

# 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 The development of agents for the preventives and therapeutics of Alzheimer's disease based on oligomer hypothesis

小野賢二郎

(昭和大学医学部内科学講座神経内科学部門)

### はじめに

わが国では、高齢者人口が未曾有の速さで増加し、それに伴い認知症を有する高齢者が増え、大きな医療・社会問題となっている。認知症高齢者の数は現在、全国に約462万人と推計されており、2025年には700万人を超えると推計され、これは、65歳以上の高齢者のうち、5人に1人が認知症に罹患する計算となる<sup>1)</sup>。

認知症の中でも最も頻度の高い疾患がアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) であり、わが国ではAD治療薬としてドネペジルが、1999年に承認され、2011年より新たな薬剤としてガランタミン、リバスチグミン、メマンチンが許可され、AD治療薬の選択肢は広がった。しかし、これらの薬剤は投与を続けても認知機能低下の速度を低下させることができないため、認知機能低下の速度を低下させる薬剤、すなわち、早期投与によってADの進行そのものを修正できる疾患修飾薬 (disease-modifying drug: DMT) の開発が期待されている<sup>2)</sup>。

ADの病理学的特徴としては、アミロイドβ蛋白 (amyloid β-protein: Aβ) から成る老人斑、微小管関連蛋白質であるタウ蛋白から成る神経原線維変化、さらに神経細胞脱落があげられる。なかでも病態生理においては、Aβがその前駆体蛋白質である amyloid precursor protein から切り出され、異常凝集し、神経細胞を傷害する過程が重

要な役割を果たすと考えられている (アミロイド仮説)<sup>3)</sup>。

従来脳アミロイドとして蓄積する不溶性のAβ線維 (Aβ fibrils: fAβ) が神経毒性を発揮すると考えられていたが、最近、より毒性の強い凝集体として、可溶性オリゴマーの研究に注目が集まっている (オリゴマー仮説)<sup>4)~6)</sup>。

以上のことを背景にアミロイド、特にオリゴマー仮説の実態を明らかにすることがAD研究の最重要ターゲットとなっており、この仮説に基づいた診断法、治療法の開発が世界中で精力的に行われている。

### Aβ凝集

AβからfAβ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 (図1)<sup>7,8)</sup>。重合核形成相は熱力学的に起こりにくく、反応全体の律速段階になっているが、いったん重合核が形成されると、線維伸長は一次反応速度論モデル、すなわち重合核、あるいはすでに存在する線維断端に前駆蛋白質であるAβが立体構造を変化させながら次々に結合することにより、速やかに進行する。神経細胞から分泌される主要なAβ分子種は、Aβ40とAβ42であるが、とくにAβ42凝集の凝集性が高い<sup>7)</sup>。我々は、金沢大学・中山らと秒の単位で観察可能な高速原子間力顕微鏡を用いて凝集が早いためリアルタイムでの観察が困難であっ

