

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790869

研究課題名(和文)バイオマーカーを指標としたアルツハイマー病の治療法開発と臨床応用

研究課題名(英文)Development of therapy of Alzheimer's disease using biomarker

## 研究代表者

若佐谷 保仁(Wakasaya, Yasuhito)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10598725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Alzheimer病モデルマウスTg2576では8月齢から、TgCRND8では3月齢から脳A $\beta$ 蓄積が認められ、加齢に伴い増加した。学習障害はTgCRND8では8週齢から、Tg2576は10月齢から認められた。神経原線維変化(NFT)と神経細胞死モデルマウスTgTauP301Lでは2月齢から脳tau蓄積が、8月齢以降でNFTが、12月齢で学習障害が認められた。Parkinson病モデルマウスTg $\alpha$ -SYNでは $\alpha$ -synuclein蓄積は2月齢から、神経細胞内封入体は7月齢から、行動障害は10.5月齢から認められた。脳への蛋白の経時的蓄積とともに学習障害が誘発されることが示された。

研究成果の概要(英文)：A $\beta$  deposition begins from 8month in Tg2576 model mice, and from 3 month in TgCRND8 mice. Memory disturbance begins from 6 month in Tg2576 mice, and from 5 month in TgCRND8 mice. CSF A $\beta$ 42 decreased with aging. In TgTauP301L mice, tau deposition begins from 2 month, NFT begins at 8 month, and memory disturbance begins from 12 month. In Tg $\alpha$ -SYN mice,  $\alpha$ -synuclein begin from 2 month, cytoplasmic inclusions begin from 7 month, and behavior disturbance was found from 10.5 month. With protein deposition in brain, behavioral disturbance was induced in these model mice.

研究分野：神経内科

キーワード：アミロイド タウ シヌクレイン アルツハイマー病 レビー小体型認知症

## 1. 研究開始当初の背景

先進各国とアジア諸国では人口の高齢化とともに認知症が爆発的に増加している。本邦でも既に200万人を超しており、15年後には人口の11%、400万人と推計されている。未だに根本的な治療法は無く、年間4兆円の国民医療費が消費され、早急に解決すべき世界的な課題である。認知症の原因の約50%はアルツハイマー病(AD)で、次に多いレビー小体型認知症(DLB)もAD病変を伴っている。ADではA $\beta$ 40、A $\beta$ 42からなるA $\beta$  amyloidとリン酸化tauからなる神経原線維変化(NFT)が脳に大量に蓄積する。病態研究分野では、APPとpresenilin-1/2に集中する家族性ADの原因遺伝子変異はA $\beta$ 42やA $\beta$  oligomerを増加すること、 $\gamma$ -secretase complex、BACE、NephrilysinによるA $\beta$ 生成・代謝機序の解明、A $\beta$  amyloid (Tg2576: Kawarabayashi T, Shoji M, J Neurosci 2001)、NFT (TauTgP301L: Murakami T, Shoji M, Am J Pathol 2006)、レビー小体(Tg $\alpha$ SNY: Ikeda M, Shoji M, Brain Res 2010, 特許第4174212号2008)を再現するモデル動物の確立と治療薬の開発、抗A $\beta$ 抗体(Bapineuzumab: Elan/Wyeth; Asami O, Shoji M, Neurobiol Dis 2005)などの新たな治療薬の臨床治験開始、A $\beta$  amyloid画像や脳脊髄液(CSF) A $\beta$ とtauのエビデンスの確立(Alzheimer Neuroimaging initiative: ADNI; Shoji M, Ann Neurol 2001)など著しい進歩がみられた。

しかし、当初期待されたA $\beta$ ワクチンの臨床治験ではA $\beta$  amyloidは改善するが、NFT、レビー小体病理、認知症の進行と生存率の改善はできなかった(Hyman Brain 2010, Holmes C, Lancet 2008)。Apo J、DMP、SORL1、PCDH11X、PICALM、CR1などの疾患関連遺伝子が次々に発見され(Nature Genetics 2009)、A $\beta$ 輸送障害や炎症などの新たな病態の存在が示唆されている。さらに、AD発症における最も重要な原因がA $\beta$ 小凝集体(A $\beta$

