

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24310102  
 研究課題名(和文) ナノ粒子とアミロイド親和・抑制物質によるアルツハイマー病早期診断・治療法開発研究  
  
 研究課題名(英文) Basic research for early diagnosis and therapy of Alzheimer disease with nanoparticles and compounds that promotes/inhibits aggregation of amyloid beta peptide  
  
 研究代表者  
 長井 篤 (NAGAI, Atsushi)  
  
 島根大学・医学部・教授  
  
 研究者番号：40273940  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病脳に沈着するアミロイド (A $\beta$ )凝集促進物質としてlysophosphatidylcholine (LPC)を特定し、LPCがオリゴマーを増加させることを証明した。A $\beta$ 凝集抑制物質としてフタロシアニンを特定し、凝集や神経細胞死のメカニズムを解明するとともに治療応用の可能性を検討した。発光域700nmのフタロシアニン誘導体を合成し、A $\beta$ との親和性を確認し、アルツハイマー病脳内に沈着するA $\beta$ を近赤外線診断する基礎検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We have detected lysophosphatidylcholine (LPC) as a compound that promotes amyloid beta aggregation through increase of oligomerization. On the other hand, detected phthalocyanine as a nano particle that inhibits amyloid beta aggregation, which decrease hydrophobicity and beta-sheet conformational change. The compound has no toxicity to neuronal culture and rat, leading to the possibility for therapeutic application. We produced and examined the new phthalocyanine derivatives for non-invasive near infrared ray-diagnosis of Alzheimer disease (AD) because they have high affinity to amyloid beta deposited in AD brains.

研究分野：神経内科、神経科学

 キーワード：アルツハイマー病 神経細胞死 アミロイドベータ(A $\beta$ ) フタロシアニン lysophosphatidylcholine 近赤外線

## 1. 研究開始当初の背景

脳の過剰なタンパク沈着は神経細胞死を誘導し、進行すると高齢者の認知症で最も多いとされるアルツハイマー型認知症の臨床病型をとり、医療財政の圧迫や介護苦などの社会問題を引き起こしている。申請者らは、以前より脳アミロイド沈着機序について臨床的に検討してきた。アミロイド血管症の新たな臨床病型について報告し、髄液を使用した新たな診断法を確立した。

最近、アルツハイマー病 (AD) 発症の少なくとも 10 年以上前より脳のタンパク沈着が始まることわかってきた。そのため、発症した時点で開始する現在の治療法は限定的であり、早期発見と早期の治療開始が望まれる。申請者らはアミロイドの早期重合過程でのメカニズムを明らかにすべく、42 アミノ酸から成るタンパク (A<sub>1-42</sub>) が重合する過程での促進・抑制因子について検討を行ってきた。アミロイド重合にはアミロイドそのものの産生過剰や代謝過程の異常も関与しているが、申請者らの最近の知見で lysophosphatidylcholine (LPC) というリン脂質にアミロイド重合促進作用があることを見出した (Sheikh, Nagai et al. 2011)。

## 2. 研究の目的

申請者は、神経毒性を有するアミロイドの重合過程を促進または抑制する物質について検討を進めている。本研究の目的は、アルツハイマー病患者脳に沈着するアミロイド (タンパク) の重合機序を解析し、アルツハイマー病簡易診断と治療法の開発に発展させることである。具体的には以下のようになる。

- 1) タンパク重合促進または抑制物質の探索と、LPC、フタロシアニン系ナノ粒子誘导体などのアミロイド重合に及ぼす影響の基礎的解析とタンパク高発現モデルマウスにおける発現動態の解析、および脳室内投与によるアミロイド沈着に及ぼす影響の解析
- 2) アミロイド親和性物質と近赤外性吸収域を有するナノ粒子を結合させ、*in vitro* でのアミロイド結合性解析、さらに正常マウス・モデルマウスに基礎的投与実験を行う

- 3) モデルマウスを用いて、近赤外線域検出 CCD カメラによるアミロイド沈着検出実験を行う。静脈注射による脳内移行や安全性を確立する。

## 3. 研究の方法

アミロイド形成促進・抑制物質およびアミロイド親和性物質の検索

これまでに判明しているアミロイド関連物質、親和性物質に加え、申請者らが近年同定した LPC などのアミロイド形成過程・機序について ThT を利用した蛍光測定法によって検討した。アミロイド<sub>1-42</sub> または<sub>1-40</sub> (アミノ酸残基) タンパクを用い試験管内におけるアミロイド形成実験を行った。オリゴマーから線維形成の過程を電子顕微鏡およびオリゴマー特異的抗体による検出システムで確認した。

