

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07846

研究課題名(和文) レニン・アンギオテンシン系の制御による脳内A β 蓄積の調節機序の解明

研究課題名(英文) Role of renin-angiotensin system in regulation of brain amyloid deposition

研究代表者

鄒 鞏 (Zou, Kun)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：40450837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 中年期の高血圧症はアルツハイマー病(AD)の危険因子とされているが、血圧調節に重要な役割を担っているレニン・アンギオテンシン系(RA系)とAD分子病態との関連は不明である。本研究の目的は、ACEおよびアンギオテンシン受容体のAD分子病態(特A β 蓄積)に果たす役割、ならびに治療標的分子を明らかにする目的である。

我々は、ACEのヘテロ欠損や臨床用量のACE阻害薬がマウス脳内A β 蓄積を増悪することを明らかにした。また、疫学調査でACE阻害薬が男性の知能指数を低下させることも明らかとなった。さらに、 α 2アドレナリン受容体とアンギオテンシン受容体が相互結合作用してA β 産生を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来高血圧の治療標的であったACEやアンギオテンシン受容体がAD分子病態に関与するという新機能を明らかにした点に独自性と新規性がある。ACE阻害薬やアンギオテンシン受容体拮抗薬が広く降圧剤として使用されていることから、レニン・アンギオテンシン系がADの発症にどう関わっているのか、そのメカニズムを含め分子・細胞・動物レベルで明らかにしておくことは極めて重要である。本研究は、今後の新規アルツハイマー病治療薬の開発においても社会的意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)： Midlife hypertension is a risk factor for the onset of Alzheimer's disease (AD). Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) is a strategy used worldwide for managing hypertension. In an 8-year longitudinal study, we found that the mean intelligence quotient of male, but not female, hypertensive patients taking ACE inhibitors declined more rapidly than that of others taking no ACE inhibitors. Moreover, the sera of all AD patients exhibited a decrease in A β 42-to-A β 40-converting activity compared with sera from age-matched healthy individuals. A clinical dose of an ACE inhibitor was sufficient to increase brain amyloid deposition. We also generated hAPP/ACE(+/-) mice and found that a decrease in ACE levels promoted A β 42 deposition and increased the number of apoptotic neurons. Moreover, we clarified that the interaction between angiotensin receptor and α 2-adrenergic receptor regulates the production of A β .

研究分野：生化学、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド タンパク アンギオテンシン変換酵素 レニン・アンギオテンシン系
アンギオテンシン受容体

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)では、アミロイド β 蛋白(Aβ)蓄積機構の解明が重要な課題となっている。我々は、血圧調節に重要なアンギオテンシン変換酵素(ACE)が、強毒性の Aβ₄₂ を神経保護作用をもつ Aβ₄₀ に変換する活性を有することを明らかにした。家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニリン(PS)変異のほとんどは、Aβ₄₂/Aβ₄₀ 比を上昇させることが知られている。また、大規模の疫学調査では、ACE 活性の低い ACE I allele 遺伝子多型は、孤発性 AD の危険因子であることが明らかになっている。中年期の高血圧症は AD の危険因子とされているが、血圧調節に重要な役割を担っているレニン・アンギオテンシン系(RA 系)と AD 分子病態との *in vivo* での関連は不明である。

(1) ADの発症には、アミロイド β 蛋白(Aβ)の脳内蓄積が深くかかわっていると考えられている。生理的条件下で産生・分泌される Aβ は、主に 2 種類(アミノ酸 40 個から成る Aβ₄₀ ならびに 42 個から成る Aβ₄₂)ある。我々は、Aβ₄₂ は強い毒性を発揮するが、Aβ₄₀ は以下のような神経保護作用を持つことを見出した。すなわち、(i) Aβ₄₂ は強い凝集性を持つため神経毒性を発揮するが、単体で存在しうる Aβ₄₀ は遷移金属をキレートして活性酸素の発生を抑制し、活性酸素による神経細胞死を抑制する (Zou *et al.*, *J Neurosci*, 22:4833-41, 2002)。(ii) 単体 Aβ₄₀ は Aβ₄₂ と結合することにより、Aβ₄₂ の β-sheet 形成を阻害し、Aβ₄₂ の重合体形成・線維化を抑制する。その結果、単体 Aβ₄₀ には、Aβ₄₂ のもつ神経毒性を抑制する作用があることを明らかにした (Zou *et al.*, *J Neurochem*, 87:609-19, 2003)。米国のグループは、Aβ₄₂ 或いは Aβ₄₀ のみを発現する AD モデルマウスを作製し、Aβ₄₀ のもつ Aβ 沈着抑制作用及び神経保護作用が確認され、我々の研究成果を強く支持した (Kim *et al.*, *J Neurosci*, 27:627-33, 2007)。

