

令和元年5月20日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15237

研究課題名(和文)アルツハイマー病における新規PETイメージング試薬の開発とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Development of a PET imaging agent and disease biomarker for Alzheimer's disease.

研究代表者

及川 伸二(OIKAWA, Shinji)

三重大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10277006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の認知症患者は500万人近くまで増加し大きな社会問題となっており、その約2/3はアルツハイマー病である。アルツハイマー病は、記憶や認知機能および思考能力を不可逆的に障害する進行性の脳変性疾患のため、患者のみならず家族の生活の質(QOL)を著しく悪化させる。従って、アルツハイマー病の臨床診断前に早期発見できるバイオマーカーの探索を行った。その結果、トランスジェニックマウス脳と早期のアルツハイマー病患者血液で共通して変動しているタンパク質が同定された。また、治療薬やPETイメージング試薬への応用に可能性がある抗酸化剤の安全性の検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は、緩徐にしかし確実に脳を変性させる難治性疾患である。アルツハイマー病は記憶障害や認知障害が進行して生活に支障をきたすようになってから初めて臨床診断がなされ治療が開始されるが、根治的治療法は確立されていない。最近、アルツハイマー病の臨床診断前に早期発見し介入や予防的治療を行うことで、病気の進行や発症時期を遅らせ、健康寿命を伸ばすことが現実的な対策と考えられている。そのため、本研究では、検診などに応用できる血液を用いて、アルツハイマー病の早期診断バイオマーカーの探索を行った。また、アルツハイマー病の治療や診断に有用な物質の安全性も検討し、アルツハイマー病予防の基礎研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly persons, with a rapidly increasing prevalence worldwide. AD is an irrevocable deleterious neurodegenerative disorder characterized by aggregated amyloid-beta (A beta) peptides and hyperphosphorylated tau protein. Thus, early diagnosis of AD is important. In this study, to identify candidate biomarkers for the early diagnosis of AD, we performed protein profiling of blood in patients with early AD. We also performed protein profiling of brain in P301S tau-transgenic (Tg) mouse. We found one protein that were significantly changed in the both plasma of AD patients and Tg mouse brain. In addition, we demonstrated that morin, a potential inhibitor of A beta-peptide aggregation, causes oxidative DNA damage in the presence of Cu(II). Thus, further studies are needed to demonstrate the oxidative pathway of morin in view of biomedical applications of morin for AD.

研究分野：予防医学

キーワード：アルツハイマー病 プロテオミクス解析 バイオマーカー 抗酸化剤

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では、日常生活に制限のない期間を示す健康寿命は女性 73.6 年、男性 70.4 年であり、平均寿命とは男女とも約 10 年以上の開きがある。健康寿命に影響を与えている主要な要因として、脳卒中や認知症、ロコモティブシンドロームなどがある。認知症に関しては、認知症日常生活自立度 II 以上の高齢者は要介護認定者の約 6 割となっており、今後も確実に増加する。その中でアルツハイマー病は、日本の認知症患者の 6~8 割を占め、記憶や認知機能および思考能力を不可逆的に障害する進行性の難治性疾患のため、患者のみならず家族の生活の質 (QOL) を著しく悪化させる。しかし、アルツハイマー病は記憶障害や認知障害が進行して生活に支障をきたすようになってから初めて臨床診断がなされ治療が行われるのが実情で、根治的治療法も未だ確立されていない。また、詳細な発症機構も未だ不明である。従って、進行を抑制するためには早期発見が必須である。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病の進行を抑制するためには早期発見による予防的治療が必要である。高齢者に対するアルツハイマー病の早期発見のためには、身体への侵襲性が低く、病状と密接に相關するバイオマーカーの探索が必須である。現在、アルツハイマー病のバイオマーカーの研究が盛んに行われているが、費用や侵襲性、精度、病態との相関性などの問題から広く実用化されたものは未だ無い。従って本研究では、アルツハイマー病の発症に関与が指摘されているタウタンパク質の変性を促進するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を用い、神経細胞のプロテオミクス解析を行い、バイオマーカーに有効なタンパク質の探索を行う。また、アルツハイマー病患者の血液についても同様にプロテオミクス解析を行う。これらの結果から、簡便に測定可能なバイオマーカー候補を明らかにする。

