

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07384

研究課題名(和文)アルツハイマー病関連ペプチドp3-A1cの神経細胞への作用メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of action of Alzheimer's disease-related peptide p3-A1c on neurons

研究代表者

羽田 沙緒里(Hata, Saori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40581012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：認知症最大の疾患であるアルツハイマー病(AD)の患者数急増が社会的な問題となっているが、いまだ効果的な治療法は確立されていない。本研究ではAD関連ペプチドp3-A1cの定量測定系を確立し、AD患者における定量解析を実施した。その結果、p3-A1cはAD発症に伴い減少することを明らかにした。p3-A1cの脳内における生理的機能を解析した結果、AD原因因子A β による神経毒性に対して保護的作用を有することが明らかとなり、新規AD治療ターゲットとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会の加速に伴い、特に患者数が多いADへの対策が喫緊の課題となっている。これまでに多数開発されてきたA β をターゲットとしたAD治療薬候補としては異なるメカニズムによって、本研究で着目した脳内内在性ペプチドであるp3-A1cは抗AD作用を有することが明らかになった。ADは認知症を発症する20年以上前から脳内において病態変化が起こることから早期診断法の確立も重要なポイントとなるが、p3-A1cはAD発症に伴い減少するため、治療開始をモニターするマーカーとしての有用性も示唆され、AD対処法に診断・治療の両方から貢献している。

研究成果の概要(英文)：The rapid increase in the number of patients with Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia, has become a social problem, but no effective treatment has yet been established. In this study, we established a quantitative measurement system for the AD-related peptide p3-A1c and conducted quantitative analysis in AD patients. The analysis revealed that p3-A1c was decreased with the onset of AD. Analysis of the physiological function of p3-A1c in the brain revealed that p3-A1c has a protective effect against AD-causing factor A β -induced neurotoxicity, suggesting that p3-A1c may be useful as a novel therapeutic target for AD.

研究分野：病態神経科学

キーワード：アルツハイマー病

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高齢化の進む先進諸国では、認知症患者の急増が社会的な問題となっており、今後も有病率の増加が見込まれている。認知症の最大疾患であるアルツハイマー病（AD）は進行性の神経変性疾患である。ADの根本的治療法を開発するために病態機序の解明が進められており、アミロイド前駆体タンパク質 APP からプロテアーゼ切断によって生成する $A\beta$ が可溶性オリゴマーを形成し、神経毒性を発現することが AD 発症の最初の段階であると理解されている（図 1 右側）。しかし、この仮説に基づき $A\beta$ を標的とした数多くの疾患修飾薬の臨床治験が実施されてきたものの、FDA 承認に至ったものは 2021 年 6 月の時点でも抗 $A\beta$ 抗体 1 種のみであり、患者数の多さと認知症発症初期あるいは前段階からの長期間における対処が必要な疾患であることから、より効果的かつ低コストな治療法の確立が強く望まれている。新たな AD 治療ターゲットの発見は、AD の効果的治療法を開発を大いに前進させることを可能とすると考えられる。

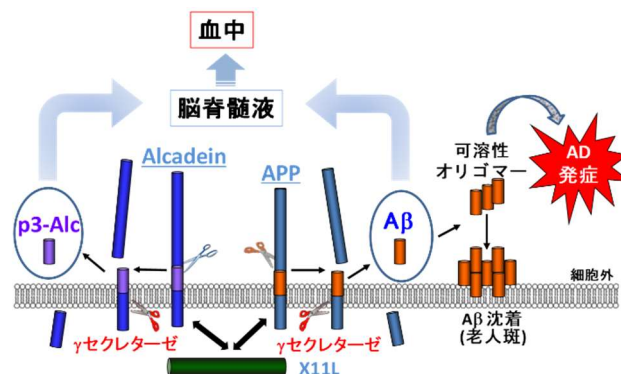


図 1 $A\beta$ の産生と Alcadein の代謝による p3-Alc の産生

2. 研究の目的

これまで AD に関連する膜タンパク質である Alcadein に着目し研究を行ってきた。Alcadein は、APP と同様の代謝様式および同じ切断酵素による切断を受けることによって、“p3-Alc”を細胞外に分泌する（図 1 左側）。Alcadein はヒトでは Alcadein α 、Alcadein β 、Alcadein γ の三種類のファミリー分子から構成されており、Alcadein α から産生される p3-Alc を p3-Alc α と呼ぶ。これまでに APP 切断酵素の AD における切断機能変化を解析するために、Alcadein 切断産物である p3-Alc の解析を行い p3-Alc α は AD 患者の脳脊髄液（CSF）・血液中で増加、あるいは質的に変化することから AD 診断マーカーとして有用であることを示してきた。Alcadein β から分泌される p3-Alc β は、CSF 中に $A\beta$ と同程度量存在することや、同じ Alcadein ファミリー分子から産生される p3-Alc α の AD 患者の量的・質的变化から、AD との関連が考えられた。そのため、本研究では p3-Alc β に着目し AD 患者における量的変化の解析し、さらに AD に関連する生理機能を解明することを目的として、実験を行った。

