

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590699

研究課題名(和文)ニューロパチーを突破口とした加齢変化の早期診断指標探索とアンチエイジングへの応用

研究課題名(英文)Development of early diagnostic markers for aging-related peripheral neuropathy and novel anti-aging therapies.

研究代表者

大林 光念(OBAYASHI, KONEN)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90361899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：自身の所属する施設に所蔵されていた高齢のニューロパチー、原発性骨粗鬆症の各患者や健常高齢者から得た生検皮膚組織や血清、尿、DNAを、LC-MS/MS法、Genome DNAアレイ法で解析し、加齢に伴うニューロパチーが出現、進行の指標となる蛋白質、遺伝子を探索した。その結果、同疾患を鑑別しうる最適な指標として尿中L-FABP、あるいは血中、尿中Glycer-AGEsが有力候補として挙がってきた。さらに、これらの生化学的指標に加え、生理学的指標(A 特異的痛覚閾値)、病理学指標(末梢神経組織へのリン酸化 α -シヌクレインの沈着量)を併用することで、加齢変化に伴うニューロパチーの鑑別が容易となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop early diagnostic markers for aging-related peripheral neuropathy and novel anti-aging therapies. Our results suggest that urinary liver-type fatty acid binding protein, quantitative sensory testing(QST), serum or urinary Glycer-glyceraldehyde-derived advanced glycation end product (Glycer-AGEs), small-fiber pain threshold values, and amount of the deposition of alpha-synuclein in peripheral nerves are the most useful methods to diagnose the aging-related peripheral neuropathy. Our present finding may have some implications for developing novel anti-aging therapies.

研究分野：病態検査学

キーワード：ニューロパチー 加齢変化 アンチエイジング

1. 研究開始当初の背景

40歳以上の日本人の約50%に出現する四肢末梢のしびれ、異常感覚、疼痛の二大原因は「加齢変化に伴うニューロパチー」と「生活習慣病に起因するニューロパチー」である(引用文献、)。しかし、この両者の正確な鑑別は極めて困難で、このことが特に後者の早期診断、早期治療を妨げ、予後の悪化を招いているという事実があった。

2. 研究の目的

本研究では、「加齢変化に伴うニューロパチー」を的確に鑑別しうる新規の生化学的・遺伝学的指標を同定、活用することで、治療法のある「生活習慣病に起因するニューロパチー」の早期診断を確実なものにすることを目的とした。さらに、同定し得た指標を糸口に、「加齢変化に伴うニューロパチー」の発症機構に迫り、未だ治療法の確立していない同疾患群、ひいては老年病全般に有効な、新しいアンチエイジング療法の考案を目指した。

3. 研究の方法

本研究は、年度ごとの到達目標としてそれぞれ以下を掲げ、遂行した。

(1) プロテオミクス、Genome DNA アレイの手法を用いた、加齢に伴うニューロパチーに関連する蛋白質や遺伝子の網羅的探索(平成24年度)

申請者の施設に所蔵されている高齢のニューロパチー、老年病の典型的 phenotype である原発性骨粗鬆症の各患者、および健常高齢者から得た生検皮膚ホルマリン固定組織や血清、尿、および DNA を、LC-MS/MS 法、および Genome DNA アレイを用いて解析し、群間比較を行うことにより、加齢に伴うニューロパチーが出現、進行する過程において、質的・量的に変動する蛋白質、遺伝子を探索、同定した。

(2) 加齢変化に伴うニューロパチーに関連する蛋白質、遺伝子の機能解析(平成25年度)

(1)の結果、候補に挙がってきた各種蛋白質、遺伝子の機能を、加齢変化と関連づけて検証した。

(3) 同定され、機能が確認された蛋白質、遺伝子に関する定量解析系の確立、検証: 加齢変化を早期に検出しうる新規診断指標の確立(平成26年度)