さらに、最近アルツハイマー病の病態に重要な役割を果たしているアミロイド やタウタンパク質の PET イメージング技術が急速に進歩しており、早期診断も現実的なものとなってきた。本研究では、アミロイド 凝集抑制作用が報告されている抗酸化剤モリン (morin) を基盤に新規 PET イメージング試薬の開発を目指した安全性の検討も行った。

## 3. 研究の方法

(1) アルツハイマー病患者血漿のプロテオミクス解析 (蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE 法))

認知機能評価試験のひとつであるアーバンス神経心理テストを用いて、早期のアルツハイマー病患者 10 名の血漿タンパク質を解析に用いた。本研究では、血漿中に高濃度に含まれており解析の妨げとなる 6 種類のタンパク質をあらかじめ除去した。その後、タンパク質をクリーンアップキットで精製・濃縮し、比較するサンプルを等量 Cy3 と Cy5 の蛍光色素でそれぞれラベルした。同時に、全てのサンプルを等量ずつ混合した後、Cy2 の蛍光色素でラベルし内部標準とした。Cy3、Cy5 でラベルした両群 1 サンプルずつと内部標準を混合し、一次元目の等電点電気泳動法で二次元電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、血漿中のタンパク質を各スポットとして分離した。各ゲルイメージを画像解析装置 Typhoon FLA9500 で取得後、統計解析ソフト DeCyder を用いて内部標準を基準に Cy3 と Cy5 でラベルした各群の各スポットの発現量を定量解析した。タンパク質の同定は、CBB 染色によって得られた各スポットをゲルから切り出し、トリプシン処理によるゲル内消化を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型タンデム質量分析装置 MALDI-TOF/TOF-MS とデータベースを用いて行った。

(2) トランスジェニックマウス (Tg マウス) 脳のプロテオミクス解析

P301S タウ トランスジェニックマウスの脳を摘出し、-80 で保存した。組織約 200 µg からタンパク質を抽出・精製し、上記と同様に 2D-DIGE 法によりワイルドタイプのマウスと比較して変動しているタンパク質スポットを経時的に解析した。各タンパク質の同定は、CBB 染色によって得られた同一のスポットをゲルから切り出し、トリプシン処理によるゲル内消化を行い、MALDI-TOF/TOF-MS とデータベースを用いて行った。

(3) 抗酸化剤モリンによる DNA 損傷の検討

DNA 損傷性とその塩基配列特異性は、<sup>32</sup>P で標識したヒト単離 DNA とモリン、金属イオンをバッファー中で反応させ、その後ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いオートラジオグラフィにて検討した。特に DNA 損傷の塩基配列特異性は Maxam-Gilbert 法を応用し一塩基ずつ分離して損傷塩基と配列特異性を解析した。酸化的 DNA 損傷能の評価は、calf thymus DNA を用いて酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) の生成量を HPLC-ECD にて測定した。DNA 損傷に関与する活性酸素種の特定については、各種活性酸素種に対する消去剤、Cu(I) のキレート剤などを添加し、<sup>32</sup>P で標識したヒト単離 DNA を用いて行った。酸化反応生成物の検出・特定は、HPLC、ESI-MS を用いて、Cu(II) 存在下におけるモリンの酸化反応生成物を検出・分取し、そのピーク物質を NMR で測定・解析し、酸化反応生成物の特定を行