3. 研究の方法

(1) p3-Alc β の定量解析

AD との関連を解明する目的で p3-Alc β の定量解析を実施するために、CSF 中のメジャー分子種を定量可能な sELISA 系を作成し、AD 患者 CSF 中の p3-Alc β の定量解析を実施した。

(2) p3-Alc β の生理機能の解明

p3-Alc β の神経細胞に対する生理機能を解明するために、マウス初代培養神経細胞を用いた p3-Alc β の AD に関連する生理作用解析およびそのメカニズム解析を実施した。

4. 研究成果

(1) p3-Alc β の定量系の作成

Alcadein、APP はいずれも γ セクレターゼによる二次切断を受けることにより、それぞれ p3-Alc と $A\beta$ が産生されるが、 γ セクレターゼ切断サイトの違いによりアミノ酸数の異なる複数の分子種

が細胞外に分泌される。p3-Alcβは、ヒト CSF 中では 37 と 40 アミノ酸からなる p3-Alcβ37、p3-Alcβ40 が主に検出される分子種である (図 2(A))。量的変化およびγセクレターゼの切断変化の両方を解析する目的で、p3-Alcβ37、p3-Alcβ40 それぞれを特異的に定量可能な sELISA 系を作成した (図 2(B))。さらに、ヒト CSF 中の p3-Alcβの定量測定方法を確立した。

(2) AD 患者における p3-Alcβの量的変化

(1)で確立したヒト CSF 中の p3-Alcβの定量測定系を用いて、非 AD (Control)、軽度認知症患者 (MCI)、AD 患者 (AD) の p3-Alcβ37、p3-Alcβ40 の定量解析を実施した。国内外 3 か所の医療機関から供与された CSF (Control n=117、MCI n=44、AD n=76)を解析した結果、p3-Alcαとは異

なり、p3-Alcβは AD 患者の CSF 中で減少することが明らかとなった(図 3)。この減少の原因を明らかにするために、ヒトと同様に老人斑が脳内に蓄積するカニクイザ

ルのサンプルを用いた解析を実施した。その結果、カニクイザル CSF において、p3-Alcβは加齢 (老人斑の蓄積) に伴い減少し、さらにこの減少は p3-Alcβの前駆体タンパク質 Alcadinβの脳内の存在量が加齢に伴い減少することに起因することを明らかにした。

(3) p3-Alcβの AD に対する作用解析

AD 患者における CSF の量的変化様式が p3-Alcαと p3-Alcβで異なっていたことや、アミノ酸配列に相同性が低いことから、CSF 中の p3-Alc にはそれぞれに異なる生理作用があることが考えられた。AD に関連した生理機能を検証するために、マウスへの Aβオリゴマー脳室投与が引き起こす急性認知機能障害に対する作用を解析し、p3-Alcβ のみに保護的作用があることが明らかとなった。さらに、p3-Alcβ37 のアミノ酸配列中で、[9-19]に相当する配列がその機能配列であることが明らかとなった。Aβ毒性に対する保護的作用メカニズム解明を実施するために、初代培養神経細胞を用いた解析を実施した。その結果、p3-Alcβには細胞の賦活化作用があり、なおかつ Aβの毒性に対して保護的作用があることを確認することができた (図 4)。この細胞の賦活化作用は、Aβ毒性のターゲットとなりうる受容体との相互作用を介する可能性や、細胞のミトコンドリアの活性化を引き起こしうることを明らかとした。

本研究で、p3-Alcβは AD 発症に伴い減少するペプチドであり、CSF 中に 10 ng/mL 程度存在する抗 AD 作用を有する生理活性ペプチドであることを明らかにした。今後のさらなる研究により、副作用発現の可能性が低く安全性の高い新規 AD 治療薬候補としての応用発展が期待される。

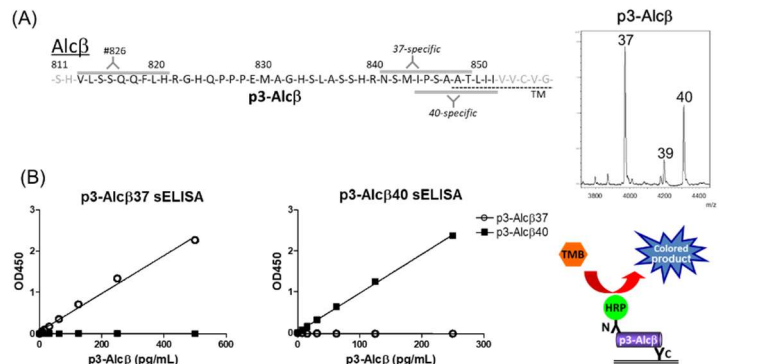


図2 p3-Alcβの配列とsELISA定量測定系

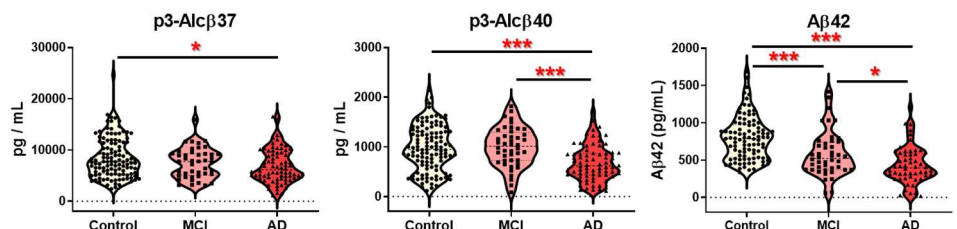


図3 p3-AlcβはAD患者の脳脊髄液中で減少する

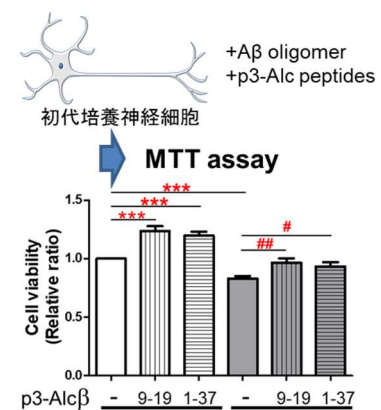


図4 p3-Alcβは細胞賦活化作用およびAβの毒性に対する保護効果を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakano Masaki, Mitsuishi Yachiyo, Liu Lei, Watanabe Naoki, Hibino Emi, Hata Saori, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Murayama Shigeo, Kasuga Kensaku, Ikeuchi Takeshi, Suzuki Toshiharu, Nishimura Masaki	4. 巻 80
2. 論文標題 Extracellular Release of ILE1/FAM3C and Amyloid- Is Associated with the Activation of Distinct Synapse Subpopulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 159 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-201174	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 Kakuda Nobuto, Yamaguchi Haruyasu, Akazawa Kohei, Hata Saori, Suzuki Toshiharu, Hatsuta Hiroyuki, Murayama Shigeo, Funamoto Satoru, Ihara Yasuo	4. 巻 190
2. 論文標題 -Secretase Activity Is Associated with Braak Senile Plaque Stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1323 ~ 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.02.009	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 Gotoh Naoya, Saito Yuhki, Hata Saori, Saito Haruka, Ojima Daiki, Murayama Chiaki, Shigeta Mayo, Abe Takaya, Konno Daijiro, Matsuzaki Fumio, Suzuki Toshiharu, Yamamoto Tohru	4. 巻 295
2. 論文標題 Amyloidogenic processing of amyloid protein precursor (APP) is enhanced in the brains of alcadein -deficient mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9650 ~ 9662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012386	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 Hata Saori, Hu Anqi, Piao Yi, Nakaya Tadashi, Taru Hidenori, Morishima-Kawashima Maho, Murayama Shigeo, Nishimura Masaki, Suzuki Toshiharu	4. 巻 29
2. 論文標題 Enhanced amyloid- generation by -secretase complex in DRM microdomains with reduced cholesterol levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 382 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz297	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 Hata S, Omori C, Kimura A, Saito H, Kimura N, Gupta V, Pedrini S, Hone E, Chatterjee P, Taddei K, Kasuga K, Ikeuchi T, Waragai M, Nishimura M, Hu A, Nakaya T, Meijer L, Maeda M, Yamamoto T, Masters CL, Rowe CC, Ames D, Yamamoto K, Martins RN, Gandy S, Suzuki T	4. 巻 5
2. 論文標題 Decrease in p3 Alc 37 and p3 Alc 40, products of Alcadin generated by secretase cleavages, in aged monkeys and patients with Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions	6. 最初と最後の頁 740 ~ 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trci.2019.09.015	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 該当する

1. 著者名 Kakuda Nobuto, Yamaguchi Haruyasu, Akazawa Kohei, Hata Saori, Suzuki Toshiharu, Hatsuta Hiroyuki, Murayama Shigeo, Funamoto Satoru, Ihara Yasuo	4. 巻 -
2. 論文標題 -Secretase activity is associated with Braak Senile Plaque stages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.02.009	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 Cam M, Durieu E, Bodin M, Manousopoulou A, Koslowski S, Vasylieva N, Barnych B, Hammock BD, Bohl B, Koch P, Omori C, Yamamoto K, Hata S, Suzuki T, Karg F, Gizzi P, Haber VE, Bencetic Mihaljevic V, Tavcar B, Portelius E, Pannee J, Blennow K, Zetterberg H, Garbis SD, Auvray P, Gerber H, Fraering J, Fraering PC, Meijer L.	4. 巻 62
2. 論文標題 Induction of Amyloid-42 Production by Fipronil and Other Pyrazole Insecticides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1663 ~ 1681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-170875	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 該当する

1. 著者名 Tsukamoto Maoko, Chiba Kyoko, Sobu Yuriko, Shiraki Yuzuha, Okumura Yuka, Hata Saori, Kitamura Akira, Nakaya Tadashi, Uchida Seiichi, Kinjo Masataka, Taru Hidenori, Suzuki Toshiharu	4. 巻 592
2. 論文標題 The cytoplasmic region of the amyloid-protein precursor (APP) is necessary and sufficient for the enhanced fast velocity of APP transport by kinesin-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2716 ~ 2724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13204	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 Motodate Rika, Saito Haruka, Sobu Yuriko, Hata Saori, Saito Yuhki, Nakaya Tadashi, Suzuki Toshiharu	4. 巻 148
2. 論文標題 X11 and X11-like proteins regulate the level of extrasynaptic glutamate receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 480 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14623	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 羽田沙緒里、齋藤遥、木下祥一、鈴木利治
2. 発表標題 アルツハイマー病新規治療法開発を目指した脳内在性ペプチドの解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽田沙緒里、胡安琪、村山繁雄、森島真帆、西村正樹、鈴木利治
2. 発表標題 アルツハイマー脳におけるラフトの脂質変化と セクレターゼの局在・機能変化
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saori Hata, Ayano Kimura, Haruka Saito, Masaaki Waragai, Takeshi Ikeuchi, Ralph Martins, Nobuyuki Kimura, Masaki Nishimura, Toshiharu Suzuki
2. 発表標題 Altered levels of p3-A β peptides in the CSF of aged monkeys and Alzheimer's disease patients.
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Suzuki, Naoya Goto, Haruka Saito, Saori Hata, Tohru Yamamoto
2. 発表標題 Enhanced - and ' -cleavages of APP in Alcadeina knockout mouse brain.
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Saito, Saori Hata, Toshiharu Suzuki
2. 発表標題 Prevention of neurons from toxicity induced by A 42 by p3-Alc peptides and their pharmacokinetics in ice.
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiharu Suzuki, Saori Hata
2. 発表標題 Mirochondria as a therapeutic target of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 The 7th International ALA and Prophyrin Symposium (IAPS7) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽田沙緒里、齋藤遥、木村彩乃、鈴木利治
2. 発表標題 新規AD治療薬候補p3-Alc の作用メカニズム解明
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽田沙緒里、齋藤遥、木村彩乃、鈴木利治
2. 発表標題 Alcadein代謝ペプチドをシードとしたアルツハイマー病新規治療法の開発
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 遥, 羽田 沙緒里, 木村 彩乃, 鈴木 利治
2. 発表標題 A オリゴマーによる神経毒性を緩和するp3-A1c ペプチドのin vitroにおける機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽田沙緒里、木村彩乃、木村展之、池内健、春日健作、藁谷正明、西村正樹、鈴木利治
2. 発表標題 -セクレターゼ切断産物p3-A1c ペプチドの加齢およびAD発症による産生変化
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木利治、齋藤 遥、木村彩乃、大森智織、羽田沙緒里
2. 発表標題 A 毒性から神経を保護するp3-A1c を用いたアルツハイマー病治療戦略
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 遥、羽田沙緒里、木村彩乃、大森智織、山本一夫、鈴木利治
2. 発表標題 Alcadein 代謝産物p3-AIc はA 及びNMDA誘導性神経毒性を緩和する
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------