

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22110003

研究課題名(和文)シナプスを標的とするアルツハイマー病の病態解明と治療

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular pathology of Alzheimer's disease focusing on the synapses toward therapies

研究代表者

岩坪 威(IWATSUBO, Takeshi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50223409

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 84,800,000円

研究成果の概要(和文):アルツハイマー病(AD)脳の最大の特徴である老人斑は、アミロイド ペプチド(A<sub>β</sub>)から成ることが明らかになっているが、その形成過程には不明の点が多く残されていた。本研究では脳機能の本態である神経活動とA<sub>β</sub>蓄積の関係に焦点を絞り、神経活動の制御法として最新の技術である光遺伝学を用いて検討を行った。ADモデルであるAPPトランスジェニックマウスの脳において、海馬の主要な入力回路である貫通線維路を、光遺伝学により長期にわたり慢性刺激したところ、投射先の海馬歯状回においてA<sub>β</sub>蓄積が増加した。これらの結果は神経活動とA<sub>β</sub>蓄積の関係をはじめて直接的に示した点で、画期的な知見である。

研究成果の概要(英文):Massive deposition of amyloid peptide (A<sub>β</sub>) as senile plaques is the pathological hallmark of Alzheimer disease (AD), although the mechanism of A<sub>β</sub> deposition remains unclear. In this study, we examined whether synaptic activity influences A<sub>β</sub> secretion and deposition in vivo. Optogenetics is a state-of-the-art technique that enables the selective control of a specific population of neurons by light. We adopted optogenetics and chronically stimulated the perforant pathway, a major input into the hippocampus, of AD model mice, and found a significant increase in A<sub>β</sub> deposition at the projection area of the perforant pathway. These findings implicate functional abnormalities of specific neuronal circuitry in A<sub>β</sub> pathology and AD.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド ペプチド シナプス 光遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer disease, AD) は高齢化社会の本格化に伴い急増しつつある認知症の主因として、最も頻度の高い神経変性疾患である。AD 脳に生じる病理学的変化のうち、老人斑は amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) からなるアミロイド線維の蓄積であり、AD の原因的過程に密接不可分な現象と捉えられているが、その形成過程ならびに神経障害のメカニズムとの関係は不明であった。近年、シナプスが神経活動依存性に生じる  $A\beta$  分泌の場であることを示唆する結果が報告され (Kamenetz *et al.*, *Neuron*, 2003, Cirrito *et al.*, *Neuron*, 2005)、AD を「シナプス異常症」と捉える視点が生じた。しかし、 $A\beta$  の産生・蓄積とシナプス活動の関係を *in vivo* レベルで直接検証した研究はなかった。

近年神経活動を時空間的に制御することが可能な新技術として光遺伝学 (オプトジェネティクス) が開発された (Boyden *et al.*, *Nat Neurosci*, 2005)。光駆動性の陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン (ChR2) を利用し、ChR2 を特定の神経細胞群に発現させることにより、その神経活動を光刺激依存的に制御させることが可能な技術であり、神経疾患研究への応用も期待された。

### 2. 研究の目的

AD を「シナプス異常症」と捉える仮説に立脚し、(1) シナプスにおける活動依存的な  $A\beta$  産生の検証と、その分泌機構の解明、(2) AD モデル動物脳におけるシナプス活動依存性  $A\beta$  蓄積の実証、さらに (3)  $A\beta$  によるシナプス障害機構の解明と治療法開発、に焦点をあて検討を行った。

### 3. 研究の方法

本研究において AD モデル動物として、我々がこれまでに樹立した APP トランスジェニック (tg) マウス (A7 系統) を用いた (Yamada *et al.*, *J Neurosci.*, 2009)。A7 マウスでは神経細胞特異的にヒト APP695 (KM670/671NL + T714I) を過剰発現することにより、大脳新皮質や海馬に約 11 ヶ月齢から  $A\beta$  蓄積が生じることが確かめられている。本研究では神経活動依存的な  $A\beta$  産生・蓄積機構の検証のため、海馬への主要な入力経路である貫通線維路に着目し、貫通線維路の起始部である嗅内皮質第 II 層の神経細胞をオプトジェネティクスを用いて特異的に刺激し、貫通線維路終末の海馬歯状回外分子層における  $A\beta$  蓄積、および海馬間質液 (interstitial fluid, ISF) 中における  $A\beta$  濃度を評価した。

本研究において貫通線維路を長期間持続的に刺激するため、ChR2 改変体 hChR2 (C128S/D156A), stabilized step function opsin (SSFO) を利用した。SSFO は 1 回の光刺激で 30 分以上神経細胞を脱分極させることが可

