

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26290022

研究課題名(和文) A オリゴマーを標的にしたアルツハイマー病の体外診断、画像診断および治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel diagnostic and therapeutic methods on Alzheimer's disease by targeting amyloid oligomers

研究代表者

遠山 育夫 (Tooyama, Ikuo)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・教授

研究者番号：20207533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は新しいクルクミン誘導体であるf-methyl-curcumin1 (FMeC1, Shiga-Y5 と FMeC2(Shiga-Y6)を新規に合成した。水晶発信子マイクロバランス法による解析では、両Shiga-Y化合物は線維化 A と A オリゴマーの両方に結合した。A 凝集体にのみ結合するShiga-X22を組み合わせた二重フッ素MR画像法を用いて、アルツハイマー病モデルマウス脳のアオリゴマーの画像を得ることができた。ついでShiga-Y5を6ヶ月間アルツハイマー病モデルマウスに経口投与したところ、Shiga-Y5が認知機能の低下を防ぎ、脳内アミロイド病変を軽減することを確認した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find curcumin derivatives that have diagnostic and therapeutic potential for Alzheimer's disease (AD). We used, f-methyl-curcumin1 (FMeC1) and FMeC2. For MRI, FMeC1 or FMeC2 (200 mg/kg) was injected into the tail vein of six Tg2576, three APP/PS1 and six control mice. Then, amyloid imaging was employed using a 7.0 T MR scanner. For therapeutic experiments, 36 model mice and 12 wild mice were divided into four groups; control diet, curcumin, FMeC1 or FMeC2 group. FMeC1, or FMeC2 (500 ppm) for 6 months from 9-month-old. Behavioral tests were conducted from 14.5 months of age, and mice were sacrificed at 15 months of age for pathological analyses. FMeC1 but not FMeC2 successfully detected amyloid plaques in living mice. Only FMeC1 showed a significant improvement on cognitive function compared to control group ($p < 0.05$). In addition, FMeC1 reduced A aggregation and glial cell activity ($p < 0.05$). FMeC1 is a potential diagnostic and therapeutic agent for AD.

研究分野：神経科学

キーワード：脳神経疾患 アルツハイマー病 核磁気共鳴画像 診断 治療 アミロイドオリゴマー

1. 研究開始当初の背景

アミロイド仮説によれば、アルツハイマー病で最も早期に起こる現象は、アミロイドβペプチド(Aβ)凝集体の出現である。Aβ凝集体は、まずAβモノマーが重合して可溶性のAβオリゴマー(以下、オリゴマー)を形成し、その後βシート構造をとって不溶化して老人斑を形成する。このうち最も神経毒性が強いのは可溶性オリゴマーであり、可溶性オリゴマーがアルツハイマー病の発症に強く関与すると考えられている。すなわち、可溶性オリゴマーを標的にした試薬を開発すれば、アルツハイマー病の早期の診断と根本治療に役立つと期待される。

申請者らは、これまで多くのアミロイドβペプチド(Aβ)凝集体結合化合物を新規に合成してきた。その中で、クルクミン誘導体であるShiga-Y5が、βシート構造をとる不溶化Aβ凝集体のみならず、βシート構造をとる前の可溶性オリゴマーとも結合することを見いだした。このShiga-Y5およびその類縁化合物を利用することで、アルツハイマー病の早期診断薬や根本治療薬に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Shiga-Y5およびその類縁化合物を利用したAβオリゴマーを標的にしたアルツハイマー病の診断治療薬としての可能性を検証することである。

3. 研究の方法

3-1. Aβオリゴマーの診断薬としての可能性の検証

アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウス(APP/PS1ダブルトランスジェニックマウス)を麻酔下に尾静脈からShiga-Y5あるいはその類縁化合物を投与し、7テスラMRIを用いたフッ素画像法でAβオリゴマーの画像化を試みる。

