

長寿医療研究開発費 課題番号 21 指-22

平成 21~22 年度総合研究報告書

及び

平成 22 年度総括研究報告書

## 高齢者の健康及び疾病状態の把握のための新たなマーカー (遺伝子・蛋白等)の探索と分析に係る研究

主任研究者 新飯田俊平

国立長寿医療研究センター研究所 遺伝子蛋白質解析室・室長

【平成 21~22 年度総合研究報告】血中の生体分子の加齢変化を知る目的で、加齢育成ラットの血漿の多層的オミックス解析 (microRNA 発現解析、プロテオーム解析、メタボローム解析) を行った。その結果、血中には加齢に伴って漸次変化する microRNA、タンパク質、代謝産物が存在することを見いだした。また、血中のマイクロパーティクル (MP) は、炎症モデル動物において鋭敏な炎症マーカーとなる可能性が示された。

一方、ヒト試料のオミックス解析をスタートさせた。中年期から高年期の血漿メタボローム解析では、女性において加齢で漸次変動する 3 種類の代謝産物を同定した。また、認知症患者の microRNA 発現解析では、疾患群で特異的に発現量を変化させる microRNAs を同定した。ヒト歯周炎患者歯肉溝液のプロテオーム解析では新規の病態関連分子群が同定され、うち 1 分子は歯周炎の急性増悪マーカーになる可能性が示された。

【平成 22 年度総括研究報告】当該年度は加齢育成ラット血漿の各オミックス解析とその情報分析ならびに炎症モデル動物の血中 MP の定量解析を行った。健診ドック受検者の血漿メタボローム解析、認知症 (アルツハイマー病及び血管性認知症) 患者の血中 microRNA 発現解析とその情報分析を行った。また、ヒト歯周炎のプロテオーム情報に基づいた検証実験を行い、急性増悪マーカー 1 分子を同定した。

### 【研究班】

|       |       |                            |
|-------|-------|----------------------------|
| 主任研究者 | 新飯田俊平 | 国立長寿医療研究センター研究所・室長         |
| 分担研究者 | 渡辺 淳  | 同所・室長                      |
|       | 滝川 修  | 同所・室長                      |
|       | 徳田治彦  | 同病院・部長                     |
|       | 山本誠士  | 富山大学大学院・助教                 |
|       | 松原悦朗  | 弘前大学大学院・准教授                |
|       | 高田 隆  | 広島大学大学院・教授                 |
|       | 松田直之  | 京都大学医学部附属病院・准教授 (平成 21 年度) |

|       |       |                         |
|-------|-------|-------------------------|
|       | 富本秀和  | 三重大学大学院・教授（平成 22 年度）    |
| 協力研究者 | 脇田英明  | 国立長寿医療研究センター研究所・室長      |
|       | 本山 昇  | 同所・室長                   |
|       | 森脇佐和子 | 同所・研究員                  |
|       | 村松 昌  | 同所・リサーチアシスタント（平成 22 年度） |
|       | 宮内睦美  | 広島大学大学院・准教授             |
|       | 服部裕一  | 富山大学大学院・教授              |

研究期間：平成 21 年 6 月 26 日～平成 23 年 3 月 31 日

## A. 研究目的

超高齢社会となり、高齢者の健康的な生活をできるだけ長期間持続させるという社会的必要性から、新しい医療関連ツールの開発が重要となっている。疾患バイオマーカーもその一つで、高齢化が最大のリスクである認知症や、高齢者が罹患している慢性疾患等の重篤化を予測するバイオマーカーなどのニーズが高まっている。

近年、病態解明や医薬品開発などのライフサイエンス分野では、質量分析装置の性能向上や次世代型高速シーケンサーの登場で、細胞内の転写産物や体液中の微量タンパク質、代謝産物などを網羅的に解析するいわゆるオミックス(Omics)解析を基盤とした新しい研究開発戦略が世界的に展開されている。本研究班では、多層的疾患オミックス解析を通して、認知症や重篤となりやすい肺炎、歯牙喪失の主因である慢性歯周炎など、高齢期の健康を脅かす疾患群の早期発見や重篤化を予測する血中微量分子の同定を目的として研究を実施した。また、血中の微量分子の運搬役と考えられている細胞小胞(エクソソーム/マイクロパーティクル)にも焦点を当て、その定量化がバイオマーカーとして有用であるかどうかについても検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) ラット血漿の多層的オミックス解析

