

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670416

研究課題名(和文) ナノ粒子薬物送達システムによる、アルツハイマー病の酸化ストレス除去療法の開発

研究課題名(英文) Trial to develop oxidative stress erasing therapy to treat Alzheimer disease using redox nanoparticles

研究代表者

富所 康志 (Tomidokoro, Yasushi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447250

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)：活性酸素除去能力を有するナノ粒子薬物送達システムを臨床展開し、アルツハイマー病患者の認知症発症抑制療法の開発へつなげることが可能か基礎的検討を行った。ラジカル補足剤を導入したレドックスナノ粒子を合成し、遺伝子改変アルツハイマー病モデルマウスTg2576へ投与したが、記憶障害や神経病理学的・生化学的変化のいずれも有意な改善が得られなかった。一方その過程において、交付申請書に記したごとく遺伝子改変動物の神経病理学的・生化学的評価に使用することを目的として合成ペプチドや生体試料による毒性A $\beta$ コンホマー特異抗体の検定を行う中で、毒性コンホマー同定法を確立し、新規診断・治療法開発につながる新知見を得た。

研究成果の概要(英文)：To test the ability for redox nanoparticles therapeutics to suppress the development of dementia in Alzheimer disease patients, redox nanoparticles which have capacity to reduce active oxygen, were administrated to Tg2576 mice. Unfortunately, treated mice did not show improvement in either behavioral, neuropathological or biochemical aspects. However, during the process of the study, as described in the grant application, antibody specific to toxic A $\beta$  conformer was evaluated with synthetic peptides, autopsied Alzheimer brains and CSF in order to use the new antibody for biochemical and immunopathological examinations of the mice. Consequentially, the method to detect toxic A $\beta$  conformer in biological samples was established and new aspects were obtained, which leads us a new insight to develop noble strategy to diagnose and treat Alzheimer disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド

#### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知症の代表的な原因疾患の一つである。アルツハイマー病のバイオマーカーの発展に伴い、認知症を発症する前の段階、すなわち、アルツハイマー病の前臨床段階やアルツハイマー病による軽度認知機能障害の段階での生化学的診断が可能となりつつあり、先制的に認知症発症を抑制する治療法の開発が喫緊の課題である。

アルツハイマー病脳では、アミロイド

(A $\beta$ ) 分子の重合と非線維性低分子重合体(オリゴマー)の形成がその病態に関して重要であり、引き続いてタウたんぱく質の沈着(タウオパチー)やシナプス・神経細胞の減少を生じると考えられている(アミロイドカスケードとオリゴマー仮説)。これまでの一連の先行研究から、アルツハイマー病患者脳では A $\beta$  産生ならびに A $\beta$  オリゴマーの形成・蓄積と酸化ストレスの間に悪性のサイクルが存在して神経障害が促進されていると考えられる。これまでもビタミンなどを用いた抗酸化療法が試みられるも十分な有効性が得られなかったが、抗酸化作用が不十分である可能性が考えられた。したがって、強力な、これまでにない酸化ストレス抑制療法により、アルツハイマー病患者の脳内での病的なプロセスであるアミロイドカスケードの進展と二次性の神経細胞障害、ひいては認知機能の低下を予防・抑制できる可能性があると考えられた。

#### 2. 研究の目的

筑波大学数理物質系の長崎研究室の開発したナノ粒子薬物送達システムは強力な活性酸素消去能力を有し、これまでにない酸化ストレス抑制療法を可能せしめるものと考えられた。このシステムを臨床展開し、前臨床期ないし軽度認知機能障害の段階の超早期のアルツハイマー病の患者における認知症発症抑制療法の開発を推進するための基礎的検討を行うこととした。慢性の中枢神経疾患であるアルツハイマー病に対しても本システムが有効か明らかにするために、アルツハイマー病のモデル動物を用いて検証することとした。

#### 3. 研究の方法

既に確立されアルツハイマー病の根本的治療法の開発に使用されている遺伝子改変アルツハイマー病モデル動物である Tg2576 マウスに対し、ラジカル捕捉剤を導入したレドックスナノ粒子を学習機能障害や脳内に A $\beta$  沈着が生じる以前の 3 か月齢から経口投与し、A $\beta$  オリゴマー蓄積の抑制や二次性のシナプス障害・タウオパチー、認知機能障害などアミロイドカスケードの A $\beta$  アミロイドシスから下流の部分の障害を抑制できるか検討した。