能である (Yizhar *et al.*, *Nature*, 2011)。アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに、CaMKII $\alpha$  プロモーター下に SSFO-EYFP あるいはコントロールとして EYFP を繋いだコンストラクトを組み込み、脳定位固定装置を用いて APP tg マウス嗅内皮質第 II 層神経細胞に遺伝子導入した。1 ヶ月後嗅内皮質に光刺激用オプティカルカニューレを埋め込み、1 日 1 回 (473 nm, 4 mW, 2 秒間) 光刺激を行った。

また、*in vivo* microdialysis 法を用い (Cirrito *et al.*, *J Neurosci*, 2003)、海馬 ISF 中  $A\beta$  濃度の測定を行った。APP tg マウス海馬に脳定位固定装置を用いて 35 kDa または 1,000 kDa カットオフの微小透析膜プローブを埋め込み、流速 1.0  $\mu$ l/min で人工脳脊髄液 (artificial CSF, aCSF) を灌流し、ISF サンプルを回収した。得られたサンプルは  $A\beta$  特異 ELISA を用いて海馬 ISF 中  $A\beta$  濃度を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 貫通線維路 SSFO 発現マウスの作出と神経活動依存的な $A\beta$ 放出の検証

貫通線維路の神経活動を制御するため、AAV-CaMKII $\alpha$ -SSFO-EYFP (SSFO) あるいはコントロールとして AAV-CaMKII $\alpha$ -EYFP (EYFP) を嗅内皮質第 II 層の神経細胞に感染させた。1 ヶ月後嗅内皮質を 2 秒間光刺激 (473 nm, 4 mW) し、その後抗 c-fos 抗体を用いて、神経活動を免疫組織化学的に検討した。その結果、光刺激を行った嗅内皮質の神経細胞、及び貫通線維路の投射先である海馬歯状回の神経細胞において c-fos 陽性像が観察された (図 1)。一方非光刺激側の海馬歯状回や、EYFP を感染させたマウスではそのような c-fos 陽性像は認められなかった。これらの結果から、オプトジェネティクスを用いて貫通線維路の神経活動を光刺激依存的に亢進可能なマウスの作出に成功した。

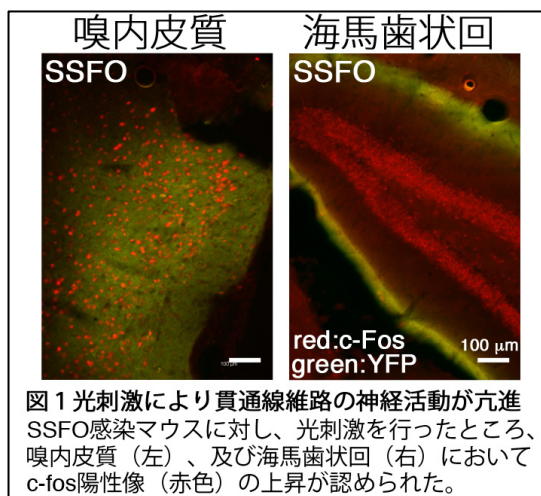


図 1 光刺激により貫通線維路の神経活動が亢進 SSFO 感染マウスに対し、光刺激を行ったところ、嗅内皮質 (左)、及び海馬歯状回 (右) において c-fos 陽性像 (赤色) の上昇が認められた。

次に神経活動依存的な  $A\beta$  放出について検討するため、SSFO あるいは EYFP を APP tg マウス嗅内皮質第 II 層の神経細胞に感染させ、1 ヶ月後海馬に 35 kDa カットオフの微小透析膜プローブを埋め込んだ。そして嗅内皮質

を毎分2秒間240分間光刺激(473 nm, 4 mW)行った。その結果 SSFO を感染させたマウスでは光刺激直後から海馬 ISF 中の A $\beta$ 42濃度が約 24% 上昇することが認められたが、EYFP を感染させたマウスでは上昇は認められなかった (Yamamoto *et al.*, *Cell Reports*, 2015)。これらの結果は神経活動依存的に A $\beta$  が軸索終末から放出されることを示すものである。

