

令和元年6月24日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09688

研究課題名(和文) アルツハイマー病態におけるBACE1発現異常及びシナプス変性の分子機序

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of BACE1 dysregulation and synaptic degeneration in Alzheimer's disease

研究代表者

荒木 亘 (ARAKI, WATARU)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第六部・研究員

研究者番号：60311429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドタンパク質(A $\beta$ )の可溶性集合体であるA $\beta$ オリゴマーによって引き起こされるシナプス異常のメカニズム、およびセクレターゼを含むA $\beta$ 産生システムの制御機構について検討した。A $\beta$ オリゴマーで処理したラット初代培養神経細胞において、複数の前シナプス、後シナプスタンパク質が異常局在すること、神経突起上でA $\beta$ は特定の2種類の受容体と結合することを見出した。これらの知見は、アルツハイマー病のシナプス病態の実体解明に重要なものである。また、オートファジー・リソソーム系の促進がA $\beta$ の産生プロセスに対して相反する2重の効果を与えることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドタンパク質(A $\beta$ )の可溶性集合体であるA $\beta$ オリゴマーは、アルツハイマー病(AD)の病態の引き金と考えられており、ADのシナプス変性に密接に関与している。A $\beta$ オリゴマーがシナプス変性を引き起こす分子機序は未解明であり、治療開発上、重要な課題である。本研究において、培養神経細胞モデルを用いた実験により、A $\beta$ オリゴマーが特定の受容体に結合することで、シナプスタンパク質の異常局在を含めたシナプスの攪乱を誘起することが示唆された。この知見は、ADのシナプス病態の実体解明に重要なものといえる。また、オートファジー・リソソーム系とA $\beta$ の産生プロセスの関連性についても新知見を見出した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms underlying the synaptic degeneration induced by amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) oligomers and those by which A $\beta$  production system including  $\beta$ -secretase is regulated. In primary neurons treated with A $\beta$  oligomers, several presynaptic and postsynaptic proteins were abnormally dislocated, and A $\beta$  was co-localized with two specific receptors on the surface of neuritic processes. These findings are important for elucidating the basis of the synaptic pathology in Alzheimer's disease. In addition, we found that facilitation of the autophagy-lysosomal pathway has dual, but opposite, effects on the process of A $\beta$  production.

研究分野：神経内科学、神経分子病態学

キーワード：アミロイド アルツハイマー病 認知症 シナプス オリゴマー セクレターゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### ・研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症 (AD) の初期病態において、アミロイドタンパク質 (A $\beta$ ) の可溶性重合体である A $\beta$  オリゴマーが病態の発動因子として重要な役割を持つと考えられている。また、AD の初期病態において、シナプスの減少が特徴的变化と考えられている。A $\beta$  オリゴマーは A $\beta$  の線維 (フィブリル) よりも毒性が強く、AD のシナプス障害に密接に関与していることが示唆されている。A $\beta$  オリゴマーは神経細胞の受容体に結合し、細胞障害性の伝達系路が活性化され、タウ異常も惹起されることが示唆されているが、A $\beta$  オリゴマーが結合する受容体の候補としては種々のものが報告されており、まだ不確定なのが現状といえる。A $\beta$  オリゴマーに起因するシナプス変性のメカニズムを明らかにすることは、治療法開発上も、きわめて重要な課題である。

一方、A $\beta$  の産生に必須な膜結合型プロテアーゼである セクレターゼ (BACE1) は主に神経細胞で発現しており、その活性を制御することに治療的意義があると考えられている。また、BACE1 の発現レベルが AD 脳で増加しており、BACE1 の AD 病態への関与が示唆されている。しかし BACE1 の神経細胞における制御メカニズム、AD 病態における BACE1 の変調のメカニズムについては、まだ十分に解明されていない。我々は、これまでに、A $\beta$  オリゴマー処理した神経細胞では、BACE1 タンパク質の発現が亢進すること、その亢進は転写、翻訳レベルではなく、翻訳後レベルのメカニズムによることを示した。しかし、A $\beta$  オリゴマーによる BACE1 発現増強の分子的機序はまだ不明確である。

