

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700351

研究課題名 (和文) アルツハイマー病における M16 メタロプロテアーゼの役割

研究課題名 (英文) The role of M16 family metalloprotease in Alzheimer's disease

研究代表者

平岡 義範 (HIRAOKA YOSHINORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60397552

研究成果の概要(和文):我々はこれまでに、*in vitro* で M16 メタロプロテアーゼ nardilysin (NRDc) が α セクレターゼ (ADAM9、ADAM10、TACE/ADAM17) を活性化し、アミロイド β ペプチド ($A\beta$) の産生を抑制することを明らかにした。今回、脳での NRDc 発現量が約 3 倍に増加している NRDc トランスジェニックマウス (NRDc-Tg) と約半分に減少している NRDc ヘテロ欠損マウス (NRDc^{+/-}) の作製に成功し、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) モデルマウス (APP-Tg) との交配により、*in vivo* での NRDc 発現量と AD 病態との関連を検討した。APP/NRDc-Tg は APP-Tg と比べてアミロイドプラークの減少が認められたことから、NRDc が *in vivo* でも α セクレターゼ活性化因子として機能していることが明らかになった。APP/NRDc^{+/-}に関しては現在解析中である。

研究成果の概要 (英文): Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by the formation of amyloid β peptide ($A\beta$) and their deposition in the brain as senile plaques. In the nonamyloidogenic pathway, the amyloid precursor protein (APP) is cleaved by the α -secretase within the $A\beta$ sequence. Proteinases of the ADAM family are the main candidates, but the underlying mechanism is not cleared. We have demonstrated that nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDc), a metalloendopeptidase of M16 family, enhances α -secretase (ADAM9, ADAM10, TACE/ADAM17) activity and reduces $A\beta$ generation *in vitro*. We have generated NRDc transgenic (NRDc-Tg) mice that overexpress NRDc in neuron and NRDc hetero-knockout mice (NRDc^{+/-}). A neuronal overexpression of NRDc in model mice of AD (APP-Tg) led to a decrease in the number and size of amyloid plaques. Analysis of mice which reduces NRDc expression in neuron is still going on. Our findings demonstrate that upregulation of NRDc represents an efficacious therapeutic approach to combating AD *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：アルツハイマー病、M16 メタロプロテアーゼ、 α セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

AD は脳内に $A\beta$ が蓄積することに起因すると考えられている。 $A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) が、 β セクレターゼと γ セ

クレターゼによって切断されることにより産生される。両セクレターゼの他に、A β ドメイン中で APP を切断して、A β の産生抑制に働く α セクレターゼが存在し、 α セクレターゼを活性化することができれば、AD の治療法につながる可能性がある。これまで、 α セクレターゼの候補分子として ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) プロテアーゼが報告されているが、その活性化機構はほとんど分かっていなかった。最近、我々は NRDC が TNF- α converting enzyme (TACE/ADAM17) の活性化を介し、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (Nishi, Hiraoka 他, JBC, 2006) や TNF- α (Hiraoka et al., BBRC, 2008) の細胞外ドメインのシェディング (切断) を顕著に増強することを明らかにした。また、NRDC は ADAM プロテアーゼ (ADAM9、ADAM10、TACE/ADAM17) の α セクレターゼを活性化し、A β の産生を抑制することを明らかにした (Hiraoka et al., J. Neurochem, 2007)。NRDC は大脳皮質の神経細胞に強く発現しており (Hiraoka et al., J. Neurochem, 2007)、*in vivo* においても α セクレターゼの活性化に関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

現在、我々は脳でのタンパク質レベルの NRDC 発現量が約 3 倍に増加している NRDC トランスジェニックマウス (NRDC-Tg) と NRDC 発現量が約半分に減少している NRDC ヘテロ欠損マウス (NRDC $^{+/-}$) を得ており、AD モデルマウス (APP-Tg) との交配により、目的 1) *in vivo* での NRDC 発現量と AD 病態との関連の検討を目的とした。また、我々は NRDC が TACE と複合体を形成することで、TACE (α セクレターゼ) を活性化することを確認している (Nishi, Hiraoka et al., JBC, 2006)、同機構に立脚した目的 2) 新規な AD 予防法・治療法への応用を将来的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) NRDC 発現量増加による AD 病態への影響の検討; APP-Tg と NRDC-Tg とを交配し、生まれてきた子供である APP/NRDC-Tg とその littermate (APP-Tg) の脳を採取し、A β に対する抗体を用いた免疫染色やと銀染色による組織学的解析により、アミロイドプラーク形成レベルを検討した。同時に、脳からタンパク質を抽出し、A β 量をサンドイッチ ELISA 法で、APP (およびその切断後の細胞質ドメイン) をウエスタンブロット法で検出し、組織学的所見との比較検討を行った。
(2) NRDC 発現量減少による AD 病態への影響の検討; APP-Tg と NRDC $^{+/-}$ とを交配し、生まれてきた子供である APP/NRDC $^{+/-}$ とその littermate (APP-Tg) の脳を採取し、(1)