oligomer)によるシナプスや神経突起の障害と考えられる根拠が揃い(A $\beta$  oligomer/シナプス仮説: Kawarabayashi T, Shoji M, J Neurosci 2004; Ashe KH, Nature Med 2006; Shanker GM, Nature Med 2008)、tau oligomerによる神経細胞死も明らかにされた(Haass JCB 2009, SantaCruz K, Science 2005)。また、A $\beta$ /tau oligomerの脳内直接投与によるAD病変の増強・伝播も報告されつつある(Clavaguera Nature Cell Biol 2009, Meyer-Luehmann M, Science 2006)。Biomarker分野ではCSF A $\beta$ 42とtauが軽度認知障害(MCI)からAD発症予測に最も鋭敏であることが示唆されている(Shaw LM, Ann Neurol 2009)。これらの結果は、1)A $\beta$ /tau oligomerの制御とシナプス・神経細胞保護を目指した治療戦略の再構築、2)病態に関連する新たな関連分子の同定とその役割の解明、3)biomarkerを指標とした動物モデルによる薬剤の迅速評価と臨床応用の必要性を示唆している。世界的にはこれらの新たな研究分野への注目が高まっており、本研究はこれまでの我々の研究成果に基づいて1)~3)の3点に検討を加え、ADとDLBの根本的治療の開発と臨床応用を目指している。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)やレビー小体型認知症(DLB)のモデル動物群とA $\beta$ 、tauやA $\beta$  oligomer測定系および抗A $\beta$ 抗体治療の研究成果に基づいて、新たな手法を駆使して、脳病理・行動障害の重症度に相関する脳実質、脳脊髄液と血液のbiomarker群および新たな治療介入の効果と相関するbiomarker群を検証する。

## 3. 研究の方法

A $\beta$ アミロイドモデル(Tg2576、TgCRND8)、NFTと神経細胞死モデル(TgTauP301L)、レビー小体モデル(Tg $\alpha$ SNY)、A $\beta$  amyloid-NFT-神経細胞死モデル(2xTgAPP+/-Tau+/-)において、

ECL 発光 ELISA による高感度多重測定を用いて、脳病理、行動障害の進行と関連した biomarker 群を微量で迅速評価可能なシステムを確立する。抗 A $\beta$  oligomer 抗体による治療介入による病態の変動を確立する。

#### 4. 研究成果

A $\beta$  アミロイドモデルマウス Tg2576 と TgCRND8、神経原線維変化(NFT)と神経細胞死モデルマウス TgTauP301L、 $\alpha$ -synuclein モデルマウス Tg $\alpha$ SYN、Tg2576 と TgTauP301L を掛け合わせた amyloid-NFT-神経細胞死マウス 2xTgAPP+/-Tau+/-の解析を行った。各モデルマウスにおいて TBS、SDS、ギ酸の3段階で抽出した脳抽出液、血漿、脳脊髄液中の A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、A $\beta$  oligomer の ELISA を経時的に測定し、免疫染色にて A $\beta$ 、tau、 $\alpha$ -synuclein 蓄積を経時的に検討した。Morris water maze 試験による行動障害を経時的に検討した。

Tg2576 マウスでは8月齢から、TgCRND8 マウスでは3月齢から脳 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 蓄積が認められ、加齢に伴い脳 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 蓄積は増加した。TgTauP301L マウスでは2月齢から脳 tau 蓄積が認められ、8月齢以降で NFT が認められた。2xTgAPP+/-Tau+/-マウスでは脳 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 蓄積は Tg2576 マウスと差を認めなかった。Tau 蓄積も出現時期は同じであったが、リン酸化 tau 蓄積は TgTauP301L マウスに比べて20月齢以上で促進された。Tg $\alpha$ SYN マウスでは $\alpha$ -synuclein 蓄積は2月齢から認められ、7月齢で神経細胞内に封入体が認められた。A $\beta$  および tau の蓄積は SDS 分画に最も多く認められ、加齢と共に増加した。脳脊髄液中の A $\beta$ 40、A $\beta$ 42 は加齢と共に低下した。脳脊髄液中の tau は TgCRND8 マウス、TgTauP301L マウスともに加齢と共に増加した。

Morris water maze 試験では TgCRND8 マウスでは8週齢から、Tg2576 は10カ月齢から NonTg マウスと比べて水面下のゴールに到

達する潜時と水泳距離が延長し、学習障害が認められた。TgCRND8 マウスでは14月齢までの検討で学習障害は経時的に進行し、NonTg マウスとの差が拡大した。脳への蛋白の経時的蓄積とともに学習障害が誘発されることが示された。

#### 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 2件)

1. Matsubara E, Takamura A, Okamoto Y, Oono H, Nakata T, Wakasaya W, Kawarabayashi T, Shoji M, Disease modifying therapies for Alzheimer's disease targeting A $\beta$  oligomers: Implications for therapeutic mechanisms. BioMed Res Int, 査読有, 2013, 2013, 984041 DOI: 10.1155/2013/984041
2. Watanabe M, Adachi Y, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Wakasaya Y, Shirahama I, Takamura A, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M. An unusual case of elderly-onset CADASIL with multiple cerebrovascular risk factors. J Stroke Cerebrovasc Dis, 査読有, 21(2), 2012, 143-145, DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2010.05.008

[学会発表](計 5件)

1. Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Nakamura T, Nakahata N, Shoji M, A $\beta$  oligomers and prion in lipid rafts. Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen,

