

令和 4 年 4 月 6 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11781

研究課題名(和文)グリセルアルデヒド由来終末糖化産物起因性のアルツハイマー病発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism in Alzheimer's disease through advanced glycation end products by glyceraldehyde

研究代表者

郡山 恵樹 (Koriyama, Yoshiki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70397199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病はアルツハイマー病(AD)の発症リスクを約2倍上昇させることが知られている。しかし、その発症に至る詳細なメカニズムは分かっていない。糖尿病患者血中には、糖とタンパク質の非酵素的反応物である終末糖化産物(AGEs)が健常人より多く存在することが知られている。その中でも、特にグリセルアルデヒド(GA)由来AGEs(TAGE)は、AD患者脳においても検出されているだけでなく、中枢神経細胞に対し最も強い毒性を示すことがわかってきた。そこで、神経細胞内のTAGE化タンパク質を同定し、AD発症との関係性について仮説を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはこれまで、ブドウ糖果糖液糖(コーンシロップ)含有飲食物の過剰摂取によるグリセルアルデヒド(GA)の蓄積が糖尿病の発症やアルツハイマー型認知症(AD)様の強い中枢神経障害を引き起こす可能性を報告してきた。これまでの研究から、GAは細胞内タンパク質と反応してGA由来の終末糖化産物(Glycer-AGEs)の生成/蓄積を介して強い中枢神経変性を引き起こすことが分かってきた。独自のGlycer-AGEs抗体を用いた予試験的なスクリーニングにより、チューブリンがGAによりAGE化されて異常な重合を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Diabetes mellitus (DM) has been identified as a risk factor for the onset and progression of Alzheimer's disease (AD). In our previous study, we demonstrated that glyceraldehyde (GA)-derived toxic advanced glycation end-products (toxic AGEs, TAGE) induced similar alterations to those observed in AD. In another study, we identified TAGE in the cell bodies of neurons in the hippocampus and parahippocampal gyrus of the brains of AD patients. GA induced dysfunctional neurite outgrowth via TAGE- $\alpha$ -tubulin aggregation, which resulted in the TAGE-dependent abnormal aggregation of  $\alpha$ -tubulin and tau phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 神経原線維変化 終末糖化産物 チューブリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の人口高齢化にともない、アルツハイマー型認知症 (AD) をはじめとする脳神経変性疾患患者や糖尿病患者はますます増加傾向にある。糖尿病は、AD の発症リスクを高めることが報告されている。ブドウ糖果糖液糖は肥満者数と糖尿病患者数の増加の元凶だとされている。さらに 1990 年代後半より米国は特にアルツハイマー型認知症 (AD) 患者数が増え続けている。AD は原因から発症まで約 30 年かかる疾患とされているため、ブドウ糖果糖液糖の継続的な多量摂取がその要因のひとつである可能性が高い。しかし、それらの因果関係を化合物や分子で説明した論文は国内外で皆無である。

一方、申請者らのこれまでの糖化蛋白質に関する研究により、私達の体内では色々な経路から様々な終末糖化産物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が生成してくる事が明らかになっている。特に、果糖の代謝中間体であるグリセルアルデヒド (GA) 由来 Glycer-AGEs は、他の様々な糖由来の AGEs と異なって、中枢神経細胞に対して極めて強い細胞障害性を示した。よってその神経変性メカニズムを精査することとした。

## 2. 研究の目的

申請者らはこれまで、ブドウ糖果糖液糖含有飲食物の過剰摂取によるグリセルアルデヒド (GA) の蓄積が糖尿病の発症やアルツハイマー型認知症 (AD) 様の強い中枢神経障害を引き起こす可能性を報告してきた。これまでの研究から、GA は細胞内タンパク質と反応して GA 由来の終末糖化産物 (Glycer-AGEs) の生成/蓄積を介して強い中枢神経変性を引き起こすことが分ってきた。しかし、未だその糖化の標的分子やその障害メカニズムの解明には至っていない。独自の Glycer-AGEs 抗体を用いた予試験的なスクリーニングにより、チューブリンが GA により AGE 化されて異常な重合を示すことが分ってきた。本研究は、特に チューブリンの重合異常が AD の主病変である神経原線維変化を誘導するという仮定をたて、細胞内 Glycer-AGEs 生成/蓄積が糖尿病起因性の AD を引き起こすメカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

Glycer-AGEs 化標的分子の同定と神経障害性メカニズムの精査を行った。GA はヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対して Glycer-AGEs を蓄積するとともに神経障害を起こす。GA 処理した SH-SY5Y 細胞ライゼートを用いて、2 次元電気泳動で分離し、独自の抗 Glycer-AGEs 抗体を用いたウェスタンブロットと MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析計で Glycer-AGEs 化標的を確認した。いくつかの Glycer-AGEs 化タンパク質が得られてきた中で我々は チューブリンに注目した。一般的に、チューブリンは チューブリンとのヘテロダイマーを経て、微小管形成と神経軸索形成に関わる。GA 処理により チューブリンが異常に重合すれば微小管形成阻害による軸索伸長阻害が起こると仮定できた。SH-SY5Y 細胞の軸索伸長を GA 処理が阻害するかどうか、軸索の長さを定性し、種々軸索マーカー (Internexin) を定量し、それらの相関性を確認した。