(2) これらの結果を踏まえ、細胞毒性の強い Aβ₄₂ からアミノ酸 2 つ切り出して細胞保護作用を持つ Aβ₄₀ に変換する (Aβ 変換) 酵素が生体内に存在すれば、その酵素活性を制御することによって脳内 Aβ 沈着の調節ができる可能性があるという考えを持つに至り、Aβ 変換酵素の同定を進めた結果、アンギオテンシン変換酵素(ACE)であることを特定した (Zou *et al.*, *J Neurosci*, 27:8628--35, 2007; Zou *et al.*, *Rev Neurosci*, 19:203-12, 2008)。ACE は、angiotensin I を血圧上昇に必要な angiotensin II に変換するメタロプロテアーゼとして報告されていたものである (Hooper *et al.*, *Nat Struct Biol*, 10:155-157, 2003)。

(3) 興味深いことに、我々は、Aβ 変換活性と angiotensin 変換活性が ACE の異なるドメインにそれぞれ存在することを見出した (Zou *et al.*, *J Biol Chem*, 284:31914-20, 2009; Zou *et al.*, *Seikagaku*, 82:1120-4, 2010; 図 1)。我々はさらに、強毒性の Aβ₄₃ が Aβ₄₂ よりも早期に脳内に沈着すること、ACE2 が Aβ₄₃ を Aβ₄₂ へ変換し、次に ACE が Aβ₄₂ を Aβ₄₀ へ変換するという二段階の変換作用で毒性の強い Aβ₄₃ を神経保護作用のもつ Aβ₄₀ に変換することを明らかにしている (Zou *et al.*, *Translational Medic*, 1:103, 2011; Zou *et al.*, *Am J Pathol*, 182:2322-31, 2013; Liu *et al.*, *J Neurosci Res*, 92:1178-86, 2014)。

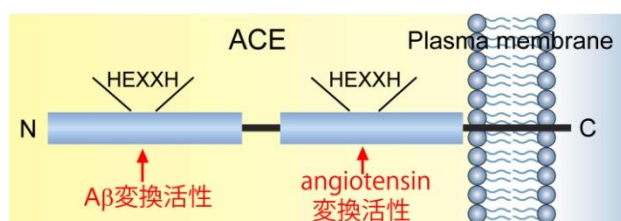


図 1 . Aβ 変換活性と angiotensin 変換活性が ACE の異なる活性ドメインに存在する。HEXXH: メタロプロテアーゼ活性モチーフ。

(4) 高血圧症治療薬の ACE 阻害薬およびアンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)は、広く降

圧剤として使用され、一部の ACE 阻害薬は AD の発症に関与しているが、ARB は AD の発症を抑制することが最近の疫学調査で報告されている(*Sink KM et al., Arch Intern Med, 169:1195-202, 2009; Davies NM et al., J Alzheimers Dis, 26:699-708, 2011*)。そこで、我々は、ARB が種類によって A β の産生に異なる作用を示すことを明らかにした(*Liu et al., Neurosci Lett, 567:51-6, 2014*)、また、ARB の標的であるアンギオテンシン受容体タイプ Ia(AgtrIa)の欠損 AD モデルマウスを作製し、脳内の A β 蓄積が顕著に減少していることを見出した(*Liu et al., Sci Rep, 5:12059, 2015; Zou, Seikagaku, 88:771-5, 2016*)。

