

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08272

研究課題名(和文)アルツハイマー病発症機構における脂質フリッパーゼの役割の解析と予防・治療法の開発

研究課題名(英文)Lipid flippase is the novel therapeutic target for the Alzheimer disease, which correlate with endocytic traffic impairment.

研究代表者

高杉 展正 (TAKASUGI, NOBUMASA)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60436590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当グループでは、アルツハイマー病脳で蓄積する CTFとリピッドフリッパーゼの構成因子TMEM30Aが結合し、小胞輸送障害を引き起こすことを明らかにしていた。さらに CTF産生酵素、セクレターゼ(BACE1)を過剰に発現するADモデル細胞系を樹立して解析を進めた。その結果、BACE1活性依存的にリピッドフリッパーゼの機能低下が起こり、小胞輸送障害が誘引される可能性が示された。さらにADモデルマウス脳では、初期からTMEM30Aと CTFの複合体が形成され、リピッドフリッパーゼ活性が低下することを明らかにした。本研究の成果は、発症仮説として交通渋滞仮説を支持し、新規治療標的を提唱している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病では小胞輸送障害は最初期病態の一つであり、その予防・根本治療法開発の鍵を握る。一方で、小胞輸送の状態について、定量的かつ網羅的な解析を行う手段は限られており、詳細な分子メカニズムの解明、小胞輸送障害を標的とした根治療法の開発がこれまで困難であった。

本研究ではアルツハイマー病における小胞輸送障害の制御因子としてリピッドフリッパーゼを同定しており、小胞輸送を標的とした根本治療薬の開発という新しい分野を開拓の短所となることが期待される。また本研究により樹立された解析系は、タンパク質の局在の定量的な解析に応用でき、当該分野の研究発展に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Although Amyloid beta (A $\beta$ ) peptide, which accumulates in Alzheimer disease (AD) brain, is focused attention as a therapeutic target, most clinical trials are failed. Interestingly, endocytic dysfunction is the early pathogenic event by the accumulation of A $\beta$  precursor protein (APP) metabolites, C-terminal fragment (CTF). We identified TMEM30A, a subcomponent of lipid flippase, as a candidate partner for CTF. Moreover, stably overexpression of CTF-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) accumulated CTF to increase the complex with TMEM30A. Intriguingly, upregulated BACE1 activity reduced both the lipid flippase formation and activity, which was accompanied by the abnormally enlarged endosomes. We confirmed the complex formation of TMEM30A and CTF, and lipid flippase dysfunction in AD model mice before A $\beta$  deposition. Our results shed light on the unidentified correlation between CTF and lipid flippase activity and suggest a novel therapeutic strategy for AD.

研究分野：薬理学

キーワード：アルツハイマー リピッドフリッパーゼ 小胞輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

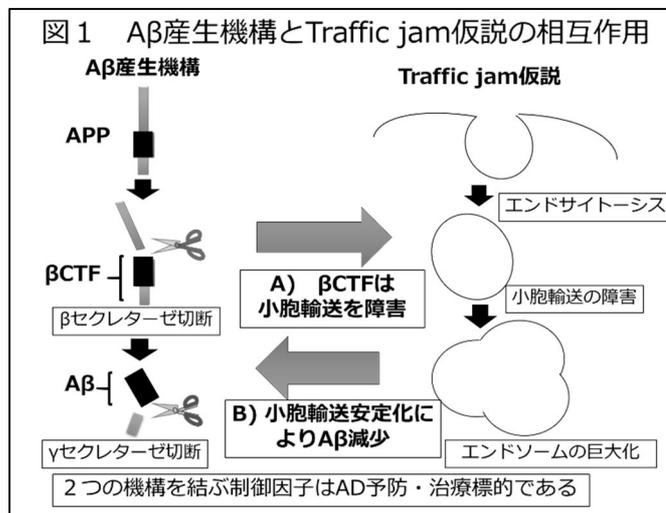
アルツハイマー病 (AD) は進行性の認知機能低下を主訴とする神経変性疾患である。病理学的な特徴として、Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) を主な構成成分とする老人斑の形成や、高度にリン酸化を受けた微小管結合タンパク質タウからなる神経原線維変化などの異常構造物の蓄積が挙げられる。特に老人斑はより早期から観察されるため、 $A\beta$  の増加・凝集が AD 発症の中心的な分子であるとする【アミロイド仮説】が提唱されている。 $A\beta$  は  $A\beta$  前駆体タンパク質 (APP) が、二種のアスパルチルプロテアーゼ、 $\beta$  及び  $\gamma$  セクレターゼによる 2 段階の切断を受け産生され、各プロテアーゼ活性は AD 発症に関連することが報告されている。一方で、産生酵素などを標的としたアミロイド仮説に基づく創薬開発は頓挫を続けており、アミロイド仮説を補完する病態メカニズムの解明が期待されていた。