1、2で同定、機能解析され、加齢変化に関する指標の候補として残った蛋白質、遺伝子について、ELISA やリアルタイム PCR による定量解析系を確立し、臨床指標としての汎用性を高める努力をした。特に、候補蛋白質に関しては、検査部での自動化まで検討を進めた。さらに、確立された定量解析系の有用性を検証するため、加齢変化に関連する臨床所見、病理学的所見と、指標となった物質の

血中、組織中でのレベル、あるいは遺伝子発現レベルとの相関について検証した。

(4) 加齢変化に伴うニューロパチー、および老年病全般に有効な、新しいアンチエイジング療法の考案(平成26年度)

(1)、(2)で同定、機能解析され、加齢変化に関する指標の候補として残った蛋白質、遺伝子について、動物実験で単独、もしくは SIRT1 との併用によるアンチエイジング効果を検討した。

4. 研究成果

計画初年度である平成24年度には、まず自身の所属する施設に所蔵されていた高齢のニューロパチー患者、老年病の典型的 phenotype である原発性骨粗鬆症の各患者、および健常高齢者から得た生検皮膚ホルマリン固定組織や血清、尿、および DNA を、LC-MS/MS 法、あるいは Genome DNA アレイを用いて解析し、群間比較を行うことにより、加齢に伴うニューロパチーが出現、進行する過程において、質的・量的に変動する蛋白質、遺伝子を探索した。結果として、まずは複数の変動する蛋白質、遺伝子が挙げられた。

そこで計画2年目の平成25年度には、これらの候補蛋白質、遺伝子に関する機能解析を行うことによって、加齢変化に伴うニューロパチーを鑑別しうる最適な指標はどれか、その絞り込みに努めた。特に in vivo study による絞り込みの結果、元来加齢や耐糖能異常で異常値を示すことが知られている尿中肝型脂肪酸結合タンパク質(L-FABP)、あるいは血中、尿中の糖代謝中間体のグリセルアルデヒドに由来する AGEs (Glycer-AGEs) がその有力な候補と考えられた。

計画2年目の平成26年度には、上記平成25年度のデータをもとに更に検討を進め、生化学的指標としての尿中 L-FABP、血中・尿中 Glycer-AGEs の測定系を確立したのに加え、これらの生化学的指標に生理学的指標として A 特異的痛覚閾値、病理学指標として末梢神経組織に沈着が確認されたリン酸化 - シヌクレインの定量値を合わせて用いることで、加齢変化に伴うニューロパチーの鑑別に、より近づけるという結論を得た。さらに、同年度には、加齢変化に関する指標の候補として残った L-FABP や Glycer-AGEs をターゲットとした新たなアンチエイジング療法についても模索してみたが、この研究に関しては期限内、予算の範囲内で有益な情報を得ることはできなかった。

なお、全研究機関を通して、本研究の結果の一部、あるいはその延長上に得た知見を報告した論文は、業績欄に示す通り23報に及んだ。中でも、高齢の家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者が多くもつ自己抗体を発見しえたことは極めて意義深い。この発見が、同疾患において、同一の遺伝子変異を持ちながら発症年齢の異なる群が存在

する理由を説明しうる、一つの有力な材料となりうる可能性がある。

<引用文献>

Tavee J, Zhou L. Small fiber neuropathy: A burning problem. *Cleve Clin J Med* 2009; 76: 297-305.
Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C. Etiology of small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009; 14: 177-183.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

