

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591418

研究課題名（和文） アミロイドβ蛋白の軸索障害に及ぼすアンギオテンシンIIの増強作用

研究課題名（英文） Enhancement effects of angiotensin II on amyloid β-induced axonal impairment

研究代表者

比留間 弘美 (HIRUMA HIROMI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10238397

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病の原因物質アミロイドβ蛋白（Aβ）は、細胞骨格アクチンの重合を介して神経細胞の軸索を障害する。本研究では血管収縮ホルモンのアンギオテンシンII（AngII）によるAβ作用修飾を検討し、次の結果を得た。1）AngIIはAβと同様、軸索輸送を減少させ軸索を収縮させた。これらはAngII AT1受容体とアクチン重合により仲介された。2）AngIIは、Aβの軸索輸送抑制、軸索収縮作用を増強した。よって、AngIIはアクチン重合を介してAβによる軸索障害を増強することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Amyloid β protein (Aβ), a causal agent of Alzheimer's disease, damages axons of neurons through actin polymerization. The present study investigated the modifying effects of angiotensin II (AngII), a vasoconstrictive hormone, on Aβ action and obtained the following results. 1) Similar to Aβ, AngII decreased axonal transport and constricted axons. These effects are mediated by AngII AT1 receptors and actin polymerization. 2) AngII enhanced the Aβ-induced inhibition of axonal transport and constriction of axons. Therefore, AngII is suggested to enhance Aβ-induced impairment of axons via actin polymerization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：アンギオテンシンII、アミロイドβ蛋白、軸索障害、軸索輸送

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) アミロイドβ蛋白の軸索輸送障害

アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβ蛋白（Aβ）は、脳組織に蓄積し神経に損傷を与える。神経細胞内の物質輸送を担う軸索輸送は、アルツハイマー病の臨床症状が明らかになる以前から障害され、やがて神経変性、神経細胞死をきたす。本研究では、

Aβが細胞骨格アクチンを凝集させ、その結果、軸索輸送を障害させることを明らかにした。

## (2) アンギオテンシンIIの神経障害作用

強力な血管収縮作用をもつアンギオテンシンII（AngII）の作用の過剰は、血管、心臓、腎臓のみならず、脳にも臓器障害を引き起こすことが明らかになってきた。ラット海馬に投与したAngIIは学習記憶障害を引き起

こし、逆に AngII 受容体阻害薬は学習記憶能力を高める。殊に最近、AngII とアルツハイマー病との関連に関心が高まってきた。大類らは、脳移行性アンジオテンシン変換酵素阻害薬がアルツハイマー病の発症を有意に抑制することを報告している。最近の疫学調査は、AngII の受容体阻害薬がアルツハイマー病の発症と進行を抑制することを提示した。

## 2. 研究の目的

AngII が  $\text{A}\beta$  の軸索障害作用を増強する可能性について検討する。併せて、その機序についても探究する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

新生仔ラットの海馬を蛋白分解酵素（パパイイン）で処理（ $37^\circ\text{C}$ 、15分）し、細胞を分離した。細胞をカバーガラス上に播き、培養液 neurobasal medium 中で36時間培養した（5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ 条件下）。

### (2) 軸索輸送の観察

海馬神経細胞が培養されているカバーガラスをチャンバーに張り付け、ビデオ顕微鏡のステージ上に固定した。薬物を投与し、オルガネラ軸索輸送の経時的变化を観察した。ビデオ画像はテープレコーダーで記録した。

### (3) 軸索輸送の解析

軸索輸送の解析は、ビデオテープを再生し、軸索輸送粒子数の増減を評価することにより行った。

### (4) 軸索径の計測

薬物投与前後の軸索径を計測した。計測はビデオ増感顕微鏡のモニタ画面上で実施し、曝露後の計測値を曝露前の値に対する百分率で比較した。

### (5) 免疫細胞化学染色

海馬培養細胞における AT1 受容体および AngII の細胞内の局在を用免疫細胞化学的に検出した。神経細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗 AT1 受容体抗体あるいは抗 AngII 抗体を細胞に投与したのち、蛍光二次抗体で発色させた。これらの細胞を共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いてアルゴンレーザー（波長：488 nm）で励起させ、緑色蛍光発色を観察した。

### (6) アクチンの蛍光染色

培養ラット海馬神経細胞を4%ホルムアルデヒドで固定・洗浄後、アクチンを標識する蛍光色素 Rhodamine-phalloidin で細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡でアクチンの形状を観察した。

## 4. 研究成果

### 結果

#### (1) アンジオテンシン II の作用

##### ① 軸索輸送に対する作用

培養海馬神経細胞に AngII を  $0.1\text{--}100\ \mu\text{M}$  の濃度で投与して軸索輸送を評価したところ、 $1\ \mu\text{M}$  以上の濃度で軸索輸送は抑制された（図1）。

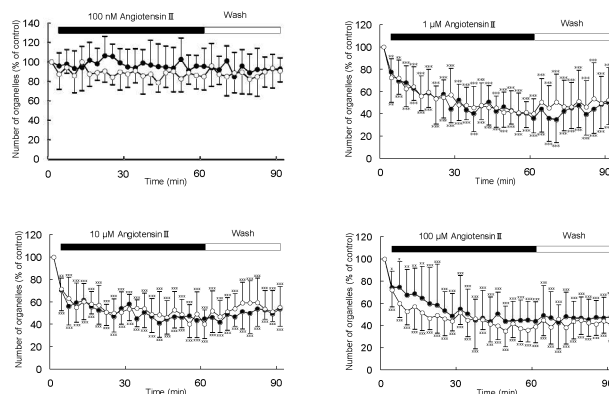


図1

AT1 受容体アゴニストの L162, 313 は  $0.1\ \mu\text{M}$  以上の濃度で軸索輸送を抑制した（図2）。

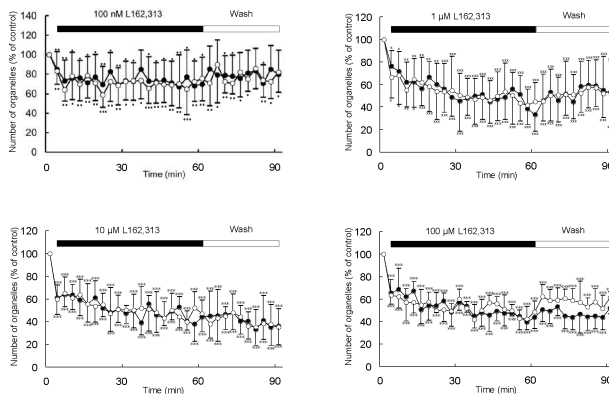


図2

一方、AT2 受容体のアゴニストの CGP42112 は、 $100\ \mu\text{M}$  の高濃度でも軸索輸送を変化させなかった（図3）。

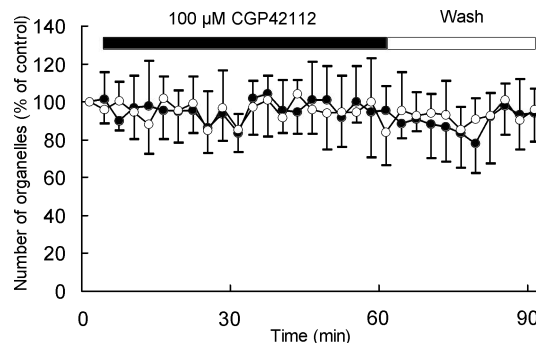


図3

AT1 受容体のアンタゴニストである losartan ( $100\ \mu\text{M}$ ) は AngII ( $1\ \mu\text{M}$ ) の軸索輸送抑制作用を解除したが（図4）、AT2 受容体のアンタゴニストである PD123, 319 ( $100\ \mu\text{M}$ ) は効果がなかった（図5）。

