

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21590353

研究課題名（和文）

アルツハイマー病におけるトリプトファン代謝異常の分子機構

研究課題名（英文）

Molecular mechanisms of the aberrant metabolism of tryptophan in Alzheimer's disease

研究代表者

滝川 修 (TAKIKAWA OSAMU)

独立行政法人国立長寿医療研究センター ラジオアイソトープ管理室 室長

研究者番号：70163342

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）は加齢に伴い急増する神経変性疾患であり、その予防法・治療法の開発は喫緊の社会的課題となっている。本研究ではAD脳で生じている神経毒キノリン酸産生を伴うトリプトファン代謝異常（インドールアミン酸素添加酵素の誘導）、特に老人斑に集積した活性化ミクログリアによる本誘導の分子機構の解明、特に、活性化ミクログリア上に存在が想定されるアミロイドβペプチド受容体の性状解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) is an increasing neurodegenerative disease with growing elderly population. Prevention and treatment of AD is an urgent social issue. In this study, molecular mechanisms of the aberrant metabolism of tryptophan via induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in AD, which leads to a generation of neurotoxin quinolinic acid, was studied. In particular, the putative receptor for amyloid β peptide expressed in activated macrophages infiltrating into amyloid plaques was tried to be characterized.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：アルツハイマー病・トリプトファン・IFN-γ・ミクログリア・アミロイドβペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）は加齢に伴い増加する神経変性疾患であり、高齢化が急速に進む本邦において現在約170万人の患者数が25年後には約340万人に倍増すると試算されており、その予防法・治療法の開発は喫緊

の社会的課題となっている。

ADはアミロイドβペプチドが凝集した老人斑の蓄積に加え、微小管関連蛋白の一つであるタウが異常重合した神経原線維変化の形成、さらに領域特性のある神経細胞の脱落を特徴とする。様々の事実から、老人斑の蓄

積が神経原線維変化の蓄積を促進していると考えられている。一方、非ステロイド性抗炎症剤がADの発症・進行を遅延することから、中枢性の「炎症」が神経変性・脱落に関与していることが示唆されており、老人斑に集積したグリア細胞が産生する炎症性サイトカインや活性酸素等による神経変性作用が「炎症」の本体ではないかと考えられている。しかし、この「炎症」の全体像は十分に解明されておらず、AD研究の重要課題の一つとなっている。申請者らは、種々の炎症性疾患で強く誘導されるトリプトファン代謝酵素（インドールアミン酸素添加酵素：IDO）とその代謝産物で興奮性神経毒性を有するキノリン酸に注目し、ヒトAD剖検脳を精査した結果、老人斑に集積した活性化ミクログリアで異常なIDO発現とキノリン蓄積を発見した。更に、脳でアミロイドβペプチドを過剰発現し老人斑を蓄積するADモデルマウス（Tg2576）で検討した結果、老人斑に集積したミクログリアにはIDO発現及びキノリン酸蓄積は認められないが、起炎剤LPSを末梢投与し脳内の「炎症」を増強した時に初めてIDO誘導及びキノリン酸蓄積の生じることを見出した。以上の結果は、老人斑に集積したミクログリアは、老人斑の主要構成成分であるアミロイドβペプチドによる刺激に加え、脳内の「炎症」が更に加わった時に初めて強く活性化されトリプトファン代謝異常を惹起することを示している。この現象をミクログリアのモデルとして汎用されるマクロファージ系細胞株THP-1細胞で検討した結果、予想通りアミロイドβペプチドと炎症性サイトカインの1つであるIFN-γとの相乗的な刺激でIDOが強誘導されることを発見した。この相乗作用は神経毒性の本体と考えられているアミロイドβペプチド1-42（Aβ1-42）に特異的であり、弱毒性を示すAβ1-40あるいはAβ25-35は無効であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミクログリアにおけるAβ1-42と炎症性サイトカインIFN-γとによる相乗的IDO誘導の分子機構を解明するためにAβ1-42受容体の同定とその分子的性質を解明する。

