

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650192

研究課題名（和文） クルクミン系化合物を利用したアルツハイマー病の血液診断法の開発

研究課題名（英文） Development of hemodiagnostic methods for Alzheimer's disease using curcumin derivatives

研究代表者

遠山 育夫 (Ikuo Tooyama)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

研究者番号：20207533

研究成果の概要（和文）：我々は A β 凝集体が存在するとケト型からエノール型になり老人斑に結合するクルクミン誘導体 (Shiga-Y5) を開発した。本研究では Shiga-Y5 の性質を利用することで老人斑の量を測定する血清診断法の開発を行った。その結果、遺伝子組換えマウスの血液中に Shiga-Y5 を注射すると脳に入って老人斑と結合し、血清への排泄が遅延すること、Shiga-Y5 と FACS を組み合わせ、液中の A β 凝集体量を測定できることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel curcumin derivative (Shiga-Y5), that can exist in an equilibrium between keto and enol tautomers, with the enol form able to bind A β aggregates while the keto form cannot. Using Shiga-Y5, we developed a hemodiagnostic method to detect A β deposition in the Tg2576 mouse, a model of AD. When Shiga-Y5 injected into tail veins of Tg2576 and wild mice, a delayed decrease rate of Shiga-Y5 clearance was observed in Tg2576 mice in comparison to wild-type mice. The delayed clearance of Shiga-Y5 from the brain into blood reflected amounts of A β depositions in the brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：神経変性疾患、認知症、アルツハイマー病、診断、ベータアミロイド

1. 研究開始当初の背景

ワクチン療法などアルツハイマー病の根本治療法の開発が進み、アルツハイマー病を早期にかつ正確に診断する技術の開発が求められている。アルツハイマー病では、老人斑の形成が最も早期におこる病理変化であることから、アルツハイマー病の早期診断には老人斑の検出が最も有効な手段と考えられる。この観点から、PET によるアミロイドイメージングの研究が盛んに行われている。しかしながら、PET は高価であり、放射線障害の可能性も完全には否定できない。そこで、もっと簡便で侵襲が少なく安価な診断法の

開発が期待されている。我々は、血液中ではケト型で存在するが、A β 凝集体が存在するとケト型からエノール型になり、老人斑に結合するクルクミン誘導体 (Shiga-Y5) を開発した。現在 PET など使われている老人斑検出試薬の Benzoxazol などは一端結合すると遊離しにくい。一方、Shiga-Y 系化合物は一端エノール型になって老人斑に結合するが、一定の時間後にケト型になって遊離して血液中に排泄されるという性質をもつ。この性質を利用することで、今までにないアルツハイマー病の血液診断法を開発できるというアイデアに結びついた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスを用いて、我々の開発したクルクミン系化合物による脳内の老人斑の量を測定する血清診断法を開発する。アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスで十分な検討を行うことを目的とし、将来のヒトへの応用研究へ向けた基礎データを得る。

3. 研究の方法

3-1. フッ素 MR 画像法による排泄遅延の確認実験

本化合物は、もともと MRI によるアミロイドイメージング用に開発されたもので、Shiga-Y 系化合物は構造に非放射性元素の¹⁹Fをもつ。¹⁹FはNMR信号を出し、7-tesla MRI装置でマウスを生かしたまま体内分布を追跡することができる。また、組織中の化合物量はシングルパルス測定で¹⁹Fのピークとなって測定できる。そこで、アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウス(以下 APP マウスと略す)と対照の野生型マウスの尾静脈に Shiga-Y5 を投与後、動物実験用の 7-tesla MRI 装置に設置し、マウスを生かしたままフッ素 MR 画像法で化合物の体内分布を追跡した。

3-2. 化合物の血中濃度の HPLC 測定

本化合物は独特の蛍光特性をもつことから、高速液体クロマトグラフィーで高感度に測定することが可能である。野生型マウスと APP マウスの尾静脈から化合物を投与し、一定時間後に血液を採取し、化合物の血中濃度を経時的に追跡した。