## 2. 研究の目的

上記のように、A $\beta$  オリゴマーは、AD の病態の引金として、きわめて重要な因子である。我々は、A $\beta$  オリゴマーによる神経・シナプス毒性のメカニズムに焦点を絞り、研究を実施してきた。具体的には、ラット初代培養神経細胞のモデル系の確立を行い、神経細胞を比較的低濃度の A $\beta$  オリゴマーで 2-3 日間処理した場合、カスパーゼ 3 活性化、eIF2 の活性化など細胞障害性の変化、タウの異常リン酸化や切断、シナプスタンパク質の異常局在 (シナプスからの解離)、BACE1 タンパク質レベルの増加がおこることなどを見出してきた。

そこで、この系を用いて、A $\beta$  オリゴマーに起因するシナプス変性のメカニズムを明らかにすることを第一の目的とした。

さらに、神経細胞における BACE1 発現の制御メカニズムについて明らかにすること、特に、A $\beta$  オリゴマーによる BACE1 発現増強の分子的機序を明らかにすることを第二の目的とした。

その他に、治療法開発の観点から、A $\beta$  オリゴマーの神経毒性を低減する天然物の探索研究も実施することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) A $\beta$ オリゴマーに起因するシナプス変性のメカニズム

培養神経細胞モデル：ラット初代培養大脳皮質神経細胞は既報に従い、無血清培地 (MACS NeuroMedium) で培養した。A $\beta$  1-42 ペプチド (Peptide Inst) を用いて、既報 (Mamada ら、2015) に従い、A $\beta$  42 オリゴマー (100  $\mu$ M) を調整した。培養 9 日目に、調整した A $\beta$  42 オリゴマーを、培養液で 2.5  $\mu$ M に希釈し、神経細胞に添加した。2~3 日後に細胞を回収・固定して、ウェスタンブロット、免疫細胞化学などで解析した。

免疫細胞化学：4%パラホルムアルデヒドで固定した神経細胞を既報 (Mamada ら、2015) の方法を用いて、免疫蛍光染色を行った。細胞に結合した A $\beta$  と受容体などの細胞表面に存在するタンパク質の局在の解析は、非浸透化条件 (Triton X-100 による前処置なし) で行った。

免疫反応性は共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM780) で観察し、画像を取得した。

ウエスタンブロットは、既報 (Mamada ら、2015) の方法に従って実施した。抗体のうち、市販以外のものとして、APP C 末抗体 (R37)、同 N 末抗体 (T97) は亀谷博士から提供された。

#### (2) A オリゴマーによる BACE1 発現増強の分子的機序

(1) の神経細胞モデルを用いて、BACE1 の制御に関わる可能性がある候補タンパク質の BACE1 との相互作用を、免疫沈降法で検討した。また、両者の共局在を免疫細胞化学で検討した。候補タンパク質中の snapin については、組換えアデノウイルスを作製して、過剰発現させる実験も行った。BACE1 の組換えアデノウイルスは既報 (Mamada ら、2015) で作製したものをを用いた。さらに、オートファジー・リソソーム経路 (ALP) と BACE1 の関連を調べるため、ALP の制御に重要な因子である TFEB の組換えアデノウイルスを作製して用いた。(TFEB cDNA はラクシュマナ博士から提供) この実験では、特殊な培養液 (NeuroCult) に交換して、2 週間以上長期培養した神経細胞を実験に用いた。組換えアデノウイルスを用いて、APP、APP の -C 末断片 (-CTF) の過剰発現条件下の実験も行った。

#### (3) A オリゴマーの神経毒性の可逆的性質に関する研究、Aβオリゴマー毒性を低減する天然物の探索研究

(1) の神経細胞モデル系を用いて、A<sub>42</sub> オリゴマーで 2 日間処理後、細胞外からオリゴマーを除去して、さらに 2 日間培養する実験を行い、障害性変化が回復するか調べた。また、天然物から、Aβオリゴマー神経毒性を低減する物質を探索した。この際、細胞抽出液中の活性化カスパーゼ 3 のレベルをウエスタンブロットにより定量して、神経毒性の程度を評価した。天然物としては、主に植物エキスと、その含有成分物質を用いた。植物エキスは、(株)常盤植物化学研究所から提供された。