った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 早期アルツハイマー病患者血液のプロテオミクス解析

早期のアルツハイマー病患者 10 名、コントロール 10 名の血漿を用いて蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE 法) を行った。その結果の画像一枚を図 1 に示した。この画像では発現量がコントロールと比較して減少しているスポットは緑色、増加しているスポットは赤色、発現量が変わらないスポットは黄色で表示されている。このようなゲルイメージを各サンプル分 10 枚作成し、内部標準を用いてスポット間のマッチングを行うと共に発現量を解析した。その結果、発現量に有意差のあるスポット (図 1 丸印) が認められた。その中のいくつかのスポットは同じタンパク質と同定されたことやタンパク質発現量が少なく同定できなかったことなどから、最終的にコントロール群と比較して有意に発現量が減少したタンパク質は 1 個、有意に発現量が増加したタンパク質は 7 個であった。発現量が減少したタンパク質は脂質代謝に関与するタンパク質であり、発現量が増加したタンパク質は補体系のタンパク質、鉄の輸送に関係するタンパク質、細胞接着分子、生理活性阻害分子であった。

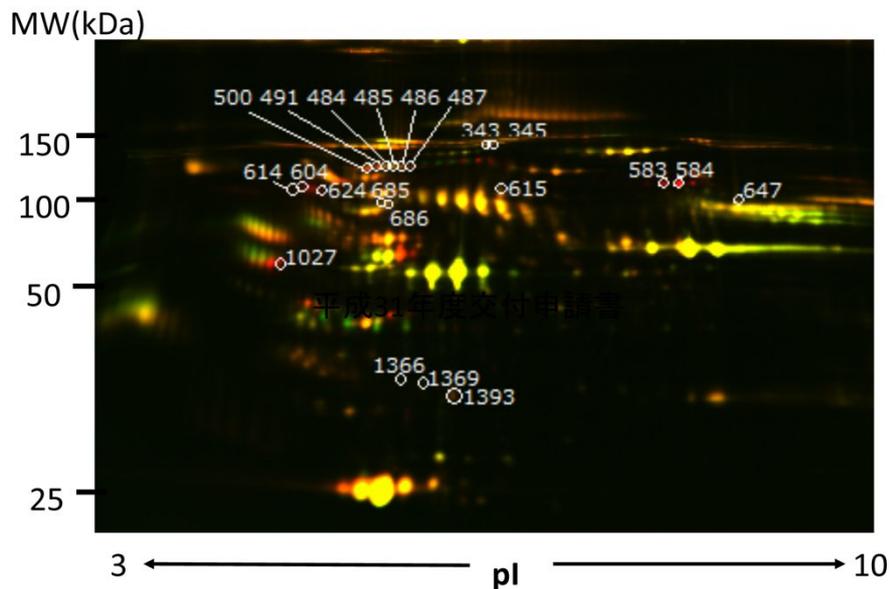


図1. 早期アルツハイマー病患者血漿のプロテオミクス解析

丸印: 有意に変動したスポット

Cy3(緑): コントロール; Cy5(赤): 早期アルツハイマー病患者

##### (2) Tg マウス脳のプロテオミクス解析

Tg マウス脳とコントロールマウス脳を比較した結果、脂質代謝に関与するタンパク質や鉄の輸送に関係するタンパク質、細胞保護タンパク質、抗酸化酵素、骨格タンパク質などが 1.5 倍以上有意に変動していた。その中で、アルツハイマー病患者で変動したタンパク質と比較検討した結果、鉄の輸送に関係するタンパク質のひとつが両者で同様の傾向を示した。このタンパク質を指標に、動物用高感度一体運用型 PET/MRI を用いて Tg マウスの脳の萎縮などの相関を解析した結果、PET と MRI の画像を一致させる処理に問題が生じ詳細な解析が行えなかったが、PET 画像においては良好な相関は認められなかった。