## 3. 研究の方法

申請者らはミクログリアと同じマクロファージ系細胞であるTHP-1細胞がAβ1-42とIFN-γとの相乗作用によりIDOが強誘導されることを明らかにしている。従って、

THP-1細胞膜上にAβ1-42を特異的に認識する受容体が存在すると考えられる。この受容体を以下の手順で同定する。

- 1) Aβ1-42を大量培養したTHP-1細胞に添加してAβ1-42-受容体複合体を形成させる。
- 2) SH剤で切断可能な架橋剤を添加して複合体を解離しないように固定化する。
- 3) Aβ1-42-受容体複合体を可溶化し、抗Aβ1-42抗体（Aβ1-42のN端から1-16アミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体6E10あるいはAβ1-42の17-24アミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体4G8）で免疫沈降する。
- 4) SH剤処理でAβ1-42から切断した受容体をSDS-PAGEで分離精製した後、相当する蛋白バンドをトリプシン処理して断片化し液体クロマトグラフィー質量分析器（LC-MS）で同定する。
- 5) アミノ酸部分配列に基づいたDNA配列をプローブ、あるいはプライマーを合成し、THP-1細胞のcDNAライブラリーから受容体の全長cDNAを単離し、Aβ1-42と受容体の相互作用及び受容体の機能解析に使用する。

## 4. 研究成果

ミクログリアと同じマクロファージ系のTHP-1細胞がAβ1-42とIFN-γとの相乗作用によりIDOが強誘導される。従って、THP-1細胞膜上にAβ1-42を特異的に認識する受容体が存在すると考えられる。当初Aβ1-42を使用した受容体の存在を生化学的に確認できなかった。最近、ヒトAD脳における神経毒性の本体は、Aβ1-42ではなく修飾されたプログルタミルAβ3-42（pAβ3-42）であることが報告されたため、平成23年度は、pAβ3-42とIFN-γによるIDO誘導の相乗作用をTHP-1細胞で確認し、しかもその相乗作用はAβ1-42よりかなり低濃度で生じることを明らかにした。これを受けて、THP-1細胞膜上に存在すると想定されるpAβ3-42受容体を、1) リガンド-受容体複合体を免疫沈降、2) SDS-PAGE分離、3) LS-MSによる同定で試みたが、免疫沈降で特異的なバンドを確認できなかった。以上の試みが不成功に終わった原因として、THP-1細胞膜上のAβと反応する受容体のレベルが想定より低く、通常の免疫沈降法でその性状を生化学的に解明することが困難であったためと考えられた。今後はパンニング法による受容体の発現クローニング法を試みる。この方法では、まず、THP-1細胞mRNAから作

製した cDNA ライブラリーを pCEV4 等の真核細胞用発現ベクターを用いて構築する。次にこのライブラリーを大腸菌で増幅し、COS7 細胞に遺伝子導入して一過性に蛋白を発現させ、pAβ3-42 をコートした培養皿で pAβ3-42 に親和性の高い受容体を細胞膜上に発現している COS7 細胞を濃縮する。この COS7 細胞からベクターを回収し、大腸菌で増幅した後、再び COS7 細胞に導入して、pAβ3-42 に親和性のある蛋白をコードしている cDNA を更に濃縮する。この一連のパンニング操作を数回繰り返すことで、pAβ3-42 受容体 cDNA のクローニングを行う。これにより当該受容体の分子的性状を解明する計画である。

