

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461266

研究課題名(和文) 高速AFM(原子間力顕微鏡)を用いたアルツハイマー病の病因因子A 凝集機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of Abeta aggregation mechanism using high-speed atomic force microscopy

研究代表者

小野 賢二郎(Ono, Kenjiro)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70377381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドタンパク質(A β)の線維への凝集は、アルツハイマー病に關与する。我々は、高速原子間力顕微鏡を使用してA β 1-42による線維形成過程を調べた。その結果、A β 1-42は2つの異なる線維形成様式を示し、一方は直線型線維を形成し、他方は螺旋型線維を形成する。各線維は初期の線維構造に依存するが、ある線維様式から別の様式への切り替えが時々観察され、線維末端構造が2つの様式間で変動したことが示唆された。このスイッチング現象は、緩衝塩組成によって影響された。我々の知見は、線維形成後に線維構造の多型が起こり、環境条件の変化によって影響を受けることを示している。

研究成果の概要(英文)：Aggregation of amyloid β -protein (A β) into insoluble amyloid fibrils is implicated in Alzheimer's disease (AD). The elucidation of the structural features and assembly kinetics of A β has been an area of intense study. We performed high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) studies of fibril formation and elongation by A β 1-42. Our data demonstrate two different growth modes of A β 1-42, one producing straight fibrils and the other producing spiral fibrils. Each mode depends on initial fibril nucleus structure, but switching from one growth mode to another was occasionally observed, suggesting that fibril end structure fluctuated between the two growth modes. This switching phenomenon was affected by buffer salt composition. Our findings indicate that polymorphism in fibril structure can occur after fibril nucleation and is affected by relatively modest changes in environmental conditions.

研究分野：神経内科学、神経化学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 蛋白 高速原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) の病理学的特徴は、老人斑、神経原線維変化、神経細胞の消失であり、なかでもアミロイド 蛋白 (A_β) の凝集こそが、AD の発症機序に多く関与すると考えられている。A_β が凝集して A_β 線維が形成されていく過程は、重合核依存性重合モデルに従うとされている。近年、最終段階である A_β 線維より、早期の凝集段階であるオリゴマーやプロトファイブリル (protofibrils: PF) の方がより毒性が強いとされ注目されているが、これらの早期凝集体もこの重合核依存性重合モデルに従うとされている。

2. 研究の目的

AD における病態解明、新たな予防・治療法の開発に向けて A_β 凝集過程を高速 AFM (原子間力顕微鏡) を用いてリアルタイムで観察する試験管内モデルを開発・確立し、詳細な A_β 凝集過程を明らかにする。

3. 研究の方法

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて A_β 42 溶液をインジェクトし、主にモノマーである low molecular weight peak (LMW) と PF を抽出する。高速 AFM を用いて LMW、PF をインキュベートして各々の A_β 線維形成過程を調べる。LMW をミリセチンと共にインキュベートして A_β 42 線維形成に及ぼすフェノール化合物の影響を観察する。LMW、PF をインキュベートして継時的に AFM の観察と共に SEC を用いて各分画の変化を調べる。

4. 研究成果

SEC を用いて LMW と PF の peak の抽出を行った。LMW のインキュベートにより A_β 42 線維が stepwise に形成されるだけでなく、線維伸長には一方向優位性があることが分かった。フェノール化合物 (ミリセチン) は A_β 42 線維形成を抑制するがその効果は可逆的であった。PF のインキュベートでは、LMW のインキュベートですでに十分な A_β 42 線維が形成される時間が経過しても十分な線維形成は認められなかった。更に高速 AFM にて PF のインキュベートの過程で PF の高さが時間を経るごとに減少する脱重合過程を捉えると共に SEC を用いて PF 分画の減少と共に LMW 分画が一時的に増加することが分かり、PF は一旦 LMW に脱重合してから線維形成過程に向かう可能性が示唆された。

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 26 件)

Ibrahim NF, Yanagisawa D, Durani LW, Hamezah HS, Damanhuri HA, Wan Ngah WZ, Tsuchi M, Kiuchi Y, Ono K, Tooyama I.