近年、 $A\beta$  蓄積以前の初期に、輸送小胞 (エンドソーム) の巨大化を病態とする小胞輸送障害が存在することが示唆されており、小胞輸送障害を AD 発症の引き金とする交通渋滞仮説 (Traffic jam) 仮説が提唱されている。

神経は独特の長い構造を有しており、タンパク質の産生部位である細胞質からその構造の末端へ物資を輸送するには多大なコストがかかる。とくに神経細胞に長期のストレスがかかる神経変性疾患ではその発症メカニズムに関与すると考えられており、実際、各疾患の遺伝的リスクファクターには多くの小胞輸送関連因子が同定されている。

興味深いことに、

- A)  $A\beta$  の前駆物質であり、AD 患者脳に蓄積する  $\beta$ CTF ( $\beta$  セクレターゼ切断性カルボキシ末端フラグメント) の蓄積が小胞輸送障害を誘導する (Kim et al., Mol psychiatry, 2015) こと
- B) 小胞輸送を安定化する薬剤は  $A\beta$  産生を抑制する (Mecozzi et al., Nat Chem Biol, 2014) こと



が報告され、アミロイド仮説の根幹となる  $A\beta$  産生機構と Traffic jam 仮説に強い相関性が認められ (図 1)、有力な治療標的として注目されている。

一方で、これまでに小胞輸送を安定化すると報告された薬物には特異性が少なく、生理機能に重要な働きを持つ小胞輸送全般の機能修飾に影響すると考えられるため、副作用が懸念されている。

$\beta$ CTF による小胞輸送障害を標的にすることで、AD 特異的かつ副作用の少ない治療薬を開発できることが予想されたが、一方で、その詳細なメカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

当グループにおいて  $\beta$ CTF と特異的に結合する因子として TMEM30A を同定した。 $\beta$ CTF と TMEM30A の複合体形成は輸送小胞の肥大化を誘発するなど病態に関与する可能性が考えられた。TMEM30A は、小胞輸送の制御に関わる膜リン脂質輸送酵素フリッパーゼの構成分子であり、これまでに明らかでなかった  $A\beta$  産生機構と小胞輸送障害をつなぐメカニズムであると考え、 $\beta$ CTF の蓄積がフリッパーゼ活性を制御している可能性を想起した。

本研究では  $\beta$ CTF による制御機構に注目して、フリッパーゼ活性と AD 発症機構との関わりを明らかにすること、そして、AD における小胞輸送障害を改善できる新規予防・治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本グループで作成した AD 特異的小胞輸送障害モデル、および、共同研究者である橋本 唯史 准教授 (東京大学医学部) から提供を受けた  $A\beta$  の蓄積開始が比較的遅く初期病態が解析できる A7 モデルマウスを利用した。細胞系においては、新たな活性測定法の樹立、及び生化学的手法により  $\beta$ CTF がリピッドフリッパーゼ活性に与える影響を解析した。培養細胞系の結果を踏まえ、AD モデル脳の生化学的解析を行い、 $A\beta$  蓄積以前において、リピッドフリッパーゼ活性が変化しているか検証を行った。

### 4. 研究成果

これまでに、AD における輸送障害を再現できるモデル細胞系の樹立に成功し、AD 特異的な小胞輸送を評価できるモデル系として特許を得ていた (特開 2016-011849)。本研究期間に、その研究をさらに進め、 $A\beta$  の前駆体である  $\beta$ CTF が蓄積することで小胞輸送障害が誘導されること、さらにその結合因子として TMEM30A を同定し、その成果を論文発表した (図 2, Takasugi et al., PLoS ONE 2018)。

