

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591698

研究課題名(和文)アルツハイマー病脳におけるマイクロRNA発現の異常と酸化ストレスの関連性

研究課題名(英文) Association between MicroRNA Dysregulation and Oxidative Damage in Brains with Alzheimer's Disease

研究代表者

布村 明彦 (NUNOMURA, Akihiko)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：60241436

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)：剖検脳を用いて免疫組織化学的検討ならびにin situ hybridization法による検討を行ったところ、大脳皮質神経細胞における核酸の酸化傷害レベルは対照例において加齢に伴って増加し、最軽度段階のAlzheimer病で顕著な増加が認められることが明らかになった。また、加齢脳における核酸の酸化傷害とミトコンドリアDNA欠失との間に相関が認められ、これらが神経変性の準備段階において重要な変化であると考えられた。他方、microRNA発現については、特異的な反応を検出することが困難であり、死後脳標本作製条件を最良にコントロールする必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An in situ approach in the cerebral cortex of postmortem brains revealed that levels of oxidative damage to nucleic acids in neurons increased during aging and remarkably increased at the stage of very mild Alzheimer's disease. The neuronal nucleic acids oxidation in aging was significantly associated with mitochondrial DNA deletion, and both of them were regarded as crucial alterations in the prodromal stage of neurodegeneration. In this study, however, specific reactions of microRNA were hardly detected in postmortem brains, which suggested requirements of strictly controlled conditions in the processing of the brains to investigate microRNA in situ.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 加齢脳 酸化ストレス RNA ミトコンドリアDNA 認知機能障害 アメリカ合衆国

#### 1. 研究開始当初の背景

わが国では、人口高齢化率の急増を背景に認知症対策の重要性が益々クローズアップされている。認知症の原因疾患の中で大きな比率を占め、加齢との関連が深い Alzheimer 病(AD)の原因究明ならびに治療・予防法開発は、老年精神医学の最重要課題のひとつである。

近年、多くの研究によって AD の病態に酸化ストレスが密接に関連することが示唆されてきたが、酸化ストレスが神経変性を引き起こすメカニズムの詳細は十分に解明されていない。

#### 2. 研究の目的

本研究では、加齢脳や AD 脳における神経変性のメカニズムを解明することを目的に、AD の病態に関連することが知られている酸化ストレス、とくに核酸の酸化傷害に焦点を絞る。

すなわち、近年重要性が解明されてきたマイクロ RNA 異常やミトコンドリア DNA 異常と核酸の酸化傷害との関連性について、剖検脳組織上で検討することによって、神経変性のメカニズム解明の糸口を得ることを目的に研究を行った。

#### 3. 研究の方法

本研究では材料として以下の剖検脳を用いた(山梨大学医学部倫理委員会承認)。

##### (1) 実験 1

認知症がない 0.3~86 歳の対照例の海馬支脚(27 例)および側頭葉皮質(38 例)

##### (2) 実験 2

preclinical AD 群(AD に合致する病理変化はあるが、Clinical Dementia Rating (CDR)スコア 0 の認知機能正常例)

最軽度群(AD 病理変化があり、CDR スコア 0.5 の軽度認知障害例)

軽度 AD 群(AD 病理変化があり、CDR スコア 1 の軽度認知症例)

年齢を一致させた対照群

以上 4 群(各群 4~6 例)の側頭葉皮質および小脳皮質

以上の各群の剖検脳組織(メタカン固定あるいはリン酸緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋)切片上で核酸の酸化傷害の指標である 8-hydroxyguanosine を免疫細胞化学的に検出した。また、in situ hybridization 法によって、マイクロ RNA 発現やミトコンドリア DNA 欠失の検出を試みた。さらに、組織上で得られた陽性反応に対して画像解析による半定量的解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 1

海馬支脚および側頭葉皮質錐体細胞内の核酸酸化傷害レベルは、認知症のない対照例において加齢に伴って増加していた。

また、海馬支脚において、核酸酸化傷害レベルとミトコンドリア DNA 欠失レベルの間に有意な相関が認められた( $R^2=0.86$ )。

##### (2) 実験 2

側頭葉皮質の錐体細胞内の核酸酸化傷害レベルは、preclinical AD 群では対照群と有意差がなかったが、最軽度 AD 群および軽度 AD 群では対照群に比べて有意な増加が認められた。一方、小脳プルキンエ細胞内の核酸酸化傷害レベルは、4 群間に差がなかった。

他方、マイクロ RNA の検出については、locked nucleic acid プローブを用いた in situ hybridization 法では、各群の脳組織標本において特異的な反応を検出することが困難であった。