3-2. Aβオリゴマーを標的にしたAD治療薬としての可能性の検証

滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得た。APP^{swe}/PS1^{dE9}のダブルトランスジェニックマウスをジャクソン研究所から購入し、繁殖して実験に用いた。ワイルドタイプ12匹とダブルトランスジェニックマウスを36匹用いた。ワイルドタイプ12匹とダブルトランスジェニックマウス12匹には、通常の餌を与えた。ダブルトランスジェニックマウス6匹ずつに、それぞれクルクミンあるいはShiga-Y6を混ぜた餌を与えた。またダブルトランスジェニックマウス12匹にShiga-Y5を混ぜた餌を与えた。与えた期間は生後9ヶ月齢から6ヶ月間で、1日の投与量はおよそ1.25 mg/day (83 mg/kg body weight)とした。6ヶ月後にモリス水迷路テストを行い、認知機能を測定した。さらに安楽死をさせて脳を取り出し、半分はELISA

法を用いて脳内のA量を測定した。半分は、固定後に免疫組織化学法で、脳病理を検索した。

4. 研究成果

3-1. Aβオリゴマーの診断薬としての可能性の検証

神経毒性の強いAβオリゴマーの画像化は、アルツハイマー病の病態解明にとって大きな意義があると考えられるが、Aβオリゴマーに特異的に結合する低分子化合物はまだ開発されていない。そこで我々は、Aβ線維のみに特異的に結合するShiga-X22とAβ線維とAβオリゴマーの両方に結合するShiga-Y5を組み合わせて利用することを考えた。Shiga-X22とShiga-Y5のフッ素NMR信号はケミカルシフトが異なることから、両試薬をAPP/PS1マウスに同時投与するとShiga-X22とShiga-Y5の画像を同時に撮影することができた(図1)。Aβ線維のみに特異的に結合するShiga-X22の画像は老人斑を示している。一方、Shiga-Y5の画像からShiga-X22の画像を差し引いた画像はAβオリゴマーの候補画像と考えられる。

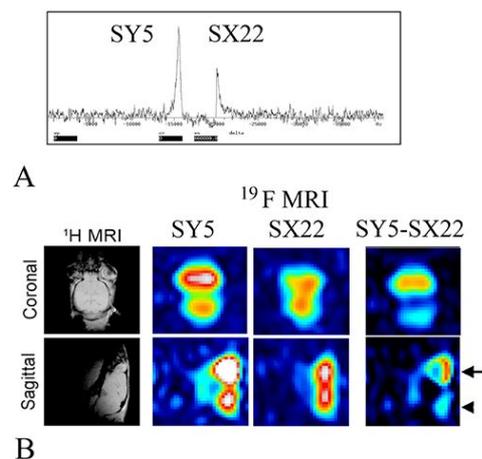


図1. Shiga-Y5とShiga-X22をAPP/PS1ダブルトランスジェニックマウスに同時投与した。Aはケミカルシフトのピーク。Bは左からプロトン画像、Shiga-Y5のフッ素画像、Shiga-X22のフッ素画像、Shiga-Y5からShiga-X22を差し引いた画像。

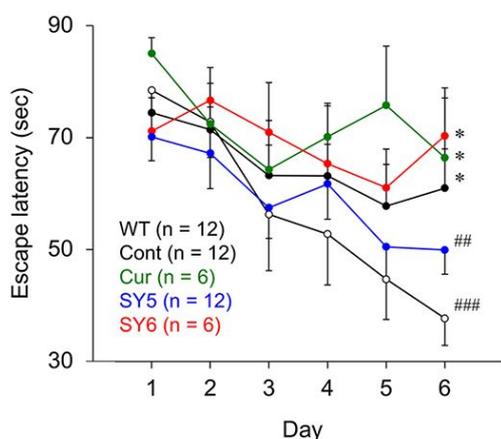
3-2. Aβオリゴマーを標的にしたAD治療薬としての可能性の検証

脳に入るShiga-Y5は認知機能の低下を防止した($p < 0.05$)。しかし、クルクミンや脳に入らないShiga-Y6では効果が認められなかった(図2)。さらにShiga-Y5投与マウスでは、脳内の不溶性A₄₂量とA₄₀量が有意に低下した。