高齢で発症する認知症などの疾患オミックスにおいては、解析の対照群となる正常加齢群の分子プロファイルの把握が重要であることから、近年加齢の分子プロファイルの作成が行われている。本研究では、ヒト臨床試料のオミックス解析に先立ち、加齢育成ラット（6～27 月齢）血漿または血清を材料として microRNA の発現解析、微量タンパク質の網羅的解析であるプロテオミクス、代謝産物の網羅的解析であるメタボロミクスの 3 つのオミックス解析を行った。詳細は分担研究報告 1, 2, 3 を参照。

### 2) 血中マイクロパーティクルの定量

近年、末梢血中には循環性血管内皮細胞(CEC)や血管内皮細胞由来マイクロパーティ

クル(EMP)が存在し、炎症性疾患やがんなどの疾患でその数が増加することが報告されている。本研究ではEMPが疾患バイオマーカーとして有効かどうか検討する目的で、in vitro および in vivo の炎症モデルを用い、培養上清中あるいは血漿中のEMPの数的変化をFlow cytometryを用いて定量した。また、ヒト動・静脈血中のCECの定量が可能化についても検討を行った(H21年度のみ)。EMP解析の詳細は分担研究報告4を参照。

### 3) 臨床試料のオミックス解析

認知症および比較的健常な中高年層の血漿の多層的オミックス解析(miRNA発現解析、プロテオミクス、メタボロミクス)を実施し、疾患における分子発現特異性について検討した。血液試料は、50代、60代、70代、80代以上と4つに区分して解析した。また、健常者のみにおいて、年齢層別の比較を行い、高齢化(老化)に伴う変化について検討した。解析の詳細は分担研究報告5、7、8を参照。

### 4) real time-RCR

ラットならびにヒト血漿のmiRNA発現解析の結果を検証する目的で、変動がみられたmiRNAについては、TaqMan®のmiRNAプローブを購入し、real time RCR解析を行った。解析の詳細は分担研究報告1を参照。

### 5) アルツハイマー病モデルマウスのメタボローム解析

ヒトAD脳と同様に加齢に伴って老人斑を蓄積するマウスモデル、Tg 2576マウスとその対照マウスについて、4、7、10、20月齢(各群n=5)の尿メタボロミクスを行った。サンプル尿はマウスを採尿ケージで飼育し、回収した。各成分は添加した内部標準物質に対する相対面積として定量した。詳細は分担報告3を参照。

### 6) 歯肉溝液のプロテオミクス

ヒト歯周炎患者および非疾患群の歯肉溝液をペーパーポイントで採取し、試料調整後プロテオーム解析を行った。解析の詳細は分担研究報告6を参照。

### 7) 血中VEGFの疾患バイオマーカーとしての検討(H21年度のみ)

国立長寿医療研究センター病院において長寿ドックを受検した者を対象とし、血清VEGF濃度をELISA法にて測定し、検診で得られた各種データと照合することで疾患マーカーとしての可能性を検討した。

## 研究方法(平成22年度)

平成22年度実施分の研究方法については、上記に同じ(7を除く)。

## (倫理面への配慮)

本研究は国立長寿医療研究センターの動物実験倫理委員会の承認を経た後、同センターの動物実験指針に従い行なった。臨床試料の使用に当たっては、国立長寿医療研究センター倫理利益相反委員会の承認を得た。また、研究参加は受検者の自由な意思によることとし、個人情報 は 厳重に保護されるため、倫理的問題は生じないと考えられた。また、研究センター外の分担研究分については各研究機関の定める倫理委員会の承認を得て実施されている。

## C. 研究結果

### 1. 研究期間全体の結果

#### 1) ラット血液試料の多層的オミックス

H21 年度には、血液からの small RNA 画分を安定して抽出できる方法を確立した。H22 年度は、ラット血中 miRNA の発現解析を行い 139 種の miRNA を検出した。これらのうち 100 種は加齢で 2 倍以上の発現変動があった。逆に加齢による変動がほとんどない miRNA が 8 種検出された。変動幅の大きい miRNA について、上位 20 種をリアルタイム PCR で検証した結果、16 種が経時的变化を示した。内訳は漸減するものが 14 個、漸増するものが 2 個であった。プロテオーム解析では、6 月齢を基点に 15 月齢で増加するタンパク質として、Beta-2-glycoprotein 1 precursor、T-kininogen II precursor 等を同定した。12 月齢から減少するタンパク質として serine (or cysteine) peptidase inhibitor、thrombospondin 1 を、15 月齢で減少するものとして haptoglobin、transferrin を同定した。メタボローム解析では、加齢に伴い漸減する脂質代謝産物として valeric acid を同定した。(各分担報告参照)