2 . 研究の目的

RA 系、具体的には、ACE およびアンギオテンシン受容体による脳内 A β 蓄積の制御機構を明らかにすることが本研究の目的である。本研究は、従来高血圧の治療標的であった RA 系の持つ AD 分子病態への関与という新機能を明らかにする点に独自性と創造性がある。すなわち、ACE が毒性の強い A β 42 を神経保護作用のある A β 40 への変換作用を持つことという我々の発見に基づく研究であり、他の研究グループが手がけていない視点を持つ。ACE 阻害薬や ARB が広く降圧剤として使用されていることから、RA 系が AD 発症にどう関わっているのか、そのメカニズムを含め分子・細胞・動物レベルで明らかにしておくことは極めて重要であり、本研究は、脳内 A β 沈着を主体とする AD 病理発現における RA 系の意義を明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) 知能指数の疫学調査

愛知県大府市の 1964 人の縦断研究から、正常者、ACE 阻害剤の服薬患者および ACE 阻害剤以外の降圧剤服薬患者の 8 年間の知能指数の変化を推定した。

(2) ACE 阻害剤の投与

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である APP 遺伝子変異を持つトランスジェニックマウス (APPtg) を、Taconic 社から購入した(9)。6 ヶ月齢 APPtg マウスならびに野生型マウスに ACE 阻害剤であるカプトプリルを投与する。臨床に応用されている用量と過剰用量を二種類の投与を行う。すなわち、軽度 ACE 阻害と重度 ACE 阻害の影響を検討する。

(3) ダブルトランスジェニックマウスの作成

ACE(+/-)マウスを、Jackson Lab.社から購入し、APPtg マウスと ACE(+/-)マウスを交配させ、APPtg/ACE(+/-)欠損マウスを作成した。APPtg /ACE(-/-)マウスは、生後間もなく死亡するため、解析しなかった。

(4) 免疫染色

マウス脳を PBS で還流後、半側脳を病理検討用に固定し、残りの半球を凍結保存した。脳標本はアミロイド沈着を評価する Thioflavin-S 染色、抗 A β 40 ならびに A β 42 特異的抗体による免疫組織染色を行った。脳内の神経細胞死を anti-NeuN 抗体を用いて免疫組織染色で評価した。

4 . 研究成果

(1) 正常群、ACE 阻害剤以外の降圧剤服薬群および ACE 阻害剤の服薬群の 8 年間の知能指数の低下を推定した。ACE 阻害剤の服薬群は、ACE 阻害剤以外の降圧剤服薬群と比べ、知能指数は有意に低下した。しかし、この低下は男性に限っており、女性に見られなかった。

(2) ACE 阻害剤のカプトプリルを低濃度(lowcaptopril)と高濃度(high captopril)を二種類の投与を APPtg マウスへ 11 カ月間連続投与し、17 カ月齢マウス脳内のアミロイド沈着を thioflavin S 染色で検討した。加齢対照群マウスの海馬および大脳皮質にアミロイド沈着が検出されたが、過剰用量のカプトプリルが APPtg マウスの海馬および大脳皮質のアミロイド沈着を顕著に増強した。さらに、臨床に応用されている用量においても、アミロイド沈着の増強が認められた。これらの結果から、ACE 抑制が脳内アミロイド沈着を促進することが示唆された。

(3) これらのマウス脳内に神経細胞死が起きているかを検討するために、我々は、成熟神経細胞マーカー NeuN の特異抗体と A β 42 の特異抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行った。高濃度カプトプリル投与群は大脳皮質の神経細胞が減少し、その局在が乱れていることを判明した。また、大脳皮質の lamina zonalis 層が薄くなっており、さらに、A β 42 の沈着が増加していることが明らかとなった。APPtg マウス脳内では、顕著な神経細胞死が通常認められていないが、ACE 活性抑制 APPtg マウス脳の病理像では、アルツハイマー病患者脳の病理像と極めて類似していた。このことは、ACE 活性低下とアルツハイマー病発症を関連していることを示唆した。