### (2) 慢性的な神経活動の亢進が A $\beta$ 蓄積を増強することを解明

A $\beta$ が神経活動依存的に軸索終末から放出されることを見出したことから、慢性的な神経活動の亢進が A $\beta$ の病理形成にどのような影響を与えるかにつき検討を行った。SSFO あるいは EYFP を 9.5 ヶ月齢の APP tg マウス嗅内皮質第 II 層の神経細胞に感染させ、1 ヶ月後より 5 ヶ月間嗅内皮質を光刺激(2 秒間/日, 473 nm, 4 mW)した。その結果 SSFO 感染マウスでは、非刺激側に比べ光刺激を行った半球側の海馬歯状回外分子層の A $\beta$ 蓄積面積は約 2.5 倍有意に上昇した(図 2)。一方 EYFP 感染マウスでは海馬歯状回の A $\beta$ 蓄積面積に変化は認められなかった。これらの結果は、慢性的な神経活動の亢進が軸索終末において A $\beta$ 蓄積を促進しうることを示す初めての所見である (Yamamoto *et al.*, *Cell Reports*, 2015)。



さらに慢性的な神経活動の亢進が A $\beta$ 蓄積開始時期を早めるか否かを検討するため、SSFO あるいは EYFP を 4.5 ヶ月齢の APP tg マウス嗅内皮質第 II 層の神経細胞に感染させ、1 ヶ月後より 5 ヶ月間嗅内皮質を同様に光刺激を行った。しかし、光刺激により A $\beta$ 蓄積開始が早まる様子は認められず、A $\beta$ 蓄積には神経活動の亢進だけではなく、なんらかの附加的要因、例えば凝集核形成など、が必要である可能性が示唆された。

次に慢性的な神経活動の亢進が A $\beta$ 蓄積を増強した分子機構を明らかにするため、A $\beta$ の産生過程に注目した。A $\beta$ は 1 回膜貫通型タンパク質 APP から  $\beta$ -secretase、次いで  $\gamma$ -secretase の二段階切断を受け産生される断片であり、特に  $\beta$ -secretase による切断は A $\beta$ 産生の律速段階である。そこで APP が  $\beta$ -secretase による切断を受け放出する sAPP $\beta$ 量を測定することにより、慢性的な神経活動が A $\beta$ 産生を亢進するかを検討した。SSFO あるいは EYFP を 3~6 ヶ月齢の APP tg マウス嗅

内皮質第 II 層の神経細胞に感染させ、1 ヶ月後より 3 ヶ月間嗅内皮質を光刺激(2 秒間/日, 473 nm, 4 mW)した。その後海馬に 1,000 kDa カットオフの微小透析膜プローブを埋め込み、嗅内皮質を光刺激した。その結果、SSFO 感染マウスでは光刺激により 8 時間以上海馬 ISF 中の A $\beta$ 濃度が上昇したが、sAPP $\beta$ あるいは、APP の  $\alpha$ -secretase 切断産物である sAPP $\alpha$ 濃度の上昇は認められなかった。一方 EYFP 感染マウスでは海馬 ISF 中の A $\beta$ , sAPP $\beta$ , sAPP $\alpha$ の濃度の上昇は認められなかった。これらの結果から慢性的な貫通線維路の神経活動亢進により A $\beta$ 産生ではなく、A $\beta$ 放出が促進される可能性が示唆された(Yamamoto *et al.*, *Cell Reports*, 2015)。

また本研究において 1 ヶ月以上光刺激を繰り返した SSFO 感染マウスでは全身性の痙攣症状を示すことがわかった。これは貫通線維路の慢性的な刺激によりキンドリングが形成されたものと考えられ、このようなてんかん様症状は EYFP 感染マウスでは認められなかった。

### (3) Neuroigin-1 が神経活動依存的に切断されることを見出す

シナプスは神経活動に応じて結合様式や形を変化させることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。本研究において我々はポストシナプスに存在し、興奮性シナプス形成に重要な役割を果たす Neuroigin-1 (NLG1)に着目し (Scheiffele *et al.*, *Cell*, 2000)、NLG1 がメタロプロテアーゼ ADAM10、次いで  $\gamma$ -secretase により切断されることを見出した。

神経活動と NLG1 の切断について検討すべく、ラット初代培養神経細胞にグルタミン投与を行ったところ、NLG1 の切断が亢進し、これは NMDA 受容体阻害剤 AP-5 により抑制されたことから、NLG1 は NMDA 受容体を介した興奮性の神経活動依存的に切断されることが示唆された。

さらに NLG1 の切断が興奮性シナプス形成に及ぼす影響を検討するため、ADAM10 による切断が抑制される変異型 NLG1 をラット初代培養神経細胞に発現させたところ、野生型 NLG1 を発現させた場合に比べ、スパイン数の有意な上昇が認められた。これらの結果は NLG1 の切断がスパインの形成に抑制的に働く可能性を示唆する結果である (Suzuki *et al.*, *Neuron*, 2012)。