図2 : TMEM30AはβCTFと結合する

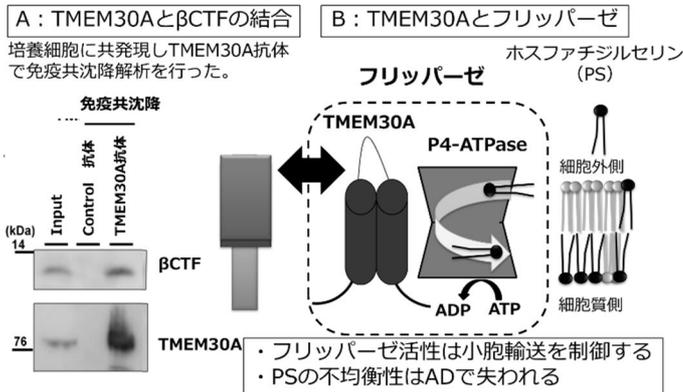


図3 NanoBit法を利用したリポッドフリッパーゼ活性測定

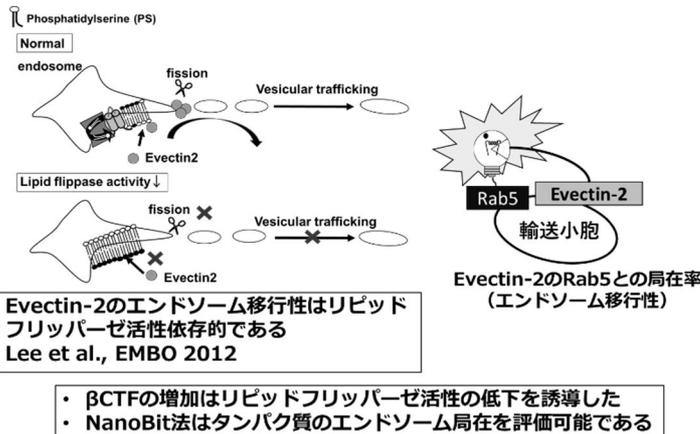


図4 本研究成果

βCTFとTMEM30Aとの結合によるAD輸送障害モデルを作出  
 ⇒輸送障害を改善する小分子化合物候補を同定した

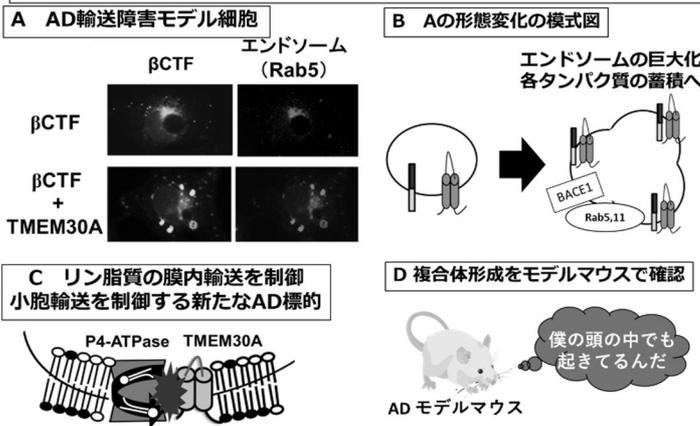
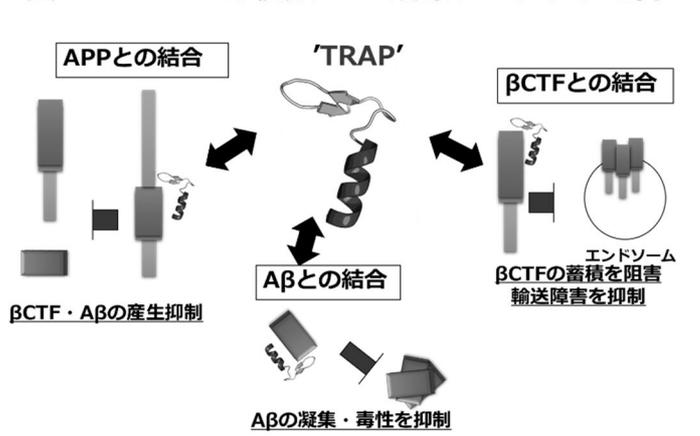


図5 'TRAP'は複数のAD治療ターゲットを持つ



TMEM30A はホスファチジルセリン (PS) などの脂質の膜内輸送に関与する「リポッドフリッパーゼ」の構成因子であり、その活性は小胞輸送を制御する。AD病態ではPSの異所性局在も報告されており、その活性低下は発症機構に深く関与すると予想した。

そこで、AD発症におけるリポッドフリッパーゼ活性変化の影響を検討するため、新規活性測定系を考案した。

PS結合性タンパク質 Ectin-2 はエンドソームのホスファチジルセリンと結合し、リポッドフリッパーゼ活性依存的にエンドソームに局在する (Lee et al., EMBO 2012)。この性質を Split luciferase 法の応用である NanoBit 法に適用し、リポッドフリッパーゼ活性測定系を構築した。この測定系により TMEM30A のノックダウン、またはβCTFの増加によって Ectin-2 のエンドソーム移行、つまりリポッドフリッパーゼの活性が低下することを明らかにした。すなわち、小胞輸送障害改善のターゲットとしてリポッドフリッパーゼを同定し、NanoBit法を用いその活性を定量的に測定できることを示した (図3: 論文投稿準備中)。

さらに AD モデル細胞系を使用した生化学的解析による評価を進め、βCTF と TMEM30A 複合体形成の促進とともに、リポッドフリッパーゼ複合体の形成不全、エンドソームマーカータンパク質の局在変化などが誘導されることが明らかになった。

次に動物モデル系での検証を行うため、Aβが蓄積する以前の A7 モデルマウス脳を用いて、生化学的解析をおこなった。その結果、βCTFの蓄積とともにその TMEM30A との複合体形成が促進し、さらにリポッドフリッパーゼの形成、及びその活性低下が起こっていることが明らかになっている。

本研究成果は AD の初期病態における小胞輸送障害機構について βCTF によるリポッドフリッパーゼ活性阻害が重要であることを示す初めての知見であり、副作用の少ない小胞輸送障害改善標的として期待できると考えている (図4)。

さらに、TMEM30A と βCTF の結合部位の探索から βCTF の Aβ 配列に強固に結合する TRAP (TMEM30A related amyloid beta binding peptide) 配列を同定した

( 図5 ). 本ペプチド配列は  $\beta$ CTF と TMEM30A の結合による小胞輸送障害の改善,  $A\beta$  配列との結合による  $A\beta$  凝集作用や毒性発揮の抑制,  $A\beta$  産生の抑制など, 複数の治療効果を持つ新規 AD 治療薬として期待される. 現在, TRAP の効果検討, 初期的スクリーニングで明らかになった薬物の治療効果を検討している.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakahara Kengo, Fujikawa Kana, Hiraoka Hideki, Miyazaki Ikuko, Asanuma Masato, Ito Akihiro, Takasugi Nobumasa, Uehara Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Attenuation of Macrophage Migration Inhibitory Factor-Stimulated Signaling <i>via</i> S-Nitrosylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1044 ~ 1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00025">https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00025</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujikawa Kana, Nakahara Kengo, Takasugi Nobumasa, Nishiya Tadashi, Ito Akihiro, Uchida Koji, Uehara Takashi	4. 巻 524
2. 論文標題 S-Nitrosylation at the active site decreases the ubiquitin-conjugating activity of ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1 (UBE2D1), an ERAD-associated protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 910 ~ 915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takasugi, Hiraoka, Nakahara, Akiyama, Fujikawa, Nomura, Furuichi, Uehara	4. 巻 20
2. 論文標題 The Emerging Role of Electrophiles as a Key Regulator for Endoplasmic Reticulum (ER) Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1783 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20071783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takasugi Nobumasa, Araya Runa, Kamikubo Yuji, Kaneshiro Nanaka, Imaoka Ryosuke, Jin Hao, Kashiya Taku, Hashimoto Yoshie, Kurosawa Masaru, Uehara Takashi, Nukina Nobuyuki, Sakurai Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 TMEM30A is a candidate interacting partner for the -carboxyl-terminal fragment of amyloid-precursor protein in endosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0200988 ~ 0200988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneshiro Nanaka, Imaoka Ryosuke, Komai Masato, Kashiya Taku, Sakurai Takashi, Uehara Takashi, Takasugi Nobumasa	4. 巻 501
2. 論文標題 Functional analysis of juxta- and intra-membrane domains of murine APP by genome editing in Neuro2a cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka H, Nakahara K, Kaneko Y, Akiyama S, Okuda K, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, Takasugi N, Uehara T.	4. 巻 40
2. 論文標題 Modulation of Unfolded Protein Response by Methylmercury.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1595-1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takasugi N, Komai M, Noda Y, Uehara T.
2. 発表標題 Epigenetic regulation of apolipoprotein E by sphingosine-1-phosphate signaling
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (USA Chicago) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneshiro N, Sakurai T, Uehara T, Takasugi N.
2. 発表標題 he analysis for APP- CTF mediated traffic impairment.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (USA Chicago) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 駒井 真人, 上原 孝, 高杉 展正
2. 発表標題 SphK2/S1PシグナリングによるApolipoproteinEのエピジェネティクス制御
3. 学会等名 第58回 日本薬学会 中四国支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金城 那香, 櫻井 隆, 上原 孝, 高杉 展正
2. 発表標題 アルツハイマー病特異的小胞輸送障害の解明
3. 学会等名 第93回 日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 駒井 真人, 上原 孝, 高杉 展正
2. 発表標題 SphK2/S1PシグナリングによるApolipoproteinEのエピジェネティクス制御
3. 学会等名 第93回 日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金城 那香, 櫻井 隆, 上原 孝, 高杉 展正
2. 発表標題 アルツハイマー病特異的小胞輸送障害の解明
3. 学会等名 第134回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金城 那香, 櫻井 隆, 上原 孝, 高杉 展正
2. 発表標題 アルツハイマー病特異的小胞輸送障害の解明
3. 学会等名 第37回 日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高杉 展正
2. 発表標題 SphK2/SP シグナルに基づいたアルツハイマー病発症機構の解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金城 那香
2. 発表標題 APP- CTFによる小胞輸送障害の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田 祐佳
2. 発表標題 SphK2/S1Pシグナルによるアルツハイマー病リスクファクターApoE発現抑制機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田 祐佳
2. 発表標題 SphK2/S1Pシグナルによるアルツハイマー病治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	橋本 唯史  (HASHIMOTO TADAFUMI)  (30334337)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授    (12601)	