#### 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 14 件)

1. Matsuno K, Yamazaki H, Isaka Y, Takai K, Unno Y, Ogo N, Ishikawa Y, Fujii S, Takikawa O, Asai A.  
Novel candesartan derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors.  
Med. Chem. Comm. , 3:475-479, 2012. 査読有 DOI:10.1039/c2md00278g
2. Nakano S, Takai K, Isaka Y, Takahashi S, Unno Y, Ogo N, Matsuno K, Takikawa O, Asai A.  
Identification of novel kynurenine production-inhibiting benzenesulfonamide derivatives in cancer cells.  
Biochemical and Biophysical Research Communications, 419: 556-561, 2012. 査読有  
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.02.059
3. Wang D, Saga Y, Mizukami H, Sato N, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M.  
Indoleamine-2,3-dioxygenase, an immunosuppressive enzyme that inhibits natural killer cell function, as a useful target for ovarian cancer therapy.  
Int J Oncol, 40:929-934, 2012. 査読有 DOI:10.3892/ijo.2011.1295
4. Blaschitz A, Gauster M, Fuchs D, Lang I, Maschke P, Ulrich D, Karpf E, Takikawa O, Schimek MG, Dohr G,

Sedlmayr P.

- Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface.  
PLoS ONE, 6: e21774, 2011. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0021774
5. Croitoru-Lamoury J, Lamoury FM, Caristo M, Suzuki K, Walker D, Takikawa O, Taylor R, Brew BJ.  
Interferon- $\gamma$  regulates the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells via activation of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO).  
PLoS One, 16;6(2):e14698, 2011. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0014698
  6. Nonaka H, Saga Y, Fujiwara H, Akimoto H, Yamada A, Kagawa S, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Suzuki M.  
Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through inhibition of natural killer cell function and angiogenesis promotion.  
Int J Oncol, 38:113-120, 2011. 査読有 DOI:10.3892/ijo\_00000830
  7. Matsuno K, Takai K, Isaka Y, Unno Y, Sato M, Takikawa O, Asai A.  
S-benzylisothioureia derivatives as small-molecule inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase.  
Bioorg Med Chem Lett, 20:5126-5129, 2010. 査読有  
DOI:org/10.1016/j.bmc.2010.07.025
  8. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kondo S, Umezu T, Nawa A, Takikawa O, Kikkawa F.  
Indoleamine 2,3-dioxygenase expression predicts impaired survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy.  
Gynecol Oncol, 117:423-428, 2010. 査読有  
DOI:org/10.1016/j.ygyno.2010.02.028
  9. Onodera T, Jang MH, Guo Z, Yamasaki M, Hirata T, Bai Z, Tsuji NM, Nagakubo D, Yoshie O, Sakaguchi S, Takikawa O, Miyasaka M.  
Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions.

