

令和元年9月2日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06972

研究課題名(和文)脳アミロイドアンギオパチーの進行抑制因子SRPX1をスパーサーとする病態解析

研究課題名(英文)The role of SRPX1 in cerebral amyloid angiopathy

研究代表者

井上 泰輝(Inoue, Yasuteru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：00806408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：CAAの共存タンパク質の研究が病態生理の解明、治療法開発に結びつく可能性があると考え、プロテオミクス解析によりCAA罹患血管における共存タンパク質を同定し、Enzyme Xに着目した。In vitroにおいてAの毒性発現にEnzyme Xが及ぼす影響を及ぼすか検討を行った。Aは、単量体が時間経過と共に次第に凝集し、Aオリゴマー、A線維が細胞毒性を示す。我々はEnzyme XがAオリゴマー、A線維形成を抑制し、一旦形成されたA線維を分解、さらにEnzyme XをAと共に添加するとAによる細胞毒性が軽減されるという新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Enzyme Xは生来人類が備え持つ酵素であり、そのCAAやADに対する病態抑制効果に着目した治療応用研究は、その安全性からも研究の持つ意義が大きいと考える。Enzyme XによるCAAの病態改善効果の分子基盤が解明されれば、同様のタンパク沈着を主体とするパーキンソン病、プリオン病などの他の神経変性疾患に対し応用・発展できる可能性がある。本研究ではこれらの研究成果を基にEnzyme XのCAA病態制御機構の解明、Enzyme Xを用いた新しいCAAの治療法開発、早期診断など臨床応用へ将来的に発展させるための基盤となる研究を行う。

研究成果の概要(英文)：Several molecules have reportedly co-accumulated with tissue amyloid deposits in patients with amyloidosis. Co-accumulating molecules may be a key-molecule in amyloidosis therapy and diagnosis. In CAA, however, molecules that co-accumulate with cerebrovascular A deposits are unknown. To identify the key molecules in CAA, we used laser capture microdissection to perform proteomic analyses with cerebral blood vessels obtained from CAA cases. Last year, we reported highly expressed co-accumulating molecules in CAA-affected vessels derived from human brain samples. The present study proposal focuses on Enzyme X, a highly up-regulated molecule in CAA in our prior research. We found that Enzyme X inhibits Amyloid beta fibril formation, degrades Aβ oligomers, and attenuates Amyloid beta-mediated cytotoxicities. From these results, we hypothesized that Enzyme X may be a novel therapeutic target for CAA and AD.

研究分野：アミロイドーシス

キーワード：アミロイドーシス 脳アミロイドアンギオパチー 脳アミロイド血管症 脳出血 アミロイドペー
認知症

1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の 90%にみられ、アミロイドベータ ($A\beta$) が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が進み CAA 患者が増加する一方で、CAA の予防や治療法は未確立であり、その開発は急務といえる。CAA と同様に $A\beta$ を原因タンパク質とする AD では、その特徴的な病理学的所見である老人班における $A\beta$ との共存タンパク質が広く研究されている。中でもアポリポプロテイン E は $A\beta$ 凝集を促進することで、 $A\beta$ の毒性を増強させ、AD の病態進行に影響を与える (*Nature*. 1994; 372: 92-4)。また、全身性アミロイドーシスでは血清アミロイド P 成分が同定され、抗体治療の有効性が示されている (*N Engl J Med*. 2015; 373: 1106-14)。このように共存タンパク質の研究を通して AD の病態生理が次々と明らかにされ、共存タンパク質の研究が疾患解明の鍵として認識されるようになっている。その一方で、CAA における共存タンパク質はこれまで検討されていない。申請者は CAA の共存タンパク質の研究が、CAA の病態生理の解明、ひいては治療法、診断法の開発に結びつく可能性があると考えた。先行研究で申請者は、CAA 症例からレーザーマイクロダイセクションを用いて脳血管を選択的に抽出し、プロテオミクス解析により共存タンパク質を複数同定した (Inoue et al. *Acta*

Neuropathol. 2017; 134: 605-17)。その中で、本研究では $A\beta$ に次いで多く CAA 罹患血管に発現している Enzyme X に着目した。Enzyme X は、生命現象に深く関与する酵素として広く研究されている生理活性物質であるが、それ以外の機能については長らく不明であった。

2. 研究の目的

Enzyme X の $A\beta$ の病態生理に与える影響を明らかにすること。

3. 研究の方法

チオフラビン T 蛍光色素を用いた $A\beta$ 線維形成過程の評価、透過型電子顕微鏡による $A\beta$ の形態学的評価、脳血管平滑筋培養細胞を用いたカスパーゼ 3/7 を指標とした $A\beta$ 細胞毒性評価を行った。

4. 研究成果

$A\beta$ は、はじめ単量体として存在し、次第に凝集し $A\beta$ 線維形成に至り、その $A\beta$ 線維が細胞毒性を示す。申請者の *in vitro* での予備的検討により Enzyme X が ① $A\beta$ の線維形成を抑制する (図 2) ② 一旦形成された $A\beta$ 線維を分解する (図 3)、さらに、③ $A\beta$ の細胞毒性を抑制する (図 4) というこれまでに報告のない新しい作用機序を見出し、治療応用への可能性を示した。Enzyme X が $A\beta$ の重合過程の阻害、さらに $A\beta$ 線維分解を介して、細胞毒性を軽減することを明らかにした。

図 1 プロテオミクス解析の手順

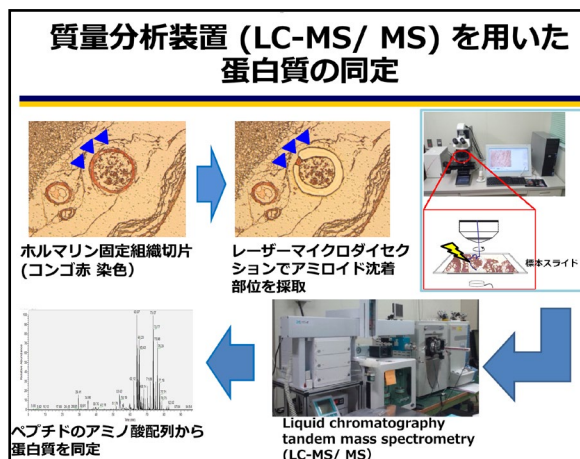


図 2

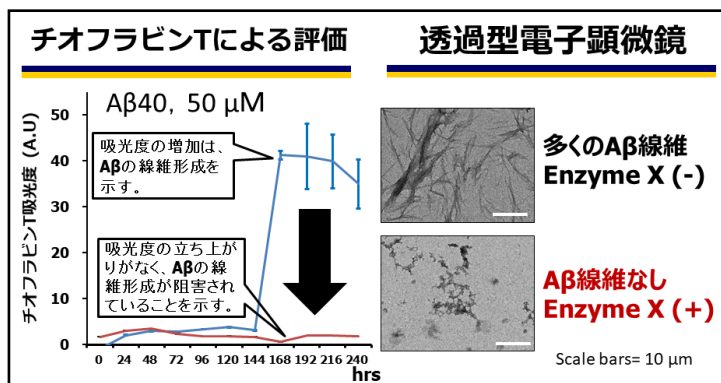
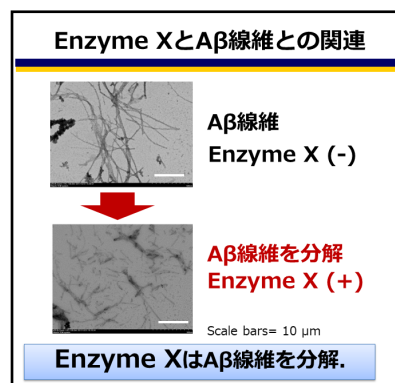


図 3



さらに Enzyme X の病態改善効果を生体内で検証するため、CAA モデルマウスの代表格ともいえる APP23 マウスの側脳室へ持続注入用ポンプ、カニューレを組み合わせた持続注入システムを用いて Enzyme X を 7 日間持続投与したところ、CAA ばかりか、AD の特徴的な病理所見である老人斑の双方が Enzyme X 投与マウスにおいて減少する結果を得た (図 5)。

Enzyme X による CAA の病態改善効果の分子基盤が解明されれば、同様のタンパク沈着を主体とするアルツハイマー病、パーキンソン病などの他疾患の治療開発に対しても、応用・発展できる可能性がある。新規化合物による直接的な A β 毒性阻害作用に基づく治療戦略は、毒性発現がしばしば臨床応用の障壁となる場合がある。本研究で着目する Enzyme X は生来人類が備え持つ酵素であり、その多面的効果に着目した治療応用研究は、その安全性からも研究の持つ意義が大きいと考える。これらのメカニズムについて、我々は Enzyme X が A β を断片化する可能性、Enzyme X が A β と結合し、A β の重合を阻害する 2 つの仮説を立て、検討を進めている。

