

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670126

研究課題名(和文) A 蛋白クリアランス促進を基軸としたアルツハイマー病の新規治療戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease based on the promotion of clearance mechanism of amyloid beta protein

研究代表者

岩佐 健介 (Iwasa, Kensuke)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：00623703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見出した天然資源由来成分Xは、アルツハイマー病の原因タンパク質とされるA<sub>42</sub>を細胞レベルで増加させる。しかしXを長期投与したマウスでは、対象群と比較して脳内A<sub>42</sub>産生量が減少しており、記憶学習能が高かった。このためXはA<sub>42</sub>の脳内におけるクリアランス機構を活性化させている可能性が考えられた。本研究により、細胞レベル実験においてXに含まれる活性候補化合物Yを単離・同定した。現在Yを長期投与したマウスを作製している。Y投与マウスの脳内A<sub>42</sub>レベル、記憶学習能を評価し、Yが脳内A<sub>42</sub>のクリアランス機構に与える影響を解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：We found a natural resource derived component X, which increased Alzheimer A<sub>42</sub> protein in cellular level study. However, mice administrated X for long term were decreased A<sub>42</sub> in the brain and showed high level of learning and memory, compared to the control mice. Therefore, it was considered that X may promote the clearance mechanism of A<sub>42</sub> in the brain. In this study, we isolated and identified candidate compound Y from the component X with the cellular level study. We are preparing the mice administrated Y for long term. We are planning to A<sub>42</sub> production and ability of learning and memory in the Y administrated mice, to reveal the A<sub>42</sub> clearance mechanism of candidate compound Y.

研究分野：神経病理

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド タンパク

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は進行性認知障害を呈する神経変性疾患であり、アミロイドβタンパク質(Aβ)の蓄積や神経原線維変化を特徴である。この2つの要因がアルツハイマー病の発症や進行に関与しているとされているが、詳細なメカニズムは不明である。これまで世界中でAβ軽減療法が検討されたが未だ良好な結果は得られていない。

そこで我々は逆転の発想により、Aβ42タンパク質を増加させる成分をスクリーニングした。神経系由来細胞によるAβ産生評価系で天然資源天然物1000種類以上を検討し、凝集性が高く病因物質と考えられているAβ42を400%以上増加させる天然資源由来成分X(特許申請のためコード番号とする)を見出した。そこで、マウスに抽出成分Xを投与し、Aβの増加のメカニズムを解析し、新たなアルツハイマー病の新規治療戦略の検討を行う。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)の新規治療戦略としてAβタンパク質枯渇療法を提案する。ADは進行性認知障害を呈する神経変性疾患であり、発症機序はAβの凝集・沈着による神経変性が有力である。申請者は新たに見出した天然資源由来抽出成分X含有飼料を用いて、マウス脳内Aβ42(凝集性が高く病因物質と考えられている)産生とクリアランスを促進させた。12カ月飼育後、X含有飼料飼育マウスは通常飼料飼育マウスに比べ脳内Aβ42が減少し、記憶学習能が高くなっていた。

本研究はさらにX含有飼料飼育マウスを長期に飼育し、Aβ42の産生量の変化、行動の変化を観察する。またXに含まれる活性成分を単離・同定し、Aβ42産生促進・クリアランスのメカニズムを解析し、Aβ枯渇療法を新構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

X:天然資源由来成分 Y:Xより単離する活性化合物 Z:GenetipでXと同様の遺伝子発現を示した既知化合物

### (1) X投与マウスの解析

マウスの平均寿命は約24カ月である。X、飼育マウスと通常飼料飼育コントロールマウスの24カ月齢マウスまでの作製を開始した。Xに含まれる活性成分Y(特許申請のためコード番号とする)が同定され次第、活性化合物Yの24カ月投与マウスの作製も開始する。解析は作業記憶、運動学習、Aβ42の計測を行った。

### (2) Aβ42増加活性成分の単離、活性化学構造解明

スウェーデン型変異を有するヒトAPP695(Aβ産生が著しく増加する変異Aβ前駆体蛋白質)を発現する安定細胞株H4-1NL細胞を用いて、Aβ42産生をELISA法で測定する評価系は確立している。ドッキングスタディーにより得られた情報より活性成分化学構造を予測し、Aβ42産生増加活性を指標に各種クロマトグラフィー(シリカゲルカラム、HPLC)により分画し、活性成分を単離した。

### (3) Xに含まれる活性化合物の遺伝子解析

X飼育マウス脳を用いてGenetip解析を行い、遺伝子を機能別にクラスター化して、発現遺伝子変動を解析している。過去に報告されたGenetipデータとの比較解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) X投与マウスの解析