- J Immunol, 183:5608-5614, 2009. 査読有 DOI:10.4049/jimmunol.0804116
10. Ogasawara N, Oguro T, Sakabe T, Matsushima M, Takikawa O, Isobe K, Nagase F.  
Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PI3K, PKC, and NF-kappaB and the generation of reactive oxygen species.  
J Cell Biochem, 108:716-725, 2009. 査読有 DOI:10.1002/jcb.22308
  11. Inaba T, Ino K, Kajiyama H, Yamamoto E, Shibata K, Nawa A, Nagasaka T, Akimoto H, Takikawa O, Kikkawa F.  
Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma.  
Gynecol Oncol, 115:185-192, 2009. 査読有  
DOI:org/10.1016/j.ygyno.2009.07.015
  12. Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, Häcker G, Bieber T, von Bubnoff D.  
Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells.  
J Immunol, 183:145-154, 2009. 査読有 DOI:10.4049/jimmunol.0803277
  13. Yamada A, Akimoto H, Kagawa S, Guillemin GJ, Takikawa O.  
Proinflammatory cytokine interferon-gamma increases induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in monocytic cells primed with amyloid beta peptide 1-42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.  
J Neurochem, 110:791-800, 2009. 査読有  
DOI:10.1111/j.1471-4159.2009.06175.x
  14. Krausse-Opatz B, Wittkop U, Gutzki FM, Schmidt C, Jürgens-Saathoff B, Meier S, Beckmann B, Takikawa O, Morgan MA, Tsikas D, Stichtenoth DO, Wagner AD, Zeidler H, Köhler L.  
Free iron ions decrease indoleamine 2,3-dioxygenase expression and reduce IFNgamma-induced inhibition of Chlamydia trachomatis infection.  
Microb Pathog, 46:289-297, 2009. 査読有  
DOI:org/10.1016/j.micpath.2009.03.001
- [学会発表] (計 24 件)
1. 田島陽子、前川京子、村山真由子、石川将己、徳江繭子、最上(西巻)知子、中西広樹、池田和貴、有田誠、田口良、キョウ建生、奥野海良人、新飯田俊平、滝川修、斉藤嘉朗  
アルツハイマー病モデル APP/Tau マウスの脳組織における脂質メタボローム解析  
日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
  2. 石川将己、前川京子、田島陽子、村山真由子、徳江繭子、最上(西巻)知子、中西広樹、池田和貴、有田誠、田口良、キョウ建生、奥野海良人、新飯田俊平、滝川修、斉藤嘉朗  
アルツハイマー病モデル APP/Tau マウスにおける血漿の脂質メタボローム解析  
日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
  3. 奥野海良人、張桂琴、吉見立也、三河隆太、高柳亜紀子、滝川修  
反応性アストロサイトによるアミロイドβペプチド産生機構  
第 33 回日本トリプトファン研究会、2011 年 12 月 3-4 日、船橋
  4. 張桂琴、奥野海良人、吉見立也、三河隆太、高柳亜紀子、滝川修  
内因性神経毒キノリン酸で誘導される反応性アストロサイトによるアミロイドβペプチド産生  
第 33 回日本トリプトファン研究会、2011 年 12 月 3-4 日、船橋
  5. Adachi K, Kunimoto S, Takeda K, Ohtani T, Watanabe A, Takikawa O, Maruyama W, Wakita H.  
Development of prophylaxis and therapy for vascular dementia by anti-E-selectin antibody using the mouse model.  
The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011. November, 2011, Toyohashi.
  6. 滝川修、新飯田俊平、曾我朋義  
CE/MS メタボロミクスによるアルツハイマー病の尿、血液及び脳バイオマーカーの検出