#### 4. 研究成果

連携研究者との協力のもと、ラジカル補足剤を導入したレドックスナノ粒子の合成を行った。アミロイド沈着と学習記憶障害を示す遺伝子改変動物 Tg2576 rd1 マウスを導入・飼育し、レドックスナノ粒子の投与を行った。モリス水迷路試験にて記憶障害の評価を行い、投与後にはマウスを剖検し以下の検討を行った。マウス脳内の A $\beta$  沈着量やタウ蛋白沈着を、毒性 A $\beta$  コンホマー特異抗体 11A1 を含めた様々な抗 A $\beta$  特異抗体や抗タウ抗体を用いるなどして免疫組織化学的に評価した。また、脳のホモジェネートを作成しホモジェネート中の A $\beta$  分子の量や重合度を特異的サンドイッチ Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) 法や免疫沈降法(IP)、ウエスタンブロット法にて測定するなどして生化学的に評価した。

しかしながら、以上の方法による今回の検討では、残念なことに、Tg2576 マウスでみられる記憶障害や神経病理学的・生化学的变化について、レドックスナノ粒子送達投与による有意な改善を確認することができなかった。

今回の評価にも用いられた毒性 A $\beta$  コンホマー特異抗体 11A1 は、近年、京都大学農学部入江研究室で新たに開発された抗体である。入江らは、アルツハイマー病における“毒性 A $\beta$  コンホマー仮説”を提唱し、毒性 A $\beta$  コンホマー特異抗体 11A1 は生体試料中で様々な A $\beta$  分子種の中から毒性 A $\beta$  コンホマーを識別・同定することを可能せしめる能力があるものと期待された。A $\beta$  は 38~42 アミノ酸残基程度のアミノ酸からなるが、中央部にヘアピン様の折りたたみ構造を有する。第 22~23 位のアミノ酸でターン構造を有する A $\beta$  分子は他の部位でターン構造を有する A $\beta$  に比べて神経毒性並びに酸化ストレス誘導能が高いことが報告された。したがって、毒性 A $\beta$  コンホマー特異抗体 11A1 は、今回のレドックスナノ粒子送達システムによる A $\beta$  分子由来の酸化ストレス消去療法の評価に有用と考えられた。しかし、抗体 11A1 による生体試料中の毒性 A $\beta$  コンホマーの検出法は確立しておらず、それゆえに生体試料中に実際に毒性 A $\beta$  コンホマーが存在するのかも明らかでなかった。

そこで本研究では、交付申請書に記したごとく、レドックスナノ粒子送達システムを用いた酸化ストレス消去療法による治療効果判定に使用することを目的として、毒性 A $\beta$  コンホマー特異抗体 11A1 による生体試料中の毒性コンホマーを同定する方法ならびに本抗体による結果の妥当性を本研究内で明らかにしておく必要があった。そこで、定法に従い、合成ペプチドやアルツハイマー病並びに対照患者剖検脳(ホルマリン固定パラフィン包埋組織ならびに凍結組織)、アルツハイマー病並びに対照患者脳脊髄液などを用いて、既に確立され汎用されている既存の A $\beta$

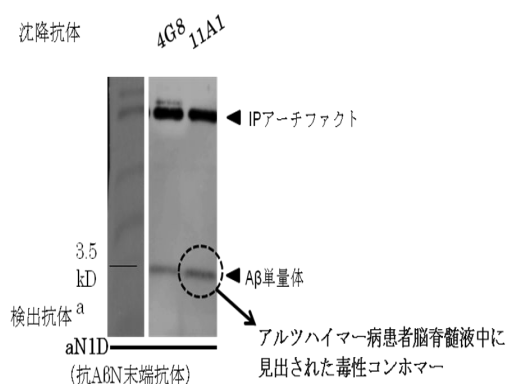
ウスモノクローナル抗A抗体4G8と比較し、その有用性・妥当性を免疫組織学的ならびに生化学的に評価した。4G8抗体は、そのエピトープ（第18位のバリン～第22位のグルタミン酸残基）が11A1のエピトープ（第22位のグルタミン酸残基～第23位のアスパラギン酸残基）に近いために対照として採用された。