#### 2) 血中の EMP の解析

血中の EMP が疾患マーカーとして有効かどうか炎症モデルマウスを用いて検討した。その結果、炎症を誘導したマウスの抹消血では正常より有意に多い EMP が検出された。この現象を in vitro で確認する目的で、脳血管性障害を想定し、脳血管内皮細胞を LPS や炎症性サイトカインで刺激したところ、培養上清中に EMP が遊離することを確認した。詳細は分担研究報告 4 を参照。

初年度には高齢で重篤化しやすい肺炎と敗血症の増悪化を予測するマーカーとして血中の CEC の定量化について検討した。健常人の動・静脈血から CD146 陽性の CEC 画分を分離した結果、静脈血から 5 cells/ml が検出されたが動脈では検出されなかった (H21 年度報告書参照)。疾患群における定量を試みる前に、分担研究者の人事異動があり本課題は中断されたが、敗血症では CEC の増加があるとする報告がなされたことから肺炎でも重症化する症例では CEC の増加が見込まれる。

### 3) 臨床試料のオミックス解析

NCGG 病院の健診を受検した男女 6 名の血中代謝産物の加齢変化をメタボローム解析で検討した。その結果、女性では解糖系、尿素回路、アミノ酸代謝などの代謝経路において加齢に伴うと考えられる変化が見られた。またこれらの変化は MMSE の変化と連動していることが示された。一方、アルツハイマー病の血中 miRNA 解析では疾患群において 31 個の発現上昇する miRNA と減少する 2 個の miRNA が同定された。血管性認知症の miRNA 解析では miR-638 と 720 が発現増加し、miR-129\* が減少していた。今後は残りのオミックス解析も行う予定である。詳細は分担研究報告を参照。

### 4) 歯周炎のプロテオーム解析

歯周炎患者歯肉溝液のオミックスでは歯肉溝液採取法と液量の関係でプロテオーム解析のみ実施した。プロテオーム解析の結果、疾患群のみにおいて発現が見られるもの、健常群、疾患群の両方に発現するが、疾患群で発現が上昇しているものなどに区別することができた。歯周炎患者のみで発現のあったタンパク質に注目して炎症歯肉組織を用いて検討した結果、歯周炎患者では Hspa2, 5, FAP $\alpha$ , Scarp, MADA mRNA の発現上昇が観察された。これらの発現は TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  や IL-8 炎症性サイトカイン発現と正の相関を示した。滲出性炎の沈静化した歯肉材料ではこれらの遺伝子の発現上昇は検知できなかった。免疫組織学的検討から、MNDA は歯肉切除材料や抜歯適応の進行した歯周炎組織の好中球に強い発現が認められた（分担報告参照）。

### 5) 血中 VEGF の疾患マーカーとして可能性

長寿ドック受検者の平均 VEGF 濃度は男性 242.4 pg/ml、女性 287.9 pg/ml で男女差に有意差は認められず、加齢による差もなかった。VEGF 濃度と検診データとの比較では、男性では GDS15、ALP、BNP、UA と正の相関が示され、女性では骨密度 BMD と負の相関を、TSH、T-Bil と正の相関を示した。

## 2. H22 年度の結果

当該年度の研究結果は、上記 1)～4) に記載したとおりである。

## D. 考察と結論

血液の多層的オミックス解析を基盤に疾患バイオマーカー分子の同定を試みる上で最も困難と思われた血中 microRNA の解析が安定して行えることが確かめられたことは臨床試料の解析に向けて大きな前進であった。また、月齢の異なるラット血漿/血清を材料としたことで、経時的な分子プロファイルの作成ができた。これによると加齢で変動する分子群が同定され、疾患群の網羅的解析を行う際は、対象試料の年齢を合わせる事が重要であることが示唆された。これは性差においても同様であった。多層オミッ

