

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590697

研究課題名(和文)アルツハイマー病前駆段階の血清学的診断とビタミンDによる進行阻止法の開発

研究課題名(英文)Developments of diagnostics for Mild Cognitive Impairment by patients serum and inhibition of the disease progress with vitamin D

研究代表者

松永 洋一 (MATSUNAGA, Yoichi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：80239053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は凝集アミロイドベータ蛋白の脳内沈着が主病因で、その前駆段階での早期診断が重要である。前駆段階患者血清中の1,25(OH)2V-D3濃度は健常者と比し有意差を認めないが、25(OH)V-D3濃度は健常者に比し有意な低下があり、早期診断法として有用である。しかし、試験管内では、25(OH)V-D3はアミロイド蛋白凝集阻止効果を示さず凝集促進効果を示した。

一方、プリオン病は脳内正常プリオン蛋白の立体構造変化による異常構造プリオン蛋白が主病因であり、正常蛋白の重合が異常蛋白形成の前駆状態にある。この前駆段階で阻止はVD3では不可能であったが、VD2で可能であった。

研究成果の概要(英文)：Aggregated amyloid-beta is a pathological feature in Alzheimer's disease(AD) and mild cognitive impairment(MCI) is an early stage of AD. Up to date, there is no diagnostics of MCI by patients serum. We found that the concentration of 25(OH)V-D3 in serum with MCI is lower than that of normal volunteers, and there is no differences in the concentration of 1,25(OH)2V-D3 between them. We suggest that the serum concentration of 25(OH)V-D3 is useful for the diagnostics of MCI. Unexpectedly, 25(OH)V-D3 showed no inhibitory effects for the aggregation in vitro, and rather promoted the aggregation.

PrPsc is the responsible protein to cause scrapie, which derived from the conformational transition of PrPc in normal brain. Oligomerization of PrPc is a pre-stage of PrPsc. We found that V-D3 could not break the oligomerization, however VD2 could break the oligomerization, suggesting that VD2 is useful for scrapie therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイドベータ蛋白 ベータシート構造 オリゴマー形成 蛋白凝集 ビタミンD2 ビタミンD3 プリオン蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病(AD)は発症前、数年間にわたる軽度認知能力低下の時期があり、この時期での早期発見が予後を左右する。その発症には、遺伝因、環境因、更に生活習慣因子の関与が示唆されるが、いずれも異常凝集アミロイドベータ( $A\beta$ )の脳内沈着との関連性が重要視されている。しかしながら、これまでADの早期診断法として確立されたものはない。

(2) 既に、人血清中には極めて微量ながらも  $A\beta$  蛋白が存在をすることが知られており (Silverberg, *Lancet Neurol.*, 2,506-511,2003)、中枢神経系と末梢血液間では年齢依存的に脊髄液中  $A\beta$  蛋白濃度と血清中  $A\beta$  蛋白濃度とが相関し、両者間で動的平衡状態を保っている (Demattos *Neurology*, 81,229-236, 2002)。また、血清中には  $A\beta$  蛋白と結合し、そのクレアランスに關与する蛋白として Gelsolin, LDL-receptor 關連蛋白の存在が報告されている (Shibata, *J. Clin. Invest.*, 106,1489-1499,2000)。我々も、特異抗体を用いた ELISA 法でヒト末梢血液中に  $A\beta$  蛋白の存在を確認している。