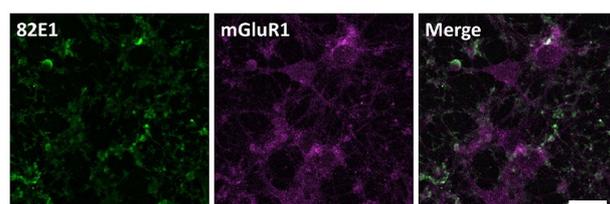
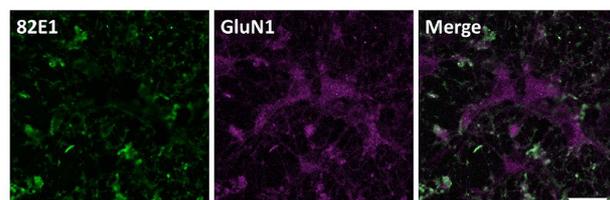
## 4. 研究成果

### (1) A オリゴマーに起因するシナプス変性のメカニズム

通常免疫蛍光染色の結果、A オリゴマー処理細胞では、対照と比較して、前、または後シナプスの特異タンパク質 Synapsin I、SNAP-25、Spinophilin、Homer1b/c の局在がシナプス様構造から細胞体、神経突起へと移行していることが観察された。ウエスタンブロット解析の結果、これらのタンパク質の総量には変化を認めなかった。さらに、非浸透化条件で、A 抗体 (82E1) と APP N 末抗体を用いて免疫蛍光二重染色を行ったところ、A オリゴマーが神経突起の細胞表面に結合していることが判明した。この所見は、先行研究と一致するものであった。次いで、A

抗体と NMDA 受容体 GluN1 サブユニット、代謝形グルタミン酸受容体 1 (mGluR1)、mGluR5 の各

抗体で 2 重染色した結果、神経突起の表面において、A が NMDA 受容体 GluN1 サブユニット、mGluR1 と共局在することが判明した (右図)。一方で、浸透化条件で免疫染色した場合、これらの受容体の染色性、パターンは、対照と A オリゴマー処理細胞で同様であった。以上から、A オリゴマーと NMDA 受容体および mGluR1 受容体との結合がシナプス障害



の発端となり、シナプスタンパクの解離などの異常が引き起こされることが示唆された。今後は、A オリゴマーの受容体結合に関する解析をさらに進めて、シナプス病態を明らかにするた

めの研究を継続する予定である。

## (2) A オリゴマーによる BACE1 発現増強の分子的機序

(1) の神経細胞モデルを用いて、我々が実施した予備的実験 (C 末タグを付加した BACE1 を過剰発現する神経細胞の抽出液から、タグ抗体で免疫沈降されたタンパク質を質量分析で同定) において、BACE1 と相互作用することが予想されたタンパク質 N カテニン、BACE1 の小胞輸送に関わるとの報告があるタンパク質 snapin に着目して、検討した。Snapin と BACE1 の両方を組換えアデノウイルスを用いて、過剰発現させる系も用いた。BACE1 発現神経細胞の抽出液を BACE1 のタグ抗体で免疫沈降した後、沈降物を N カテニン、snapin 抗体でウエスタンブロットした結果、相互作用を確認できなかった。免疫蛍光二重染色では、BACE1 と snapin の共局在が示唆されたが、相互作用の確認ができないことから、これらの候補タンパク質の解析を取りやめ、別の角度からの解析に重点を置くこととした。

オートファジー・リソソーム経路 (ALP) の変動の観点から、検討を進めることとし、ALP の制御因子である TFEB を組換えアデノウイルスベクターを用いて、長期培養した神経細胞に過剰発現させて、BACE1 を含めた APP セクレターゼ分子の変動、APP の C 末断片 (C-CTF) のレベル、A 分泌量の変化を調べた。その結果、BACE1、セクレターゼに変化はなかったが、ADAM10 の増加が認められた。また、APP、または APP C-CTF の過剰発現条件下では、C-CTF レベルと A<sub>40</sub>、A<sub>42</sub> 分泌量が増加した。したがって、TFEB による ALP の促進は、A の産生プロセスに対して増加及び低下の 2 重の効果を与えることを見出した。

## (3) A オリゴマーの神経毒性の可逆的性質に関する研究、Aβオリゴマー毒性を低減する天然物の探索研究

神経細胞を比較的低濃度の A<sub>42</sub> オリゴマーで 2 日間処理後、細胞外からオリゴマーを除去する実験において、神経細胞の特異的異常変化 (カスパーゼ 3 活性化、タウリン酸化、切断、カテニンの異常局在化など) が回復したことから、A<sub>42</sub> オリゴマーの神経毒性が可逆的性質を持つことが示唆された。