Xの投与期間は、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月及び24ヶ月で実施した。

マウス大脳皮質におけるAβ42の産生量はELISAを用いて計測した。コントロールでは年齢依存的なAβ42の増加を認めた。一方で、X投与群では3ヶ月においてAβ42の有意な産生量増加が見られ、細胞での結果を再現した。一方で、12ヶ月、24ヶ月においては、減少する傾向が見られた。(Fig.1)

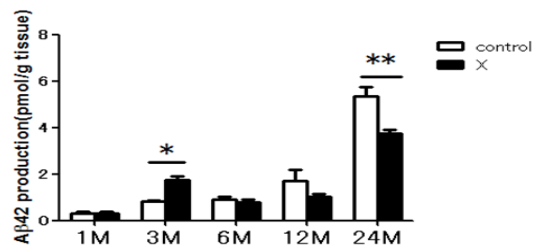


Fig. 1 Aβ42産生量の変化

天然資源由来成分Xは食経験があり人類が通常生活において摂取してきた歴史があり、またX摂取によりアルツハイマー病、認知症が増加したという報告は皆無である。そのためX摂取による一過性Aβ42増加は、アルツハイマー病発症とは無関係である可能性が考えられる。むしろ一過性Aβ42増加により体内Aβ42クリアランス機構が活性化し、その後24ヶ月後においてもAβ42レベルを長期にわたって減少させると考えた。

XがAβ42を増加させるメカニズムについては、Aβの分解酵素であるネプリライシンの発現量をはじめ、いくつかの因子を調べたが、因子の同定は出来なかった。

次に、行動試験を実施した。実施したのは、作業記憶を評価するY-mazeテスト、運動学習を評価するロータロッドなどである。3ヶ月齢では、作業記憶・運動学習レベルに差はなかった。一方、12ヶ月齢に関しては、コン

トロールに比べて、スコアが改善される傾向があった。24ヶ月に関しては、有意な差はなかった。(Fig. 2)

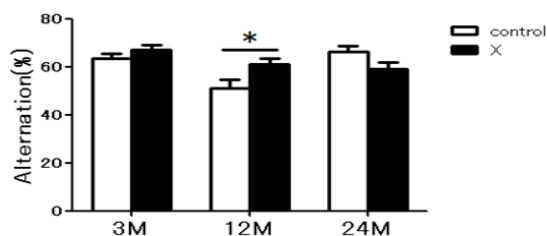


Fig. 2 Y-mazeテストの結果

### (2) Aβ42 増加活性成分の単離

Aβ42 産生増加活性を指標に各種クロマトグラフィーにより分画し、活性成分を単離し、H4-INL 細胞を用いて Aβ42 産生を ELISA 法で測定した。その結果、活性候補化合物 Y を同定した。現在 Y 含有餌で飼育したマウスを作製しており、飼育後 Aβ42 産生量、記憶学習能に与える影響を評価する予定である。

### (3) X に含まれる活性化合物の遺伝子解析

過去に報告された Genetip データとの比較解析を行った結果、Z (特許申請のためコード番号とする) を長期投与したマウス脳における遺伝子発現と X 投与マウスは相同性の非常に高い遺伝子変動をしていることを明らかとした (Fig. 3)

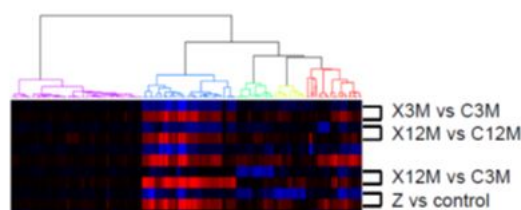


Fig. 3 Genetip解析

### 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6件)

[1] Shimizu Y, Ishikawa M, Gotoh M, Fukasawa K, Yamamoto S, Iwasa K, Yoshikawa K, Murakami-Murofushi K. Quantitative determination of cyclic phosphatidic acid and its carba analog in mouse organs and plasma using LC-MS/MS, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018 Feb 15;1076:15-21. 査読有

[2] Hashimoto M, Yamamoto S, Iwasa K, Yamashina K, Ishikawa M, Maruyama K, Bosetti F, Yoshikawa K. The flavonoid Baicalein attenuates cuprizone-induced demyelination via suppression

of neuroinflammation. *Brain Res Bull.* 2017 Sep 15. pii: S0361-9230(17)30220-4. doi: 10.1016/j.brainresbull.2017.09.007. 査読有

[3] Yamamoto S, Yamashina K, Ishikawa M, Gotoh M, Yagishita S, Iwasa K, Maruyama K, Murakami-Murofushi K, Yoshikawa K. Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease, *J Neuroinflammation.* 2017 Jul 21;14(1):142. doi: 10.1186/s12974-017-0923-5. 査読有