(3) 前回の研究期間内(平成20年度~22年度)で我々は健康人、軽度AD、重度AD、各群10-20名の末梢血液中に微量ながら存在する  $A\beta$ 40 蛋白の立体構造的相違を、 $A\beta$ 40 構成部位である  $A\beta$ 17-21 特異的モノクローナル抗体との反応性の相違として明らかにし、新規診断法を確立した。即ち生体内で  $A\beta$  蛋白を取り巻く環境因として、生理学的範囲内の温度変化で誘発される  $A\beta$ 40 蛋白の構造変化に着目し、各群末梢血中  $A\beta$ 40 蛋白の加温前後での立体構造変化を特異抗体との反応性の相違として検出することで各群間  $A\beta$ 40 蛋白の立体構造的相違を識別可能であることを報告した (Funda F., *Matsunaga Y. et al, Acta Neurol. Scand*, 2008;117, 404-408)。また、前回の研究期間中、我々は所謂プレカーペプチドを用いた  $A\beta$  蛋白の凝集抑制に關する研究を遂行しており、脳脊髄液内への  $A\beta$ 40 蛋白を持続投与したラットモデルを用いた動物行動実験にて8残基より構成されるペプチド鎖が行動異常の阻止に有効であることを最近報告した (Funda F., *Matsunaga Y., Curr Alz. Res*, 7,602-615,2010)。

## 2. 研究の目的

(1) 現在我々は、約100名以上のAD患者を外来にてフォローアップしており、従来よ

りの診断法であるインタビュー、認知能力評価テスト、核医学的画像検査にてアルツハイマー病早期段階(MCI)の臨床診断を行っている。しかしながら、現時点でMCIの客観的診断法は皆無である。そこで、今回我々は、患者血清を用いて、信頼性と客観性があるMCI新規診断法の開発を行った。

(2) 既に、統計学的研究よりAD患者では健康者に比べ血液中ビタミンD濃度が低下している (Buell JS., *Neurology*, 2010, 74:18-26)、また、多発性硬化症における再発抑制にビタミンDが關与している (Simpson S., *Ann Neurol*. 2010, 68:193-203) との報告がある。しかしながら、現在までのところ、ビタミンDが  $A\beta$ 40 凝集抑制に有効であることを立証する科学的根拠は皆無である。我々は既に、その作用機序に關与すると考えられる研究成果の一部を蛋白レベルで得ている。今回、我々は分子レベルで、 $A\beta$ 40 に対するビタミンD親和性部位の同定とその詳細な作用メカニズムを解明し、AD前駆段階であるMCIの診断法、さらに進行阻止法を開発することを目標とした。

(3) 脳内蛋白変性に由来する所謂プリオン病の主病因蛋白である異常立体構造プリオン蛋白(PrP<sup>Sc</sup>)の前駆状態として、正常プリオン蛋白(PrP<sup>C</sup>)のオリゴマー形成段階があり、この段階での阻止が重要である。今回V-D派生化合物が阻止効果を示すことを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) ビタミンDによる  $A\beta$  蛋白への親和性と凝集阻止の検討を行う。

$A\beta$ 40蛋白と結合可能な脂溶性ビタミン類を検索する過程では、 $A\beta$ 40蛋白の凝集性がビタミン類との混和により影響を受け、混和後  $A\beta$ 40蛋白のプロテアーゼKに対する感受性が変化することをDot blot法にて評価する。即ち  $A\beta$ 40蛋白凝集性はビタミンD、E添加にて阻止可能であることを示唆する研究成果を既に得ているが、更にそれらビタミン類と  $A\beta$ 40蛋白との親和性を測定する必要があり、Biacore systemを用い、 $A\beta$ 蛋白とビタミン類との結合力を詳細に測定する。また、それらビタミン類が  $A\beta$  蛋白に結合することが予想されるシーケンス部位決定をMOEにてDocking simulationを行う。

(2) 健康者、MCI、AD各患者血清中のビタミンD値の測定を行う。

健常者、患者からの血液サンプル採取、保存、試料の使用に関しては、既に福岡大学、生命倫理委員会にて了承済。対象血清は福岡大学病院・神経内科にてMCI, ADと診断された患者および健常者ボランティアとした。年齢、男女比がマッチした各群構成とし健常者30名、高度AD30~40名、軽度AD30~40名、MCI30~40名につき解析した。各群血清中ビタミンDの測定は、1-alpha,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>濃度を radioimmunoassay にて行なう。