以上のことから、酸化ストレス異常とミトコンドリア異常は、AD 発症前段階において、相乗的に発症準備状態に関与していることが推定され、今後 AD の治療・予防法を開発する上で示唆に富む成果と考えられる。

他方、マイクロ RNA の剖検脳組織上の検出については、高度にコントロールされた剖検脳処理条件が求められると考えられ、至適条件の検討が今後の課題として残った。

#### 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 15 件)

布村明彦、精神疾患の病態における酸化ストレスの役割、精神神経学雑誌、査読有、116 巻、2014、印刷中

Blair JA, Siedlak SL, Wolfram JA, Nunomura A, Castellani RJ, Ferreira ST, Klein WL, Wang Y, Casadesus G, Smith MA, Perry G, Zhu X, Lee HG. Accumulation of Intraneuronal amyloid- is common in normal brain. Current Alzheimer Research, 査読有、11 巻、2014、317-324、DOI:10.2174/1567205011666140302200902

布村明彦、酸化ストレス仮説に基づくアルツハイマー病治療法開発の現状と展望、臨床神経学、査読無、53 巻、2013、1043 - 1045、

DOI:http://dx.doi.org/10.5692/clinicalneuro.53.1043

Perry EA, Castellani RJ, Moreira PI, Nunomura A, Lui Q, Harris PL, Sayre LM,

Szweda PA, Szweda LI, Zhu X, Smith MA, Perry G, Neurofilaments are the major neuronal target of hydroxynonenal-mediated protein cross-links, *Free Radical Research*, 査読有、47 巻、2013、507-510、DOI: 10.3109/10715762.2013

Santos RX, Correia SC, Zhu X, Smith MA, Moreira PI, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, 査読有、18 巻、2013、2444-2457、

DOI: 10.1089/ars.2012.5039

布村明彦, 玉置寿男、Preclinical AD と MCI 脳を分ける変化:酸化障害、*Dementia Japan*, 査読無、27 巻、2013、237-243、J-GLOBAL ID: 201302273914323518

布村明彦, 玉置寿男、アルツハイマー病診断のバイオマーカー 最近の進歩 酸化ストレスマーカー、*老年精神医学雑誌*, 査読無、24 巻、2013、140-147、J-GLOBAL ID: 201302224251908346

布村明彦、加齢と神経変性疾患における RNA 酸化傷害、*Brain and Nerve*, 査読無、65 巻、2013、179-194、

J-GLOBAL ID: 201302235672002097

Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, Nakamura M, McKeel DW Jr, Tabaton M, Lee HG, Smith MA, Perry G, Zhu X, The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 査読有、71 巻、2012、233-241、

DOI:10.1097/NEN.0b013e318248e614

Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G, Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders, *Neurotoxicity Research*, 査読有、22 巻、2012、231-248、

DOI: 10.1007/s12640-012-9331-x

Santos RX, Correia SS, Zhu X, Lee HG, Petersen RB, Nunomura A, Perry G, Smith MA, Moreira PI, Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer's disease, *Free Radical Research*, 査読有、46 巻、2012、565-576、

DOI: 10.3109/10715762.2011.648188

Bonda DJ, Castellani RJ, Zhu X, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA, A novel perspective on tau in Alzheimer disease, *Current Alzheimer Research*, 査読有、8(6):639-642, 2011

DOI: 10.2174/156720511796717131

布村明彦, 玉置寿男、認知症学 (下)

その解明と治療の最新知見 *Vascular cognitive impairment*, 日本臨床、査読無、69 巻 増刊号 10、2011、325-330、J-GLOBAL ID: 201102268280459472

布村明彦、アルツハイマー病根本治療薬の開発、*精神科*、査読無、19 巻、2011、502-508、

J-GLOBAL ID: 201202284976361275

布村明彦、アルツハイマー病: 予防診療の進歩、*最新医学*、査読無、66 巻 9 月増刊号、2011、2133-2145、

J-GLOBAL ID: 201102210946622677

[学会発表](計 12 件)

布村明彦、RNA 酸化傷害と認知症疾患、第 33 回日本認知症学会学術集会シンポジウム(招待講演)、2014 年 11 月 29 日~12 月 1 日、パシフィコ横浜(横浜市)

布村明彦、精神疾患の病態における酸化ストレスの役割、第 110 回日本精神神経学会学術総会シンポジウム(招待講演)、2014 年 6 月 26 日~28 日、パシフィコ横浜(横浜市)