(4) 我々は、in vivo で ACE の AD 発症との関わりを解明するため、APPtg/ACE(+/-)マウスを作成した。解析した結果、APPtg/ACE(+/-)マウス脳における ACE の発現は APPtg/ACE(+/+)マウスに比べ、50%減少した。また、APPtg/ACE(+/-)マウスの海馬および大脳皮質にアミロイド沈着が APPtg/ACE(+/+)マウスよりも顕著に増強した。

(5) 我々は、アンギオテンシン II 受容体タイプ I が A β 産生を促進することを明らかにし、その作用機序には、 β 2 アドレナリン受容体が関与していることを明らかにした。A β 産生および A β 除去機序の研究についても、新しい知見が得られた。我々は、新たに温度の上昇が γ セクレターゼ複合体の構成を促進し、A β 産生を増加させることを見出した。また、A β 除去に重要な ApoE の分泌が γ セクレターゼであるプレセニリンに依存することを明らかにした。

(6) さらに、我々は、PS 変異による A β 42/A β 40 比の増加に、PS 変異による ACE 活性変動が関与することを明らかにした。PS1 欠損細胞から精製した ACE は、ACE 活性 (Angiotensin I to II 換活性) が消失し、さらに、A β 42-to-A β 40 変換活性が野生型に比べて有意に低下していた。PS1 欠損細胞に野生型 PS1 を遺伝子導入すると A β 42-to-A β 40 変換活性ならびに ACE 活性が完全に回復した。PS1 欠損細胞に変異型 PS1 を導入すると、ACE の Angiotensin I to II 換活性は完全回復を示したが、A β 42-to-A β 40 換活性の回復は不完全であった。これらの結果は、PS 遺伝子変異による A β 42/A β 40 比の増加のメカニズムとして、A β 産生変化の他に、PS 遺伝子変異による A β 42-to-A β 40 換活性低下があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Tomohisa Nakamura, Kun Zou, Yasuyuki Shibuya, Makoto Michikawa	4. 巻 99
2. 論文標題 Oral dysfunctions and cognitive impairment/dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 518-528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24745	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 Mohammad Abdullah, Tomohisa Nakamura, Taslima Ferdous, Yuan Gao, Yuxin Chen, Kun Zou, Makoto Michikawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Cholesterol Regulates Exosome Release in Cultured Astrocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 722581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.722581	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 Sadequul Islam, Yang Sun, Yuan Gao, Tomohisa Nakamura, Arshad Ali Noorani, Tong Li, Philip C Wong, Noriyuki Kimura, Etsuro Matsubara, Kensaku Kasuga, Takeshi Ikeuchi, Taisuke Tomita, Kun Zou, Makoto Michikawa	4. 巻 42
2. 論文標題 Presenilin Is Essential for ApoE Secretion, a Novel Role of Presenilin Involved in Alzheimer's Disease Pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 1574-1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2039-21.2021	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 Kota Kikuchi, Yu Fujita, Xuefeng Shen, Junjun Liu, Tomoki Terakawa, Daiki Nishikata, Sho Niibori, Takayuki Ito, Kazuyuki Ashidate, Takuya Kikuchi, Yu Kikuchi, Tomoji Maeda, Kun Zou, Hiroto Komano	4. 巻 43
2. 論文標題 Interaction between Angiotensin Receptor and α -Adrenergic Receptor Regulates the Production of Amyloid β -Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 731-735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00007	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 Kun Zou, Mohammad Abdullah, Makoto Michikawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Current Biomarkers for Alzheimer's Disease: From CSF to Blood	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pers Med	6. 最初と最後の頁 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jpm10030085	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 Arshad Ali Noorani, Hitoshi Yamashita, Yuan Gao, Sadequl Islam, Yang Sun, Tomohisa Nakamura, Hiroyuki Enomoto, Kun Zou, Makoto Michikawa	4. 巻 295
2. 論文標題 High temperature promotes amyloid β -protein production and β -secretase complex formation via Hsp90	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 18010-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013845	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 Tomohisa Nakamura, Kun Zou, Yasuyuki Shibuya, Makoto Michikawa	4. 巻 99
2. 論文標題 Oral dysfunctions and cognitive impairment/dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 518-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24745	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 Yu Fujita, Tomoji Maeda, Chiharu Sato, Masaya Sato, Hatsune Hatakeyama, Yume Ota, Nozomi Iwabuchi, Komaki Tatesawa, Ayako Nomura, Kun Zou, Hiroto Komano	4. 巻 443