その過程において、

- (1) 通常ウエスタンブロット法ではゲルやサンプルにドデシル硫酸ナトリウムが含まれ、その化学的特性を利用してたんぱく質の分析が行われる。しかし、毒性Aコンホマー特異抗体11A1は毒性ターンの認識する立体構造特異的な抗体であるため、ドデシル硫酸ナトリウムにより抗体11A1のエピトープが破壊され、同抗体を検出抗体とした通常ウエスタンブロット法では毒性Aコンホマーの検出と評価が困難となる。
- (2) 毒性Aコンホマーを検出するためには毒性Aコンホマー特異抗体を用いた免疫沈降法をウエスタンブロット法に先駆けて行い、これら2つの方法を組み合わせることが有効である。
- (3) 免疫組織病理学的検討から、毒性Aコンホマーは非毒性コンホマーと同様にアルツハイマー病患者剖検脳の老人斑やアミロイド血管症の血管、軟膜などに沈着する。
- (4) 認知症の明らかでなかった対照神経疾患患者剖検脳に沈着した老人斑にも既に毒性Aコンホマーが沈着している。
- (5) 生化学的検討から、アルツハイマー病剖検脳から実際に抽出された毒性Aコンホマーは、先行研究で既に報告・想定されたA<sup>-</sup>(1-42)に限定されず、実際にはN-/C-末端が不均一であり様々な分子種が含まれる。
- (6) 毒性Aコンホマーが高齢のアルツハイマー病患者脳脊髄液（図）や同年齢の対照神経疾患患者脳脊髄液中に同程度の量で見いだされる。
- (7) 高齢者のみならず、10歳代を含めた若年の対照神経疾患患者脳脊髄液にも毒性Aコンホマーが見いだされる。

など、複数の新たな知見が明らかになった。

これらのことから、毒性Aコンホマーがヒト脳ならびに脳脊髄液中に実際に存在することが示されたことで、毒性Aコンホマーの形成抑制という新たな治療戦略が今後検討すべき課題として浮上するとともに、脳脊髄液中の毒性Aコンホマーが、現在使用されている脳脊髄液中のA



図：アルツハイマー病患者脳脊髄液に見出された毒性Aコンホマー

- (1-42) に比べてよりよいサロゲートマーカーとなりうるのか検討すべきと考えられた。すなわち、アルツハイマー病の超早期診断のための客観的診断マーカーとなることに加えて先制医療の標的となり、かつその効果を反映するマーカーとなりうるのか検討することが、今後のアルツハイマー病の発症前超早期診断と先制医療を開発する上で重要と考えられた。

以上、レドックスナノ粒子送達システムによる酸化ストレス抑制療法を用いてモデル動物におけるA<sup>-</sup>沈着と認知機能障害を抑制する試みには成功しなかったが、交付申請書に記したごとく当初から予定していたその準備と評価の過程で、生体試料における毒性Aコンホマー評価法を確立するとともにアルツハイマー病の新たなサロゲートマーカーと根本的治療法開発にかかわる新たな知見を得た。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 富所康志他、非認知症神経疾患患者脳ならびに脳脊髄液中の毒性Aコンホマーの検討、第34回日本認知症学会学術集会、2015年10月2-4日、リンクステーション青森（青森県青森市）
- (2) Yasushi Tomidokoro 他、Toxic A conformer is present in brains and cerebrospinal fluid obtained from non-demented individuals、27<sup>th</sup> Alzheimer Association International Conference、2015年7月18-23日、ワシントンDC（米国）
- (3) Yasushi Tomidokoro 他、Analysis of toxic A conformer in brains and cerebrospinal fluid obtained from non-demented individuals、第56回日本神経学会学術大会、2015年5月20-23日、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）
- (4) 富所康志他、AD脳ならびに脳脊髄液中の

毒性 A コンホマー同定の試み、第 33 回  
日本認知症学会学術集会、2014 年 11 月  
29 日-12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈  
川県横浜市）

- (5) Yasushi Tomidokoro 他、Biochemical analysis of A toxic conformer in human autopsied brains and cerebrospinal fluid、26<sup>th</sup> Alzheimer Association International Conference、2014 年 7 月 12-17 日、コペンハーゲン（デンマーク）
- (6) 冨所康志他、毒性 A コンフォーマーのヒト脳ならびに脳脊髄液における生化学的同定の試み、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 21-24 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）
- (7) Yasushi Tomidokoro 他、Biochemical analysis of toxic conformer of A isolated from AD brains.、25<sup>th</sup> Alzheimer Association International Conference、2013 年 7 月 13-18 日、ボストン（米国）
- (8) 冨所康志他、Alzheimer 病患者脳における高毒性 A コンフォーマーの同定、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）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

冨所 康志 (Tomidokoro, Yasushi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447250

### (2) 研究分担者

石井 一弘 (Ishii, Kazuhiro)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70323293

玉岡 晃 (Tamaoka, Akira)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50192183

### (3) 連携研究者

長崎 幸男 (Nagasaki, Yukio)

筑波大学・数理物質系・教授

研究者番号：90198309

### (4) 研究協力者

小出 拓也 (Koide, Takuya)