- 第6回メタボロームシンポジウム、2011年10月13日、大阪
7. 吉見立也、張桂琴、奥野海良人、横井寛、三河隆太、滝川修  
反応性アストロサイトによるアミロイドβペプチド産生  
第84回日本生化学大会、2011年9月22日、京都
  8. 滝川修、奥野海良人、張桂琴、横井寛、吉見立也、三河隆太  
内在性神経毒キノリン酸による海馬アミロイドβペプチドの増加機構：神経細胞ではなく反応アストロサイトに因る  
第84回日本生化学大会、2011年9月23日、京都
  9. Okuno A, Zhang G, Yokoi H, Takikawa O.  
Astrocytes but not neurons are responsible for the hippocampal increase of amyloid β peptide induced by neurotoxin quinolinic acid.  
AAIC 2011. July, 2011, Paris, France.
  10. Takikawa O, Niida S, Soga T.  
Detection of urine, blood, and brain biomarkers for Alzheimer's disease by capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE-MS)-based metabolomic analysis.  
Seventh International Conference of the Metabolomics Society. June, 2011, Cairns, Australia.
  11. 滝川修、奥野海良人、張桂琴、横井寛、吉見立也  
反応性アストロサイトによるAβ産生—アルツハイマー病のアミロイド代謝異常に関する新発見  
日本基礎老化学会第34回大会、2011年6月15-17日、東京
  12. 奥野海良人、張桂琴、横井寛、吉見立也、滝川修  
キノリン酸によるアミロイドβペプチドの増加機構—神経細胞ではなく反応性アストロサイトに因る  
日本基礎老化学会第34回大会、2011年6月15-17日、東京
  13. 張桂琴、奥野海良人、横井寛、吉見立也、滝川修  
反応性アストロサイトによるアミロイドβペプチド産生  
日本基礎老化学会第34回大会、2011年6月16日、東京
  14. Takikawa O, Kagawa S, Okuno A, Yokoi H, Zhang Q.  
Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathology of Alzheimer's disease by killing neurons and increasing the amyloid beta peptide levels in the hippocampus.  
AD/PD2011 (アルツハイマー病・パーキンソン病2011)、2011年3月9-11日、バルセロナ (スペイン)
  15. 滝川修  
アルツハイマー病で見られるトリプトファン代謝異常の病態生理学的意義：神経毒キノリン酸のダークパワー  
BMB2010、2010年12月7日、神戸
  16. Takai K, Isaka Y, Unno Y, Matsuno K, Sato M, Takikawa O, Asai A.  
Assay development and screening for new chemical entities as IDO Inhibitors.  
BMB2010、2010年12月7日、神戸
  17. 奥野海良人、香川正太、横井寛、張桂琴、滝川修  
内在性神経毒キノリン酸によるアミロイドβペプチド増加機構とその病態生理学的意義  
第32回日本トリプトファン研究会学術集会、2010年12月5日、彦根
  18. 横井寛、奥野海良人、張桂琴、滝川修  
LPSの抹消投与による脳内炎症モデルの作製：アルツハイマー病の理解を目指して  
第32回日本トリプトファン研究会学術集会、2010年12月5日、彦根
  19. 松野研司、高井一成、井坂吉伸、海野雄加、佐藤雅之、滝川修、浅井章良  
IDO阻害活性を有する  
S-benzylisothiourea 誘導体の構造活性相関  
第29回メディシナルケミストリーシンポジウム、2010年11月17日、京都
  20. 山崎寛史、松野研司、高井一成、井坂吉伸、海野雄加、佐藤雅之、浅井章良、滝川修  
IDO阻害活性を有する  
S-benzylisothiourea 誘導体の構造活性相関  
第25回農薬デザイン研究会、2010年11月5日、浜松
  21. Takikawa O, Kagawa S, Okuno A, Yokoi H, Zhang Q.  
Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathology of Alzheimer's disease by increasing the amyloid beta peptide levels.  
ICAD2010 (国際アルツハイマー病学会

2010)、2010年7月5日、ホノルル(米国)

22. Takikawa O

Endogenous neurotoxin quinolinic acid may play a primary role in the pathology of Alzheimer's disease by increasing the amyloid beta peptide levels.

ICNCC 2010 (第1回国際神経組織培養研究会)、2010年6月25日、ソウル(韓国)

23. 滝川修、香川正太、張桂琴、横井寛

アルツハイマー病とトリプトファン代謝異常：神経毒キノリン酸による神経細胞死とアミロイドβペプチド増加

日本基礎老化学会第33回大会、2010年6月18日、名古屋

24. Kagawa S, Yamada A, Akimoto H, Yokoi H, Guillemin GJ, Takikawa O.

Neurotoxin quinolinic acid produced in overactivated microglia may contribute to the progression of Alzheimer's disease.

第12回国際トリプトファン研究会、2009年7月10日、フローレンス(イタリア)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

1. 名称：アルツハイマー病の診断マーカー、アルツハイマー病の予防及び治療薬のスクリーニング方法並びにアルツハイマー病の診断方法

発明者：滝川修、曾我朋義

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス財団

種類：特願

番号：2010-113496

出願年月日：2010年5月17日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/lrs/index-lrs-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 修 (TAKIKAWA OSAMU)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・ラジオアイソトープ管理室・室長

研究者番号：70163342

(2) 研究分担者

香川 正太 (KAGAWA SYOTA)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・ラジオアイソトープ管理室・研究員

研究者番号：30463201