Kukidome D, Nishikawa T, Sato M, Igata M, Kawashima J, Shimoda S, Matsui K, Obayashi K, Ando Y, Araki E. Measurement of small-fiber pain threshold values for the early detection of diabetic polyneuropathy. *Diabet Med*, 査読有, 2015 in press. doi: 10.1111/dme.12797.
Tasaki M, Ueda M, Matsumoto K, Kawaji T, Misumi Y, Eiki D, Suenaga G, Obayashi K, Yamashita T, Tanihara H, Ando Y. Clinico-histopathological and biochemical analyses of corneal amyloidosis in gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Amyloid*, 査読有, 2015, 22, 67-69. doi: 10.3109/13506129.2014.983222.
Yanagisawa A, Ueda M, Sueyoshi T, Okada T, Fujimoto T, Ogi Y, Kitagawa K, Tasaki M, Misumi Y, Oshima T, Jono H, Obayashi K, Hirakawa K, Uchida H, Westermark P, Ando Y, Mizuta H. Amyloid deposits derived from transthyretin in the ligamentum flavum as related to lumbar spinal canal stenosis. *Mod Pathol*, 査読有, 2015, 28, 201-207. doi: 10.1038/modpathol.2014.102.
Misumi Y, Doki T, Ueda M, Obayashi K, Tasaki M, Tamura A, Ando Y. Myopathic phenotype of familial amyloid polyneuropathy with a rare transthyretin variant: ATTR Ala45Asp. *Amyloid*, 査読有, 2014, 21, 216-217. doi: 10.3109/13506129.2014.932277.
Nakazono M, Obayashi K, Sasamoto K, Tomiyoshi K, Suenaga G, Ando Y. Novel styrylbenzene derivatives for detecting amyloid deposits. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2014, 436, 27-34. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.028.
Oshima T, Kawahara S, Ueda M, Kawakami Y, Tanaka R, Okazaki T, Misumi Y, Obayashi K, Yamashita T, Ohya Y, Ihse E, Shinriki S, Tasaki M, Jono H,

Asonuma K, Inomata Y, Westermark P, Ando Y. Changes in pathological and biochemical findings of systemic tissue sites in familial amyloidotic polyneuropathy more than 10 years after liver transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 査読有, 2014, 85, 740-746. doi: 10.1136/jnnp-2013-305973.
Obayashi K. Salivary mental stress proteins. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2013, 425, 196-201. doi: 10.1016/j.cca.2013.07.028.
Ogasawara N, Kitagawa W, Obayashi K, Itoh Y, Noda H, Funaki Y, Yokoi T, Sasaki M, Imai H. Solitary amyloidosis of sigmoid colon featuring submucosal tumor caused hematochezia: Case report. *Intern Med*, 査読有, 2013, 52, 2523-2527. <http://www.naika.or.jp/imonline/index.html>
Tasaki M, Ueda M, Obayashi K, Koike H, Kitagawa K, Ogi Y, Jono H, Su Y, Suenaga G, Oshima T, Misumi Y, Yoshida M, Yamashita T, Sobue G, Ando Y. Effect of age and sex differences on wild-type transthyretin amyloid formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Int J Cardiol*, 査読有, 2013, 170, 69-74. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.10.033.
Obayashi K, Misumi Y, Watanabe T, Ando T, Akagami T, Tasaki M, Shinriki S, Ueda M, Yamashita T, Hirotsu S, Ando Y. Dominant cardiac type of familial amyloidotic polyneuropathy associated with a novel transthyretin variant Thr59Arg. *Muscle Nerve*, 査読有, 2013, 48, 839-841. doi: 10.1002/mus.23939.
Sakashita N, Kagawa S, Date R, Ueno T, Nakagawa T, Yamashita T, Obayashi K, Oshima T, Ueda M, Horiguchi H, Ando Y, Takeya M. Remarkable cardiomegaly on patient with familial amyloidotic polyneuropathy after orthotopic liver transplantation; a case study. *Pathol Int*, 査読有, 2013, 63, 260-265. doi: 10.1111/pin.12055.
Usuku H, Obayashi K, Shono M, Oshima T, Tasaki M, Yasuda H, Ogawa H, Ando Y. Usefulness of B-type natriuretic peptide as a marker of cardiac diastolic function in senile systemic amyloidosis. *Amyloid*, 査読有, 2013, 20, 251-255. doi: 10.3109/13506129.2013.844122.
Wixner J, Obayashi K, Ando Y, Karling P, Anan I. Loss of gastric