A(1-42)は37°Cで24時間静置することにより凝集体を形成する。この凝集体をPAGEにより解析すると、A(1-42)はゲル

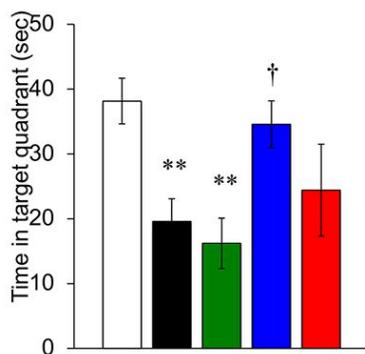
の最上部にのみ認められた。一方、Shiga-Y5を混合して凝集反応を実施した場合は、A (1-42) はゲルの最上部だけではなく、スミアなバンドとしても認められた。MTT 法による解析では、A 凝集体を SH-SY5Y 細胞に処置すると細胞生存率が減少した。一方、Shiga-Y5 存在下で形成された A 凝集体を処置した場合は、細胞生存率の減少が軽減された。以上のことから、Shiga-Y5 は A 凝集体形成を修飾することで、より低分子量で低毒性の A 凝集体を形成させることが推察され、Shiga-Y5 およびクルクミン誘導体がアルツハイマー病治療薬の候補となることが示唆された。

Day 1-6: 訓練試行



A *p < 0.01 vs. WT; ##p < 0.01, ###p < 0.001 vs. Day 1

Day 7: プローブ試行



B **p < 0.01 vs. WT; †p < 0.05 vs. Cont.

図2 . APP^{swe}/PS1^{dE9} のダブルトランスジェニックマウスと野生型マウスのモリス水迷路試験の結果。

なお、本研究課題は、課題終了1年前の申請を行い採択され、平成29年度から17H03560に発展・継続された

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14件)

- 1) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Fluorine-19 magnetic resonance imaging probe for the detection of tau pathology in female rTg4510 mice. *J Neurosci Res*.96:841-851, 2018 (doi:10.1002/jnr.24188).
- 2) Durani LW, Hamezah HS, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Makpol S, Damanhuri HA, Tooyama I: Age-related changes in the metabolic profiles of rat hippocampus, medial prefrontal cortex and striatum. *Biochem Biophys Res Commun*. 493:1356-1363, 2017 (doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.164).
- 3) Hamezah HS, Durani LW, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Kato T, Shiino A, Tanaka S, Damanhuri HA, Ngah WZW, Tooyama I: Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Exp Gerontol*. 99: 69-79, 2017 (doi: 10.1016/j.exger.2017.09.008).
- 4) Yanagisawa D, Oda K, Inden M, Morikawa S, Inubushi T, Taniguchi T, Hijioka M, Kitamura Y, Tooyama I: Fluorodopa is a promising fluorine-19 MRI probe for evaluating striatal dopaminergic function in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 95:1458-1494, 2017 (doi: 10.1002/jnr.23983).
- 5) Ibrahim NF, Yanagisawa D, Durania LW, Hamezaha HS, Damanhuri HD, Wan Ngahb WZ, Tsuji M, Kiuchi Y, Ono K, Tooyama I: Tocotrienol-rich fraction modulates amyloid pathology and improves cognitive function in AβPP/PS1 mice. *J Alzheimer Dis* 55:597-612, 2017(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27716672>).
- 6) Shiino A, Chen Y-W, Tanigaki K, Yamada A, Vigers P, Watanabe T, Tooyama I, Akiguchi I: Sex-related difference in human white matter volumes studied: Inspection of the corpus callosum and other white matter by VBM. *Sci Rep*. 3;7:39818, 2017 (doi: 10.1038/srep39818).
- 7) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Ibrahim NF, Inubushi T, Morikawa S: Amyloid imaging using fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F-MRI). *Ageing Res Rev*, 30: 85-94, 2016 (doi: 10.1016/j.arr.2015.12.008)
- 8) Yang M, Yang H, Guan H, Bellier JP, Zhao S, Tooyama I: Mapping of mitochondrial ferritin in the brainstem of Macaca fascicularis. *Neuroscience*. 328: 92-106, 2016 (doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.035).
- 9) Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Novel curcumin derivatives as potent inhibitors of

amyloid β aggregation. *Biochem Biophys Report* 4: 357-368, 2015 (doi: 10.1016/j.bbrep.2015.10.009).