クス情報の統合解析については当初3年計画の3年目に予定していたことから、今回実施は出来なかった。今後機会があれば解析を行いたい。

一方、実際の臨床試料の解析についてはH22年度後半から解析を開始した。まだ例数の少ない単層オミックス解析の所見であるが、例えばアルツハイマー病のmicroRNA発現解析ではがんで顕著に発現変動するmicroRNA群と類似した種類が同定され、退行変性疾患とがんの共通性が示唆された。また血管性認知症例の解析では、最も顕著な発現増加を示した hsa-miR-638 は血管壁を構成する線維芽細胞の老化、あるいは虚血環境下における組織修復に関与する間葉系幹細胞と関連があるといわれており、血管性認知症の虚血や老化病態を反映している可能性がある。今後は解析数を蓄積して検討を続けたいと考えている。

歯周炎のプロテオーム解析はこれまで報告のない、新規の情報が得られた。プロテオーム解析情報の分析から HSP など複数の炎症関連タンパク質が検出され、歯周炎の病態解明に寄与する所見が得られた。また、炎症歯肉を用いた検証試験の結果から、歯肉溝浸出液中の MNDA 量は歯周炎の急性増悪の指標となる可能性が示唆された。また、血中のマイクロパーティクルが炎症によってその数を増加させることが示された点も興味深い。最近、同様のコンセプトによる診断法開発を実施する米国ベンチャー企業のプレス発表があり、我々のアプローチが実用的であることが裏付けられた。

以上のように、オミックス解析はこれまで報告のない新たな生体内分子の同定を可能にした。本研究課題の延長となる新規課題においては臨床試料の解析数を充実させ、バイオマーカー分子の同定に向けた研究を進めたいと考えている。昨今、欧米では臨床試料のオミックス解析は疾患研究の中心的基盤となっており、疾患研究機関においてはオミックス解析が可能な設備を充実される必要があると思われた。なお、血清 VEGF は男女で異なるパラメーターと相関があり、男性ではさらなる検討が必要であるが動脈硬化との関係が示唆され、女性では骨粗鬆症のマーカーになる可能性が示された。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

平成 21 年度

- 1) Ekuni D, Yamanaka R, Yamamoto T, Miyauchi M, Takata T, Watanabe T: Effects of mechanical stimulation by a powered toothbrush on healing of periodontal tissue in rat model of periodontal disease. **J Periodontol. Res.** 45: 45-51, 2010
- 2) Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, Kunimoto S, Kalaria RN, Watanabe A: Mutations in Notch3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading

- to impaired cell proliferation. **Hum Mol Genet.** 19: 79-89, 2010
- 3 ) Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M: Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human  $\alpha$ -synuclein A30P+A53T transgenic mice with  $\alpha$ -synuclein pathology. **Brain Res.** 1250: 232-241, 2009
  - 4 ) Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Kurihara H: Brain-derived neurotrophic factor protects cementoblasts from serum starvation-induced cell death. **J Cell Physiol.** 221(3): 696-706, 2009
  - 5 ) Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G, Bieber T, von Bubnoff D: Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. **J Immunol.** 183: 145-154, 2009
  - 6 ) Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, Guillemin GJ, Takikawa O: Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases indoleamine 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem.** 110: 791-800, 2009
  - 7 ) Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, Takikawa O, Isobe K, Nagase F: Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-kappaB and the generation of reactive oxygen species. **J Cell Biochem.** 108: 716-725, 2009
  - 8 ) Adachi S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O: Involvement of Rho-kinase in prostaglandin E(1)-stimulated VEGF synthesis through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.** 90: 1-6, 2009
  - 9 ) Nisapakultorn K, Makrudthong J, Sa-Ard-Iam N, Rerkyen P, Mahanonda R, Takikawa O: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression and regulation in chronic periodontitis. **J Periodontol.** 80: 289-297, 2009
  - 1 0 ) Tsujio M, Mizorogi T, Kitamura I, Maeda Y, Nishijima K, Kuwahara S, Ohno T, Niida S, Nagaya M, Saito R, Tanaka S: Bone mineral analysis through dual energy X-ray absorptiommetry in laboratory animals. **J Veterinary Med Sci.** 71: 1493-1497, 2009
  - 1 1 ) Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Azuma T, Tamaki N, Irie K, Maruyama T, Yamamoto T, Watanabe T, Miyauchi M, Takata T: Effects of improvement in periodontal inflammation by toothbrushing on serum lipopolysaccharide concentration and liver injury in rats. **Acta Odontologica Scandinavica** 67: 200-205, 2009