(3) 合成プリオン蛋白 (PrP<sup>c</sup> 90-231) に、V-D<sub>2</sub> およびV-D<sub>3</sub>を添加しそれぞれの結合性をBiacoreにて観察した。さらに結合部位特定目的で、PrP<sup>c</sup>のオリゴマー形成に必須であるPrP(109-112)部位特異抗体をPrP<sup>c</sup>(90-231)と培養後、V-D<sub>2</sub> およびV-D<sub>3</sub>との結合能の変化をBiacoreで検討する。V-Dによるオリゴマー形成阻止の評価はV-D添加前後でPrP(90-231)が示す蛋白分解酵素 (protease K)抵抗性の変化として評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) アルツハイマー病前駆段階(MCI)患者血清中ビタミンD濃度測定

年齢相応健常者と比較しMCIでは、男性、女性ともに、血中25(OH)V-D<sub>3</sub>濃度の低下が有意に認められ(Fig.1a,b)、アルツハイマー病早期段階の診断法として有用であることが示唆されたが、1,25(OH)<sub>2</sub>V-D<sub>3</sub>は、各群間で有意差が認められなかった(Fig.2)。また、25(OH)V-D<sub>3</sub>濃度はその後の病状進行度との相関性が認められなかった。

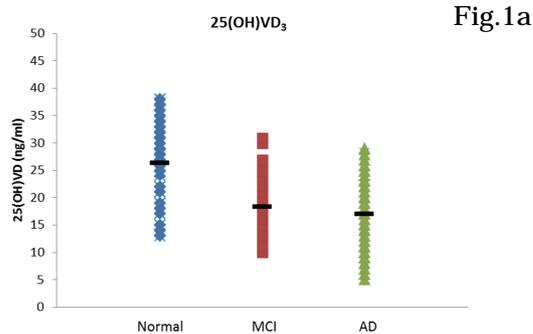


Fig.1a

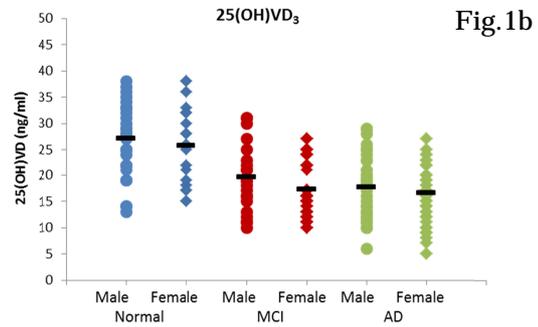


Fig.1b

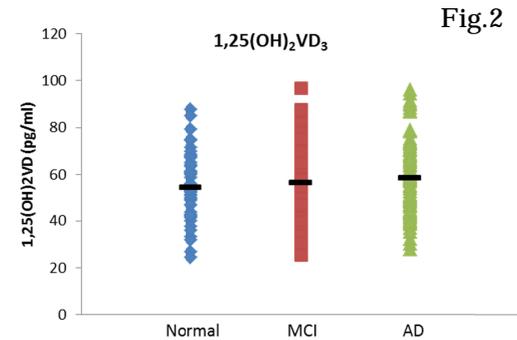


Fig.2

##### (2) アルツハイマー病の主病因である、凝集アミロイドベータ蛋白に対するV-Dの結合性について

アミロイドベータ(Aβ40)に対するV-Dの親和性を検討すると、VD<sub>2</sub>のみと強い親和性を示したがVD<sub>3</sub>とは全く結合を示さなかった(Fig.3a,b)。さらにMOEを用いたドッキングシミュレーションではAβ40を構成する19番目のPhe残基がV-D<sub>2</sub>との結合に重要であることが示唆された(Fig.4)。

この結果は、Thioflavin-Tを用いたβ-sheet構造の増加と矛盾しない(Fig.5a,b)。更に、VD<sub>2</sub>が惹起するAβ40凝集性は分子間相互作用定量QCM装置での測定結果でも示された。