Tocotrienol-rich fraction modulates amyloid pathology and improves cognitive function in A_β PP/PS1 mice. *J Alzheimers Dis.* 査読有, 55, 597-612, 2017, DOI:10.3233/JAD-160685

Noguchi-Shinohara M, Komatsu J, Samuraki M, Matsunari I, Ikeda T, Sakai K, Hamaguchi T, Ono K, Nakamura H, Yamada M. Cerebral amyloid angiopathy-related microbleeds and cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 査読有, 55, 905-913, 2017, DOI:10.3233/JAD-160651

村上秀友、小野賢二郎、MELAS による脳卒中様発作。Brain and Nerve、査読無、69、111-117、2017、DOI:10.11477/mf.1416200650

Murakami H, Momma Y, Nohara T, Mori Y, Futamura A, Sugita T, Ishigaki S, Katoh H, Kezuka M, Ono K, Miller MW, Kawamura M. Improvement in language function correlates with gait improvement in drug-naïve Parkinson's disease patients taking dopaminergic medication. *J Parkinsons Dis.* 査読有, 6, 209-217, 2016, DOI:10.3233/JPD-150702

Umeda T, Ono K, Sakai A, Yamashita M, Mizuguchi M, Klein WL, Yamada M, Mori H, Tomiyama T. Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid- and tau oligomers. *Brain.* 査読有, 139, 1568-1586, 2016, DOI:10.1093/brain/aww042

Watanabe-Nakayama T*, Ono K*, Itami M, Takahashi R, Teplow DB, Yamada M. *Equally contributed. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid 1-42 aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 113, 5835-5840, 2016, DOI:10.1073/pnas.1524807113

小野賢二郎、山田正仁：パーキンソン病の認知障害のバイオマーカー。Dementia Japan、査読無、30、223-228、2016

石垣征一郎、小野賢二郎：アルツハイマー型認知症および認知症の疫学研究、Pharma Medica、査読無、34、9-12、2016、http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ai1phtml/2016/003407/002&name=0009-0012j&UserID=202.254.227.190&base=jamas_pdf

- ②4 Takahashi R, Ono K, Shibata S, Nakamura K, Komatsu J, Ikeda Y, Ikeda T, Samuraki M, Sakai K, Iwasa K, Kayano D, Yamada M. Efficacy of diflunisal on autonomic dysfunction of late-onset familial amyloid polyneuropathy (TTR Val30Met) in a Japanese endemic area. J Neurol Sci. 査読有, 345, 231-235, 2014, DOI:10.1016/j.jns.2014.07.017
- ②5 Iwasa K, Yoshikawa H, Samuraki M, Shinohara M, Hamaguchi T, Ono K, Nakamura H, Yamada M. Myasthenia gravis: predictive factors associated with the synchronized elevation of anti-acetylcholine receptor antibody titer in Kanazawa, Japan. J Neuroimmunol. 査読有, 267, 97-101, 2014, DOI:10.1016/j.jneuroim.2013.12.011
- ②6 Varghese M, Ho L, Wang J, Zhao W, Levine S, Ono K, Mannino S, Pasinetti GM. Green coffee as a novel agent for Alzheimer's disease prevention by attenuating diabetes. Translational Neuroscience. 査読無, 5, 111-116, 2014, DOI:10.2478/s13380-014-0213-y

[学会発表](計40件)

Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Mizuguchi M, Hamaguchi T, Yamada M. Exogenous amyloidogenic proteins function as seeds in A aggregation. Neuroscience 2016, November 12-16, 2016, San Diego convention center (San Diego, アメリカ)

Murakami H, Ishigaki S, Katoh H, Ono K. 123I-loflupane SPECT predicts the efficacy of selegiline monotherapy for motor symptoms in drug-naive Parkinson's disease. Neuroscience 2016, November 12-16, 2016, San Diego convention center (San Diego, アメリカ)

小野賢二郎: 早期凝集体に焦点を当てたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発、第35回日本認知症学会学術集会、2016.12.1-3、東京国際フォーラム(東京)

小野賢二郎、中山隆宏、伊丹将大、高橋良一、David Teplow、山田正仁: 高速原子力間顕微鏡を用いた A_β42 凝集過程の観察、2016.12.1-3、東京国際フォーラム(東京)

村上秀友、石垣征一郎、加藤大貴、小野賢二郎: Parkinson 病初発例の運動症状に対するドパミン作動薬の効果と DAT スキャン所見との関連、第34回日本神経治療学

会総会、2016.11.3-5、米子コンベンションセンター/米子市文化ホール(米子)