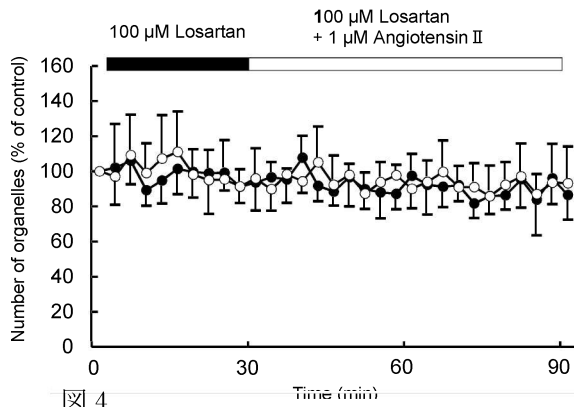


図 4

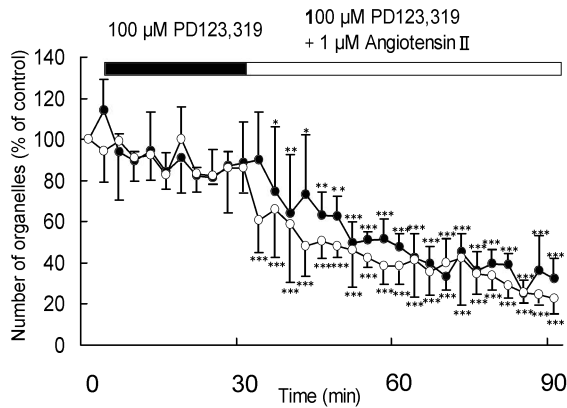


図 5

アクチン脱重合薬である latrunculin B (5 μM) は AngII (1 μM) の軸索輸送抑制効果を解除した(図 6)。

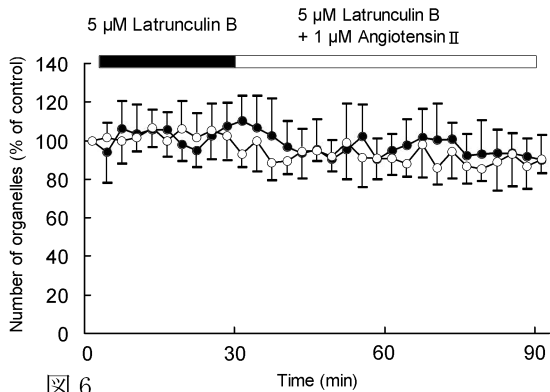


図 6

### ②軸索径に対する作用

AngII (1 μM) を海馬神経細胞に曝露すると、軸索径は曝露前の  $85.9 \pm 3.0\%$  (mean  $\pm$  S.E.  $n=16$ ) となり、コントロール群 ( $99.3 \pm 0.7\%$ ,  $n=6$ ) に比べ軸索径の有意な縮小が観察された。AngII (1 μM) と latrunculin B (1 μM) の混合では軸索径の平均は  $99.2 \pm 0.8\%$  ( $n=6$ ) となり、軸索径の変化は観察されなかった(図 7)。