interstitial cells of Cajal in patients with hereditary transthyretin amyloidosis. *Amyloid*, 査読有, 2013, 20, 99-106. doi: 10.3109/13506129.2013.787985. Obayashi K, Tasaki M, Jono H, Ueda M, Shinriki S, Misumi Y, Yamashita T, Oshima T, Nakamura T, Ikemizu S, Anan I, Suhr O, Ando Y. Impact of antibodies against amyloidogenic transthyretin (ATTR) on phenotypes of patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) ATTR Valine30Methionine. *Clin Chim Acta*, 査読有, 2013, 419, 127-131. doi: 10.1016/j.cca.2013.02.002. Obayashi K, Ueda M, Oshima T, Kawahara S, Misumi Y, Yamashita T, Jono H, Yazaki M, Kametani F, Ikeda S, Ohya Y, Asonuma K, Inomata Y, Ando Y. Pathological changes long after liver transplantation in a familial amyloidotic polyneuropathy patient. *BMJ Case Rep*, 査読有, 2012, E-pub. doi: 10.1136/bcr-2012-006593. Su Y, Misumi Y, Ueda M, Shono M, Tasaki M, Guo J, Jono H, Obayashi K, Senokuchi T, Yamagata K, Ando Y. The occurrence of islet amyloid polypeptide amyloidosis in Japanese subjects. *Pancreas*, 査読有, 2012, 41, 971-973. doi: 10.1097/MPA.0b013e318249926a. Ohya Y, Isono K, Obayashi K, Hayashida S, Lee KJ, Yamamoto H, Takeichi T, Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Peritransplant gastrointestinal symptoms in familial amyloidotic polyneuropathy. *Exp Clin Transplant*, 査読有, 2013, 11, 327-331. doi: 10.6002/ect.2012.0257. Yamashita T, Ando Y, Okamoto S, Misumi Y, Hirahara T, Ueda M, Obayashi K, Nakamura M, Jono H, Shono M, Asonuma K, Inomata Y, Uchino M. Long-term survival after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Neurology*, 査読有, 2012, 78, 637-643. doi: 10.1212/WNL.0b013e318248df18. Obayashi K, Ando Y. Focus on autonomic dysfunction in familial amyloidotic polyneuropathy. *Amyloid*, 査読有, 2012, 19 (Suppl 1), 28-29. doi: 10.3109/13506129.2012.673514. Ueda M, Ageyama N, Nakamura S, Nakamura M, Chambers JK, Misumi Y, Mizuguchi M, Shinriki S, Kawahara S, Tasaki M, Jono H, Obayashi K, Sasaki E, Une Y, Ando Y. Aged vervet monkeys developing transthyretin amyloidosis with the human disease-causing Ile122 allele: A

valid pathological model of the human disease. *Lab Invest*, 査読有, 2012, 92, 474-484.

doi: 10.1038/labinvest.2011.195.

- ⑳ Su Y, Jono H, Misumi Y, Senokuchi T, Guo J, Ueda M, Shinriki S, Tasaki M, Shono M, Obayashi K, Yamagata K, Araki E, Ando Y. Novel function of transthyretin in pancreatic alpha cells. *FEBS Lett*, 査読有, 2012, 586, 4215-4522. doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.025.
- ㉑ Misumi Y, Ueda M, Obayashi K, Jono H, Su Y, Yamashita T, Oshima T, Ando Y, Uchino M. Relationship between amyloid deposition and intracellular structural changes in familial amyloidotic polyneuropathy. *Hum Pathol*, 査読有, 2012, 43, 96-104. doi: 10.1016/j.humpath.2011.01.036.
- ㉒ 大林 光念, 安東 由喜雄. 多角的自律神経機能検査法をもちいた小径線維ニューロパチーの診断. *臨床神経*, 査読有, 2014, 54, 1044-1046. doi: 10.5692/clinicalneuro.54.1044.