### (4) CLAC-P は神経筋発生に必須の分子であることを発見

CLAC-P / collagen type XXV は AD 脳老人斑アミロイドより同定した非 A $\beta$ 老人斑アミロイド構成因子である (Hashimoto *et al.*, *EMBO*, 2002)。これまで CLAC-P は成体マウスでは中枢神経特異的に発現することが確かめられていたが、その生理機能は不明であった。そこで我々は CLAC-P の生理機能を明らかにす



るため、CLAC-P 遺伝子欠損マウスを作成したところ、E0 において、脊髄の運動ニューロンが消失し、骨格筋の形成不全により致死となることを見出した。

さらに、CLAC-P 遺伝子欠損マウス胎児を用いて検討したところ、E12.5 において運動ニューロンは正常に発生し、標的骨格筋まで軸索束を投射するものの、その後筋肉での軸索伸長・分枝が起こらず、アポトーシスにより消失することがわかった (図 3、Tanaka *et al.*, *J Neurosci*, 2014)。

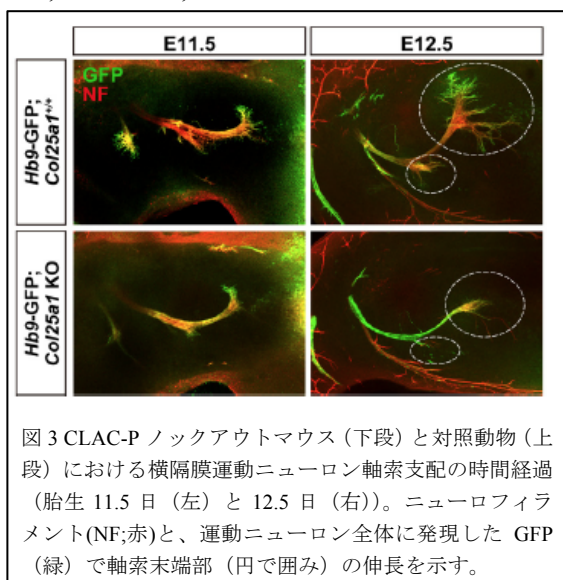


図 3 CLAC-P ノックアウトマウス (下段) と対照動物 (上段) における横隔膜運動ニューロン軸索支配の時間経過 (胎生 11.5 日 (左) と 12.5 日 (右))。ニューロフィラメント (NF; 赤) と、運動ニューロン全体に発現した GFP (緑) で軸索末端部 (円で囲み) の伸長を示す。

これらの結果は、CLAC-P が神経筋発生に必要な分子であることを示すものであり、今後詳細な分子メカニズムの解明が期待される。

#### <引用文献>

Boyden E, et al., Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.*, 8, 1263-1268, 2005

Cirrito JR, et al., *In vivo* assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- $\beta$  metabolism and half-life. *J. Neurosci.*, 23, 8844-8853, 2003

Cirrito JR, et al., Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- $\beta$  levels *in vivo*. *Neuron*, 48, 913-922, 2005

Hashimoto T, et al., CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J*, 21, 1524-1534, 2002

Kamenetz F, et al., APP processing and synaptic function. *Neuron*, 37, 925-937, 2003

Scheiffele P, et al., Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101,

657-669, 2000

Suzuki K, et al., Activity-dependent proteolytic cleavage of Neuroligin-1. *Neuron*, 76, 410-422, 2012

Tanaka T, et al., CLAC-P/Collagen Type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development. *J. Neurosci.*, 34, 1370-1379, 2014

Yamada K, et al., A $\beta$  immunotherapy: intracerebral sequestration of A $\beta$  by an anti-A $\beta$  monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A $\beta$ . *J. Neurosci.*, 29, 11393-11398, 2009

Yamamoto K, et al., Chronic optogenetic activation augments A $\beta$  pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Reports*, 11, 859-865, 2015

Yizhar O, et al., Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477, 171-178, 2011

#### 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 30 件)

1. Yamamoto K, Tanei Z, Hashimoto T, Wakabayashi T, Okuno H, Naka Y, Yizhar O, Fenno LE, Fukayama M, Bito H, Cirrito JR, Holtzman DM, Deisseroth K, Iwatsubo T: Chronic optogenetic activation augments A $\beta$  pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Reports*, 11, 859-865, 2015  
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.04.017, 査読有

2 Takagi-Niidome S, Sasaki T, Osawa S, Sato T, Morisima K, Cai T, Iwatsubo T, Tomita T: Cooperative roles of hydrophilic loop 1 and the C terminus of presenilin 1 in the substrate-gating mechanism of  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci*, 35, 2646-2656, 2015  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3164-14.2015, 査読有

3. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T: Decreased CALM expression reduces A $\beta$ 42 to total A $\beta$  ratio through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. *Nat Commun*, 5, 3386, 2014  
DOI: 10.1038/ncomms4386, 査読有

4. Tanaka T, Wakabayashi T, Oizumi H, Nishio S, Sato T, Harada A, Fujii D, Matsuo Y, Hashimoto T, Iwatsubo T: CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during

neuromuscular development. *J Neurosci*, 34, 1370-1379, 2014  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2440-13.2014, 査読有

5. Ihara R, Matsukawa K, Nagata Y, Kunugi H, Tsuji S, Chihara T, Kuranaga E, Miura M, Wakabayashi T, Hashimoto T, Iwatsubo T: RNA binding mediates neurotoxicity in the transgenic *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathy. *Hum Mol Genet*, 22, 4474-4484, 2013  
DOI: 10.1093/hmg/ddt296, 査読有

6. Kamikawaji S, Ito G, Sano T, Iwatsubo T: Differential effects of familial Parkinson mutations in LRRK2 revealed by a systematic analysis of autophosphorylation. *Biochemistry*, 52, 6052-6062, 2013  
DOI: 10.1021/bi400596m, 査読有

7. Suzuki N, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zheng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*, 76, 410-422, 2012  
DOI: 10.1016/j.neuron.2012.10.003, 査読有

8. Kuwahara T, Tonegawa R, Ito G, Mitani S, Iwatsubo T: Phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein protein at Ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 287, 7098-7109, 2012  
DOI: 10.1074/jbc.M111.237131, 査読有

9. Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Osawa S, Morihashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of the  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene*, 31, 787-798, 2012  
DOI: 10.1038/onc2011.265, 査読有

10. Ito G, Iwatsubo T: Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. *Biochem J*, 441, 987-994, 2012  
DOI: 10.1042/BJ20111215, 査読有

11. Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci*, 31, 6850-6857, 2011  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011, 査読有

12. Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M: A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A $\beta$  pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 30, 11157-11166, 2010  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2884-10.2010, 査読有

〔総説〕(計 7 件)

鈴木 邦道、富田 泰輔、岩坪 威: シナプス接着分子 neuroligin-1 の神経活動依存的なタンパク質切断, 実験医学 31, 419-422, 2013

橋本 唯史、岩坪 威: オプトジェネティクスを用いた病態解明, 実験医学, 30, 2592-2593, 2012

De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS: Presenilins and  $\gamma$ -Secretase: Structure, Function and Role in Alzheimer's Disease. In *The Biology of Alzheimer Disease*. Edited by Selkoe, Holtzman, Mandelkow. Cold Spring Harbor Lab Press

〔学会発表〕(計 34 件)

1. Iwatsubo T: Molecular pathology and translational approaches on Alzheimer's disease. The 12th international conference on Alzheimer's & Parkinson's disease, 2015年3月19日, Nice (France)

2. Iwatsubo T: Activity-dependent synaptic and circuit pathophysiology in a model of Alzheimer's disease. International symposium "New Frontier of Molecular Neuropathology 2014", 2014年3月17日, Suzuki Memorial Hall, 東京医科歯科大学, 東京

3. 岩坪 威: 「アルツハイマー病: 遺伝学的・環境的リスク因子に関する実験的検証の現況」第54回日本神経学会学術大会ホットトピックス, 2013年5月31日, 東京国際フォーラム, 東京

4. 岩坪 威: 「アルツハイマー病の分子病態解明と治療法の開発」第29回高峰カンファレンス, 2013年3月1日, 東京

5. Iwatsubo T: From protein deposits to disease-modifying therapies: a personal history longing for the cure of Alzheimer's disease. Potamkin prize award presentation. 64th Academy of Neurology. 2012年4月24日, New Orleans (U.S.A.)

6. Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from cellular

to synapse/circuit biology. Kick off symposium of Scientific Research on Innovative Area “Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology”, 2010年10月27日, 東京医科歯科大学講堂, 東京

7. Iwatsubo T: Molecular pathology of amyloid  $\beta$  peptides in Alzheimer's disease. XVIIth International Congress of Neuropathology, 2010年9月13日, Salzburg (Austria)

[その他]

ホームページ等

<http://www.neuropathology.m.u-tokyo.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩坪 威 (IWATSUBO, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50223409

### (2) 研究分担者

若林 朋子 (WAKABAYASHI, Tomoko)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20530330

伊藤 弦太 (ITO, Genta)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10431892

(平成26年度より分担者から外れる)

橋本 唯史 (HASHIMOTO, Tadafumi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：30334337

(平成26年度より研究分担者)