(Fig.6a,b)。

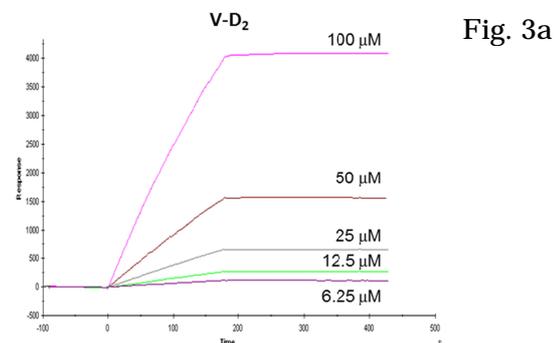


Fig.3a

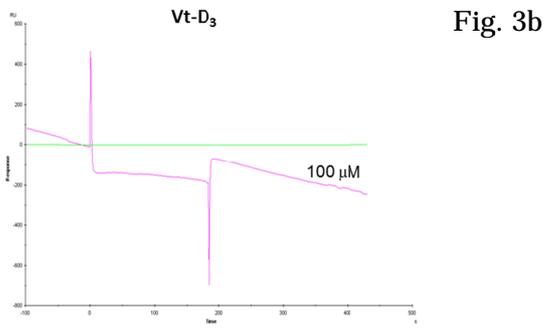


Fig. 3b

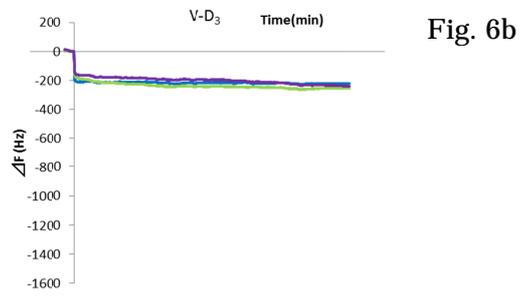


Fig. 6b

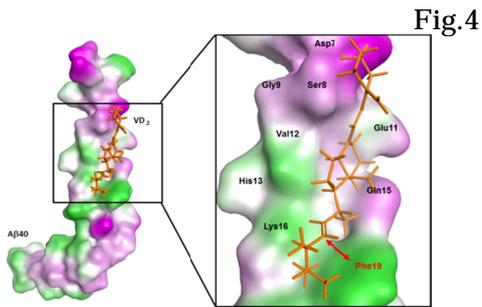


Fig. 4

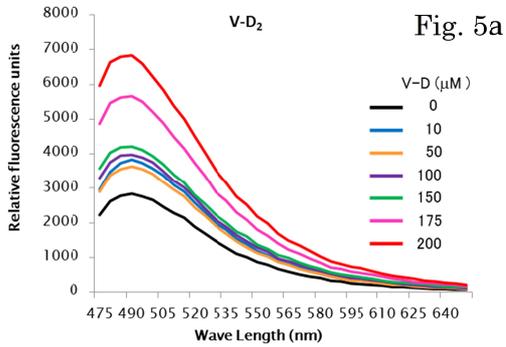


Fig. 5a

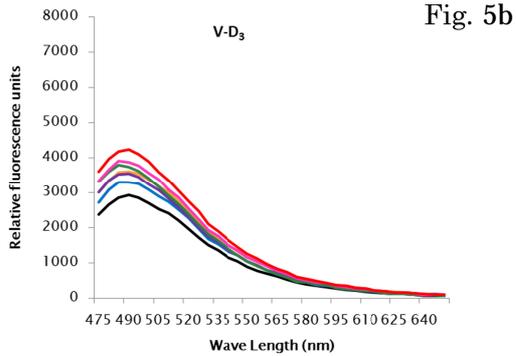


Fig. 5b

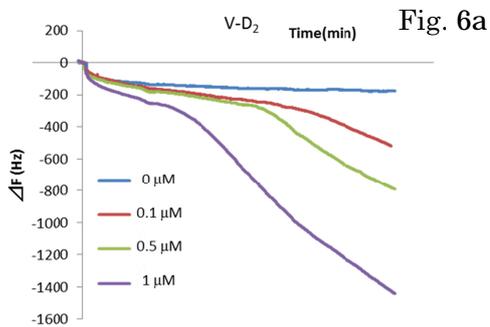


Fig. 6a

### (3) プリオン蛋白に対する V-D の親和性について

プリオン病は感染性を有する点で、アルツハイマー病とは大きく異なるが、いずれも認知症性の神経変性疾患である。プリオン病では、所謂スクレイピープリオン蛋白と呼ばれる、正常プリオン蛋白の立体構造変化に起因した異常凝集蛋白の脳内蓄積が主病因である。Aβ40 に対する VD の親和性から VD は、正常プリオン蛋白へも親和性を示す事が予想される。実際 Biacore system を用いた実験結果で、VD<sub>2</sub> と親和性があったが VD<sub>3</sub> とは親和性がなかった (Fig. 7a, b)。正常プリオンの異常プリオン蛋白への変換には、プリオン構成アミノ酸残基 109~112 番目に相当する部位 (M K H M) が重要である。更に VD<sub>2</sub> の結合部位は M K H M であることを示し (Fig. 8)、VD<sub>2</sub> の結合により正常プリオンの重合が阻止できる事を示した (Fig. 9)。今後、VD<sub>2</sub> のプリオン病への新規治療薬としての可能性を示唆した。

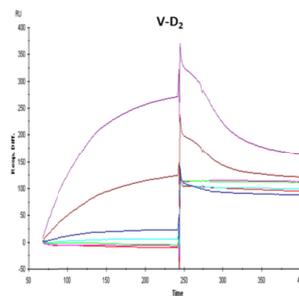