[学会発表](計10件)

大林 光念, 安東 由喜雄. 多角的自律神経機能検査法を用いた FAP ATTR V30M の早期診断. 第 67 回日本自律神経学会総会教育講演(招待講演). 2014 年 10 月 30-31 日, ラフレさいたま (さいたま市).

大林 光念, 安東 由喜雄. 多角的自律神経機能検査法を用いた小径線維ニューロパチーの診断. 第 55 回日本神経学会学術大会シンポジウム(招待講演). 2014 年 5 月 21-24 日, 福岡国際会議場 (福岡市).

Obayashi K. Transthyretin familial amyloidotic polyneuropathy (TTR-FAP): pathogenesis, clinical features, diagnosis, and therapies. 9th

Japan-China Cooperative Life Science Symposium(招待講演). 2013 年 12 月 16-17 日, 山東大学, 中国山東省済南.

大林 光念, 安東 由喜雄. 栄養評価と炎症マーカー. 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会シンポジウム(招待講演). 2013 年 8 月 30 日-9 月 1 日, あわぎんホール (徳島市).

大林 光念, 大嶋 俊範, 田崎 雅義, 山下 太郎, 安東 由喜雄. FAP 患者の胃内における Cajal 細胞、粘膜内小径線維の密度とアミロイド沈着パターンとの関連. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区).

大林 光念, 山下 太郎, 大嶋 俊範, 安東 由喜雄. 全身性アミロイドーシスの診断と自律神経障害. 第 65 回日本自律

神経学会総会. 2012年10月25-26日, 都市センターホテル(東京都千代田区).

大林 光念, 田崎 雅義, 神力 悟, 植田 光晴, 城野 博史, 安東 由喜雄. 家族性アミロイドポリニューロパチー患者における異型トランスサイレチンに対する自己抗体の存在とその意義. 第52回日本臨床化学会年次学術集会. 2012年9月6-8日, いわて県民情報交流センター(盛岡市).

大林 光念, 大嶋 俊範, 山下 太郎, 安東 由喜雄. C線維の機能評価にA 特異的痛覚閾値検査を組み合わせた小径線維ニューロパチーの早期診断. 第23回日本末梢神経学会学術集会. 2012年8月31日-9月1日, 九州大学医学部百年講堂(福岡市).

大林 光念, 植田 光晴, 三隅 洋平, 大嶋 俊範, 山下太郎, 安東 由喜雄. C線維の機能評価にA 特異的痛覚閾値検査を組み合わせた小径線維ニューロパチーの早期診断法に関する検討. 第53回日本神経学会学術大会. 2012年5月22日-25日, 東京国際フォーラム (東京都千代田区).

Obayashi K, Ohshima T, Tasaki M, Suhr OB, Anan I, Misumi Y, Ueda M, Yamashita T, Jono H, Ando Y. Detection of autoantibodies against ATTR in patients with FAP ATTR V30M. XIIIth International Symposium on Amyloidosis. 2012年5月6-10日, Groningen, Netherlands.

〔図書〕(計2件)

大林 光念 他、フジメディカル出版、心に残る経腸栄養の患者さんたち、2015、236-238

大林 光念 他、南山堂、南山堂医学大辞典、2015、髄液一般検査他4項

大林 光念、安東 由喜雄. 医学書院、臨床検査：生殖細胞系列遺伝子検査、2013、738-743

大林 光念. 医学書院、臨床検査：診療ガイドラインに活用される臨床検査：神経・筋領域、2014、61-65

大林 光念、安東 由喜雄. 医学書院、臨床検査：NSTの機能を高める検査室間連携、2014、417-421.

〔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

<http://www.hs.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 光念 (OBAYASHI, Konen)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90361899

(2) 研究分担者

安東 由喜雄 (ANDO, Yukio)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20253742