

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07836

研究課題名(和文) アミロイド オリゴマーの受容体結合に着目したアルツハイマー病のシナプス病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the synapse pathology of Alzheimer's disease with a focus on the receptors which bind amyloid-beta oligomers

研究代表者

荒木 亘 (ARAKI, WATARU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60311429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイド タンパク質(A<sub>β</sub>)の可溶性重合体であるA<sub>β</sub>オリゴマー(A<sub>β</sub>O)は、神経細胞膜上の何らかの受容体に結合し、神経・シナプス毒性を引き起こすと想定されるが、その受容体の実体はまだ不明確である。本研究では、ラット初代培養神経細胞に、A<sub>β</sub>Oを添加する系を用いて、この問題について検討した。その結果、A<sub>β</sub>Oは、GluN2Bサブユニットを含むNMDA受容体とmGluR1受容体の両方に結合すること、そしてそれが発端となり、前及び後シナプス特異タンパク質のシナプスからの解離が起こることが示唆された。本研究の知見は、アルツハイマー病におけるシナプス病態の分子メカニズムの一端を明らかにするものといえる。

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<sub>β</sub>)は、アルツハイマー病(AD)の脳に線維化し、蓄積するが、むしろ、可溶性のA<sub>β</sub>オリゴマーがシナプス障害などを引き起こす病原因子と考えられている。本研究では、A<sub>β</sub>オリゴマーがシナプス障害を引き起こす分子メカニズムを、A<sub>β</sub>オリゴマーと候補受容体の結合性の解析から検討した。その結果、GluN2Bサブユニットを含むNMDA受容体と代謝型グルタミン酸受容体1(mGluR1)が、ADのシナプス障害に重要な役割を持つことが明らかとなった。本研究成果は、ADの分子病態解明の一助となるものである。

研究成果の概要(英文)：Soluble assemblies of amyloid-β protein called A<sub>β</sub> oligomers (A<sub>β</sub>O) are considered to induce neurotoxicity and synaptotoxicity through binding to certain receptors on the neuronal membrane. However, it remains unclarified which receptors are most critically involved. In this study, we investigated this issue using a model system in which rat primary neurons are exposed to A<sub>β</sub>O. We found that A<sub>β</sub>O binds to both NMDA receptors containing GluN2B subunits and metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1), which possibly leads to dislocation of both presynaptic and postsynaptic proteins from synapses. Our findings thus clarify part of the molecular mechanisms underlying the synapse pathology of Alzheimer's disease.

研究分野：神経分子病態学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド オリゴマー シナプス グルタミン酸受容体 神経毒性 認知症

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

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症またはアルツハイマー病 (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 $\beta$  オリゴマーが病原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、シナプスの障害・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膜上の何らかの受容体に結合し、細胞障害、タウ異常が惹起されると想定される。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いるが、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。

## 2. 研究目的

上述のように、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。A $\beta$  オリゴマーが相互作用する神経細胞表面の受容体候補としては、NMDA 受容体、プリオン前駆体 (PrP) など様々なものが報告されている。

一方、グルタミン酸系の神経伝達は、神経可塑性に密接に関与しており、AD 病態において、グルタミン酸系の制御異常があることが明らかとなっている。

本研究では、我々がこれまでに確立した初代培養神経細胞モデルを主に用いて、A $\beta$  オリゴマーに起因するシナプスタンパク質の異常について解析するとともに、A $\beta$  オリゴマーに結合する受容体の実体を明らかにするため、グルタミン酸系受容体を中心にして、解析を行った。

さらに、このような解析から得られた受容体候補の発現が、AD モデルマウスの脳において変化しているか、検討した。

## 3. 研究方法

抗体：A $\beta$  抗体としては、N 末に対するモノクローナル抗体 82E1 (IBL 社)、構造特異的抗体 (GeneTex 社) を用いた。アミロイド前駆体タンパク質 (APP) の N 末抗体 (T97) は亀谷博士から提供された。その他、下記に記載する市販の抗体を用いた。

初代培養神経細胞：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、ウエスタンブロット、免疫細胞化学などで解析した。