- 1 2) Natsume H, Adachi S, Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Yamauchi J, Kato K, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: (-)-Epigallocatechin gallate attenuates the induction of HSP27 stimulated by sphingosine 1-phosphate via suppression of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in osteoblasts. **Int J Mol Med**. 24: 197-203, 2009
- 1 3) Minamitani C, Otsuka T, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Hanai Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O: Involvement of Rho-kinase in sphingosine 1-phosphate-stimulated HSP27 induction in osteoblasts. **Int J Mol Med**. 24: 77-82, 2009
- 1 4) Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S: Transthyretin accelerates vascular A $\beta$  deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. **Brain Pathol**. 19: 48-57, 2009

#### 平成 22 年度

- 1) Kato K, Otsuka T, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, Tokuda H: (-)-Epigallocatechin gallate inhibits thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. **Mol Med Rep**. (in press)
- 2) Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Natsume H, Otsuka T, Kozawa O: Enhancement of basic fibroblast growth factor-stimulated VEGF synthesis by Wnt3a in osteoblasts. **Intern J Mol Med**. (in press)
- 3) Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O, Otsuka T: Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. **Endocrinology**. (in press)
- 4) Natsume H, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Yamakawa K, Otsuka T, Kozawa O: Wnt3a up-regulates transforming growth factor- $\beta$ -stimulated VEGF synthesis in osteoblasts. **Cell Biochem Function**. (in press)
- 5) Ohara M, Miyauchi M, Tsuruda K, Takata T, Sugai M: Topical application of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* CDT induces cell cycle arrest in rat gingival epithelium in vivo. **J Periodont Res**. (in press)
- 6) Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O: Wnt3a regulates tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 release in osteoblasts. **Mol Cell Endocrinol**. 331:66-72, 2011
- 7) Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy. **J Neurosci Res**. 89:576-584, 2011
- 8) Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: Dissociation of  $\beta$ -amyloid

- from Lipoprotein in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease accelerates  $\beta$ -amyloid-42 assembly. **J Neurosci Res.** 89(6):815-821, 2011
- 9) Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Kozawa O: Role of heat shock protein 27 in transforming growth factor- $\beta$ -stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts. **Intern J Mol Med.** 27:423-428, 2011
- 1 0) Iizuka S, Kudo Y, Yoshida M, Tsunematsu T, Yoshiko Y, Uchida T, Ogawa I, Miyauchi M, Takata T: Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase via crosstalk between integrin  $\beta$ 1 and CD63. **Mol Cell Biol.** 2010 Dec 13. [Epub ahead of print]
- 1 1) Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E: Extracellular and intraneuronal HMW-A $\beta$  Os represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. **Mol Neurodegener.** 6(1):20, 2011
- 1 2) Kitagawa M, Kitagawa S, Nagasaki A, Miyauchi M, Uchida T, Takata T: Synthetic ameloblastin peptide stimulates differentiation of human periodontal ligament cells. **Arch Oral Biol.** 2010 Nov 10. [Epub ahead of print]
- 1 3) Sugimoto H, Takikawa O, Shiro Y: Tryptophan catabolism by heme dioxygenases in *Handbook of Porphyrin Science* (Kadish et al., eds), Vol.5, 72-122, Heme Proteins, Academic Press, 2010
- 1 4) Takahashi K, Adachi K, Kunimoto S, Wakita H, Takeda K, Watanabe A: Potent inhibitors of amyloid  $\beta$  fibrillization, 4,5-dianilinophthalimide and staurosporine aglycone, enhance degradation of preformed aggregates of mutant Notch3. **Biochem Biophys Res Commun**, 402: 54-58, 2010
- 1 5) Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Yamakawa K, Gu Y, Otsuka T, Kozawa O: AMP-activated protein kinase positively regulates FGF-2-stimulated VEGF synthesis in osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** 400:123-127, 2010
- 1 6) Minamitani C, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Kato K, Natsume H, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: p70 S6 kinase limits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-6 synthesis in osteoblast-like cells. **Mol Cell Endocrinol.** 315:195-200,2010
- 1 7) Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung CG, Komano H, Michikawa M: Homocysteine, another risk factor for Alzheimer's disease, impairs apolipoprotein E3 function. **J Biol Chem**, 285: 38382-38388, 2010
- 1 8) Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kondo S, Umezu T, Nawa A, Takikawa O, Kikkawa F: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy. **Gynecol Oncol.** 117:423-428, 2010

