量の増加により産生量は有意に低下した。48 時間より A β だけのものと抗 A β オリゴマー抗体を加えた群間では有意な差が生じ持続した。* < 0.05
** < 0.05, *** < 0.05

2)

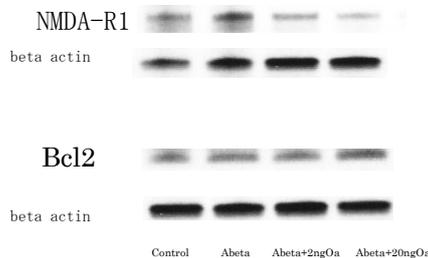


図 3. 抗 NMDA 受容体抗体、抗 Bcl2 抗体による

るウエスタンブロットの結果

抗 A β オリゴマー抗体量の増加により NMDA-R1 発現量は低下傾向が認められる。Anti-Bcl2 抗体を用いた結果では各群間に有意差はなかった。

3)

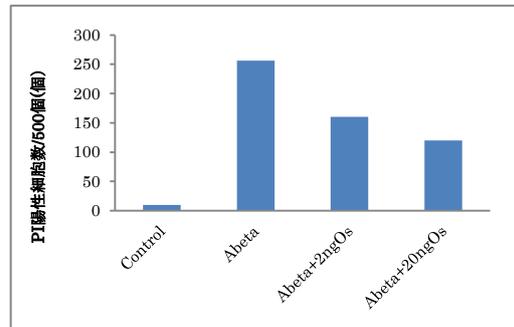


図 4. PI 陽性細胞数の計測 抗 A β オリゴマー抗体量増加により PI 陽性細胞数は減少した。

抗 β アミロイドオリゴマー抗体は β アミロイド (A β) オリゴマーに結合し重合体を形成することを阻止する作用があると思われる。これにより重合途中で形成されることが知られている H₂O₂ は産生が抑制されることが示された。H₂O₂ は \cdot OH になり細胞傷害作用を有することが知られている。

これにより細胞膜の傷害などが引き起こされ細胞膜の過酸化などを経て細胞死に至るものと考えられている。今回の細胞ではアポトーシスを阻止する Bcl2 タンパクの増加は認められなかった。これは今回の実験における細胞死の過程がネクローシスに至る系での細胞死を引き起こしている可能性を示唆するものと思われる。また、A β オリゴマーはシナプスに存在する神経伝達物質の受容体、特に記憶、学習に関与する NMDA 受容体数の変化のみならずオリゴマーと NMDA 受容体の結合に対するコンフォメーション変化に関与する可能性があるものと思われる。NMDA 受容体数及び形状自体を変化させることで異常な細胞の活動、過剰な細胞内へのカルシウムの流入などを防ぐ可能性があるのではないかと考える。このために細胞死が阻止される可能性がある。神経細胞死が阻止されれば認知症で生じる機能障害も改善する可能性はある。抗体による細胞保護機構の一つにはそういった記憶、学習に重要な受容体数の変化のみならず形状に対する効果も考慮していく必要があるものと思われる。

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6件)

1. 林要人 石田康 岡原一徳 三山吉夫
アルツハイマー型認知症患者の行動および
心理症状に対する抑肝散の効果
脳 21 2009 12 巻4号 452-455 査読有

2. Takeda R, Watanabe Y, Ikeda T, Abe H,
Ebihara K, Matsuo H, Nonaka H, Hashiguchi
H, Nishimori T, Ishida Y: Analgesic effect
of milnacipran is associated with c-Fos
expression in the anterior cingulate
cortex in the rat neuropathic pain model.
Neurosci Res 2009 64 (4): 380-384 査
読有

3. 林要人 石田康 井上輝彦 宇田川充隆
竹内康三 木上幸一郎 二宮嘉正 河野次
郎 鮫島哲郎 川原岳 後藤勇 首藤謙二
倉山茂樹 中村純五 岡原一徳 三山吉夫
アルツハイマー型認知症の周辺症状 (BPSD)
に対する抑肝散の効果-日常診療下における
検討: 入院患者における部分集団解析-
Geriatric Medicine (老年医学) 2010 48 巻
6号 831~838 査読有

4. Hayashi Y, Ishida Y, Inoue T, Udagawa M,
Takeuchi K, Yoshimuta H, Kiue K, Ninomiya
Y, Kawano J, Sameshima T, Kawahara T, Goto
I, Shudo K, Kurayama S, Nakamura J, Okahara
K, Mitsuyama Y. Treatment of behavioral and
psychological symptoms of Alzheimer-type
dementia with Yokukansan in clinical
practice. Prog Neuropsychopharmacol Biol
Psychiatry. 2010 Apr 16;34(3):541-5. 査読
有

5. Okahara K, Ishida Y, Hayashi Y, Inoue T,
Tsuruta K, Takeuchi K, Yoshimuta H, Kiue
K, Ninomiya Y, Kawano J, Yoshida K, Noda
S, Tomita S, Fujimoto M, Hosomi J,
Mitsuyama Y. Effects of Yokukansan on
behavioral and psychological symptoms of
dementia in regular treatment for

Alzheimer's disease. Prog

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.

2010 Apr 16;34(3):532-6. 査読有

6. 岡原一徳、石田康、林要人、土屋利紀 認
知症患者の行動・心理症状 (BPSD) に対する
抑肝散長期投与の安産性および有効性の検
討 Dementia Japan 2012 26 巻 196-205
査読有

[学会発表] (計5件)

1. 国際老年精神医学会 カナダ モントリ
オール 2009年9月1-5日
Hayashi Y, Ishida Y, Okahara K, Mitsuyama
Y:
A multicenter open label study to
investigate the effect of a traditional
Japanese medicine, yokukansan, on the
behavioral and psychological symptoms
of dementia in patients with Alzheimer's
disease

2. 国際老年精神医学会 カナダ モントリ
オール 2009年9月1-5日
Hayashi Y, Ishida Y, Okahara K, Mitsuyama
Y: A randomized, controlled comparative
open label study of a traditional Japanese
medicine, yokukansan, on the behavioral
and psychological symptoms of dementia in
patients with Alzheimer's disease.

3. 第32回日本神経科学大会, 2009年9月
16-18日 名古屋 畑敏道, 蛭原功介,
伊達紫, 石田康, 中原大一郎: オレキシ
ンAによる脳内自己刺激閾値の上昇はCRF受
容体阻害によって抑制される.

4. 第40回 北米神経科学学会
サンディエゴ 2010年11月13-17日
Matsuo H, Abe H, Ebihara K, Takeda R,
Nishimori T, Ishida Y: Effect of
aripiprazole on methamphetamine-induced
disruption of latent inhibition in rats.

5. アメリカ精神医学会 ハワイ 2011年5月
14-18日
Hayashi Y, Ishida Y, Okahara K, Mitsuyama
Y An open label study to ascertain the effect
of a traditional Japanese medicine yokukansan,
short-term treatment on the BPSD in patients
with AD

[図書] (計0件)

[産業財産権]

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 要人(HAYASHI YOSHIHITO)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：20295223

(2) 研究分担者

蛭原 功介(EBIHARA KOUSUKE)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20510720

船橋 英樹(HUNAHASHI HIDEKI)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：10404435

(3) 連携研究者

()

研究者番号：