免疫細胞化学：4%パラフォルムアルデヒドで固定した神経細胞を既報 (Mamada ら、2015) の方法に従い、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：RIPA 緩衝液で細胞を溶解し、既報 (Mamada ら、2015) の方法に従って実施した。各バンドを定量し、 $\alpha$ -アクトチンの量で補正した。

AD モデルマウス脳の免疫組織学的解析：AD モデルマウスとして、5XFAD マウスを用いた。対照として、野生型マウスを用いた。7 ヶ月齢のマウスの脳の凍結切片を、既報 (Taniguchi ら、2019) に従い調整した。切片を各抗体で免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS

SP8)で観察し、画像を取得した。海馬 CA3 領域に設定した関心領域中の免疫蛍光輝度を定量し、平均値を算出した。

#### 4 . 研究成果

##### 1 ) A オリゴマーによるシナプス特異タンパク質の異常変化

前シナプスの特異タンパク質である Synapsin I、SNAP-25、または後シナプスの特異タンパク質である Spinophilin、Homer1b/c の変化について調べた。

その結果、A オリゴマー処理細胞では、対照に比較して、これらすべてのタンパク質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。しかし、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。

また、A オリゴマーの神経毒性効果は、活性化型 Caspase-3 の増加からも確認できた。以上の結果は、我々の先行報告 (Tanokashira ら、2017) と合致するものであった。

##### 2 ) A オリゴマーと各種グルタミン酸受容体との結合の解析

A オリゴマー処理細胞を、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 オリゴマーが細胞体及び神経突起の細胞表面に結合していることが判明した。A オリゴマー特異抗体を用いた場合も同様な所見を確認した。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、代謝型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 と明らかに共局在するが、mGluR5 との共局在は少ないことが判明した。

NMDA 受容体は、GluN1、GluN2 の 2 種のサブユニットからなり、後者としては、GluN2A、GluN2B が主要なものである。そこで、GluN2A、GluN2B サブユニットについて、同様な解析を実施した。

その結果、A は GluN2A とは共局在が少ないが、GluN2B とは明瞭に共局在していた。

また、AMPA 受容体 GluA2 サブユニットについても解析したところ、A と GluA2 はほとんど共局在しなかった。

一方で、浸透化条件で上記の各受容体の抗体を用いて、対照と A オリゴマー処理細胞を免疫染色したところ、染色パターン及び強度は、両者間で差がなく、各受容体タンパク質の明らかな細胞内局在の変化は認められなかった。

また、ウエスタンブロット解析の結果、各受容体タンパク質の総量には、対照と A オリゴマー処理細胞間で変化を認めなかった。

##### 3 ) AD モデルマウス脳における NMDA 受容体および mGluR1 受容体の発現変化

5XFAD トランスジェニックマウスと野生型マウスを用いて、大脳における GluN2A、GluN2B、mGluR1 の発現を免疫蛍光染色で検討した。これらの受容体タンパク質は、大脳に広く発現していたが、特に海馬 CA3 領域で強い発現が認められたため、この領域に焦点を絞って免疫蛍光輝度を定量して、比較した。その結果、GluN2A、GluN2B、mGluR1 の蛍光輝度は、5XFAD では対照に比べて、それぞれ約 20%、10%、20%低下していた (Taniguchi ら、2022)。これらの変化は 5XFAD マウスの認知機能障害と関連している可能性が考えられる。

##### 4 ) 考察

以上から、A オリゴマーと、GluN2B を含む 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、前及び後シナプスのシナプス特異的タンパク質の解離などの異常が引き起こされることが示唆された。A オリゴマーと、GluN2B を含む NMDA 受容体の関連性については、過去の研究報告を裏付けるものといえ、NMDA 受容体の部分アンタゴニストのメマンチンが A オリゴマーの神経毒性を部分的に防御するという報告とも合致している。A オリゴマーと mGluR1 受容体との関連性については新規な知見といえる。しかし、この関連性をさらに明確にするためには、今後さらに mGluR1 特異的拮抗剤などを用いる検討などが必要と考えられる。5XFAD マウス海馬における GluN2A、GluN2B、mGluR1 の発現低下所見は予備的なものではあるが、同マウスの認知機能障害に関連している可能性があり、興味深い。