##### (3) 抗酸化剤モリンの安全性の検討

アルツハイマー病における新規 PET イメージング試薬の開発を目的に、我々はアミロイド凝集抑制作用を持つモリンに注目した。モリンはフラボノイドの一種である抗酸化剤で、アルツハイマー型認知症の原因の 1 つであるアミロイドの凝集や蓄積の抑制効果が報告されている。我々は、フラボノイド類に脳内への移行性が高い脂溶性置換基を導入したところ、マウスの死亡率が上昇するという結果を得た。従って、脂溶性置換基を導入してしまうと毒性が強まる可能性があるため、置換基の導入を回避した。さらに、モリンは金属イオン存在下で核膜脂質の過酸化と同時に DNA の損傷を引き起こすとの報告があるため、モリンの安全性を検討することを目的とし、そのメカニズムを明らかにした。その結果、モリンは、2 価の銅イオン (Cu(II)) の存在下において濃度依存的に単離 DNA を損傷した。またピペリジン処理により、DNA 損傷が増強したことから、DNA 鎖の切断に加えて塩基の損傷も認められた。これらの DNA 損傷は、抗酸化酵素 SOD ならびに・OH (OH ラジカル) スカベンジャーであるエタノール、マニトールおよびギ酸ナトリウムでは抑制されなかった。一方で・OH よりも弱いラジカルを消去できるメチオナール

と Cu(I) をキレートするバツキュプロインを添加した場合には DNA 損傷が抑制された。以上の結果から、モリンは、Cu(II) 存在下において活性酸素種を生成し、DNA を損傷していることが示唆された。さらに HPLC、ESI-MS を用いて反応生成物を測定したところ、Cu(II) の濃度に依存して増加したピークが検出された。そのピーク物質を NMR で測定・解析した結果、反応生成物として下図 2 に示すキノン体は不安定と思われるため検出できなかったが、さらに酸化された 2,4-dihydroxybenzoic acid が検出された。以上の結果より、モリンは Cu(II) 存在下において、Cu(I) と  $H_2O_2$  を介して活性酸素種を生成し、酸化的 DNA 損傷を引き起こすことが示唆された (図 2)。

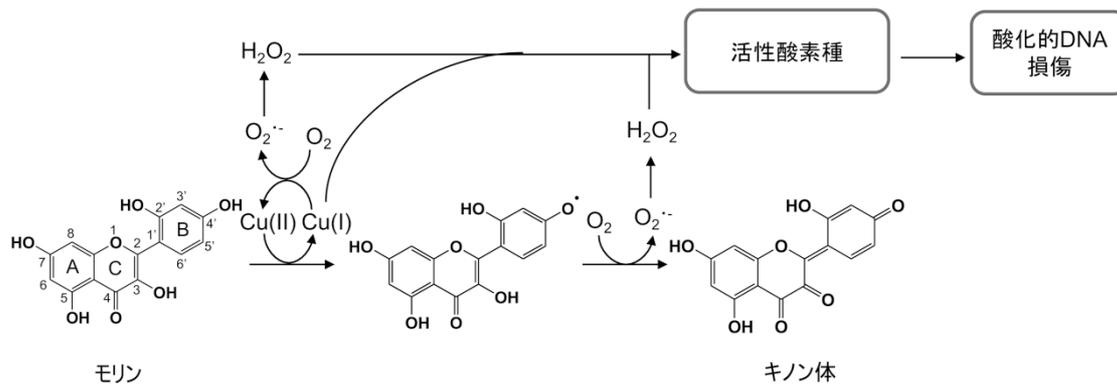


図2. モリンによる酸化的DNA損傷機構

#### (4) まとめ

早期アルツハイマー病患者血液のプロテオミクス解析結果と Tg マウス脳のプロテオミクス解析結果を比較検討した結果、鉄の輸送に関係するタンパク質が早期アルツハイマー病患者を検出するバイオマーカー候補になる可能性が示唆された。また、モリンの DNA の損傷性には、B 環の 2' と 4' の OH 基が重要な役割を果たしていることが明らかになったことから、4' の OH 基を H 基などに置換したモリンは安全性が期待できるため新規 PET イメージング試薬の開発も可能となると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計23件)