Fig. 7a

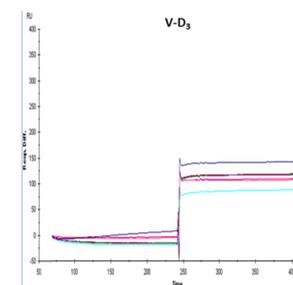


Fig. 7b

Fig. 8

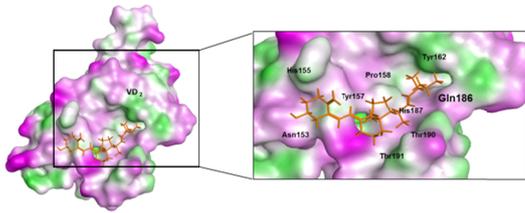
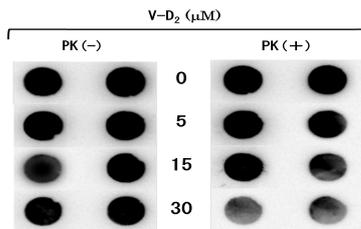


Fig.9



### 総括

脳内異常蛋白凝集へのビタミンDの関与については、 $\text{A}\beta_{40}$ では $\text{VD}_2$ による凝集促進、プリオン蛋白に関しては、凝集阻止という、逆の効果が認められた。 $\text{VD}_3$ は、両蛋白の凝集性に影響を与えなかった。 $\text{VD}_2$ と $\text{VD}_3$ の化学構造上の相違とこれらの蛋白凝集への関与の相違との相関性、およびそれらVDの水酸化部位の相違が親和性に及ぼす影響については、今後検討が必要である。

### 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)

[論文発表](計12件)

Suenaga M, Hiramoto Y, Matsunaga Y. (2013). Vitamin D<sub>2</sub> interacts with human PrPc(90-231) and breaks PrPc oligomerization in vitro. PRION, 7, 1-7

Kitashima A, Umemoto G, Tsuboi Y, Higuchi MA, Baba Y, Kikuta T. (2013). Effects of subthalamic nucleus deep brain stimulation on the swallowing function of patients with Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord., 19, 480-482.