総合すると、GluN2B を含む NMDA 受容体と mGluR1 受容体が AD のシナプス病態に重要な役割を持つことが明らかになった。本研究で得られた知見は、AD におけるシナプス病態の分子メカニズムの一端を明らかにするものといえる。

なお、上記研究成果を英文原著として、国際誌に発表した(Taniguchi ら、2022)。

#### 5) その他

A オリゴマーによる神経毒性の低減効果を持つ抗酸化性の低分子化合物に関する英文総説を国際誌に発表した (Araki & Kametani、2022)。

AD モデルマウスを用いて新規 A 抗体医薬の効果を検討する治療法開発研究において、実験及び討議に協力した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi Kaori, Yamamoto Fumiko, Amano Akiko, Tamaoka Akira, Sanjo Nobuo, Yokota Takanori, Kametani Fuyuki, Araki Wataru	4. 巻 -
2. 論文標題 Amyloid- oligomers interact with NMDA receptors containing GluN2B subunits and metabotropic glutamate receptor 1 in primary cortical neurons: Relevance to the synapse pathology of Alzheimer ' s disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	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.neures.2022.03.001	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 Araki Wataru, Kametani Fuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Protection against Amyloid- Oligomer Neurotoxicity by Small Molecules with Antioxidative Properties: Potential for the Prevention of Alzheimer ' s Disease Dementia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 132 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11010132	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 Komaki Keisuke, Takano Tetsuya, Sato Yutaka, Asada Akiko, Ikeda Shikito, Yamada Kaoru, Wei Ran, Huo Anni, Fukuchi Aoi, Saito Taro, Ando Kanae, Murayama Shigeo, Araki Wataru, Kametani Fuyuki, Hasegawa Masato, Iwatsubo Takeshi, Tomomura Mineko, Fukuda Mitsunori, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 170
2. 論文標題 Lemur tail kinase 1 (LMTK1) regulates the endosomal localization of -secretase BACE1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 729 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab094	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 Taniguchi K, Yamamoto F, Arai T, Yang J, Sakai Y, Itoh M, Mamada N, Sekiguchi M, Yamada D, Saitoh A, Kametani F, Tamaoka A, Araki YM, Wada K, Mizusawa H, Araki W	4. 巻 70
2. 論文標題 Tyrosol reduces amyloid- oligomer neurotoxicity and alleviates synaptic, oxidative, and cognitive disturbances in Alzheimer's disease model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Alzheimer ' s Dis	6. 最初と最後の頁 937-952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190098	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野晶子, 三條伸夫, 安楽泰孝, 中木戸誠, 松原悦朗, 永田哲也, 西田陽一郎, 荒木亘, 津本浩平, 片岡一則, 横田隆徳
2. 発表標題 ナノミセル内包型抗A オリゴマー抗体によるアルツハイマー病態改善効果
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木亘
2. 発表標題 アルツハイマー病態と膜ラフト
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Araki W, Taniguchi K, Yamamoto F, Arai T, Kametani F, Tamaoka A
2. 発表標題 Amyloid beta-protein oligomers bind to both NMDA receptor and metabotropic glutamate receptor 1
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 A composition for prevention and/or treatment for Alzheimer 's disease and/or Alzheimer dementia, and composition for reducing amyloid-beta oligomer neurotoxicity	発明者 Wataru Araki, Jinwei Yang	権利者 Wataru Araki
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/016483	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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	三條 伸夫  (Sanjo Nobuo)  (00343153)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト教授    (12602)	

	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
研究協力者	亀谷 富由樹  (Kametani Fuyuki)	東京都医学総合研究所・研究員	
研究協力者	谷口 香織  (Taniguchi Kaori)	東京大学 疾患生命工学センター・特任研究員	
研究協力者	玉岡 晃  (Tamaoka Akira)	筑波大学・教授	
研究協力者	山本 詞子  (Yamamoto Fumiko)	筑波大学	
研究協力者	天野 晶子  (Amano Akiko)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任研究員	
研究協力者	横田 隆典  (Yokota Takanori)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授	

## 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
---------	---------