1. Mori Y, Kato S, Fujisawa Y, Ohnishi S, Hiraku Y, Kawanishi S, Murata M, Oikawa S. Mechanisms of DNA damage induced by morin, an inhibitor of amyloid beta-peptide aggregation. *Free Radic Res* 2019, 53(1):115-123. doi:10.1080/10715762.2018.1562179. (査読あり)
2. Kitamura Y, Kojima M, Kurosawa T, Sasaki R, Ichihara S, Hiraku Y, Tomimoto H, Murata M, Oikawa S. Proteomic profiling of exosomal proteins for blood-based biomarkers in Parkinson's Disease. *Neuroscience* 392, 121-128, 2018. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.09.017 (査読あり)
3. Kuzuya K, Ichihara S, Suzuki Y, Inoue C, Ichihara G, Kurimoto S, Oikawa S. Proteomics analysis identified peroxiredoxin 2 involved in early-phase left ventricular impairment in hamsters with cardiomyopathy. *PLoS One*. 2018, 13(2):e0192624. doi: 10.1371/journal.pone.0192624. (査読あり)
4. Ichihara S, Suzuki Y, Chang J, Kuzuya K, Inoue C, Kitamura Y, Oikawa S. Involvement of oxidative modification of proteins related to ATP synthesis in the left ventricles of hamsters with cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2017, 7(1):9243. doi: 10.1038/s41598-017-08546-1. (査読あり)
5. Kitamura Y, Usami R, Ichihara S, Kida H, Satoh M, Tomimoto H, Murata M, Oikawa S. Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol Res*. 2017, 39(3):231-238. doi: 10.1080/01616412.2017.1281195. (査読あり)

6. Matsuo K, Shindo A, Niwa A, Tabei KI, Akatsu H, Hashizume Y, Akiyama H, Ayaki T, Maki T, Sawamoto N, Takahashi R, Oikawa S, Tomimoto H. Complement Activation in Capillary Cerebral Amyloid Angiopathy. Dement Geriatr Cogn Disord. 2017, 44(5-6):343-353. doi: 10.1159/000486091. (査読あり)
7. Huang Z, Ichihara S, Oikawa S, Chang J, Zhang L, Hu S, Huang H, Ichihara G. Hippocampal phosphoproteomics of F344 rats exposed to 1-bromopropane. Toxicol Appl Pharmacol. 2015, 282(2):151-60. doi: 10.1016/j.taap.2014.10.016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 9 件)

1. 森有利絵、本城貴志、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二。軽度認知障害とアルツハイマー型認知症の血漿プロテオミクス解析 第 89 回日本衛生学会学術総会、名古屋市、名古屋大学東山キャンパス、2019 年 2 月 1 日～3 日
2. 森有利絵、加藤信哉、川西正祐、村田真理子、及川伸二。金属イオン存在下 Morin による酸化的 DNA 損傷機構の解明。第 88 回日本衛生学会総会、東京都大田区、東京工科大学蒲田キャンパス、2018 年 3 月 22～24 日
3. 近藤志織、北村祐貴、本城貴志、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二、2D-DIGE 法を用いた軽度認知障害患者の血漿タンパク質のプロファイリング 日本酸化ストレス学会東海支部第 5 回学術集会、名古屋市、愛知学院大学名城公園キャンパス、2017 年年 2 月 18 日
4. 北村祐貴、近藤志織、本城貴志、山嶋哲盛、村田真理子、及川伸二、軽度認知障害の診断バイオマーカーの探索、第 87 回日本衛生学会総会、宮崎市、フェニックス・シーガイア・リゾート、2017 年 3 月 26～28 日
5. 小嶋みどり、北村裕貴、森有利絵、木田博隆、佐藤正之、市原佐保子、埜村智之、石川雅一、村田真理子、冨本秀和、及川伸二。アルツハイマー病患者血漿エクソソーム内タンパク質の発現量解析。日本プロテオーム学会 2017 大会(JHUPO 第 15 回大会)、吹田市、ホテル阪急エキスポパーク、2017 年 7 月 27～28 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

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：冨本 秀和

ローマ字氏名：(TOMIMOTO, Hidekazu)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 80324648

研究分担者氏名：福原 潔

ローマ字氏名：(FUKUHARA, Kiyoshi)

所属研究機関名：昭和大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70189968

研究分担者氏名：矢田 健一郎

ローマ字氏名：(YATA, Kenichiro)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：産官学連携研究員

研究者番号(8桁): 40467361