図 4

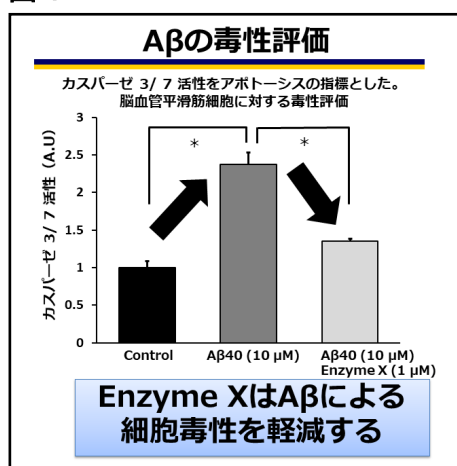
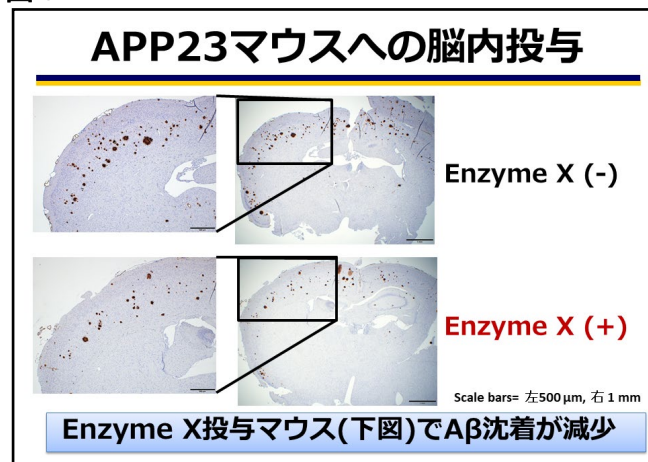


図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Kikuta K, Yamashita T, **Inoue Y**, Ueda M, Ando Y, Wilson MR, Hamano T, Nakamoto Y, Naiki H, Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- β aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun* 7:pp12.2019 (査読あり)
2. Nakamura M, Misumi Y, Nomura T, Oka W, Isoguchi A, Kanenawa K, Masuda T, Yamashita T, **Inoue Y**, Ando Y, Ueda M. Extreme Adhesion Activity of Amyloid Fibrils Induces Subcutaneous Insulin Resistance. *Diabetes* 68:pp 609-616.2019 (査読あり)
3. Tasaki M, Ueda M, Hoshii Y, Mizukami M, Matsumoto S, Nakamura M, Yamashita T, Ueda A, Misumi Y, Masuda T, **Inoue Y**, Torikai T, Nomura T, Tsuda Y, Kanenawa K, Isoguchi A, Okada M, Matsui H, Obayashi K, Ando Y. A novel age-related venous amyloidosis derived from EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1. *J Pathol* 247:pp 444-455.2019 (査読あり)
4. **Inoue Y**, Miyashita F, Minematsu K, Toyoda K. Clinical characteristics and outcomes of intracerebral hemorrhage in very elderly. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 27:pp97-102. 2018 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. **Inoue Y**, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita

- A, Ando Y, Sushi repeat-containing protein 1 co-accumulates with cerebrovascular A β deposits in cerebral amyloid angiopathy. 19th International Congress of Neuropathology, Tokyo, Japan, Sep, 2018
2. **Inoue Y**, Ueda M, Tasaki M, Takeshima A, Nagatoshi A, Masuda T, Misumi Y, Kosaka T, Nomura T, Mizukami M, Matsumoto S, Yamashita T, Takahashi H, Kakita A, Ando Y, Sushi repeat-containing protein 1 co-accumulates with cerebrovascular A β deposits in cerebral amyloid angiopathy. International Symposium on Amyloidosis. Kumamoto, Japan, Mar, 2018
 3. **井上泰輝** 脳アミロイドアンギオパチーの最新知見とその予防への応用. 第 59 回日本神経学会学術大会. 札幌, May, 2018

〔図書〕（計 1 件）

1. 井上泰輝, 植田光晴.脳アミロイドアンギオパチーの新規病態関連因子 SRPX1. **医学のあゆみ**,医歯薬出版株式会社, 266: pp295-296, 2018.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。