3-3. Shiga-Y5 と A β 抗体を結合させた磁気ビーズによる A β 凝集体測定法の開発

Protein G microspheres に、抗 AB モノクローナル抗体 (自家製ハイブドーマクロン 1A-10F 産生抗体、マウス IgG1、1mg/mL) を加え、4°C で 1 時間反応させ結合させた。反応後、PBS-T で 3 回洗浄回洗浄操作を行い、0.25mL の PBS-T に懸濁し、使用時まで 4°C で保存。同様の方法により非特異的マウス IgG1 抗体 (SIGMA 社製 No. M 9269、マウスミエローマ由来 IgG1、1mg/mL) を用いて陰性対照用 microspheres を調製した。上記にて作製した抗 A β 抗体結合 microspheres と Shiga-Y5、および既述の方法で作製したアミロイド β ペプチド凝集体を混合し、4°C で 5~10 分間反応した後、フローサイトメーター (FACS) 法 (Becton Deckinsson 社製、FACS Calibur) で Shiga-Y5 の発する蛍光強度解析を行った。非特異的マウス IgG1 抗体を結合した陰性対照用 microspheres での解析値をバックグラウンドとして減ずることで抗 A β

抗体特異的な蛍光陽性粒子のカウント数を求めた。

4. 研究成果

3-1. フッ素 MR 画像法による排泄遅延の確認実験

APP マウスと対照の野生型マウスの尾静脈に 200 mg/kg の Shiga-Y5 を投与し、経時的に脳の¹⁹F信号を測定すると、野生型マウスでは速やかに脳から排泄されるが、APP マウスでは老人斑に結合して排泄が遅延した (図 1)。この排泄遅延は、統計的にも有意であった (図 2)。本研究の成果は、国際学術誌に報告した (Yanagisawa et al. Neuroscience 2011)。

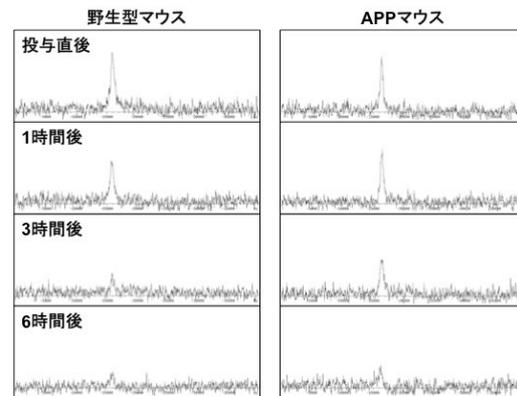


図 1. 野生型マウス (左) と APP マウス (右) 脳から検出された Shiga-Y5 の¹⁹F 信号ピークの経時変化。

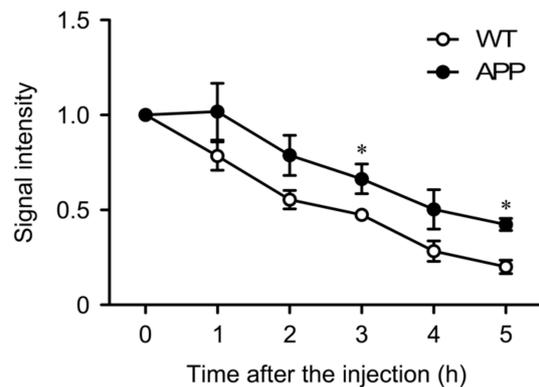


図 1. 野生型マウス (WT) と APP マウス (APP) 脳から検出された Shiga-Y5 の¹⁹F 信号強度の経時変化。* $P < 0.05$

3-2. 化合物の血中濃度の HPLC 測定

野生型マウスと APP マウスの尾静脈から化合物を投与し、一定時間後に血液を採取し、化合物の血中濃度を HPLC にて経時的に測定した。その結果、これまでのところクルクミンも Shiga-Y5 も野生型と APP マウスで明

らかな血清中濃度の差は見られていない (図3)。また APP マウスの血中、髄液中、組織中の Aβ 量を測定したところ、鼻粘膜での Aβ 凝集体量が脳内の Aβ 凝集体量に正比例することを見だし、国際学術誌に論文発表した (Kameshima et al. Neuroscience Letters, 2012)。