Shimazaki H, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Namekawa M, Tsugawa J, Tsuboi Y, Suzuki C, Baba M, Nakano I (2013).

Middle cerebellar peduncles and Pontine T2 hypointensities in ARSACS. J. Neuroimaging, 23, 82-85.

Kiyohara C, Miyake Y, Koyanagi M, Fujimoto T, Shirasawa S, Tanaka K, Fukushima W, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. (2013). MDR1 C3435T polymorphism and interaction with environmental factors in risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. Drug Metab. Pharmacokinet., 28, 138-143

Shimazaki H, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Namekawa M, Tsugawa J, Tsuboi Y, Suzuki C, Baba M, Nakano I. (2012). Middle Cerebellar Peduncles and Pontine T2 Hypointensities in ARSACS. J. Neuroimaging, 23, 82-85

Inobushi T, Kamemura N, Oda M, Sakurai J, Nakaya Y, Harada N, Suenaga M, Matsunaga Y, Ishidoh K, Katunuma N. (2012). L-Tryptophan Suppresses Rise in Blood Glucose and Preserves Insulin Secretion in Type-2 Diabetes Mellitus Rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol, 58, 415-422

Saito Y, Takashima Y, Kamada A, Suzuki Y, Suenaga M, Okamoto Y, Matsunaga Y, Hanai R, Kawahara T, Gong X, Tori M. (2012). Chemical and genetic diversity of Ligularia virgaurea collected in northern Sichuan and adjacent areas of China. Isolation of 13 new compounds. Tetrahedron, 68, 10011-10029

Matsunaga Y, Suenaga M. (2012). Environmental factors preceding A-beta40 monomer to oligomers and the detection of oligomers in Alzheimer's disease patient serum. J. Amino Acids, 2012, 1-8

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M, Study

Group TF. (2012). UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan. BMC Neurol., 12, 62.

Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Sasaki S, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Shimada H, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group. (2012). SNCA polymorphisms, smoking, and sporadic Parkinson's disease in Japanese. Parkinsonism Relat. Disord., 18, 557-561.

Samukawa M, Hirano M, Tsugawa J, Sakamoto H, Tabata E, Takada K, Kuwahara M, Suzuki S, Kitada M, Yamada T, Hara H, Tsuboi Y, Nakamura Y, Kusunoki S. (2012). Refractory acute disseminated encephalomyelitis with anti-galactocerebroside antibody. Neurosci. Res., 74, 284-289

Hatip FB, Hatip KA, Matsunaga Y, Suenaga M, Sen N. (2010). Effects of 8-residue beta-sheet breaker peptides on aged A-beta40 induced memory impairment and A-beta40 expression in rat brain and serum following intraamygdaloid injection. Curr. Alz. Res., 7, 606-614

[学会発表](計3件)

Amyloid  $\beta$ 凝集に対する Vitamin D<sub>2</sub>の効果. 末永みどり, 石川隼, 高村佳香, 合馬 慎二, 山田 達夫, 松永 洋一; 第 84 回日本生化学会大会(京都市) 2011 Sep 23.

ヒト単球由来 ApoE 分解酵素の探索. 末永みどり, 西原利治, 松永 洋一; 第 85 回日本生化学会大会(福岡市) 2012 Dec 16.

末永みどり, 高村佳香, 平本雄介, 藤澤 恵美, 高橋宏暢, 松永洋一; ビタミン D のアミロイド $\beta$ および正常プリオン蛋白との親和性. 第 86 回日本生化学会大会(横浜市) 2013 Sep 11.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永洋一 (MATSUNAGA, Yoichi)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80239053

(2) 研究分担者

末永みどり (SUENAGA, Midori)  
徳島文理大学・薬学部・助教  
研究者番号: 00389181

(3) 連携研究者

坪井義夫 (TSUBOI, Yoshio)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 90291822

(4) 連携研究者

上原吉就 (UEHARA, Yoshinari)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号: 70373149