布村明彦、ストレスと認知症、第 14 回日本抗加齢医学会総会シンポジウム(招待講演)、2014 年 6 月 6 日~8 日、大阪国際会議場(大阪市)

Nunomura A, Oxidative RNA damage in diverse neuropsychiatric disorders, 8th Brain Research Conference RNA Metabolism in Neurological Disease, 2013 年 11 月 7 日~8 日、Sheraton San Diego Hotel and Marina, San Diego, CA, USA

Nunomura A, Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders, 11th International Conference on Environment Mutagens(招待講演)、2013 年 11 月 3 日~8 日、Bourbon Convention & Spa Resort Cataratas do Iguass, Foz do Iguass, PR, Brazil

Nunomura A, Oxidative RNA damage and repair, 5th Meeting in Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis(招待講演)、2013 年 10 月 31 日~11 月 2 日、University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

布村明彦、酸化ストレス仮説に基づくアルツハイマー病治療法開発の現状と展望、第 54 回日本神経学会 企画シンポジウム(認知症領域)(招待講演)、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)

布村明彦、多様な精神神経疾患における酸化傷害: 早期介入のターゲットとしての重要性、第 109 回日本精神神経学会 トピック・フォーラム 10(招待講演)、2013 年 5 月 23 日~25 日、福岡国際会議場(福岡市)

布村明彦、酸化ストレスと精神神経疾患、

第 109 回日本精神神経学会シンポジウム  
10 (招待講演)、2013 年 5 月 23 日~25  
日、福岡国際会議場 (福岡市)

Nunomura A, Neuronal RNA oxidation in  
age-related neurodegenerative  
disorders, 2nd Annual World Congress of  
NeuroTalk-2011 (招待講演)、2011 年 5  
月 22 日~25 日、Dalian World EXPO Center,  
Dalian, China

布村明彦、第 30 回日本認知症学会 (招待  
講演)、Preclinical AD 脳と MCI 脳を分  
ける変化: 酸化傷害 (Oxidative Damage)、  
2011 年 11 月 11 日~13 日、タワーホール  
船堀 (東京都江戸川区)

布村明彦、第 30 回日本認知症学会、加齢、  
preclinical AD、および MCI 脳における  
神経細胞内 RNA の酸化傷害、2011 年 11  
月 11 日~13 日、タワーホール船堀 (東  
京都江戸川区)

#### [図書] (計 6 件)

布村明彦、認知症の診断、精神医学的診  
察、In: 認知症ハンドブック、中島健二、  
天野直二、下濱 俊、富本秀和、三村 将  
(編) 医学書院、東京、2013、133-140  
Castellani RJ, Marlatt MW, Nunomura A,  
Moreira PI, Lee HG, Casadesus G, Zhu X,  
Perry G, Smith MA, Thinking outside the  
box in Alzheimer disease treatment,  
In: Development of Therapeutic Agents,  
Gad SC (Ed) John Wiley & Sons, Inc.,  
Hoboken, NJ, 2011, 929-942

Perry G, Mondragón-Rodríguez S,  
Nunomura A, Zhu X, Moreira P, Smith MA,  
Oxidative stress and balance in  
neurodegenerative diseases、 In:  
Neurodegeneration: The Molecular  
Pathology of Dementia and Movement  
Disorders, 2nd Edition, Dickson DW,  
Weller RO (Eds) International Society  
of Neuropathology, Wiley-Blackwell,  
Hoboken, NJ, 2011, 10-12

布村明彦、認知症とうつ病、In: 精神科  
研修ノート、笠井清登、村井俊哉、三村 将、  
岡本泰昌、大島紀人 (編) 診断と治療社、  
東京、2011、309-311

布村明彦、神経疾患の脳研究から見た精  
神疾患研究の難しさ、In: 脳バンク 精  
神疾患の謎を解くために、加藤忠史 (編)  
光文社新書、東京、2011、77-85

Chang J, Siedlak S, Moreira P, Nunomura  
A, Castellani RJ, Smith MA, Zhu X,  
Perry G, Casadesus G, Oxidative stress  
in Alzheimer's disease: a critical  
appraisal of the causes and the  
consequences、 In: Studies on  
Experimental Models: Oxidative Stress  
in Applied Basic Research and Clinical  
Practice, Part 3, Basu S, Wiklund L  
(Eds) Springer Science+Business Media

LLC, New York, 2011, 211-220

[その他]

ホームページ

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_Display.Scholar?ID=7A340E6805978836](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar?ID=7A340E6805978836)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

布村 明彦 (NUNOMURA Akihiko)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号: 60241436