2. 論文標題 Engulfment of Toxic Amyloid β -protein in Neurons and Astrocytes Mediated by MEGF10	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.07.016	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 Liu Shuyu, Ando Fujiko, Fujita Yu, Liu Junjun, Maeda Tomoji, Shen Xuefeng, Kikuchi Kota, Matsumoto Aoi, Yokomori Mirai, Tanabe-Fujimura Chiaki, Shimokata Hiroshi, Michikawa Makoto, Komano Hiroto, Zou Kun	4. 巻 294
2. 論文標題 A clinical dose of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor and heterozygous ACE deletion exacerbate Alzheimer's disease pathology in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 9760 ~ 9770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006420	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 Yang Sun, Sadequul Islam, Yuan Gao, Tomohisa Nakamura, Kun Zou, Makoto Michikawa	4. 巻 164
2. 論文標題 Apolipoprotein E4 inhibits γ -secretase activity via binding to the γ -secretase complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 858-874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15750	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 Kun Zou, Sadequul Islam, Yang Sun, Yuan Gao, Tomohisa Nakamura, Hiroto Komano, Taisuke Tomita, Makoto Michikawa	4. 巻 14
2. 論文標題 Presenilin Deficiency Increases Susceptibility to Oxidative Damage in Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Aging Neurosci	6. 最初と最後の頁 902525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2022.902525	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 Yuan Gao, Yang Sun, Sadequul Islam, Tomohisa Nakamura, Taisuke Tomita, Kun Zou, Makoto Michikawa	4. 巻 15
2. 論文標題 Presenilin 1 deficiency impairs A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities of ACE	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Aging Neurosci	6. 最初と最後の頁 1098034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnagi.2023.1098034	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kun Zou, Sadequl Islam, Yang Sun, Yuan Gao, Tomohisa Nakamura, Arshad Ali Noorani, Tong Li, Philip C Wong, Noriyuki Kimura, Etsuro Matsubara, Kensaku Kasuga, Takeshi Ikeuchi, Taisuke Tomita, Makoto Michikawa
2. 発表標題 Presenilin is essential for ApoE secretion
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sadequl Islam, Yang Sun, Yuan Gao, Tomohisa Nakamura, Arshad Ali Noorani, Tong Li, Philip C Wong, Noriyuki Kimura, Etsuro Matsubara, Kensaku Kasuga, Takeshi Ikeuchi, Taisuke Tomita, Kun Zou, Makoto Michikawa
2. 発表標題 ApoE分泌におけるプレセニリンの制御作用
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 鄒驥, Noorani Arshad, 山下均, 高原, 孫陽, Islam Sadequl, 中村知寿, 榎本啓之, 道川誠
2. 発表標題 Molecular Mechanism of A β production regulated by Hsp90 at high temperature
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 鄒驥, Noorani Arshad, 山下均, 高原, 孫陽, Islam Sadequl, 中村知寿, 榎本啓之, 道川誠
2. 発表標題 Role of temperature in production of amyloid beta-protein
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鄒鶴
2. 発表標題 Heterozygous ACE deletion increases amyloid deposition in mice
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 鄒鶴
2. 発表標題 Inhibition of ACE impairs human intelligence and exacerbates Alzheimer's pathology in mice
3. 学会等名 Neuro 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鄒鶴
2. 発表標題 A clinical dose of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor and heterozygous ACE deletion exacerbate Alzheimer's disease pathology in mice
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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			
米国	Department of Neuroscience	School of Medicine	Johns Hopkins University	