近赤外線波長光吸収帯を有するナノ粒子の開発

これまでの医理工連携プロジェクトを通じて得られた協力関係を生かして、新規ナノ粒子の開発を行う。フタロシアニンは励起発光するナノ粒子で、医学領域への応用に向けて申請者らのプロジェクトを通じて基礎実験が行われてきた (Ikeue, Handa et al. 2010)。ナノ粒子を脳へ沈着したアミロイドに結合させその発光を体外から検出するには、透過深度が得られる近赤外域の波長を用いることが必要で、そのためにナノ粒子の構造改変を行いながら最適な物質を合成した。

培養神経細胞を用いたアミロイド関連物質の発現解析

これまでの実験で確認された LPC のアミロイド線維形成促進作用について、神経細胞培養を用いて、機序を検討した。

フタロシアニンのアミロイド (A) 凝集抑制作用機序の検討

フタロシアニンの実験過程で確認された A 凝集抑制作用について、*in vitro* で詳細なメカニズムを検討し、神経細胞培養レベルでも検討を行った。

モデルマウスを用いた脳内 A 沈着同定実験

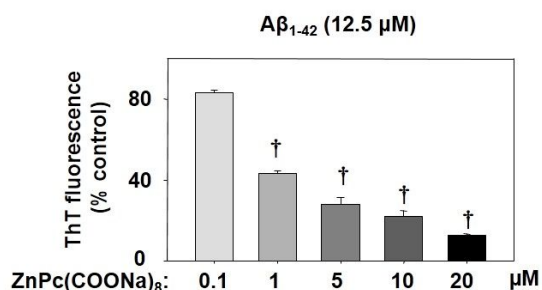
今回合成したフタロシアニン誘导体を用いて、脳へ沈着した A に移行し、結合したフ

タロシアニンを頭蓋外より近赤外線検出が可能かどうか検討した。また、直接物質を注入または経静脈的投与により脳血液関門を通過し脳内へ移行させることが可能か検討した。

#### 4. 研究成果

アミロイド形成促進・抑制物質およびアミロイド親和性物質の検索

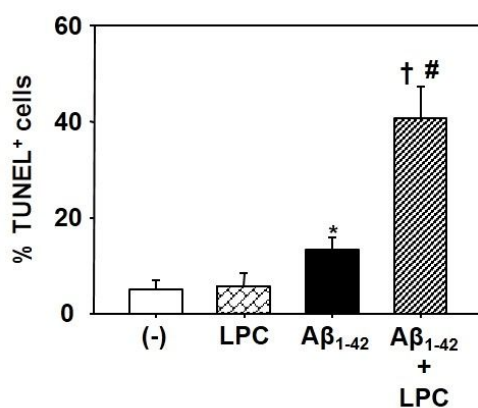
アミロイド A 凝集を促進する物質としては LPC を見出しているため、以降の実験で A 凝集・沈着メカニズムの研究を進展させた。また、今回作成したナノ粒子であるフタロシアニン誘導体のひとつである  $ZnPc(COONa)_8$  が著明な A 凝集抑制効果を示した(図: A<sub>1-42</sub>濃度が 12.5 $\mu$ M 条件下で  $ZnPc(COONa)_8$  の濃度依存性に A 凝集を抑制)。



近赤外線波長光吸収帯を有するナノ粒子の開発

上記誘導体を含めて 4 種類の化合物を合成して検討した。いずれも発光域は 700 nm 付近であり、近赤外線域での検出が可能であった。

培養神経細胞を用いたアミロイド関連物質の発現解析

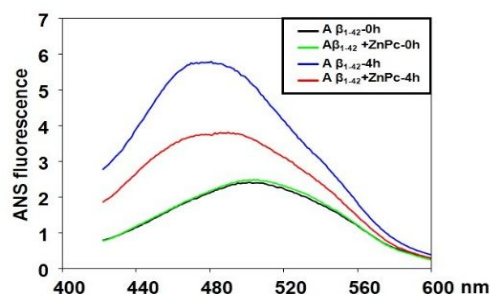


これまでの検討結果を踏まえて、LPC による A 凝集促進作用のメカニズムを検討し、神経細胞死への関与を検討した。我々の作成したヒト由来神経細胞株 A1 細胞を用いた培養