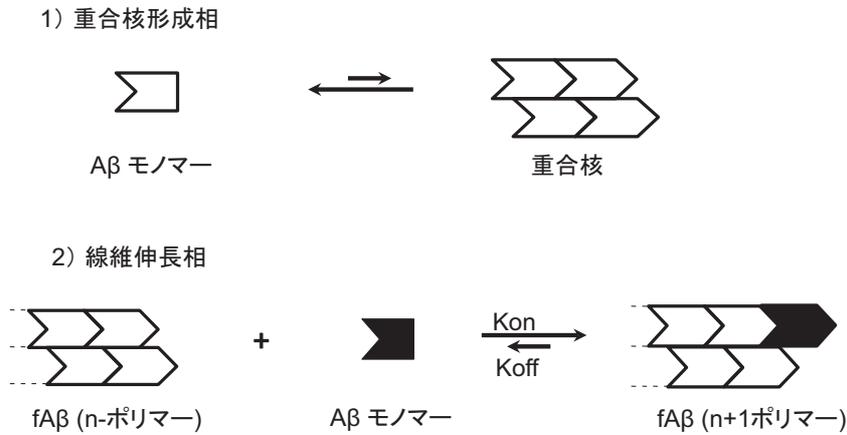


図1 重合核依存性重合モデル

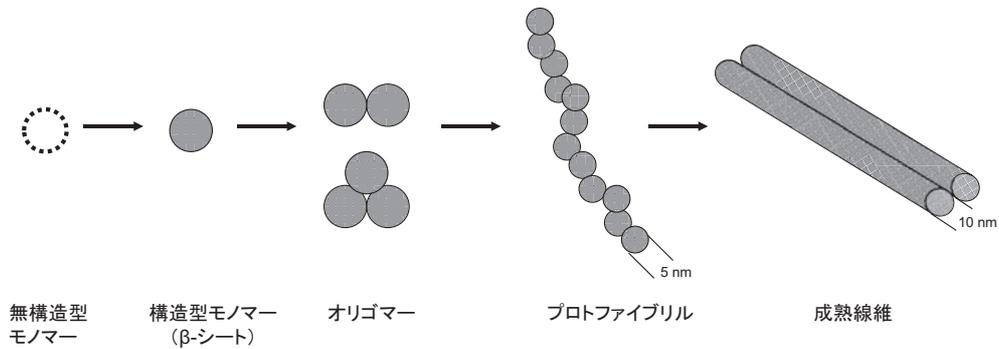


図2 Aβ凝集モデル

中間凝集体のオリゴマーやプロトファイブリンは、元来の線維形成経路の中間体なのか、別個の経路なのかは現在のところ、不明である。

た fAβ<sub>42</sub> が stepwise に形成されるだけでなく、一方方向優位性があること、形成された成熟線維は、straight、spiral の 2 つの type が存在し、switching した hybrid type もみられること、線維構造は周囲の電解質条件により変化し得ることを証明した<sup>9)</sup>。

### Aβ凝集とオリゴマー

前述のように Aβ が凝集していく過程では、無構造の Aβ モノマーから β-シートへの構造変換を起こし、続いてオリゴマーが形成され、幅約 5nm のプロトファイブリン、さらには幅約 10nm の成

熟線維である fAβ が形成される (図 2)。従来、脳アミロイドとして蓄積する fAβ が神経毒性を發揮すると考えられていたが、最近、AD 患者脳から抽出した Aβ ダイマーが最小単位のアミロイド凝集体であることが報告され<sup>10)</sup>、可溶性オリゴマーの研究に注目が集まっている (オリゴマー仮説)<sup>4)~6)10)</sup>。我々は、photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) 法を用いて Aβ オリゴマーを安定化した状態で抽出し、ダイマー、トリマー、テトラマーがモノマーに比し、β-シート構造の割合だけでなく、細胞毒性も増加し、特にモノマー→ダイマーの過程が AD の重要な治療ターゲットになる可能性があることを示した<sup>11)</sup>。

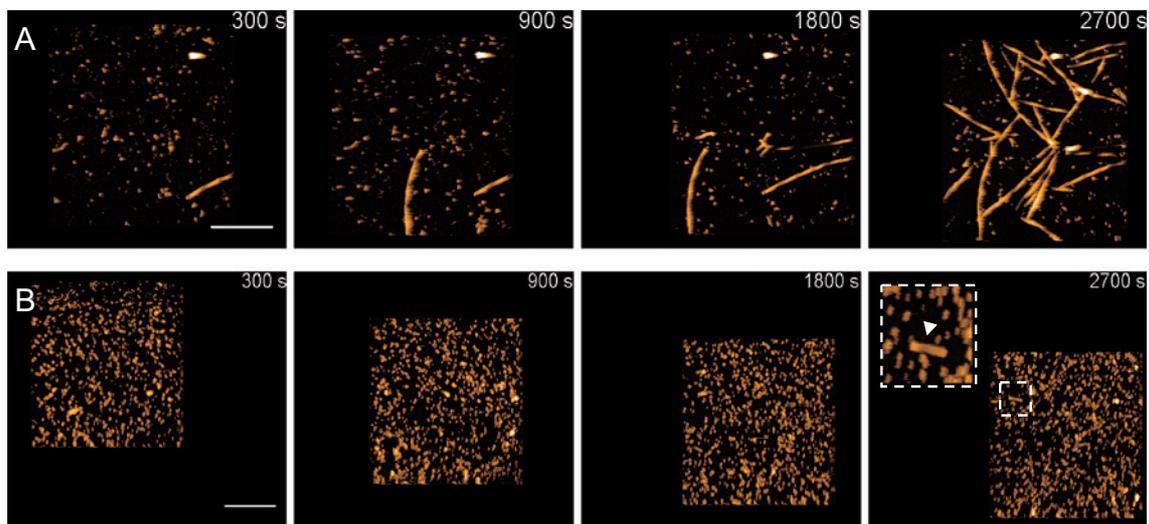


図3 高速原子間力顕微鏡を用いた Aβ42 凝集の観察 (文献9より)

(A) 低分子 Aβ42 (主にモノマー) のインキュベートでは 2700 秒 (45 分) 経過にて明らかな fAβ42 形成が認められるが、  
 (B) プロトファイブリルのインキュベートでは同時間経過にて fAβ42 形成が非常に少ない。