- 10) Taguchi H, Yanagisawa D, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Synthesis and Tautomerism of Curcumin Derivatives and Related Compounds. *Australian Journal of Chemistry* 68: 224-229, 2015.
- 11) Kato T, Konishi Y, Shimohama S, Beach TG, Akatsu H, Tooyama I: Alpha1-chimaerin, a Rac1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 591: 19-24, 2015 (doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.013).
- 12) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Curcumin derivative with the substitution at C-4 position, but not curcumin, is effective against amyloid pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 36: 201-210, 2015 (doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.041).
- 13) McClure R, Yanagisawa D, Stec D, Koktysh D, Xhillari D, Jaeger R, Chekmenev E, Tooyama I, Gorel JC, Pham W: Inhalable Curcumin: Offering the Potential for Translation to Imaging and Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis* 144: 283-295, 2015 (doi: 10.3233/JAD-14079).
- 14) Yang H, Guan H, Yang M, Liu Z, Takeuchi S, Yanagisawa D, Vincent SR, Zhao S, Tooyama I: Up-regulation of mitochondrial ferritin by proinflammatory cytokines: Implications for a role in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 45: 797-811, 2015 (doi: 10.3233/JAD-142595).

〔学会発表〕(計 22 件)

- 1) 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、遠山育夫：フッ素 MRI によるタウ病変のイメージング 第 36 回日本認知症学会総会、2017 年 11 月 14-16 日、金沢
- 2) Hamezah HS, Durani LW, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Kato T, Shiino A, Damanhuri HA, Wan Nagh WZ, Tooyama I: Brain atrophy, cognitive functions and oxidative stress in aged rats. 第 36 回日本認知症学会総会、2017 年 11 月 14-16 日、金沢
- 3) Durani LW, Hamezah HS, Ibrahim NF, Nasaruddin ML, Yanagisawa D, Mori M, Damanhuri HA, makopol S, Wan Nagh WZ, Tooyama I: Tocotrienol-rich fraction derived palm oil alleviates cognitive impairment and alters metabolite profiling in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice model. 第 36 回日本認知症学会総会、2017 年 11 月 14-16 日、金沢
- 4) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H: Application of double MR imaging for analysis of multiple proteins in the brain of

transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 第 44 回日本脳科学会総会 2017 年 10 月 14-15 日、弘前市

- 5) Tooyama I, Mendsaikhan A, Yanagisawa D, Taguchi H: F-methyl-curcumin-1 is a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease. 第 4 回モンゴル神経科学会(招待講演) 2017 年 9 月 16 日、ウランバートル市、モンゴル
- 6) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Tau imaging using fluorine-19 MRI in a mouse model of tauopathy. 国際アルツハイマー病会議 2017 2017 年 7 月 16-20 日、ロンドン、英国
- 7) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H: Shiga-Y5 is a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease. 中国微小脳循環学会(招待講演) 2017 年 5 月 28 日、天津市、中国
- 8) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Tooyama I: In vivo detection of tau pathology by fluorine-19 MRI in a mouse model of tauopathy. 第 12 回日本分子イメージング学会 2017 年 5 月 25-26 日、横浜市
- 9) Tooyama I, Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H: A novel curcumin derivative, F-methyl-curcumin-1, is a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease. 第 14 回アジア太平洋州神経化学会(招待講演) 2016 年 8 月 27-30 日、クアラルンプール、マレーシア
- 10) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Application of double MR imaging to detect amyloid oligomers in the brain of APP/PS1 double transgenic mouse. 国際アルツハイマー病会議 2016, 2016 年 7 月 22-28 日、トロント、カナダ
- 11) 柳沢大治郎、Ibrahim NF, 田口弘康、森川茂廣、遠山育夫：フッ素 MRI による A β オリゴマーの検出 第 39 回日本神経科学大会、2016 年 7 月 20-22 日、横浜
- 12) Tooyama I, Yanagisawa D, Kato T, Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah HS, Taguchi H: Development of Shiga-Y. a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease. 第 31 回 SAM 国際学会サテライトシンポジウム(招待講演) 2016 年 7 月 9 日、京都
- 13) 柳沢大治郎、Ibrahim NF, 田口弘康、森川茂廣、遠山育夫：アルツハイマー病の病態解明のためのダブルプローブイメージング法の開発 第 11 回日本イメージング学会総会、2016 年 5 月 28-29 日、神戸
- 14) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Morikawa S: F-methyl-curcumin-1, is a potential diagnostic and therapeutic agent for