Denmark, July 12-17, 2014

2. Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Nakahata N, Oono H, Matsubara E, Shoji M, Accumulation of A $\beta$  oligomers and prion and impaired signal transduction in lipid rafts. Neuroscience 2013, the Society for Neuroscience, 43<sup>th</sup> Annual Meeting, San Diego, Nov 9-13, 2013.
3. Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Shoji M, A $\beta$  oligomers in lipid rafts impair signal transduction pathways in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 2012, the Society for Neuroscience, 42<sup>th</sup> Annual Meeting, New Orleans, Oct 13-17, 2012.
4. 瓦林毅, 中村琢洋, 仲田崇, 若佐谷保仁, 中畑直子, 東海林幹夫, A $\beta$  oligomer は lipid rafts で prion と結合して信号伝達系を障害する. 第 33 回日本認知症学会学術集会 パシフィコ横浜 2014 年 11 月 29 日-12 月 1 日
5. 東海林幹夫, 中村琢洋, 仲田崇, 若佐谷保仁, 中畑直子, 瓦林毅. アルツハイマー病モデルマウスを用いた脳アミロイドアンギオパチーの検討. 第 2 回日本アミロイドーシス研究会学術集会, KKR 東京ホテル, 2014 年 8 月 22 日
6. Kawarabayashi T, Nakata T, Wakasaya Y, Matsubara E, Shoji M: Binding of A $\beta$  oligomers and prion in lipid rafts of Alzheimer model mice. 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター 2014 年 5 月 21-24 日
7. 仲田崇, 瓦林毅, 若佐谷保仁, 中村巧美, 東海林幹夫, 原発性進行性失語 Primary Progressive Aphasia の亜型分類に基づいた臨床的検討 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター 2014 年 5 月 21-24 日
8. 若佐谷保仁, 仲田崇, 瓦林毅, 東海林幹夫, 高橋利幸, 松原悦朗, 吃逆にて発症した NMO spectrum disorder の 3 例. 第 93 回日本神経学会東北地方会フォレスト仙台 2014 年 3 月 8 日
9. 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 大野英人, 中畑直子, 松原悦朗, 東海林幹夫, 経口 Abeta ワクチンによるアルツハイマー病治療法の開発 VSA-COG Japan 2013 第 4 回日本血管性認知障害研究会 東京コンファレンスセンター 2013 年 8 月 10 日
10. 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 大野英人, 中畑直子, 松原悦朗, 東海林幹夫, アルツハイマー病モデルマウスにおけるアミロイドアンギオパチーの検討 VSA-COG Japan 2013 第 4 回日本血管性認知障害研究会 東京コンファレンスセンター 2013 年 8 月 10 日

11. 松原悦朗, 仲田崇, 若佐谷保仁, 大野英人, 中畑直子, 瓦林毅, 東海林幹夫, AB 重合体カスケード仮説の検証, 第 4 回日本血管性認知障害研究会, VSA-COG Japan 2013 東京コンファレンスセンター 2013 年 8 月 10 日
12. 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, 経口 Abeta ワクチンは AD モデルマウスの行動障害を改善する 第 54 回日本神経学会学術大会 東京国際会議場 2013 年 5 月 29 日 - 6 月 1 日
13. 松原悦朗, 仲田崇, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, AB 重合体はタウの上流で作用する 第 54 回日本神経学会学術大会 東京国際会議場 2013 年 5 月 31 日
14. 松原悦朗, 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 東海林幹夫, sortilin が AB 重合体の神経毒性発現を制御している. 第 31 回日本認知症学会学術集会, つくば国際会議場, 2012 年 10 月 26 日-28 日
15. 松原悦朗, 仲田崇, 中畑直子, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, AB 重合化がアルツハイマー病の脳脊髄液中で亢進している. 第 29 回日本老年医学会東北地方会. 弘前, 2012 年 10 月 29 日
16. 瓦林毅, 仲田崇, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, AB oligomerはlipid raftsの信号伝達系を障害する. 第53回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム, 2012年5月25日
17. 松原悦朗, 仲田崇, 中畑直子, 若佐谷保仁, 瓦林毅, 東海林幹夫, リポ蛋白が AB 重合化の制御因子である 第 53 回日本神経学会学術大会 東京国際フォーラム, 2012 年 5 月 23 日
18. 仲田崇, 瓦林毅, 若佐谷保仁, 松原悦朗, 東海林幹夫, 動物モデルを用いた脳アミロイドβ蛋白の伝播性の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会. 東京国際フォーラム, 2012 年 5 月 25 日

〔図書〕(計 1 件)

若佐谷保仁, 東海林幹夫. ポケット版神経内検査・処置マニュアル. 新興医学出版社. 2015

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.h-shinnai.jp/study02/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

若佐谷 保仁 (WAKASAYA, Yasuhito)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10598725

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：