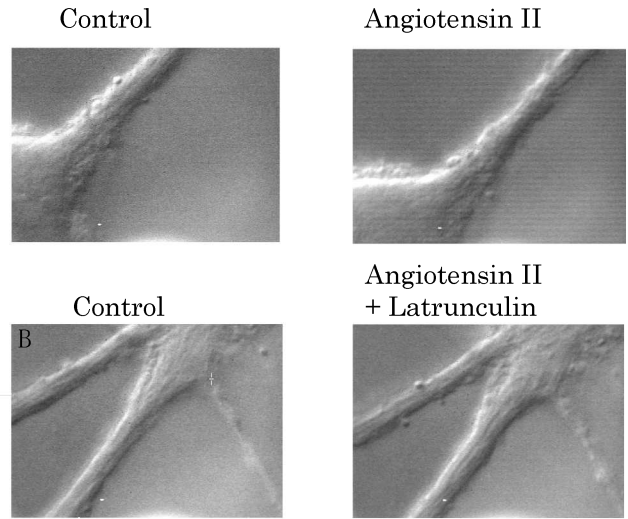


図 7

### ③免疫細胞化学染色

ラット海馬培養細胞では、AT1 受容体は顆粒状に存在し、全細胞の約 30 % が AT1 受容体発現陽性であった(図 8)。

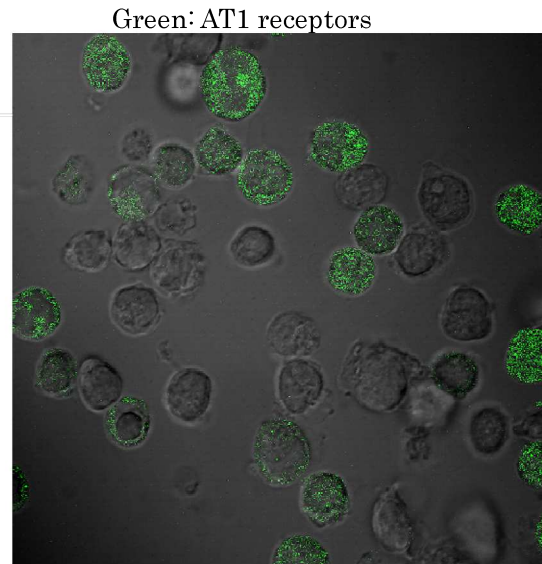


図 8

AngII に対する免疫抗体反応は、すべての海馬神経細胞の細胞体及び神経線維に見られ、顆粒状に発現していた(図 9)。

### ④アクチンへの作用

AngII に曝露された海馬神経細胞ではアクチン凝集がみられた(図 12)。

Green: Angiotensin II

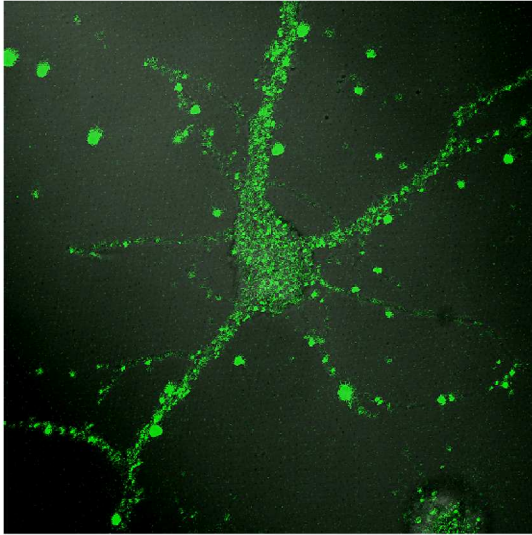


図 9 10  $\mu\text{m}$

(2) アミロイド蛋白の軸索障害に対するアンジオテンシン II の増強作用

①軸索輸送に対する作用

培養海馬神経細胞に  $\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{M}$ ) を投与すると軸索輸送は不可逆に抑制された (図 1)。

$\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{M}$ ) に AngII (1  $\mu\text{M}$ ) を添加した薬物を投与したところ、 $\text{A}\beta_{25-35}$  単独の場合より、軸索輸送はより一層減少した (図 10)。

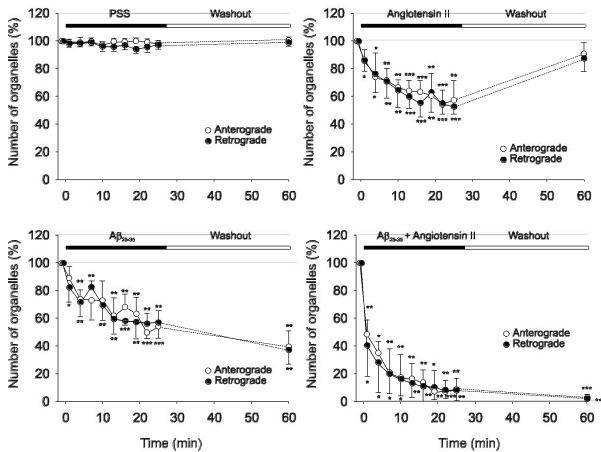


図 10

②軸索径に対する作用

$\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{M}$ ) を海馬神経細胞に曝露すると、軸索径は曝露前の  $82.5 \pm 6.3\%$  (mean  $\pm$  S.E. n=4) となり、コントロール群 ( $99.3 \pm 0.7\%$ ) に比べ軸索径の有意な縮小が観察された。AngII (1  $\mu\text{M}$ ) と  $\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{M}$ ) の混合では軸索径の平均は  $74.7 \pm 5.1\%$  (n=5) となり、 $\text{A}\beta_{25-35}$  単独に比べ軸索径はさらに小さくなった (図 11)。

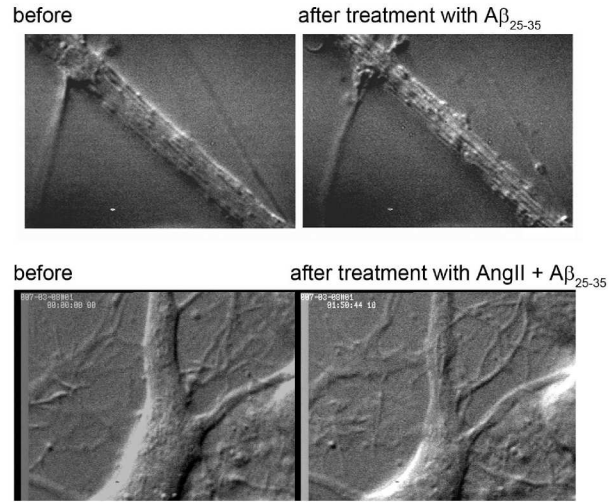


図 11 2  $\mu\text{m}$

③アクチンへの作用

$\text{A}\beta_{25-35}$  (20  $\mu\text{M}$ ) に暴露された海馬神経細胞ではアクチン凝集と変性がみられた。AngII (1  $\mu\text{M}$ ) が加わるとさらにこれらの程度は高度となった (図 12)。