系で、LPC そのものは神経毒性を有しないが、A との共培養では神経細胞死を誘導した。さらに細胞死の原因を検討したところ、図のように TUNEL 染色陽性細胞が有意に増加し、さらにアポトーシスシグナルの増加が確認され、神経細胞死の原因はアポトーシスであると考えられた。そしてどのような凝集体が毒性を有するか検討したところ、少数の A 分子が凝集した「オリゴマー」を LPC は増加させてアポトーシスが生じることがわかった。この結果は、AD における神経細胞死の原因と通じる可能性があり、今後さらに LPC がもたらす神経細胞内の代謝異常メカニズムについて検討を進める必要がある。

フタロシアニンのアミロイド (A) 凝集抑制作用機序の検討

本実験の過程でフタロシアニンが A 凝集抑制作用を有することを見出したが、そのメカニズムをさらに検討した。下図では、A<sub>1-42</sub> にフタロシアニン誘導体 ( $ZnPc(COONa)_8$ ) を添加することで ANS fluorescence が低下しており、フタロシアニンは A<sub>1-42</sub> の疎水性を緩和していることが示唆された。さらに CD spectra で 2 次構造を検討すると、フタロシアニンは明らかに凝集しにくいとされる  $\alpha$ -helix 構造をとる A<sub>1-42</sub> を増加させることがわかった。神経細胞培養系での A<sub>1-42</sub> からの細胞保護効果も検討し、培養レベルでも A による神経毒性を軽減させることが確認された。



モデルマウスを用いた脳内 A 沈着同定実験

フタロシアニンを近赤外線により頭蓋外から同定できれば、AD の早期診断としてフタロシアニンを活用できる可能性がある。今回の検討では、レーザー光が経頭蓋的に散乱無く通過させることができることを確認した。フ

タロシアンを同定するためには、CCD カメラが必要であるが、機器設備がなく、今後の課題となった。現在のところ経静脈的に血液脳関門を通過するフタロシアン誘導体を合成できておらず、今後も模索する必要がある。フタロシアンの細胞毒性、*in vivo*での毒性を検討し、培養神経細胞やラット静脈内投与実験では毒性がみられなかった。フタロシアンによるADの近赤外線診断、A凝集抑制作用を利用した治療へのアプローチなど、今後の臨床応用に向けて動物実験を進めていく予定である。

教育および島根大学プロジェクトへの貢献

本研究は島根大学医理工連携プロジェクトとして行われ、成果はプロジェクト全体の遂行に貢献した。また、数名の大学院学生を指導しながら行われ、学位論文の創出もでき、教育的貢献も行えた。

## 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13件)

Sheikh AM, Michikawa M, Kim SU, Nagai A: Lysophosphatidylcholine increases the neurotoxicity of Alzheimer's amyloid  $\beta_{1-42}$  peptide: role of oligomer formation. *Neuroscience* 292:159-169, 2015 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.03>

Tabassum S, Sheikh AM, Yano S, Ikeue T, Handa M, Nagai A: A carboxylated Zn-phthalocyanine inhibits fibril formation of Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide. *FEBS J*, 282:463-476, 2015 査読有  
DOI:10.1111/febs.1315Epub

Notsu Y, Yano S, Shibata H, Nagai A, Nabika T: Plasma arginine/ADMA ratio as sensitive risk marker for atherosclerosis:

Shimane CoHRE study.

*Atherosclerosis*, 239:61-66, 2014 査読有  
DOI:10.1016/j.atherosclerosis

Tanaka S, Yano S, Sheikh AM, Nagai A, Sugimoto T: Effects of uremic toxin *p*-cresol on proliferation, apoptosis, differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Artificial Organs*, 38: 566-571, 2014 査読有  
DOI:10.1111/aor.12252

Nitta E, Yoshitomi H, Sugamori T, Fukuma A, Shibata H, Adachi T, Ito S, Takahashi N., Nagai A, Tanabe K: A case of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a 70-year-old patient. *J Med Ultrasonics* 41: 73-76, 2014 査読有  
DOI:10.1007/s10396-013-0455-2

Kumakura S, Shibata H, Isobe T, Hirose M, Ohe M, Nishimura N, Onoda K, Nagai A, Yamaguchi S: Comparison of Hemagglutination Inhibition Assay and Enzyme Immunoassay for Determination of Mumps and Rubella Immune Status in Health Care Personnel. *J Clin Lab Anal* 27: 418-421, 2013 査読有  
DOI:10.1002/jcla.21632