- Alzheimer's disease. 第 57 回日本神経学会
総会、2016 年 5 月 18-20 日、神戸
- 15) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H,
Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah, HS,
Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Morikawa S:
F-methyl-curcumin-1, is a potential
diagnostic and therapeutic agent for
Alzheimer's disease. 第 57 回日本神経学会
総会、2016 年 5 月 18-20 日、神戸
- 16) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H,
Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah, HS,
Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Morikawa
S : Styrylbenzoxazole and curcumin
derivatives that have preferred features of a
fluorine-19 MRI probe for amyloid imaging.
国際分子イメージング学会、2015 年 9 月
2-5 日、ホノルル市、米国
- 17) 柳沢大治郎、Ibrahim NF, Durani LW,
Hamezah, HS, 田口弘康、遠山育夫: Effect
of novel curcumin derivatives on amyloid
aggregation and cell toxicity. 第 38 回日本
神経科学大会、2015 年 7 月 28-31 日、神
戸市
- 18) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Durani LW,
Hamezah, HS, Taguchi H, Morikawa S,
Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Effects of
novel curcumin derivative with C-4
substituent on cognitive impairment and
amyloid deposition in APP/PS1 mice. 国際
アルツハイマー病会議 2015、2015 年 7
月 18-23 日、ワシントン DC、米国
- 19) Tooyama I: Targeting on Antioxidant
pathways in Neurodegeneration. 第 1 回抗
酸化物質と細胞変性に関する国際会議
(招待講演) 2015 年 6 月 3-4 日、クア
ラルンプール、マレーシア
- 20) Yanagisawa D, Taguchi H, Ibrahim NF,
Durani LW, Morikawa S, Hirao K, Shirai N,
Sogabe T, Tooyama I: Novel curcumin
derivative with C-4 substituent inhibits
amyloid pathology in APP/PS1 mice. 北米
神経科学会 2014、2014 年 11 月 14-19 日、
ワシントン DC、米国
- 21) 柳沢大治郎、遠山育夫、Ibrahim NF、田
口弘康: クルクミン誘導体による A β 凝集
抑制効果と細胞障害軽減効果の解析 第
11 回サプリメント研究会、2014 年 10 月
4 日、東京
- 22) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Durani LW,
Taguchi H, Tooyama I: Effect of novel
curcumin derivative on amyloid pathology in
APP/PS1 mice. 第 31 回日本神経科学大
会、2014 年 9 月 11-13、横浜

〔図書〕(計 1 件)

Tooyama I, Ibrahim NF, Durani LW, Hamezah
HS, Damanhuri HA, Wan Nagh WZ, Taguchi H,
Yanagisawa D: Fruits, Vegetables and Herbs:
Bioactive Foods in Health Promotion. Elsevier
2016, 593 (pp. 487-505)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 神経難病の画像診断薬及び体外診断薬
発明者: 遠山育夫、田口弘康、柳沢大治郎、
曾我部孝行、白井伸明、平尾浩一
権利者: 滋賀医科大学、大塚製薬
種類: 特許
番号: 特願 2017-046350
出願年月日: 2017 年 3 月 10 日
国内外の別: 日本

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 育夫 (TOOYAMA, Ikuo)
滋賀医科大学神経難病研究センター・教授
研究者番号: 20207533

(2) 研究分担者

椎野 顕彦 (SHIINO, Akihiko)
滋賀医科大学神経難病研究センター・准教
授 (平成 28 年度まで)
研究者番号: 50215935

(3) 研究分担者

田口 弘康 (TAGUCHI, Hiroyasu)
滋賀医科大学神経難病研究センター・特任
教授 (平成 28 年度まで)
研究者番号: 90102912