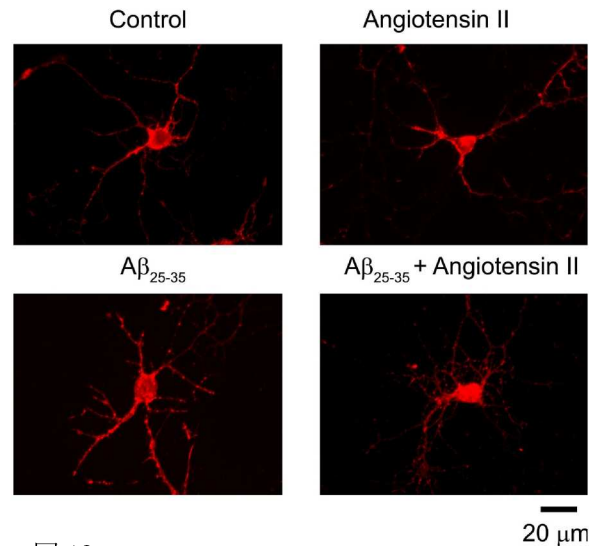


図 12 20  $\mu\text{m}$

考察

以上の結果から、次のことが示唆された。

- 1) AngII は  $\text{A}\beta$  と同様に、アクチン重合・凝集を介して軸索輸送の低下と減少させ、軸索を収縮させる。またこの作用は AT1 受容体に仲介される。
- 2) AngII は海馬神経細胞からも生成、分泌されている可能性がある。
- 3) AngII は  $\text{A}\beta$  の軸索輸送抑制、軸索収縮作用を増強する。

展望

本研究は、AngII が  $\text{A}\beta$  の神経毒性作用を増強することを、国内外ではじめて示したもの

である。本研究結果から、AngII がアルツハイマー病の発症、進行に深く関与している可能性が示唆される。本研究は、AngII の受容体阻害薬がアルツハイマー病の予防や進行制御に有用である可能性を示す基礎的研究である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①Hiruma H, Kawakami T. Characteristics of weak base-induced vacuoles formed around individual acidic organelle. *Folia Histochem Cytobiol* (2011). (in press) 査読有

②Isonaka R, Hiruma H, Kawakami T. Inhibition of Axonal Transport Caused by tert-Butyl Hydroperoxide in Cultured Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Mol Neurosci* (2010). (in press) 査読有

③Katakura T, Hiruma H, Isonaka R, Kawakami T. Rapid inhibitory effect of progesterone on axonal transport in isolated and cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *The Kitasato Medical Journal* (2010) 40:12-19. 査読有

④Hiruma H, Kawakami T. Effects of 4-aminopyridine on organelle movement in cultured mouse dorsal root ganglion neurites. *J Mol Neurosci* (2010) 40(3):295-302. 査読有

⑤Takenami T, Yagishita S, Nara Y, Tsai YH, Hiruma H, Kawakami T, Hoka S. Spinal procaine is less neurotoxic than mepivacaine, prilocaine and bupivacaine in rats. *Reg Anesth Pain Med* (2009) 34(3):189-195. 査読有

⑥Hiruma H, Shimizu K, Takenami T, Sugie H, Kawakami T. Effects of clonidine on lidocaine-induced inhibition of axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurones. *Br J Anaesth* (2008) 101(5):659-665. 査読有

⑦Shimizu K, Hiruma H, Kawakami T, Hoka S. Clonidine prevents neurotoxic effects of lidocaine in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *The Kitasato Medical Journal* (2008) 38:37-46. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Hiruma H, Katakura T, Kawakami T. Amyloid- $\beta$  protein-actin complex is more neurotoxic than amyloid- $\beta$  protein alone. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009). 2009年8月1日. 京都.

②Hiruma H, Katakura T, Kawakami T. Effects of amyloid- $\beta$  protein-actin complex on axonal transport in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2008. 2008年11月19日. ワシントン (米国) .

③Hiruma H, Katakura T, Kawakami T. Angiotensin II enhances amyloid  $\beta$ -protein-induced impairment of axonal transport. *Neuroscience* 2007. 2007年11月6日. サンジエゴ (米国) .

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

比留間 弘美 (HIRUMA HIROMI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10238397