## 4. 研究成果

中枢神経系におけるタンパク質の Glycer-AGEs 化が AD の発症や進展に関与する可能性が示唆されるが、標的となるタンパク質はこれまで不明であった。我々は TAGE 化タンパク質を特異的に認識する抗体を作製し、神経細胞において TAGE 化されるタンパク質を検出した。GA で処理した神経細胞からタンパク質を抽出し、等電点電気泳動とポリアクリルアミド電気泳動により二次元に展開した。その後、特異的抗体を用いて TAGE 化タンパク質を検出した。飛行時間型質量分析装置を用いたアミノ酸配列解析により、いくつかの標的タンパク質を同定した。その結果、Glycer-AGEs 化タンパク質の 1 つとして チューブリンを同定した。チューブリンは細胞骨格タンパク質の 1 種であり、チューブリンと重合することにより微小管を構成する。また、微小管の束は、タウタンパク質の結合をもって安定的な神経軸索を構成する。このように、チューブリンは中枢神経の軸索形成に極めて重要な役割を担うタンパク質である。チューブリンと チューブリンを含むチューブリンタンパク質溶液に GA 処理して Glycer-AGEs 化させ、そのサンプルを抗 チューブリン抗体と抗 Glycer-AGEs 抗体を用いたウェスタンブロットで解析した。GA の濃度が高くなるにつれ、チューブリンの Glycer-AGEs 化が認められた。また、GA によって Glycer-AGEs 化された チューブリンはモノマーとして存在するのではなく、3 量体から 5 量体のオリゴマー形成をするデータが得られた。このことから、チューブリンは GA 処理による Glycer-AGEs 化によって、異常凝集が引き起こされることが分かった。この反応は試験管内の実験だけでなく、神経細胞に GA 処理した場合においても細胞内の チューブリンは Glycer-AGEs 化されて異常凝集が引き起こされた。次に、神経軸索の構成タンパク質である チューブリンが Glycer-AGEs 化し、異常凝集することが、軸索伸長にどのような影響を与えるかを調べた。興味深いことに、培養された神経細胞に GA を処理すると軸索伸長過程を抑制する様子が観察された。これらのことから、チューブリンの Glycer-AGEs 化は神経軸索の形成に異常をきたし、神経機能を障害していることが示唆さ

れた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T, Takino JI, Koriyama Y, Kikuchi C, Furukawa A, Nagamine K, Horii T, Matsunaga T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Intracellular Toxic AGEs (TAGE) Triggers Numerous Types of Cell Damage.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules.	6. 最初と最後の頁 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11030387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Koinuma S, Negishi R, Nomura R, Sato K, Kojima T, Segi-Nishida E, Goitsuka R, Iwakura Y, Wada N, Koriyama Y, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Nakamura T.	4. 巻 157
2. 論文標題 TC10, a Rho family GTPase, is required for efficient axon regeneration in a neuron-autonomous manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurochem .	6. 最初と最後の頁 1196-1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15235.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoneshige A, Hagiwara M, Takashima Y, Ueno S, Inoue T, Kimura R, Koriyama Y, Ito A.	4. 巻 9
2. 論文標題 ge A, Hagiwara M, Takashima Y, Ueno S, Inoue T, Kimura R, Koriyama Y, Ito A. Elevated Hydrostatic Pressure Causes Retinal Degeneration Through Upregulating Lipocalin-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 664327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.664327.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 那須隆斗, 古川絢子, 竹内正義, 郡山恵樹	4. 巻 5
2. 論文標題 グリセルアルデヒド由来終末糖化産物起因性のアルツハイマー病発症機序の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 那須 隆斗、郡山 恵樹、古川 絢子、竹内 正義
2. 発表標題 AGEs 阻害剤は -チュープリンのTAGE化を介した神経軸索伸長抑制を軽減する
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 正義、逆井(坂井) 亜紀子、高田 尊信、瀧野 純一、郡山 恵樹、古川 絢子、那須 隆斗、菊池 千草、長嶺 憲太郎、堀 隆光、松永 民秀
2. 発表標題 生活習慣病における新たな概念Toxic AGEs (TAGE)
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 正義、逆井(坂井) 亜紀子、高田 尊信、瀧野 純一、郡山 恵樹、菊池 千草、古川 絢子、長嶺 憲太郎、堀 隆光、松永 民秀
2. 発表標題 細胞内Toxic AGEs (TAGE) の生成・蓄積は各種細胞障害のトリガーとなる
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 朝倉 彩絵、郡山 恵樹
2. 発表標題 タミバロテン(Am80)による中枢神経再生作用とその作用機序解明について
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 及川弘崇、藤川隆彦、郡山 恵樹
2. 発表標題 鈴鹿医療科学大学薬理学実習内での改定型8方向放射迷路を用いた取組報告
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 飛由馬、郡山 恵樹
2. 発表標題 HSP70を標的とした網膜色素変性症の新たな治療薬の可能性
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須 隆斗, 古川 絢子, 竹内 正義, 郡山 恵樹
2. 発表標題 毒性終末糖化産物(TAGE)によるアルツハイマー尿神経原線維変化の可能性について
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	古川 絢子	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教	
	(Furukawa Ayako)		
	(10455537)	(34104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------