と同様の解析を行った。

(3) NRDC と TACE の結合ドメインの同定; NRDC および TACE、それぞれのデリベーションミュータントを作成し、結合ドメインの同定を行う。

4. 研究成果

(1) NRDC 発現量増加による AD 病態への影響の検討; A β に対する抗体を用いた免疫染色の結果、APP/NRDC-Tg は APP-Tg と比べて、顕著なアミロイドプラークの減少が認められた。使用したサンドイッチ ELISA 法では A β が検出できなかったため、他のサンドイッチ ELISA 法を検討中である。

(2) NRDC 発現量減少による AD 病態への影響の検討; APP/NRDC $^{+/-}$ がなかなか生まれてこないため、随時、マウスが 1 年齢になり次第、継続して解析を行う。

(3) NRDC と TACE の結合ドメインの同定; マウス NRDC を N 末端と C 末端に分けたミュータントの作製には成功している。さらに、N 末端側を 3 分割 (N 末端、酸性アミノ酸、M16 酵素ドメイン) したミュータントは現在作製中である。

以上の結果から、脳内の NRDC の発現量が増加するとアミロイドプラークの減少が認められたことから、NRDC が *in vivo* で AD 病の病態制御に関与していることが明らかになった。

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 1 件)

- ① Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, and Nishi E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. Nat. Neurosci. 査読有. 2009; 12: 1506-1513

[学会発表] (計 15 件)

- ① Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. The role of a metalloendopeptidase nardilysin in adaptive thermogenesis. ポスター発表 BMB2010 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)
- ② Matsuoka T, Hiraoka Y, Ohno M, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. NRDC controls lipid and glucose metabolism through the modulation of PPARalpha activity. ポスター発表、BMB2010 (2010 年 12 月 7-10 日、神戸)

- ③ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Kimura T, Kita T, Nishi E. シェディング活性化因子ナルディライジンの多発性硬化症における意義の解明、ポスター発表 BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ④ Matsuoka T, Hiraoka Y, Ohno M, Nishi K, Kimura T, Kita T, Nishi E. A Metalloendopeptidase Nardilysin controls Lipid and Glucose metabolism through the modulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha activity. American Heart Association Sessions 2010 November 13-17 Chicago, Illinois
- ⑤ 松岡 龍彦、平岡 義範、大野 美紀子、大島 尚子、清成 寛、木村 剛、北 徹、西 英一郎. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism、第47回 日本臨床分子生物学会 2010年4月10-11日 東京
- ⑥ 大野 美紀子、平岡 義範、松岡 龍彦、木村 剛、北 徹、西 英一郎. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system、第47回 日本臨床分子生物学会 2010年4月10-11日 東京
- ⑦ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Niizuma S, Shioi T, Kita T, Kimura T, Nishi E. A Metalloendopeptidase Nardilysin is a Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Oral Presentation, The 74rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑧ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin, a Novel Transcriptional Co-regulator of PPARalpha, Controls Glucose and Lipid Metabolism, Poster Presentation, The 74rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑨ Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. Critical roles of nardilysin in energy balance and thermoregulation. ポスター発表 第32回日本分子生物学会年回 (2009年12月9-12日、横浜)
- ⑩ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Kimura T, Kita T, Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the CNS and PNS. ポスター発表 第32回日本分子生物学会年回 (2009年12月9-12日、横浜)
- ⑪ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism. ポスター発表 第32回日本分子生物学会年回 (2009年12月9-12日、横浜)
- ⑫ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism. Poster presentation, The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 15-18, 2009, Orland, Florida
- ⑬ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. Poster presentation, Gordon Research Conference (Matrix Metalloproteinases) (Aug 30 - Sep 4, 2009, Les Diablerets, Switzerland)
- ⑭ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin, a Metalloendopeptidase, is a Novel Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Featured Research Session, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka
- ⑮ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin Deficiency Causes Lean Phenotype with Hypotriglyceridemia and Hypoinsulinemia, Oral Presentation, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法

発明者：西 英一郎、平岡 義範、松本 恭
一、國近 誠

権利者：京都大学（50%）、三洋化成工業株式
会社（50%）

種類：特許

番号：特願 2009-160792

出願年月日：2009年7月7日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/sentan-bunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 義範 (HIRAOKA YOSHINORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60397552