小野賢二郎: 非薬物的アプローチからアルツハイマー型認知症を考える、第11回日本リハビリテーション医学会専門医会学術集会、2016.10.29-30、金沢市文化ホール(金沢)

小野賢二郎: アルツハイマー型認知症の診断と治療、第146回日本神経学会東海北陸地方会、2016.10.29、石川県地場産業振興センター(金沢)

小野賢二郎: オリゴマオパチーとしてのアルツハイマー病、第21回日本神経感染症学会総会・学術大会、2016.10.21-22、金沢東急ホテル(金沢)

小野賢二郎: アルツハイマー型認知症の診断と治療、第55回全国自治体病院学会、2016.10.20-21、富山県民会館/富山第一ホテル(富山)

金野竜太、黒川信二、大湾喜行、二村明憲、四郎丸あずさ、笠井英世、黒田岳志、矢野怜、石垣征一郎、村上秀友、小野賢二郎: 進行性非流暢性/失文法性失語の脳血流部位に関する研究、第21回日本神経精神医学会、2016.9.17-18、くまもと県民交流館パレア(熊本)

小野賢二郎: 2016年度日本神経化学会優秀賞受賞講演: オリゴマー仮説に基づいたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発、第59回日本神経化学会大会・第38回日本生物学的精神医学会合同年会、2016.9.8-10、福岡国際会議場(福岡)

小野賢二郎: A 凝集過程と阻害薬開発、第4回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2016.8.19、KKRホテル東京(東京)

小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、水口峰之、瀧口毅、山田正仁: 外因性アミロイド蛋白のアミロイド 蛋白凝集へのクロス・シーディング効果、第4回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2016.8.19、KKRホテル東京(東京)

佐村木美晴、松成一朗、吉田光宏、島啓介、篠原もえ子、瀧口毅、小野賢二郎、山田正仁: アルツハイマー病における脳アミロイドアンギオパチー関連微小出血と脳脊髄液バイオマーカーとの関連、第4回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2016.8.19、KKRホテル東京(東京)

小野賢二郎:オリゴマー仮説に基づいたアルツハイマー型認知症治療薬の研究、第7回日本脳血管・認知症学会学術大会、2016.8.6、金沢都ホテル(金沢)

佐村木美晴、松成一朗、吉田光宏、島啓介、篠原もえ子、瀧口毅、小野賢二郎、山田正仁:アルツハイマー病における脳アミロイドアンギオパチー関連微小出血と脳糖代謝・灰白質容量との関係、第7回日本脳血管・認知症学会学術大会、2016.8.6、金沢都ホテル(金沢)

篠原もえ子、小松潤史、佐村木美晴、松成一朗、池田篤平、坂井健二、瀧田毅、小野賢二郎、山田正仁:アルツハイマー病における微小出血と脳脊髄液バイオマーカーとの関連、第7回日本脳血管・認知症学会学術大会、2016.8.6、金沢都ホテル(金沢)

小野賢二郎:関東地区推薦講演:A凝集に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発、第30回老年期認知症研究会、2016.7.30、コクヨホール(東京)

小野賢二郎:オリゴマー仮説に基づいたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発、第39回日本神経科学大会、2016.7.20-21、パシフィコ横浜(横浜)

山田正仁、篠原もえ子、小野賢二郎、瀧口毅:食品関連因子による認知症予防・治療法の開発、第58回日本老年医学会学術集会、2016.6.8-10、石川県立音楽堂/ANAクラウンプラザホテル/金沢市アートホール(金沢)

- ⑳ 小野賢二郎:アルツハイマー型認知症の診断と治療、第57回日本神経学会学術大会、2016.5.18-21、神戸コンベンションセンター/神戸ポートピアホテル(神戸)
- ㉑ 小野賢二郎:2015年度日本神経学会賞受賞講演:フェノール化合物に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬の開発、第57回日本神経学会学術大会、2016.5.18-21、神戸コンベンションセンター/神戸ポートピアホテル(神戸)
- ㉒ 小野賢二郎:アルツハイマー病の病態研究の最前線:オリゴマーの実体とは何か?、第57回日本神経学会学術大会、2016.5.18-21、神戸コンベンションセンター/神戸ポートピアホテル(神戸)
- ㉓ 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、水口峰之、瀧口毅、山田正仁:Exogenous amyloid proteins function as seeds in amyloid β -protein aggregation. 第57回日本神経学会学術大会、2016.5.18-21、