Ishihara T, Mishima S, Kodama R, Yoshino I, Adachi E, Suyama T, Shibata H, Taketani T, Nagai A: Low-density lipoprotein as a biomarker for the mobilization of hematopoietic stem cells in peripheral blood. *Transfus Apher Sci* 49(3): 539-541, 2013 査読有  
DOI:10.1016/j.transci.2013.07.033.Epub

Mitaki S, Isomura M, Maniwa K, Yamasaki M, Nagai A, Nabika T, Yamaguchi S: Apathy is associated

with a single-nucleotide polymorphism in a dopamine-related gene. *Neurosci Lett*, 549: 87-91.2013 査読有

DOI:10.1016/j.neulet.2013.05.075.Epub

Nakagawa T, Onoda K, Takahashi H, Yamaguchi T, Mitaki S, Ishihara M, Oguro H, Nagai A, Yamaguchi S: The Effect of Blood Pressure on Prevention of Cerebral Microbleeds Appearance: A Longitudinal Cohort Study in a Brain Check-Up System. *Cerebrovascular Diseases* 36: 51-52. 2013 査読有

Mitaki S, Isomura M, Maniwa K, Yamasaki M., Nagai A, Nabika T, Yamaguchi S: Impact 5 SNPs in dopamine-related genes on executive function. *Acta Neurologica Scandinavica* 127:70-76,2013 査読有 DOI:10.1111/j.1600-0404.2012.01673x.Epub

Wang H, Nagai A, Sheikh AM, Liang XY, Yano S, Mitaki S, Ishibashi Y, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S: Human Mesenchymal Stem Cell Transplantation Changes Proinflammatory Gene Expression Through a Nuclear Factor- $\kappa$ B-Dependent Pathway in a Rat Focal Cerebral Ischemic Model. *J Neurosci Res* 91: 1440-1449, 2013 査読有 DOI:10.1002/jnr.23267.Epub

Shibata H, Kumakura S, Isobe T, Hirose M, Ohe M, Nishimura N, Onoda K, Nagai A, Yamaguchi S: Comparative analysis of a complement fixation assay and enzyme immunoassay to determine the seroprevalence of measles and varicella in a survey of healthcare workers. *J Int Med Res*. 41:224-230,

2013 査読有

DOI:10.1177/0.000606124773.Epub

Liang XY, Nagai A, Sheikh AM, Wang H, Mitaki S, Araki A, Maruyama R, Harada T: Increased Vulnerability of Hippocampal CA1 Neurons to Hypoperfusion in Ataxia and Male Sterility (AMS) Mouse. *Brain Res* 1494:109-117, 2013 査読有 DOI:10.1016/j.neulet.2011.03.091.Epub

〔学会発表〕(計 4件)

Nagai A: Acaboxylated Zn-phthalocyanine inhibits the fibril formation of Alzheimer's amyloid peptide. 2<sup>nd</sup> International Conference on Alzheimer's Disease & Dementia, Valencia Spain, 23-25 September, 2014

Mitaki S, Isomura M, Yamasaki M, Nagai A, Nabika T, Yamaguchi S: Apathy is associated with a single-nucleotide polymorphism in a dopamine-related gene. XXI World Congress of Neurology, Vienna Austria, 21-26 September, 2013

塩田由利, 山田和夫, 馬庭恭平, 岩上有香里, 並河 徹, 長井 篤: LC-MS/MS による酸化ストレスマーカー、ADMA・キヌレニン関連物質の一斉分析. 第 54 回日本臨床化学会年次学術集会, 東京大学本郷キャンパス (東京), 2014 年 9 月 5 日-7 日

Shikh AM, 長井 篤, 王 暉, 矢野彰三, 三瀧 真悟, 小林祥泰, 山口修平: 間葉系幹細胞移植は脳卒中モデルラットにおいて NF -  $\kappa$ B 経路抑制を介して症状を改善させる. STROKE2014, 大阪国際会議場(大阪), 2014 年 3 月 13 日-15 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長井 篤(Nagai, Atsushi)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：40273940

### (2)研究分担者

SK Abdullah MD (Sheikh Abdullah  
Mohammad)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：30403447

### (3)研究分担者

塩田 由利(Shiota, Yuri)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10581415