[4] Iwasa K, Yamamoto S, Yagishita S, Maruyama K, Yoshikawa K. Excitotoxicity-induced prostaglandin D<sub>2</sub> production induces sustained microglial activation and delayed neuronal death, *J Lipid Res.* 2017 Apr;58(4):649-655. doi: 10.1194/jlr.M070532. Epub 2017 Feb 7. 査読有

[5] Yagishita S, Suzuki S, Yoshikawa K, Iida K, Hirata A, Suzuki M, Takashima A, Maruyama K, Hirasawa A, Awaji T. Treatment of intermittent hypoxia increases phosphorylated tau in the hippocampus via biological processes common to aging, *Mol. Brain*, 10: 2, 2017, 査読有

[6] Iwasa K, Yamamoto S, Takahashi M, Suzuki S, Yagishita S, Awaji T, Maruyama K, Yoshikawa K. Prostaglandin F<sub>2α</sub> FP receptor inhibitor reduces demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014 Nov;91(5):175-82. doi: 10.1016/j.plefa.2014.08.004. Epub 2014 Sep 6. 査読有

[学会発表](計9件)

[1] 岩佐健介、丸山敬、吉川圭介  
興奮毒性誘発 PGD<sub>2</sub> 産生が持続的ミクログリア活性化と遅発性神経細胞死を引き起こす, 第136回日本薬理学会関東部会, 2017年7月8日, 東京医科歯科大学(東京都文京区)

[2] 岩佐健介、吉川圭介  
興奮毒性誘発 PGD<sub>2</sub> 産生が持続的ミクログリア活性化と遅発性神経細胞死を引き起こす, 第59回日本脂質生化学会, 2017年6月15.16日, 京都大学百周年時計台記念館(京都市左京区)

[3] Yoshikawa K, Yamamoto S, Yamashina K, Iwasa K, Gotoh M, Suzuki M, Maruyama K, Murakami-Murofushi K. Cyclic phosphatidic acid derivative is a novel drug candidate for multiple sclerosis, 第90回日本薬理学会年会, 2017年3月15日~17日, 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

[4] 山本梓司、清水嘉文、後藤真里、橋本真歩、山科孝太、岩佐健介、丸山敬、室伏きみ子、吉川圭介

多発性硬化症の新規治療薬候補・環状ホスファチジン酸誘導体, 第 58 回 日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9,10 日, にぎわい交流館 AU (秋田県秋田市)

[5] 岩佐健介、山本梓司、山科孝太、丸山敬、吉川圭介

Effects of oral bacteria on multiple sclerosis, 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 10 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[6] 岩佐健介、山本梓司、高橋茉莉香、鈴木星也、柳下聡介、淡路健雄、丸山敬、吉川圭介

プロスタグランジン F<sub>2α</sub> FP レセプター阻害は多発性硬化症モデルマウスの神経脱髄と運動障害を改善する, 第 57 回日本脂質生化学会, 2015 年 5 月 28 日, 一橋講堂 (東京都千代田区)

[7] 岩佐健介、山本梓司、高橋茉莉香、鈴木星也、柳下聡介、淡路健雄、丸山敬、吉川圭介

Prostaglandin F<sub>2</sub> FP receptor inhibitor reduces demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, 第 88 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 20 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)

[8] Yoshikawa K, Iwasa K, Yamamoto S, Maruyama K.

Prostaglandin F<sub>2a</sub> FP receptor inhibitor suppress demyelination and motor dysfunction in a cuprizone-induced multiple sclerosis mouse model, NEUROSCIENCE, 2014 年 11 月 15 ~ 19 日, Washington Convention Center. ( Washington DC, USA )

[9] 山本梓司、後藤真里、川村勇樹、岩佐健介、丸山敬、室伏きみ子、吉川圭介

環状ホスファチジン酸は多発性硬化症モデルマウスの神経脱髄と運動障害を改善する, 第 56 回日本脂質生化学会, 2014 年 6 月 6,7 日, 近畿大学東大阪キャンパス (大阪府大阪市)

〔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

<http://saitama-med.ac.jp/uinfo/yakuri/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩佐 健介 ( Kensuke Iwasa )  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究者番号 : 00623703

(2)研究分担者

吉川 圭介 ( Keisuke Yoshikawa )  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 10435860

柳下 聡介 ( Sosuke Yagishita )

国立精神神経医療研究センター・神経研究所  
疾病研究第五部・室長  
研究者番号 : 30585592

(3)連携研究者

近藤 隆一郎 ( Kondo Ryuitiro )  
九州大学・農学研究科・教授  
研究者番号 : 80091370

清水 邦義 ( Kuniyoshi Shimizu )

九州大学・農学研究科・准教授  
研究者番号 : 20346836