Aβ 凝集過程の中間体として、上述のダイマーやトリマーといった低分子オリゴマーだけでなく、12量体である Aβ-derived diffusible ligand (ADDL) や globulomer、あるいは球状の amylospheroid、プロトファイブリルが報告されているが、それらが元来の線維形成経路の中間体なのか、別個の経路なのかは不明であったが<sup>12)~14)</sup>、最近、我々は高分子オリゴマーであるプロトファイブリルとモノマーからの凝集過程を高速原子間力顕微鏡を用いて観察し、プロトファイブリルから fAβ42 形成はモノマーからの fAβ42 形成より時間がかかること (図3)、それどころかプロトファイブリルの凝集体サイズが時間経過とともに小さくなることを発見し、プロトファイブリルはモノマーから最終段階である fAβ42 が形成される経路 (on-pathway) とは違った経路 (off-pathway) に位置し、モノマーに一旦脱重合してから on-pathway に入る可能性があることを提唱した<sup>9)</sup>。

## 低分子化合物による Aβ 凝集抑制

### 1) *in vitro* における検討

近年の疫学的研究は、緑茶等の天然フェノール化合物含有食品の摂取は認知症の発症率を下げることを示唆しているが<sup>15)</sup>、我々は、ミリセチン、ロスマリン酸をはじめとするフェノール化合物が *in vitro* にて fAβ 形成を抑制することを明らかにした<sup>16)17)</sup>。

我々は、高速原子間力顕微鏡を用いてフェノール化合物による Aβ42 凝集抑制を動画にて観察し、その抑制はフェノール化合物を取り除くことにより再開することを発見し、フェノール化合物による Aβ42 凝集抑制は可逆的であることを証明した (図4)<sup>9)</sup>。

また、PICUP 法を主に用いてフェノール化合物は、凝集の中間段階である Aβ オリゴマーやプロトファイブリル形成を抑制し、細胞毒性を軽減させることを明らかにした<sup>18)19)</sup> (図5)。さらに、マウスの海馬スライスを用いて CA1 領域の興奮性シナプス後場電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) を記録し、Aβ42 のモノマー、オリゴマーおよびポリフェノールによって抑制され

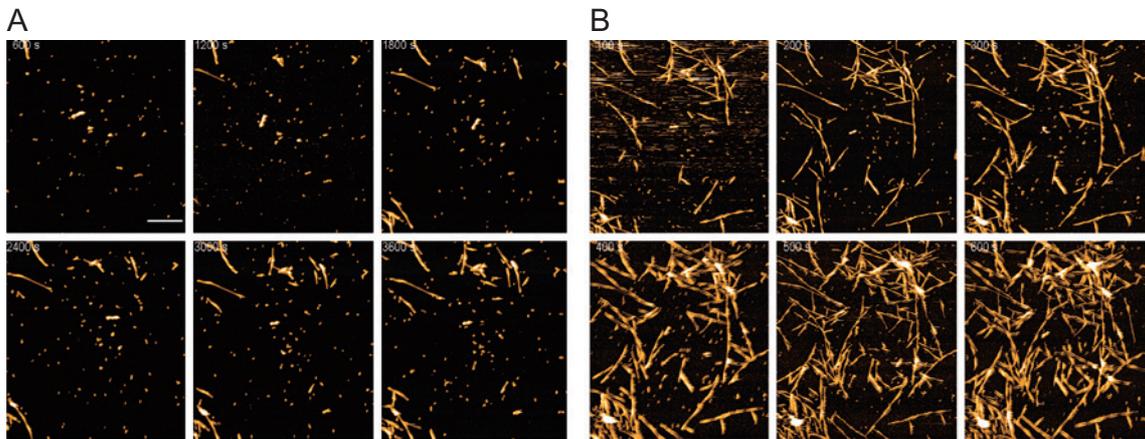


図4 高速原子間力顕微鏡を用いたミリセチンの可逆的なfAβ伸長抑制の観察 (文献9より)  
 低分子 Aβ42 (主にモノマー)、超音波により切断した fAβ42、ミリセチンを混合してインキュベートすると、fAβ42 の線維伸長反応は抑制されるが (A)、ミリセチンを取り除くと、明らかな線維伸長が観察される (B)。スケールバー = 300nm。

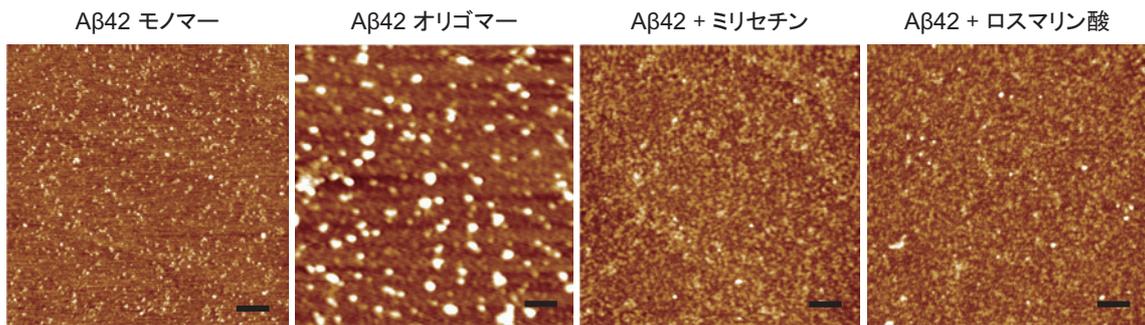


図5 フェノール化合物の Aβオリゴマー形成抑制効果 (文献19より)  
 Aβ42 は PICUP 法にて高さ約 1.39nm のオリゴマーが形成されるが、ミリセチン、またはロスマリン酸を添加するとオリゴマー形成が抑制される。スケールバー = 100nm。

た凝集体の Long term potentiation (LTP) および Long-term depression (LTD) に及ぼす影響を比較解析した。オリゴマー化によって LTP は抑制され、LTD は増強されるが、ミリセチンやロスマリン酸といったフェノール化合物によってオリゴマー形成が抑制されることによりシナプス毒性は軽減されることを示した<sup>19)</sup>。

また、我々は、<sup>15</sup>N でラベルした Aβ とフェノール化合物の混合溶液を用いて核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance : NMR) で解析し、フェノール化合物が結合する Aβ の特定領域を同定し

た<sup>19)</sup>。

富山らは、以前に結核などの治療に使われてきた抗生物質リファンピシンが fAβ 形成を抑制すること<sup>20)</sup>、我々はリファンピシンがすでに形成された fAβ を不安定化させることを報告してきたが<sup>21)</sup>、最近、我々は富山らとリファンピシンが Aβ、tau、α-シヌクレイン蛋白 (αS) のより早期の凝集段階であるオリゴマー形成を抑える作用があることを発見した (図6、図7)<sup>22)</sup>。

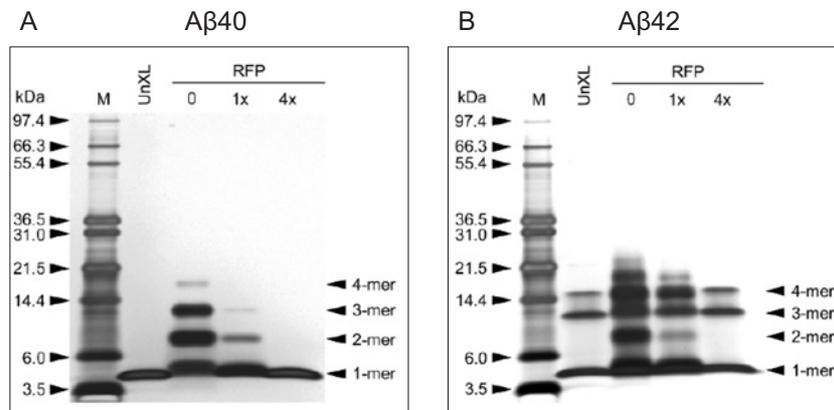


図6 リファンピシン (RFP) による Aβ40 (A) および Aβ42 (B) オリゴマーの形成抑制効果 (文献 22 より)

Aβ40 (A) および Aβ42 (B) は PICUP 法にてオリゴマーが形成されるが、RFP を添加すると濃度依存性にオリゴマー形成が抑制される。

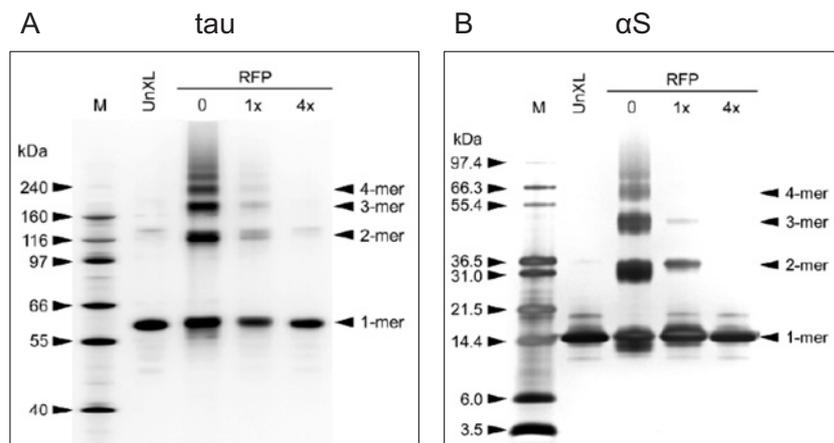


図7 リファンピシン (RFP) による tau (A) および αS (B) オリゴマーの形成抑制効果 (文献 22 より)

tau (A) および αS (B) は PICUP 法にてオリゴマーが形成されるが、RFP を添加すると濃度依存性にオリゴマー形成が抑制される。

## 2) *in vivo* および human における検討

我々は、マウントサイナイ病院・Giulio M. Pasinetti 教授らとアミロイド前駆体蛋白遺伝子 (amyloid precursor protein: APP) 遺伝子改変度物である Tg2576 マウスを用いてブドウ種子由来ポリフェノールが脳内の Aβ 沈着だけでなく、可溶性 Aβ オリゴマーも減少させ、さらに高次脳機能障害も改善することを示した<sup>23)</sup>。同様に、我々

は、Tg2576 モデルマウスに数種類のフェノール化合物を経口投与し、ロスマリン酸は、脳内の Aβ 沈着だけでなく Aβ オリゴマーも抑制すること、ミリセチンやクルクミンは、Aβ オリゴマーを減少させるが脳内の Aβ 沈着には効果はないことを発見した<sup>24)</sup>。

さらに、我々は、AD 病変のもう 1 つの重要なターゲット蛋白である tau に対するフェノール化

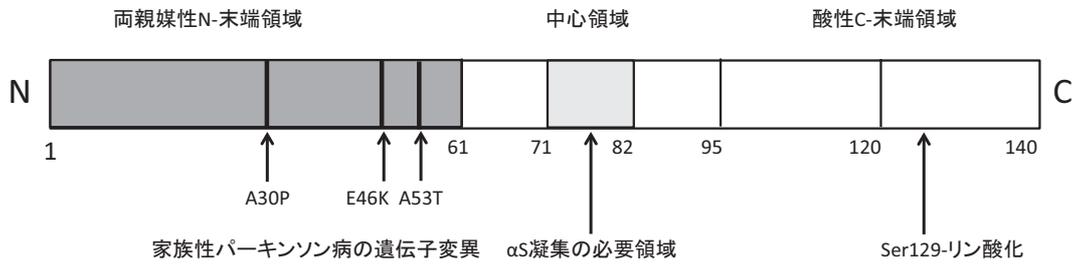


図8 α-シヌクレイン蛋白の構造

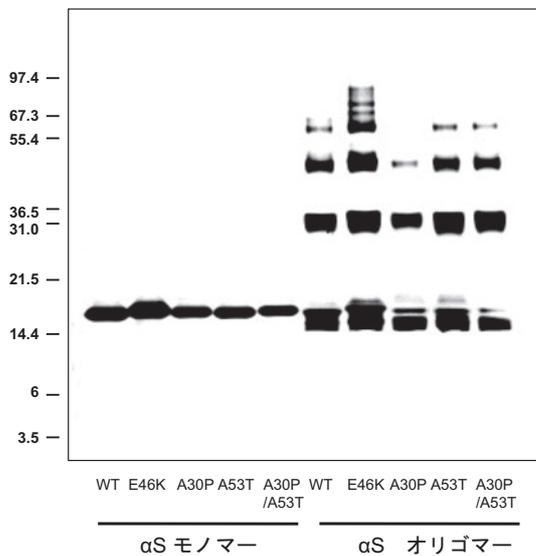


図9 αSのオリゴマー形成に及ぼすαS変異の影響（文献30より）

PICUP法を用いて作成した野生型 (WT)、E46K、A30P、A53T、および A30P/A53T 変異型の αS オリゴマーを電気泳動にて調べた。E46K 変異は αS オリゴマー形成を促進した一方で、A30P 変異は αS オリゴマー形成を抑制した。

化合物の効果を調べた結果、ぶどう種子由来ポリフェノールが、*in vitro* レベルで tau のランダムコイルから β シートへの 2 次構造変換および線維形成過程を抑制すること、そして、tau441 遺伝子過剰発現させた TMHT マウスを用いて *in vivo* レベルでリン酸化 tau を減少させることを明らかにした<sup>25)</sup>。

我々は健常者におけるポリフェノールの安全性試験（第 1 相試験）にて忍容性および安全性を確

認し<sup>26)</sup>、現在、少数の AD 患者さんにおけるプラセボ対照の第 2 相試験（ランダム化二重盲検）を施行中である。

最近、我々は、富山らとの共同研究にてリファンピシンを Aβ オリゴマーモデルマウスである APPOSK マウス、Tg2576 モデルマウスや tau609 モデルマウスに 1 カ月間経口投与したところ、*in vivo* レベルで脳の Aβ や tau のオリゴマーが減少し、シナプスが回復して、記憶障害が改善されることを報告した<sup>22)</sup>。

### αS 凝集

αS (図 8) の異常沈着は、Parkinson 病、Lewy 小体型認知症、多系統萎縮症、脳の鉄蓄積を伴う神経変性症 1 型などでも確認され、αS が線維状に凝集・沈着して神経細胞が傷害される疾患群として「α-シヌクレイノパチー」とよばれる<sup>27)</sup>。αS が凝集して成熟線維を形成する過程は、Aβ と同様に、重合核依存性重合モデルに従う<sup>28)</sup>。従来、レビー小体として蓄積する αS 線維が神経毒性を発揮すると考えられていたが、Aβ と同様に、より早期の凝集体であるプロトファイブリルやオリゴマーの研究に注目が集まっている<sup>29)</sup>。我々は、A30P、E46K、A53T の家族性パーキンソン病の αS 変異は、αS 凝集の最終段階である成熟線維形成だけでなく、最も重要な早期段階であるランダムコイルから β シートへの 2 次構造変換や早期凝集段階であるオリゴマー形成にも影響を及ぼすことを報告した (図 9)<sup>30)</sup>。また、近年、神経変性疾患の進行メカニズムとして、細胞内蛋白凝集体

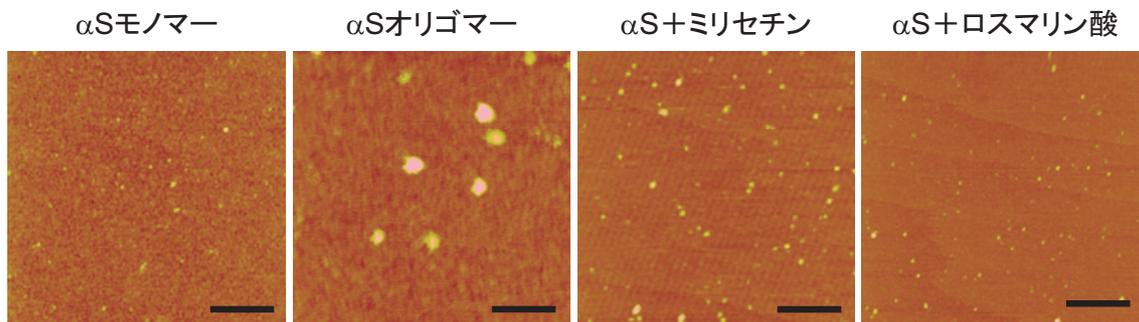


図 10 原子間力顕微鏡を用いたフェノール化合物による  $\alpha$ S 凝集抑制の観察 (文献 37 より)  
PICUP 法により高さ約 1.60nm の  $\alpha$ S オリゴマーが形成されるが、ミリセチンやロスマリン酸の添加後にはオリゴマー形成が抑制された。スケールバー = 100nm。

が細胞から細胞へと広がり、伝播した先でシードとして機能し、次々と蛋白凝集体形成が加速していくという「伝播仮説」が提唱されているが、*in vitro* および *in vivo* レベルでの  $\alpha$ S 凝集と  $A\beta$  や tau 蛋白凝集との線維形成促進効果 (cross-seeding 効果) も報告されている<sup>31)32)</sup>。

#### $\alpha$ S 凝集抑制薬の開発

我々は、 $\alpha$ S の異常凝集抑制という観点から  $\alpha$ -シヌクレイノパチーの新規予防・治療薬を開発することを目的として、試験管内  $\alpha$ S 凝集機構解明のための基本モデルを開発・確立し、このモデルを用いて  $\alpha$ S 線維形成過程に及ぼす様々な有機化合物の影響を解析した。その結果、ワイン関連ポリフェノール<sup>33)</sup>、カレースパイスの主成分であるクルクミン<sup>33)</sup>やビタミン A 類<sup>34)</sup>といった低分子化合物が、 $\alpha$ S 線維の形成を抑制するばかりでなく、すでに形成された  $\alpha$ S 線維も不安定化することを明らかにした。前述のように  $\alpha$ S においてもより早期の凝集段階が注目されているが、我々は、睡眠ホルモンであるメラトニンやプラミペキソールやエンタカポンをはじめとする抗パーキンソン病薬が、 $\alpha$ S 線維形成を抑制するばかりでなく、より早期段階であるプロトファイブリルやオリゴマー形成も抑制して神経毒性を軽減させることを明らかにした<sup>35)36)</sup>。また、我々は、最近ミリセチンやロスマリン酸をはじめとするフェノール化合物が濃

度依存的にオリゴマー形成を抑制することを示した<sup>37)</sup>(図 10)。さらに、マウスの海馬スライスから Long term potentiation (LTP) を記録し、 $\alpha$ S オリゴマーのシナプス毒性を検討した結果、 $\alpha$ S オリゴマーは LTP を抑制し、シナプス毒性を有した一方で、ミリセチンやロスマリン酸を作用させると LTP の抑制が軽減し、フェノール化合物の  $\alpha$ S オリゴマー形成抑制によりシナプス毒性が軽減することを報告した<sup>37)</sup>。

#### おわりに

我々は、 $A\beta$  や  $\alpha$ S の凝集、とくにオリゴマーに着目して、オリゴマーの凝集過程における役割、そして *in vitro* だけでなく、*in vivo* 実験系においてもオリゴマー形成抑制効果を示し、臨床試験まで進んでいる化合物を報告している。 $A\beta$  や  $\alpha$ S の凝集抑制、とくにオリゴマー形成抑制薬は、AD や  $\alpha$ -シヌクレイノパチーの根本的予防・治療において重要な位置を占める可能性がある。

#### 謝 辞

まず、このような素晴らしい名誉ある賞に愚生を選んでいただいた日本神経化学会優秀賞選考委員会の先生方、本稿執筆の機会を与えてくださった広報委員会の先生方に深謝します。本稿で紹介させていただ



図 11 昭和大学神経内科のメンバーとともに。最前列の右から2人目が筆者。

た研究は、多くの先生方のご協力、ご助言等の支えによって行われました。特に3人のかけがえのないボス、ぼくをアミロイド研究に導き、長い間にわたり、臨床・研究両面でご指導を賜った金沢大学脳老化・神経病態学（神経内科）山田正仁先生、アミロイド研究を含む基礎研究のABCを叩き込んで下さった福井大学分子病理学 内木宏延先生、LAを僕の心の故郷にしてくれた、オリゴマーの提唱者であるカリフォルニア大学ロサンゼルス校神経学 David B. Teplow先生に深く感謝します。今回の成果は、多くの共同研究者の方の協力があってのものです。上述の3人のボス以外に、福井大学医学部分子病理学 長谷川一浩先生、国立長寿医療研究センター 高島明彦先生、吉池裕二先生、大阪市立大学大学院医学研究科 富山貴美先生、梅田知宙先生、富山大学大学院医学薬学研究部 西条寿夫先生、高村雄策先生、水口峰之先生、大阪大学大学院神経内科学 望月秀樹先生、カリフォルニア大学ロサンゼルス校神経学 Erica Fradinger先生、Mohammed Inayathullah先生、Robin Roychaudhuri先生、マウントサイナイ病院精神医学 Giulio M. Pasinetti先生、Lap Ho先生、Jun Wang先生、金沢大

学バイオ AFM 先端研究センター 中山隆宏先生、そして、金沢大学大学院脳老化・神経病態学（神経内科学）浜口毅先生、篠原もえ子先生、森永章義先生、池田篤平先生、高橋良一先生、高崎純一君他医局員の先生方に深く感謝します。昨年より母校の昭和大学医学部内科学講座神経内科学教室を主催させていただいております（図11）。臨床の教室で基礎研究を継続していくことの厳しさを実感する毎日ですが、これまでお世話になった先生方には今後とも変わらぬご教授、ご鞭撻を賜ることをよろしく申し上げます。

## 文 献

- 1) 山田正仁. アルツハイマー病の診断と治療の新しい展開. からだの科学, 278, 2-7 (2013).
- 2) 小野賢二郎, 山田正仁. 疾患修飾薬の開発研究の基礎. からだの科学, 278, 152-155 (2013).
- 3) Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science, 297, 353-356 (2002).

- 4) Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 101-112 (2007).
- 5) Ono K, Yamada M. Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 117, 19-28 (2011).
- 6) Viola KL, Klein WL. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*, 129, 183-206 (2015).
- 7) Jarrett JT, Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73, 1055-1058 (1993).
- 8) Naiki H, Gejyo F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol*, 309, 305-318 (1999).
- 9) Watanabe-Nakayama T, Ono K, Itami M, Takahashi R, Teplow DB, Yamada M. High-speed atomic force microscopy reveals structural dynamics of amyloid  $\beta$ 1-42 aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 5835-5840 (2016).
- 10) Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*, 14, 837-842 (2008).
- 11) Ono K, Condrón MM, Teplow DB. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid  $\beta$ -protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14745-14750 (2009).
- 12) Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condrón MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. Amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem*, 274, 25945-25952 (1999).
- 13) Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6448-6453 (1998).
- 14) Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid- $\beta$  protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440, 352-357 (2006).
- 15) Noguchi-Shinohara M, Yuki S, Dohmoto C, Ikeda Y, Samuraki M, Iwasa K, Yokogawa M, Asai K, Komai K, Nakamura H, Yamada M. Consumption of green tea, but not black tea or coffee, is associated with reduced risk of cognitive decline. *PLoS One*, 9, e96013 (2014).
- 16) Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 87, 172-181 (2003).
- 17) Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurosci Res*, 75, 742-750 (2004).
- 18) Ono K, Condrón MM, Ho L, Wang J, Zhao W, Pasinetti GM, Teplow DB. Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid  $\beta$ -protein self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem*, 283, 32176-32187 (2008).
- 19) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid  $\beta$ -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem*, 287, 14631-14643 (2012).
- 20) Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H, Endo N. Inhibition of amyloid  $\beta$  protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. *J Biol Chem*, 271, 6839-6844 (1996).

- 21) Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils *in vitro*. *J Neurochem*, 81, 434-440 (2002).
- 22) 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- $\beta$  and tau oligomers. *Brain*, 139, 1568-1586 (2016).
- 23) Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, Humala N, Teplow DB, Pasinetti GM. Grape seed extract MegaNatural-AZ prevents A $\beta$  oligomerization and attenuates cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28, 6388-6392 (2008).
- 24) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, Yamada M. Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid  $\beta$  aggregation pathway. *Am J Pathol*, 175, 2557-2565 (2009).
- 25) Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiazek-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM. Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 22, 653-661 (2010).
- 26) Noguchi-Shinohara M, Ono K, Hamaguchi T, Iwasa K, Nagai T, Kobayashi S, Nakamura H, Yamada M. Pharmacokinetics, Safety and Tolerability of Melissa officinalis Extract which Contained Rosmarinic Acid in Healthy Individuals: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One*, 10, e0126422 (2015).
- 27) Ono K, Hirohata M, Yamada M.  $\alpha$ -synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders. *Curr Pharm Des*, 14, 3247-3266 (2008).
- 28) Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL.  $\alpha$ -synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*, 274, 19509-19512 (1999).
- 29) Goldberg MS, Lansbury PT Jr. Is there a cause-and-effect relationship between  $\alpha$ -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol*, 2, E115-119 (2000).
- 30) Ono K, Ikeda T, Takasaki J, Yamada M. Familial Parkinson disease mutations influence  $\alpha$ -synuclein assembly. *Neurobiol Dis*, 43, 715-724 (2011).
- 31) Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid  $\beta$ -protein and  $\alpha$ -synuclein. *J Neurochem*, 122, 883-890 (2012).
- 32) Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, Riddle DM, Kwong LK, Xu Y, Trojanowski JQ, Lee VM. Distinct  $\alpha$ -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell*, 154, 103-117 (2013).
- 33) Ono K, Yamada M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for  $\alpha$ -synuclein fibrils *in vitro*. *J Neurochem*, 97, 105-115 (2006).
- 34) Ono K, Yamada M. Vitamin A potently destabilizes preformed  $\alpha$ -synuclein fibrils *in vitro*: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis*, 25, 446-454 (2007).
- 35) Ono K, Mochizuki H, Ikeda T, Nihira T, Takasaki J, Teplow DB, Yamada M. Effect of melatonin on  $\alpha$ -synuclein self-assembly and cytotoxicity. *Neurobiol Aging*, 33, 2172-2185 (2012).
- 36) Ono K, Takasaki J, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Effects of antiparkinsonian agents on  $\beta$ -amyloid and  $\alpha$ -synuclein oligomer formation *in vitro*. *J Neurosci Res*, 91, 1371-1381 (2013).
- 37) Takahashi R, Ono K, Takamura Y, Mizuguchi M, Ikeda T, Nishijo H, Yamada M. Phenolic compounds prevent the oligomerization of  $\alpha$ -synuclein and reduce synaptic toxicity. *J Neurochem*, 134, 943-955 (2015).