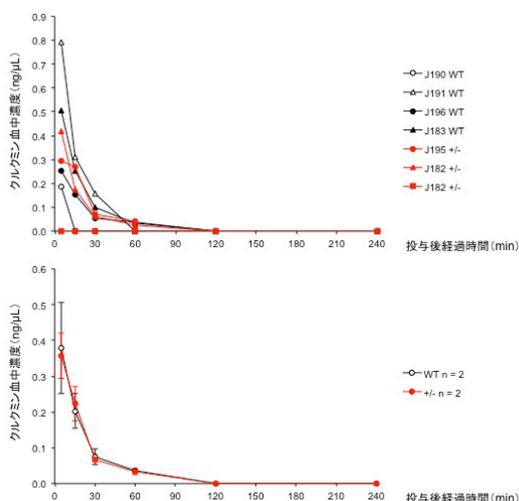


図3. 野生型マウスと APP マウスの尾静脈からクルクミンを投与した場合の血中濃度の経時的変化。

3-3. Shiga-Y5 と Aβ 抗体を結合させた磁気ビーズによる Aβ 凝集体測定法の開発

Shiga-Y5 と Aβ 抗体を結合させた磁気ビーズに Aβ 凝集体を反応させ、洗浄後に Shiga-Y5 を加えると、抗体に結合した Aβ 凝集体と反応して強い蛍光を発した。蛍光を発する磁気ビーズの量をフローサイトメトリー (FACS) でカウントすると、カウント数は溶液中の Aβ 凝集体量に比例し、測定ができることがわかった (図4)。本研究に関連する特許を1件出願した。

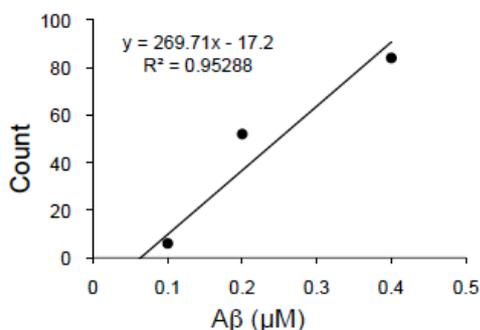


図4. Shiga-Y5 と磁気ビーズを利用した Aβ 凝集体の測定

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) Kameshima N, Nanjou T, Fukuhara T, Yanagisawa D, Tooyama I: Correlation of Aβ deposition in the nasal cavity with the formation of senile plaques in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 513: 166-169, 2012 (査読有) .

2) Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitania M, Shirai N, Hirao K, Shiino A, Inubushid T, Tooyama I: In vivo detection of amyloid β deposition using ¹⁹F magnetic resonance imaging with a ¹⁹F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 184: 120-127. 2011 (査読有) .

[学会発表] (計4件)

1) Nanjo T, Kameshima N, Fukuhara T, Sogabe S, Tooyama I: Development of a simple and sensitive method for measurements of A, and its application to measure Aβ contents in human nasal smear. 第14回国際アルツハイマー病会議 (ICAD2012) 2012年7月14日～7月19日、カナダ バンクーバー市

2) 遠山育夫: アルツハイマー病とクルクミン 第5回認知症サプリメント研究会 (招待講演) 2011年9月10日、東京

3) Kameshima N, Tooyama I, Fukuhara T, Kouge M, Nanjo T: Aβ40 deposition in the nasal cavity of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 第13回国際アルツハイマー病会議 (ICAD2011) 2011年7月16日～7月21日、フランス パリ市

4) Nanjo T, Tooyama I, Kameshima N, Fukuhara T: Development of highly accurate measurements of Aβ using formic acid. 第13回国際アルツハイマー病会議 (ICAD2011) 2011年7月16日～7月21日、フランス パリ市

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アミロイドβ蛋白凝集体結合化合物とその用途

発明者：田口弘康、遠山育夫、柳沢大治郎
権利者：滋賀医科大学
種類：特許出願
番号：特願 2012-099685
出願年月日：2012 年 4 月 25 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ben.shiga-med.ac.jp/~hqmnrn/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 育夫 (Tooyama Ikuo)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

研究者番号：20207533