複数の植物エキスの中で、紅景天エキスに A<sub>42</sub> オリゴマー毒性を低減する効果が認められた。そこで、その主要な含有成分物質 6 種について、検討したところ、チロソールに有意な Aβオリゴマー毒性の抑制効果が認められた。このチロソールは、抗酸化能を有することが知られており、AD の治療・予防薬候補物質となりうることから、AD モデルマウスを用いて、*in vivo* での有効性を、科研費以外の研究課題で、検討することとした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, Tamaoka A, Kametani F, Lakashmana MK, Araki W: TFEB-mediated enhancement of the autophagy-lysosomal pathway dually modulates the process of amyloid β-protein generation in neurons. *Neurosci* 402: 11-22, 2019 DOI 10.1016/j.neuroscience.2019.01.010

Araki W: Reversibility of Aβ oligomer neurotoxicity. *Oncotarget* 8(31), 50335-50336, 2017 DOI: 10.18632/oncotarget.19083

Mamada N, Tanokashira D, Ishii K, Tamaoka A, Araki W: Mitochondria are devoid of amyloid β-protein (Aβ)-producing secretases: evidence for unlikely occurrence within mitochondria of Aβ

generation from amyloid precursor protein. Biochem Biophys Res Comm 486: 321-328, 2017  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.035

Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK, Araki W: The neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. Mol Brain 10:4, 2017 DOI: 10.1186/s13041-016-0284-5

Araki W: Post-translational regulation of the  $\beta$ -secretase BACE1. Brain Res Bull 126, 170-177, 2016 DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.009

〔学会発表〕(計 7 件)

Araki W, Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, Tamaoka A, Kametani F, Lakashmana MK: Enhancement of the autophagy-lysosomal pathway modulates the process of amyloid  $\beta$ -protein generation. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, 7.2, 2018

Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, Tamaoka A, Kametani F, Lakashmana MK, Araki W: Enhancement of the autophagy-lysosomal pathway modulates the process of beta-amyloid generation. 第 59 回日本神経学会学術大会, 札幌, 5.26, 2018

Taniguchi K, Yamamoto F, Mamada N, Tamaoka A, Araki W: Soluble A $\beta$  oligomers induce disorganization of synapses in primary cultured neurons. ConBio2017 神戸, 12.6, 2017

山本詞子, 谷口香織, 儘田直美, 玉岡 晃, Madepalli K. Lakshmana, 荒木 亘: オートファジー-リソソーム経路の促進のアミロイド  $\beta$  タンパク質産生過程への影響. 日本認知症学会学術集会, 金沢, 11.24, 2017

Araki W, Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK: The reversibility of the neurotoxicity induced by amyloid  $\beta$ -protein oligomers. 第 90 回日本薬理学会年会, 長崎, 3.15, 2017

Araki W, Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Tamaoka A, Lakshmana MK: The neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein oligomers is reversible in nature. 第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 7.21, 2016

Mamada N, Araki W, Tanokashira D, Kametani F, Tamaoka A : Amyloid beta oligomers induce BACE1 augmentation in the neuritic compartment of neurons. 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸, 5.19, 2016

〔図書〕(計 1 件)

荒木亘, 荒木由美子: アミロイド  $\beta$  オリゴマー除去によるアルツハイマー病態回復の可能性. アルツハイマー病 発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発 332-338, 2018 (エヌ・ティー・エス)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

ラクシュマナ マデパリ(LAKSHMANA, MADEPALI)

Torrey Pines Institute for Molecular Studies ・ Associate Member

亀谷 富由樹 ( KAMETANI, FUYUKI )

東京都医学総合研究所 ・ 研究員

玉岡 晃 ( TAMAOKA, AKIRA )

筑波大学 人間総合科学研究科 ・ 教授

谷口 香織 ( TANIGUCHI, KAORI )

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部 ・ 流動研究員

山本 詞子 ( YAMAMOTO, FUMIKO )

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部 ・ 研究生

荒井 卓也 ( ARAI, TAKUYA )

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部 ・ 科研費研究助手

楊 金緯 ( YANG, JINWEI )

(株)常磐植物化学研究所

小西吉裕 ( KONISHI, YOSHIHIRO )

鳥取医療センター ・ 臨床研究部長、滋賀医科大学 ・ 客員准教授