- 1 9) Yamano E, Miyauchi M, Furusyo H, Kawazoe A, Ishikado A, Makino T, Tanne K, Tanaka E, Takata T: Inhibitory effects of orally administrated liposomal bovine lactoferrin on the LPS-induced osteoclastogenesis. **Lab Invest.** 90(10):1236-1246, 2010
- 2 0) Rego EB, Inubushi T, Kawazoe A, Tanimoto K, Miyauchi M, Tanaka E, Takata T, Tanne K: Ultrasound Stimulation Induces PGE(2) Synthesis Promoting Cementoblastic Differentiation Through EP2/EP4 Receptor Pathway. **Ultrasound Med Biol** 90(8): 1236-1246, 2010
- 2 1) Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Takamura, A, Yamamoto-Watanabe Y, Kurata T, Abe K, Ikeda M, Westaway D, Murakami T, St.George-Hyslop P, Matsubara E, Shoji M: A $\beta$  amyloid accelerates phosphorylation of tau and NFT formation in APP and tau double transgenic mice model. **J Neurosci Res.** 88(16): 3547-54, 2010
- 2 2) 富本秀和 : 皮質下血管性認知症の診断と治療。臨床神経学 50(8):539-546, 2010
- 2 3) 滝川 修, 横山祐一: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の病態生理学的意義と阻害剤の開発 ファルマシア(日本薬学会誌) 46: 241-246, 2010
- 2 4) Natsume H, Tokuda H, Adachi S, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Kato K, Minamitani C, Niida S, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: Rho-kinase limits FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts. **Bone.** 46: 1068-1074, 2010
- 2 5) Natsume H, Tokuda H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Kato K, Kozawa O, Otsuka T: Synergistic effect of vasoactive intestinal peptides on TNF- $\alpha$ -induced IL-6 synthesis in osteoblasts: amplification of p44/p42 MAP kinase activation. **Intern J Mol Med.** 25: 813-817, 2010
- 2 6) 富本秀和 : 血管性認知症の臨床と病理 **Dementia Japan.** 24: 461-467, 2010
- 2 7) Hiramoto M, Maekawa N, Kuge T, Ayabe F, Watanabe A, Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H, Imai T: High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads. **Biomed Chromatogr**, 24: 606-612, 2010
- 2 8) Matsuno K, Takai K, Isaka Y, Unno Y, Sato M, Takikawa O, Asai A: S-benzylisothiourea derivatives as small-molecule inhibitors of indoleamine 2,3 -dioxygenase. **Bioorg Med Chem Lett.** 20: 5126-5126, 2010
- 2 9) Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Hanai Y, Takai S, Harada A, Kozawa O: Inhibition by minodronate of basic fibroblast growth factor-stimulated vasucular endothelial growth factor synthesis in osteoblast-like cells. **Mol Med Rep.** 3: 167-171, 2010
- 3 0) Kato K, Tokuda H, Natsume H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Mizutani J, Kozawa O, Otsuka T: Rho-kinase regulates prostaglandin D2-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts. **Exp Therapeut Med.** 1: 579-583, 2010

## 2. 学会発表

平成 21 年度

- 1) 松原悦朗 : 認知症治療の最前線 日本内科学会東北地方会第 57 回生涯教育講演会 2010 年 2 月 19 日 (仙台)
- 2) 松原悦朗 : アルツハイマー病 病態解明の現状 第 16 回東北脳循環カンファレンス 2009 年 11 月 28 日 (仙台)
- 3) 國本正子, 足立香代, 吉崎嘉一, 武田和也, 脇田英明, 高橋慶吉, 渡邊 淳 : 家族性脳血管性認知症 (CADASIL) モデル動物の作製と病態解析 第 28 回日本認知症学会 2009 年 11 月 20 日 (仙台)
- 4) 渡邊 淳, 足立香代, 國本正子, 武田和也, 脇田英明, 高橋慶吉 : 変異 Notch3 による重合体の形成と細胞増殖の低下 第 28 回日本認知症学会 2009 年 11 月 20 日 (仙台)
- 5) 松原悦朗 : アルツハイマー病の分子メカニズムと治療戦略 第 18 回東北老年期認知症研究会 2009 年 11 月 14 日 (仙台)
- 6) 松原悦朗 : アルツハイマー病の発症病態解明に向けて 特別講演会 2009 年 11 月 2 日 (札幌)
- 7) 松原悦朗 : アルツハイマー病の予防・治療最前線 Brain Science Conference 2009 年 10 月 10 日 (京都)
- 8) Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Seino Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E, Shoj M: Accumulation of protein in lipid rafts in mouse models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2009, the Society for Neuroscience, 39<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009 年 10 月 17 日 Chicago (USA)
- 9) Takikawa O: Neurotoxin quinolinic acid produced in over-activated microglia may contribute to the progression of Alzheimer's disease, ISTRY2009 (Meeting of the international society for tryptophan research), 2009 年 7 月 9 日 Florence (Italy)
- 1 0) Imai H, Iizuka S, Miyauchi M, Takata T: Heparin derivative induces bone regeneration: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009 年 2 月 7 日 Hiroshima (Japan)
- 1 1) Kawazoe Y, Miyauchi M, Takata T: Influence of elevation of GGT by cholestatic liver disease on bone and LPS induced alveolar bone destruction: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009 年 2 月 7 日 Hiroshima (Japan)
- 1 2) Rego EB, Inubushi T, Kawazoe A, Miyauchi, M, Takata T, Tanne K: Ultrasound stimulation increases PGE2 production and induces mineral deposition via prostaglandin EP4 receptor activation in mouse cementoblasts: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009 年 2 月 7 日 Hiroshima (Japan)
- 1 3) Inubushi T, Rego EB, Eizo Y, Otani J, Miyauchi M, Takata T, Tanne K: Low-intensity Ultrasound Stimulation Inhibits Root Resorption Induced by the Application of Experimental

Force: 3rd The International Workshop on Biodental education & Research 2009年2月7日  
Hiroshima (Japan)

平成 22 年度

- 1) Takikawa O, Kagawa S, Okuno A, Yokoi H, Zhang Q, Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathogenesis of AD by killing neurons and increasing amyloid  $\beta$  peptides in the hippocampus, AD/PD2011, March, 2011, Barcelona (Spain)
- 2) 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 宮崎賢治, 佐竹美芽, 堂本光子, 柳橋努, 生谷尚士, 長井良憲, 高津聖志, 新飯田俊平, 服部裕一: マウス脳血管内皮細胞株を用いた Endothelial microparticles (EMP) の in vitro 産生系の確立および疾患バイオマーカーとしての可能性の検討 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会年会合同大会 2010 年 12 月 10 日 (神戸)
- 3) Watanabe A: The molecular pathology of the CADASIL 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会年会合同大会, 2010 年 12 月 (神戸)
- 4) 堂本光子, 新飯田俊平, 服部裕一: 脳血管内皮細胞株を用いた endothelial microparticles (EMP) の in vitro 産生系の確立および in vivo 病態モデルでの解析 第 18 回日本血管生物医学会学術集会/第 8 回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 併催大会 2010 年 12 月 2 日 (大阪)
- 5) 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 柳橋努, 生谷尚士, 長井良憲, 高津聖志, 渡邊淳, 堂本光子, 新飯田俊平, 服部裕一: 脳血管内皮細胞株を用いた endothelial microparticles (EMP) の in vitro 産生系の確立および in vivo 病態モデルでの解析 第 18 回日本血管生物医学会学術集会/第 8 回 Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 併催大会 2010 年 12 月 2 日 (大阪)
- 6) Miyauchi M, Kawazoe Y, Takata T:  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) is a potent risk factor of periodontitis, 58th JADR Annual Meeting, 2010 年 11 月 20-21 日 (北九州)
- 7) Kudo Y, Iizuka S, Miyauchi M, Takata T: Ameloblastin regulates osteogenic differentiation by inhibiting Src kinase, 58th JADR Annual Meeting, 2010 年 11 月 20-21 日 (北九州)
- 8) 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 柳橋努, 生谷尚士, 長井良憲, 高津聖志, 宮崎賢治, 佐竹美芽, 堂本光子, 新飯田俊平, 服部裕一: 血管内皮細胞株を用いた Endothelial microparticles (EMP)の効率的な産生系の確立および疾患バイオマーカーとしての可能性の検討 第 20 回日本循環薬理学会 2010 年 11 月 11 日 (札幌)
- 9) 渡邊 淳, 足立香代, 國本正子, 武田和也, 脇田英明, 丸山和佳子, 高橋慶吉: ヒト変異 Notch3 重合体の分解促進剤のスクリーニング 第 29 回日本認知症学会 2010 年 11 月 (名古屋)
- 10) 足立香代, 國本正子, 武田和也, 渡邊 淳, 丸山和佳子: 血管性認知症モデルマウスを用いた抗 E-selectin 抗体による治療法の有効性の検討 第 29 回日本認知症学会 2010 年

11 月 (名古屋)

- 1 1) 脇田英明, 足立香代, 武田和也, 國本正子, 渡邊 淳, 丸山和佳子: マウス血管性認知症モデルに対する Sialyl Lewis X 結合リポソームの有効性の検討 第 29 回日本認知症学会 2010 年 11 月 (名古屋)
- 1 2) 山本誠土, 東英梨月, 村松昌, 宮崎賢治, 佐竹美芽, 堂本光子, 新飯田俊平, 服部裕一: Endothelial microparticles (EMP) の in vitro 産生系の確立および in vivo 病態モデルでの解析 第 61 回日本薬理学会北部会 2010 年 9 月 10 日 (札幌)
- 1 3) Kunimoto S, Watanabe A, Adachi K, Matsuzaki M, Takeda K, Wakita H, Kalaria RN, Maruyama W, Takahashi K: Development of mutant NOTCH3 knock-in mice as a model for CADASIL. Neuro2010, September 4, 2010, Kobe
- 1 4) 村松昌, 山本誠土, 森脇佐和子, 本山 昇, 徳田治彦, 新飯田俊平: Aging impacts on miRNAs expression in blood 第 2 回 RNAi 研究会 2010 年 8 月 29 日 (広島)
- 1 5) Kawazoe A, Inubushi T, Miyauchi M, Rego EB, Ishikado A, Tanne K, Takata T: Anti-inflammatory effects of soybean lecithin liposomalized lactoferrin during orthodontic tooth movement, 15th International Congress on Oral Pathology and Medicine, August 16-20, 2010, Seoul (South Korea)
- 1 6) Miyauchi M, Kawazoe Y, Inubushi T, Takata T: hyper- $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) emia is a potent risk factor for osteoporosis, The 15th International Congress of Oral Pathology and Medicine, August 16-20, 2010, Souel (South Korea)
- 1 7) Takamura A, Kawarabayashi T, Matsubara T, Shoji S, Matsubara E: Alzheimer neuronal degeneration: extracellular vs. intracellular A $\beta$  oligomers. International conference on Alzheimer's disease (ICAD), July 10-15, 2010, Honolulu (USA)
- 1 8) Takikawa O, Kagawa S, Okuno A, Yokoi H, Zhang Q: Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathology of Alzheimer's disease by increasing the amyloid  $\beta$  peptide levels. ICAD, July 10-15, 2010, Honolulu (USA)
- 1 9) Watanabe A, Kunimoto S, Adachi K, Takeda K, Niida S, Wakita H, Kalaria RN, Takahashi K: Proteomic analysis of the mutant Notch3-expressing cells and the microvessels of CADASIL brain. ICAD, July 10-15, 2010, Honolulu (USA)
- 2 0) Takikawa O: Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathology of Alzheimer's disease by increasing the amyloid  $\beta$  peptide levels. ICNCC 2010, May, 2010, Seoul (South Korea)
- 2 1) 松原悦朗, 高村歩美, 若佐谷保仁, 渡辺有希子, 中畑直子, 渡辺光法, 瓦林毅, 東海林幹夫: A $\beta$  オリゴマー特異的受動免疫予防法の開発 第 51 回日本神経学会総会 2010 年 5 月 20-22 日 (東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

平成 21 年度

- 1) 発明の名称：ベンゾイミダゾール誘導体を有効成分とする IDO 阻害剤  
発明者：滝川 修、浅井章良、松野研司、海野雄加  
出願番号：特願 2009-133633  
出願日：平成 21 年 6 月 3 日
- 2) 発明の名称：含硫化合物を有効成分として含有する IDO 阻害剤  
発明者：滝川 修、浅井章良、松野研司、海野雄加  
出願番号：特願 2009-205484  
出願日：平成 21 年 9 月 7 日
- 3) 発明の名称：アルツハイマー病モデル動物及びその作成方法  
発明者：滝川 修、香川正太  
出願番号：PCT 出願 PCT/JP2009/006760  
出願日：平成21年12月10日

平成22年度

- 1) 発明の名称：アルツハイマー病の診断マーカー、アルツハイマー病の予防及び治療薬のスクリーニング方法並びにアルツハイマー病の診断方法  
発明者：滝川 修、曾我朋義  
出願日：平成 22 年 5 月 17 日  
出願番号：特願 2010-113496

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし