

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659449
研究課題名（和文）A β オリゴマーカルシウムチャンネルに着目したアルツハイマー病神経変性機構の探索
研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying Alzheimer's neurodegeneration: implication for A β oligomer Ca ²⁺ channels
研究代表者 松原悦朗（MATSUBARA ETSURO） 弘前大学医学（系）研究科（研究院）・准教授 研究者番号：70219468

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病モデルマウスと野生型マウスから調整した培養神経細胞に A β オリゴマーを投与すると細胞内カルシウム濃度の著明な増加と細胞死が観察された。しかし既存のカルシウムチャンネル阻害薬ではその抑制効果を認めず、A β オリゴマー特異的抗体でのみ両者の顕著な抑制が可能であった。この結果は A β オリゴマー自体が細胞外からのカルシウム流入をきたす神経細胞膜障害を惹起することで、神経毒性を発揮していると推測された。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanism of calcium (Ca²⁺) homeostasis underlying immunotherapy targeting A β oligomers (A β Os) remains to be determined. We found that A β Os caused calcium (Ca²⁺) overload in the cytosol of viable cells. The anti-A β O antibody 72D9 afforded a near blockade of cytosolic Ca²⁺ overload in cortical neurons obtained from either non-Tg or 3x Tg-AD mice, indicating that cytosolic Ca²⁺ overload originates from extracellular Ca²⁺. Neither *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) antagonists nor L-type voltage-dependent Ca²⁺ channel (L-VDDC) blockers also attenuated them, suggesting that the impairment of membrane integrity was owing to A β O-depending action such as a pore formation for Ca²⁺. Thus, in neurons, monoclonal 72D9 acts as a modulator of pathological Ca²⁺-homeostasis via specific control of extracellular A β Os.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：A β オリゴマー、カルシウムチャンネル、シナプス、神経細胞変性

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病患者脳においては、生理的に産生された amyloid β (A β) は脳外へのクリアランスと脳内での分解によりその恒常レベルが保たれ、脳内蓄積を免れている。しかしアルツハイマー病ではこのバランスが破綻し、A β の脳内蓄積から老人斑

アミロイド形成、次いで神経変性 (tauopathy) が惹起され、その病態が完成し発症に至ると考えられている (アミロイドカスケード仮説)。ところがアルツハイマー病モデルマウスの開発と最近の免疫療法の解析報告から、老人斑アミロイドは治療標的ではなく、アミロイド線維形成して沈

着・蓄積する前の中間分子(A β オリゴマー)こそがシナプス障害・認知機能障害を引き起こす直接原因であり、治療標的であることが明らかとなった。我々もアルツハイマー病患者脳でA β ダイマーが特異的に増加していること(Matsubara E, Neurobiol Aging 2004)、アミロイド沈着前のアルツハイマー病モデルマウス脳内で記憶障害と同期してA β ダイマー沈着が始まることを見だし(Kawarabayashi T, Matsubara E, J Neurosci 2004)、このA β オリゴマー制御を標的とした治療法開発を目的にその特異的抗体作製に着手し、静脈注射にてアルツハイマー病モデルマウスで再現される病態(記憶障害・神経細胞内A β 蓄積)の発症予防効果を有する治療用モノクローナル抗体の開発に成功した(日本特願 2008-201058, 米国特願 12/533, 294 & 12/533, 348)。細胞内カルシウム代謝異常はアルツハイマー病の発症病態への関与は想定されていたが、記憶障害発症や神経細胞内A β 蓄積に起因した神経細胞変性への観点から、特にA β オリゴマー特異的なカルシウム代謝制御機構の役割は明らかでなかった。

2. 研究の目的

A β オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー病における記憶障害発症の分子基盤と考えられている。このシナプス・神経変性を惹起する分子メカニズム解明はアルツハイマー病の治療法開発にきわめて重要であるものの、その詳細は依然不明である。本研究ではこのA β オリゴマーと細胞内カルシウム制御との関連を、その機能的・構造的解析から施行し、アルツハイマー病における神経細胞変性機構解明と新規分子標的療法開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) A β オリゴマーカルシウムチャンネルの局在と特異性検証

分子量で分画した蛍光標識A β ペプチド(Fr. 1 < 3kDa, Fr. 2 3-10 kDa, Fr. 3 10-30 kDa, Fr. 4 30-100 kDa, Fr. 5 > 100 kDa)をマウス大脳皮質神経細胞に添加し、分画したA β ペプチドの神経細胞膜上局在(細胞体、樹状突起、スパイン、軸索)と細胞内カルシウム流入の coupling の様子を共焦点レーザー顕微鏡でリアルタイムに観察する。細胞内カルシウムイメージングは蛍光色素 Fluro-8 NW を用いて行う。アルツハイマー病モデルマウスと野生型マウス由来神経細胞間で細胞内カルシウム流入にカップリングした蛍光標識A β 分画と細胞内シグナル伝達の質的相違を明らかとし、オリゴマー特異的抗体でのみ細胞内カルシウム

流入が阻害可能な分子メカニズムを探索する。さらに、A β オリゴマー添加による細胞内カルシウム増加が既存の内因性イオンチャンネルに由来しないことを各種イオンチャンネル阻害薬で確認する。また細胞死と細胞変性判定はLDH assay と Live/dead assay を用いる。

(2) A β オリゴマーカルシウムチャンネル阻害活性を有する抗体のスクリーニング

これまで取得した様々なA β オリゴマー特異的抗体から、細胞内カルシウム流入の阻害活性を有する抗体と有さぬ抗体をスクリーニングする。

(3) シナプス・神経細胞変性へのカルシウムシグナルカスケード解析

A β オリゴマー特異的抗体による予防的受動免疫療法を施行し記憶障害発症予防効果の得られたマウス脳内で、in vivo シナプス機能および神経細胞変性予防機能にリンクしたカルシウムカスケード責任分子を、CaMKII を中心に免疫沈降法やイムノプロット法、免疫組織化学的手法で実証する。

4. 研究成果

(1) A β オリゴマーカルシウムチャンネルの局在と特異性検証

細胞内カルシウムはA β オリゴマー分画添加に反応して増加し、その際に細胞死も惹起されることが明らかとなり、細胞内カルシウム増加と細胞死がリンクしていることが明らかとなった。一方、野生型マウス脳から調整した培養神経細胞を用いた実験では、A β オリゴマー添加に反応して増加する細胞内カルシウムの抑制効果はA β オリゴマー抗体>>カルシウムチャンネルブロッカー(MK-801, D-APV, nifedipine)であることが明らかとなり、A β オリゴマー依存的な細胞外からの細胞内カルシウム動員機構の存在が示唆された。一方、PS1 変異を有し、細胞内由来のカルシウム増強効果を有する3xTg-ADマウス脳から調節した培養神経細胞でも同様の検討を行った結果、生理的な定常状態での細胞内カルシウム増加はMK-801, D-APV, nifedipine で抑止がかかることなく、A β オリゴマー添加に反応して顕著に増加した細胞内カルシウムにもその効果は全く無効であった。しかしながら、A β オリゴマー抗体ではほぼA β オリゴマーの存在しない定常状態まで細胞内カルシウムレベルは抑制され、細胞死も抑圧された。

(2) Aβ オリゴマーカルシウムチャンネル阻害活性を有する抗体のスクリーニング

我々が作成した Aβ オリゴマー特異的抗体(1A9, 2C3, 72D9)はすべて上記活性を有していたが、市販の抗体 A11, 6E10 では認めなかった。

(3) シナプス・神経細胞変性へのカルシウムシグナルカスケード解析

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKII)は、神経活動制御やシナプス可塑性、特に学習・記憶に重要な働きをしているが、Aβ オリゴマー特異的抗体による受動免疫療法を施行し記憶障害発症予防効果の得られたマウス脳内ではCaMKII の自己リン酸化が亢進している一方で、NMDA 受容体の NR2B のリン酸化には変化を認めぬことが明らかとなり、NMDA 受容体非依存的なカルシウム流入がアルツハイマー病モデルマウスの記憶障害発症に関与していると考えられた。一方、PSD95 優位な維持効果が認められる治療マウスで CREB 自体の変化は明らかでないことから、Aβ オリゴマー依存的なカルシウム流入の主座はシナプスと考えられ、Aβ オリゴマーの神経毒性発揮部位として矛盾しないものであった。

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 6 件)

1. Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang L-S, Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuhira T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim J-W, Ki C-S, Won H-H, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I, The Alzheimer Disease Genetics Consortium, St. George-Hyslop P, Mayeux R, Hagines

JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenburg GD, Farrer LA, Kuwano R. *SORL1* is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians. *PLoS One.* 8: e58618, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0058618

2. Takamura A, Sato Y, Watabe D, Okamoto Y, Nakata T, Kawarabayashi T, Oddo S, LaFerla FM, Shoji M, *Matsubara E. Sortilin is Required for Toxic Action of Aβ Oligomers (AβOs): Extracellular AβOs Trigger Apoptosis, and Intraneuronal AβOs Impair Degradation Pathways. *Life Sci.* 91 : 1177-1186, 2012. Doi:10.1016/j.lfs.2012.04.038. (査読あり)
3. Matsubara E, Takamura A. Molecular mechanism underlying Aβ immunotherapy: implications for the toxic action of Aβ oligomers. *J Gerontol Geriat Res.* S2:001. Doi:10.4172/2167-7182.S2-001, 2012. (査読あり)
4. 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. The Dissociation of Aβ from Lipoprotein in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease accelerates Aβ42 assembly. *J Neurosci Res.* 89:815-821, 2011. (査読あり)
5. 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-AβOs Represent a Molecular Basis of Memory Loss in Alzheimer's Disease Model Mouse. *Mol Neurodegener.* 6 : 20, 2011. Doi:10.1186/1750-1326-6-20. (査読あり)
6. 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 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

1. Matsubara E. A β oligomer immunotherapy as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. The 15th MNRC International Symposium, 2012 年 11 月 13 日, Shiga. シンポジウム
2. 松原悦朗. トピックス徹底討論, 免疫療法. 第 31 回日本認知症学会, 2012 年 10 月 28 日, つくば. シンポジウム
3. 松原悦朗. アルツハイマー病の早期診断・治療のためのガイドラインに向けて: predromal AD, Pre-MCI, 生化学的、病理学的バックグラウンド. 第 31 回日本認知症学会, 2012 年 10 月 26 日, つくば. シンポジウム
4. 松原悦朗. アルツハイマー病治療開発への道程: 臨床医学から見た基礎研究の意義. 認知症研究を知る若手研究者の集まり (日本認知症学会主催・基礎委員会企画), 2011 年 7 月 30 日, 大府. ワークショップ
5. 松原悦朗. 抗体医療開発の現状. Aging Science Forum 「アルツハイマー病研究の up-to-date」, 第 48 回日本老年医学会学術集会, 2011 年 6 月 17 日, 東京. シンポジウム
6. 松原悦朗. アルツハイマー病モデルマウスに対するメラトニンの効果. 第 11 回日本抗加齢医学会, 2011 年 5 月 28 日, 京都. シンポジウム
7. 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, 2011 年 2 月 19 日, 仙台. 教育講演

[図書] (計 1 件)

1. Matsubara E. Lipoproteins and apolipoproteins in Alzheimer's disease (Kostner G, Frank S eds) Lipoprotein / Book 1, 613-620, InTech, Croatia, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: A β オリゴマーに特異的に結合する抗体およびその利用

発明者: 松原悦朗、柴田昌夫、達巳

権利者: イムナス・ファーマ株式会社、国立長寿医療研究センター

種類: PCT

番号: JP2008/068848

出願年月日: 2008. 10. 17

国内外の別: 国際

名称: Antibody specific binding to A Beta oligomer and the use.

発明者: 松原悦朗、柴田昌夫、達巳

権利者: イムナス・ファーマ株式会社、国立長寿医療研究センター

種類: U.S. Patent Application, Appl.

番号: No. 12/533, 294

出願年月日: 2009. 07. 31

国内外の別: 国際

名称: Antibodies that specifically bind to A β oligomers and uses thereof

発明者: 松原悦朗、柴田昌夫、達巳

権利者: イムナス・ファーマ株式会社、国立長寿医療研究センター

種類: U.S. Patent Application, Appl.

番号: No. 12/533, 348

出願年月日: 2009. 07. 31

国内外の別: 国際

○取得状況 (計 2 件)

名称: A β オリゴマーに特異的に結合する抗体およびその利用

発明者: 松原悦朗、柴田昌夫、達巳

権利者: イムナス・ファーマ株式会社、国立長寿医療研究センター

種類: 特許証

番号: 特許第 5113853 号

取得年月日: 2012. 10. 19

国内外の別: 国内

名称: Antibodies that specifically bind to A β oligomers and uses thereof

発明者: 松原悦朗、柴田昌夫、達巳

権利者：イムナス・ファーマ株式会社、国立
長寿医療研究センター
種類：特許証
番号：US patent No. 8378081
取得年月日：2013.2.19
国内外の別：米国

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.h-shinnai.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原悦朗 (MATSUBARA ETSURO)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号：70219468

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし