

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07405

研究課題名(和文)新規モデル系を用いたアルツハイマー病の神経変性制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of neurodegenerative control mechanism of Alzheimer's disease using a new model system

研究代表者

林 永美 (LIM, YOUNGMI)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究生

研究者番号：60421898

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)：アルツハイマー病に対する治療薬の開発のためには、神経変性誘導の理解が必要である。我々はモデル動物を用いて、アルツハイマー病の発症原因因子であるアミロイド(A β)を中心として、A β のN末端がピログルタミル化(pE化)という修飾を受け、pE-A β として働いていることに注目して研究を行ってきた。本課題では、pE化に至るまでのシグナル伝達に関する解析を行い、A β の下流でニコチン性アセチルコリン受容体(D α)がMAPキナーゼファミリー分子であるErkの活性化を仲介して働いている事を見出した。このA β からErkの活性化に至るまでのシグナル伝達が最終的な神経変性誘導に対して重要な役割を持つ事が予想される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本では4人に1人が65歳以上である「超高齢社会」に突入していることから、アルツハイマー病を始めとする高齢者に特有の疾患に対する対策が急務である。しかしながら、これまでにアルツハイマー病に対する有効な治療薬は開発されていないのが現状である。特に、アルツハイマー病に伴った神経変性誘導のメカニズムは未だに不明である。本研究からアルツハイマー病の原因因子であるA β からpE化に至る道筋が見えて来たことから、これを手がかりとしてアルツハイマー病に対する治療薬の開発が促進される事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Understanding the induction of neurodegeneration is necessary for the development of therapeutic agents for Alzheimer's disease. We have been studying the mechanism of neurodegenerative induction focusing on β -amyloid (A β), which is the causative factor of the onset of Alzheimer's disease, in Drosophila and mice. In particular, for those in which the N-terminal of A β is modified by pyroglutamylation (pE conversion) and expressed as pE-A β , the mechanism centered on the endoplasmic reticulum stress response has been elucidated. In this research project, we have been analyzing signal transduction leading to pE formation, and found that nicotinic acetylcholine receptor (D α) acts to mediate the activation of Erk, a MAP kinase family molecule, downstream of A β . It is expected that the signal transduction from A β to the activation of Erk will play an important role in the final induction of neurodegenerative disease.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：アルツハイマー病 神経変性 アミロイド ショウジョウバエ シグナル伝達

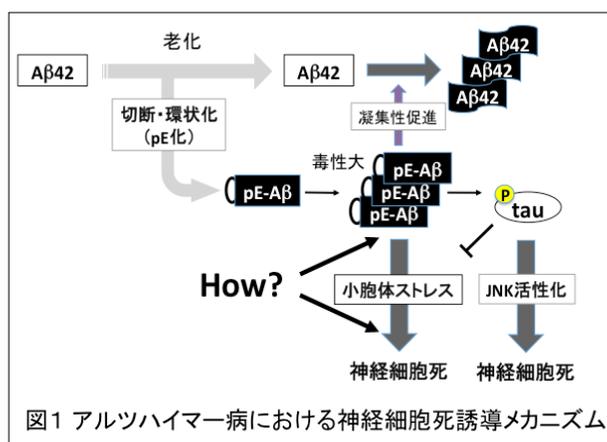
研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

現在、人口の4人に1人が65歳以上である超高齢社会を迎えている日本国では、高齢者に頻発する認知症に対する治療法の確立が強く求められている。認知症の中でも7割以上を占めるアルツハイマー病（AD）では、病態が段階的に進行し、重篤化に伴って脳の萎縮が観察される。ADにおける脳の萎縮には、神経細胞死の誘導が関わっていると考えられているが、詳しいメカニズムは明らかになっていない。

これまで、ADにおける神経細胞死の誘導にはマイクロチューブル結合因子の一つであるTauが関わっていると予想されていた。しかし、TauだけでAD病態におけるすべての神経変性を説明することが困難であることから、別の機構が関わっていると予想されてきた。AD病態の形成にはTauに加えてアミロイドベータ（A β ）が重要な役割を持っていると考えられている。しかし、これまでの

マウスやショウジョウバエを用いた研究報告から、A β 42自身による神経変性誘導能は著しく低いことが示唆されている。最近、A β 42の翻訳後修飾が神経変性誘導に関わっていることが予想されている。A β 42は産生された後、多くはN末端が切断と環状



化を伴うピログルタミル化（pE化）という修飾を受け、pE化されたA β 42（pE-A β ）が老人斑の大半を占めることが報告されている。pE-A β はA β 42と比較した場合、凝集性が増加する等の毒性効果が強くなっていると考えられている。研究代表者の研究室ではショウジョウバエモデルを用いてpE-A β による神経細胞死の誘導メカニズムに関して研究を行ってきた。これまでの先行研究からpE-A β による神経変性誘導にはpE-A β による小胞体ストレス応答の誘導、およびTauとの相乗効果に関わっていることが示唆されている[1]（図1）。以上のことから、ADに伴う神経変性誘導にはpE-A β が重要な役割を持っていると考えられ、A β との関係を含めたpE-A β の機能解明が治療法の確立につながることを期待された。

2. 研究の目的

本研究課題では、ADの重篤化に伴ったA β 毒性の亢進がどのようなメカニズムで生じているのかを明らかにすることを目的として研究を開始した。特にA β のN末端がpE化という修飾されたpE-A β に着目して、pE-A β による神経細胞死の誘導メ

カニズム解明を目的としている。当初は治療法の確立を目指して pE-A β による神経細胞死誘導を抑制する薬剤スクリーニングの開発を一つの目標に設定した。しかし、スクリーニング系に問題があったため、方向の修正を行った。特に、研究の過程で、pE-A β の産生に関与する酵素であるグルタミニルシクラーゼ (glutaminyl cyclases; QC) の発現には、A β 自身の活性が必要であることが見出された (Lim et al, 未発表)。そこで、A β による神経毒性に注目することにより、pE-A β 産生との関係を探る方向に研究を転換させ、ショウジョウバエおよびマウスモデルを用いて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) pE-A β による毒性を抑制する薬剤スクリーニング

小胞体ストレス応答を生体内で検出する目的で XBP1-GFP が開発されている。これは、小胞体ストレス応答を仲介する XBP1 が小胞体ストレス応答依存的にスプライシング調節を受けることを利用し、小胞体ストレス応答の存在する時にだけ GFP 陽性になるようにセッティングされている[2]。光受容神経細胞を含む複眼で pE-A β を発現するバックグランド (GMR>pE-A β) で XBP1-GFP を同時に発現させ、GFP 陽性細胞を抑制する活性での薬剤検出を試みた。パイロットスクリーニングとして、A β 42 に直接結合して A β 毒性を抑制できる Quercetin を用いて条件を検討した。

(2) マウス内耳有毛細胞を用いた解析

代表者が所属する研究室では A β による神経機能低下および神経変性誘導を観察できる系として、A β 42 をマウス内耳有毛細胞で発現する Tg マウス [math1-A β 42Arc] が開発されている[3]。この系を用いることにより A β から pE-A β の産生につながる重篤化の過程を観察できると考えた。具体的には、A β 毒性から QC に到るまでのシグナル伝達に注目し、遺伝学的な解析を行った。これまでの報告で、カルシウムチャネル (mGluR7) の機能が A β 毒性を仲介していることが報告されていることから、mGluR7 ノックアウトマウス (mGluR7-KO) を作成して検討した[4]。聴力測定には歪成分耳音響放射 (DPOAE) を用いた。

(3) A β 42 による pE 化酵素 QC の発現誘導メカニズム解析

A β 42 を光受容神経細胞で発現誘導しているショウジョウバエモデル (GMR>A β 42) を用いて、QC 発現を定量 PCR でモニターして作用検定を行った。関与するシグナル伝達機構としては、A β 毒性を仲介していることが報告されているニコチン性アセチルコリン受容体 7 (nAChR7; D α 7) に注目した[5]。さらに nAChR7 の下流で働くことが予想されている PI3K/Akt/Erk シグナル伝達

因子に関して、dsRNA を発現することにより pE-A β による QC 発現誘導に対する効果を検討した。

4. 研究成果

(1) pE-A β による毒性を抑制する薬剤スクリーニング

GMR>pE-A β ; XBP1-GFP 系統を作成して検討を行った結果、GFP 陽性細胞の産生にバラツキが大きく、Quercetin の効果が判定できなかったため、この系は薬剤検定には向いていないことが判明した。

(2) マウス内耳有毛細胞を用いた解析

[$\text{math1-A}\beta\text{42Arc}$]では生後5ヶ月齢で超高音域(24kHz<)に対する応答性が低下する[3]。これに対して、mGluR7-KOを導入したものでも抑制効果は観察されなかった。この結果から、内耳有毛細胞におけるA β 42の毒性にはmGluR7は関与していないことが予想された。

(3) A β 42 による pE 化酵素 QC の発現誘導メカニズム解析

GMR>A β 42 ではコントロールと比較して約2倍 QC 発現量が増加する。これに対してA β 42の毒性を仲介していることが予想されているD α 7の変異体バックグラウンドでは誘導が抑制された。一方、D α 7の過剰発現ではQC遺伝子の発現上昇が観察されたことから、A β によるQCの発現誘導はD α 7を介していることが示唆された。また、D α 7の下流で働いていることが予想されているPI3K, AKT, Erk それぞれに対するdsRNAの発現によりA β 42によるQC発現誘導活性を有意に抑制することが観察された。この結果から、pE-A β の産生にはPI3K/Akt/Erkを介するA β 42の活性が必要であることが示唆された。

<考察>

ADの病態進行にはA β 42によるD α 7を介したシグナル伝達が重要な役割を持つと考えられ、QCの発現が上昇していると思われる。QCの発現上昇幅は大きくは無いが、数年という時間単位

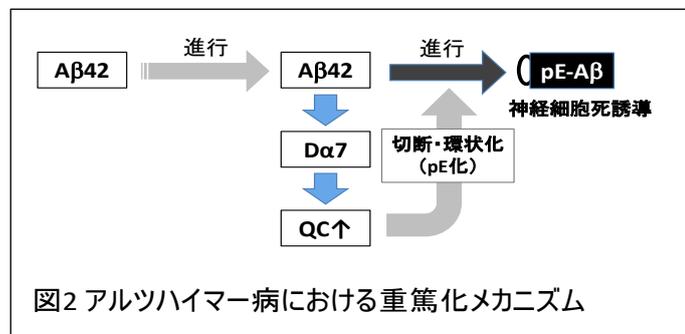


図2 アルツハイマー病における重篤化メカニズム

でpE-A β の産生が促進される結果、神経細胞死の誘導が生じていると考えられる(図2)。

AD 治療薬の開発には A β 、pE-A β 、QC を標的とする薬剤だけでなく A β 42 から QC の発現に到るまでの過程を標的とする薬剤開発も有効であることが期待される。

< 引用文献 >

1. Tsuda, L., Omata, Y., Yamasaki, Y., Minami R., Lim, YM. Pyroglutamate-amyloid- β peptide expression in *Drosophila* leads to caspase-dependent and endoplasmic reticulum stress-related progressive neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 26: 4642-4656, 2017
2. Ryoo HD., Domingos, PM., Kang, M-J., Steller, H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J*, 26: 242-252, 2007.
3. Omata, Y., Tharasegaran, S., Lim, YM., Yamasaki, Y., Ishigaki, Y., Tatsuno, T., Maruyama, M., and Tsuda, L. Expression of amyloid- β in mouse cochlear hair cells causes an early-onset auditory defect in high-frequency sound perception. *Aging*, 8: 427-440, 2016
4. Gu, Z., Cheng, J., Zhong, P., Qin, L., Liu, W., Yan, Z. Ab selectivity impairs mGluR7 modulation of NMDA signaling in basal forebrain cholinergic neurons: implication in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 34: 13624-13628, 2014.
5. Eadaim, A., Hahm, E-T., Justice, ED., Tsunoda, S. Cholinergic synaptic homeostasis is tuned by an NFAT-mediated alpha7 nAChR-Kv4/Shal coupled regulatory system. *Cell Reports*, 32: 108119, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 南竜之介、林永美、津田玲生
2. 発表標題 アミロイド によるシナプス機能低下の誘導メカニズム解析
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 林永美、津田玲生
2. 発表標題 アルツハイマー病における神経変性誘導メカニズム解析
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 津田玲生、南 竜之介、林 永美
2. 発表標題 内耳有毛細胞と神経細胞の共通性に着目したアルツハイマー病研究
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 永美、南 竜之介、津田玲生
2. 発表標題 ショウジョウバエとマウスを組み合わせたアルツハイマー病治療薬の開発研究
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuda L., Minami R., Lim YM
2. 発表標題 Searching for the therapeutic drugs for AD using Drosophila and mouse
3. 学会等名 AD/PD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田玲生
2. 発表標題 孤発性アルツハイマー病の発症における加齢と蛋白質代謝の役割
3. 学会等名 第5回生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田玲生、山崎泰豊、林 永美
2. 発表標題 ショウジョウバエの脳神経で発現させたガングリオシドの機能解析.
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田玲生
2. 発表標題 アミロイド によるシナプス機能低下と加齢の関係.
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林永美、南竜之介、津田玲生
2. 発表標題 創薬モデル動物を用いたアルツハイマー病治療薬の開発
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 南竜之介、林永美、津田玲生
2. 発表標題 聴覚機能を用いたアミロイド (A) によるシナプス機能低下の分子機構解析.
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 津田玲生、南竜之介、林永美
2. 発表標題 Development of therapeutics for Alzheimer ' s disease using chemical biological approaches.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南竜之介、林永美、津田玲生
2. 発表標題 Importance of nutrients in the late onset of Alzheimer ' s disease associated with aging.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lim YM., Yamasaki Y., Minami R., Tsuda L.
2. 発表標題 Chemical biological approaches to identify therapeutic drugs for Alzheimer ' s disease using mouse and Drosophila in vivo model systems
3. 学会等名 International conference on Alzheimer ' s and Parkinson ' s diseases (AD/PD 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamasaki Y., Lim YM., Tsuda L.
2. 発表標題 Induction of ganglioside synthesis accelerates assembly of amyloid protein in the brain.
3. 学会等名 International conference on Alzheimer ' s and Parkinson ' s diseases (AD/PD 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minami R., Lim YM., Tsuda L.
2. 発表標題 Analysis of neuronal dysfunction mechanism common to dementia and senile deafness.
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林永美、山崎泰豊、南竜之介、津田玲生
2. 発表標題 Charlatan, a Drosophila NREF/REST, is implicated in the neuronal diversity formation
3. 学会等名 第13回日本ショウジョウバエ研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南竜之介、林 永美、津田玲生
2. 発表標題 新規アルツハイマー病 (AD) モデルマウスにおける神経機能低下の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 南 竜之介、林 永美、津田玲生
2. 発表標題 加齢性神経疾患の研究における内耳有毛細胞と神経細胞との分子的共通性
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tsuda L. and Lim YM.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 308
3. 書名 Advances in Experimental Medicine and Biology Series	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイド 42蓄積抑制用組成物、並びに、アルツハイマー型認知症予防治療用組成物及び脳アミロイドアンギオパチー予防治療用組成物	発明者 津田玲生、林 永美、 立崎 仁、國吉智子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-62873	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	津田 玲生 (Tsuda Reo) (30333355)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究生 (83903)	

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