神戸コンベンションセンター/神戸ポートピアホテル(神戸)

- ㉔ 篠原もえ子、小松潤史、佐村木美晴、松成一朗、池田篤平、坂井健二、瀧口毅、小野賢二郎、山田正仁:アルツハイマー病におけるCAA関連微小出血と脳脊髄液バイオマーカーとの関連、第57回日本神経学会学術大会、2016.5.18-21、神戸コンベンションセンター/神戸ポートピアホテル(神戸)
- ㉕ 小野賢二郎:アミロイド仮説に基づいたアルツハイマー型認知症の予防・治療薬開発、第89回日本薬理学会年会、2016.3.9-11、パシフィコ横浜(横浜)
- ㉖ Ono K, Takasaki J-I, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Effects of antiparkinsonian agents on β -amyloid and α -synuclein Oligomer formation in vitro. Neuroscience 2015, October 17-21, 2015, Chicago(America)
- ㉗ 小野賢二郎:現在のAD治療と予防・治療薬の開発、第39回日本高次脳機能障害学会学術総会、2015.12.10-11、ベルサール渋谷ファースト(東京)
- ㉘ 小野賢二郎:病態に基づいたアルツハイマー型認知症の予防・治療薬開発、第25回日本医療薬学回年会、2015.11.21-23、パシフィコ横浜(横浜)
- ㉙ 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、水口峰之、瀧口毅、山田正仁:外因性アミロイド蛋白のアミロイド β 蛋白凝集へのクロス・シーディング効果、第34回日本認知症学会学術集会、2015.10.2-4、リンクステーション青森(青森)
- ㉚ 小野賢二郎、高橋良一、山田正仁:有機化合物に焦点をあてたシヌクレイン凝集抑制薬の開発、第56回日本神経学会学術集会、2015.5.20-23、朱鷺メッセ(新潟)
- ㉛ 小野賢二郎、高橋良一、山田正仁:有機 Positioning of early aggregates of A β in its aggregation process. 第56回日本神経学会学術集会、2015.5.20-23、朱鷺メッセ(新潟)
- ㉜ Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2014, July 12-17, 2014, Copenhagen(Denmark)

- ③4 小野賢二郎、高崎純一、高橋良一、池田篤平、山田正仁：抗パーキンソン病薬のアミロイド 蛋白及び シヌクレイン蛋白のオリゴマー形成抑制、第 33 回日本認知症学会学術集会、2014.11.29-12.1、パシフィコ横浜（横浜）
- ③5 小野賢二郎、山田正仁：バイオマーカーの視点から PD の認知障害を考える、第 33 回日本認知症学会学術集会、2014.11.29-12.1、パシフィコ横浜（横浜）
- ③6 小野賢二郎、山田正仁：病態に基づいた Alzheimer 病の予防・治療薬の開発、第 32 回日本神経治療学会総会、2014.11.20-22、東京ドームホテル（東京）
- ③7 Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M : Cross-seeding effects of amyloid -protein and -synuclein. 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014、2014.9.11-13、パシフィコ横浜（横浜）
- ③8 小野賢二郎、高橋良一、池田篤平、山田正仁：アミロイド 蛋白と シヌクレイン蛋白のクロス・シーディング効果、第 2 回日本アミロイドーシス研究会学術集会、2014.8.22、KKR ホテル東京（東京）
- ③9 小野賢二郎：第 10 回十全医学賞受賞記念講演 フェノール化合物に焦点をあてたアルツハイマー病の予防・治療薬開発、平成 26 年度金沢大学十全医学会学術集会、2014.6.24、金沢大学十全講堂（金沢）
- ④0 Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M : Cross-seeding effects of amyloid -protein and -synuclein. 第 55 回日本神経学会学術大会、2014.5.21-24、福岡国際会議場（福岡）

〔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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小野 賢二郎 (ONO, Kenjiro)
 昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70377381

(2) 研究分担者

()
 研究者番号：

(2) 連携研究者

山田 正仁 (YAMADA, Masahito)
 金沢大学・医学系・教授

研究者番号：80191336

中山 隆宏 (NAKAYAMA, Takahiro)
 金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・
 助教

研究者番号：00532821

(4) 研究協力者

()