

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06844

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能不全によるアルツハイマー病の病態解明

研究課題名(英文) Mitochondrial regulation by MITOL and diseases

研究代表者

稲留 涼子 (INATOME, RYOKO)

学習院大学・理学部・EF共同研究員

研究者番号：90408691

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)：私たちは以前ミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLの機能低下がアルツハイマー病の病態を著しく増悪させるメカニズムを解明した。これらの研究成果からMITOLの活性を上昇させる薬剤がアルツハイマー病の治療薬になると考え、MITOLを活性化する薬剤を探索した結果、MITOLを活性化する薬剤(マイトルビン)の同定に成功した。マイトルビンを異常タウを発現したアルツハイマー病のモデル細胞に投与したところ、異常タウの凝集を顕著に抑制することを見出した。この分解はMITOLによる異常タウの分解であった。これらの結果より、マイトルビンがアルツハイマー病の治療薬になることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は国内外で精力的に研究がされているが、ミトコンドリア機能との関連に着目した研究報告は未だ数が少なく、その実態が明らかにされていない。私たちの研究はミトコンドリアの機能低下がアルツハイマー病の原因と考えられているA β プラークの毒性亢進とタウ凝集形成の分子メカニズムに密接に関連することを示唆したものであり、ミトコンドリアを標的にした新たな治療法の開発に道を拓くものである。実際にマイトルビンはミトコンドリアを活性化する薬剤であり、アルツハイマー病の治療薬候補として有望である。

研究成果の概要(英文)：We have previously elucidated the mechanism by which the loss of function of the mitochondrial ubiquitin ligase MITOL significantly exacerbates the pathophysiology of Alzheimer's disease. Based on these research results, we hypothesized that a drug that increases the activity of MITOL would be a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease, and as a result of our search for a drug that activates MITOL, we succeeded in identifying a drug named MitoRubin. When MitoRubin was administered to Alzheimer's disease model cells expressing aggregated tau, they found that the aggregation of abnormal tau was markedly inhibited. This degradation of aggregated tau was caused by MITOL through ubiquitin-proteasome pathway. These results strongly suggest that MitoRubin is a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease.

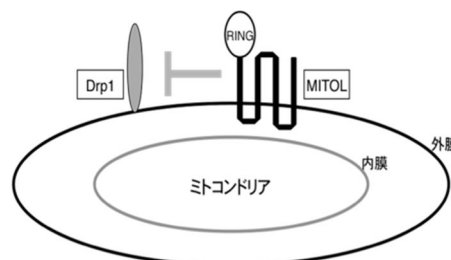
研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアダイナミクスとはミトコンドリアの融合・分裂による形態制御、ミトコンドリアの移動、小胞体などの他のオルガネラとの相互作用を包括する機能的な概念である。これまでのミトコンドリアダイナミクスの研究は、主に分裂因子や融合因子によるミトコンドリアの形態制御機構に焦点が当てられてきた。一方、近年のイメージング解析技術の進歩により、微小管を中心とした細胞骨格に沿ったミトコンドリアの動的な移動や、小胞体などの他のオルガネラとの会合と解離現象が見いだされ、その制御機構と生理的重要性が注目されている。MITOL は、ミトコンドリア外膜を4回貫通するユニークな膜型ユビキチンリガーゼである(図1)。MITOL はミトコンドリアの分裂因子である Drp1 を基質として、その分解を促進することによってミトコンドリアの形態を制御することが報告された(図1)(EMBO J. 2006)。

一方で MITOL は、酵母や線虫にはなく進化的に高等生物から登場していることから、高次細胞機能を制御するシグナル伝達への関与が指摘されていた。興味深いことに、MITOL の機能を抑制すると、ミトコンドリアの動きは止まり、小胞体との相互作用も阻害されることが観察され、その結果、細胞老化が誘導された。MITOL はミトコンドリアダイナミクスの制御に密接に関与する酵素であり、その破綻は老化と密接に関与していることが示唆された。



(図1)MITOLによるミトコンドリアの形態制御MITOLは分裂因子Drp1を基質にしてミトコンドリアの形態を制御する

2. 研究の目的

これまでのアルツハイマー病(AD)研究ではその特徴的病理所見の一つである「Amyloid-(A)による老人斑」に着目し、AD家系から同定された変異を導入したマウス(Aマウス)が広く活用されてきたが、AマウスがADのもう一つの病理所見「過剰リン酸化Tauによる神経原線維変化」を一切示さないことも問題の一つであり、Tauの変異を導入することで神経原線維変化を誘導したモデルマウスTauマウスも過剰リン酸化Tauによる変異に由来した神経原線維変化がADの病態と本当に合致するのか不明瞭であることから、TauマウスもまたADの最適なモデルマウスであるとは言いがたかった。神経老化の基礎メカニズムとミトコンドリアとの関連という視点から現在のモデルマウスの難点を克服することを目指す。

3. 研究の方法

1. 新規モデルマウスとしての基盤構築

【老化促進レベルの検証】

申請者は既に、大脳皮質・海馬特異的 MITOL 欠損マウスと A マウスを交配し、老化促進 A マウスの樹立に成功している。このマウスが本研究目的を達成するべく適切な新規モデルマウスであるという基盤構築のため、まず MITOL 欠損による神経老化について検証する。

【過剰リン酸化 Tau の評価】

予備研究より、老化促進 A マウスが予想通り Tau の過剰リン酸化を示すことをウエスタンブロッティングより確認している。この Tau の過剰リン酸化を確実に判定するために、Tau のリン酸化抗体を複数使用し(AT8, PHF1)、量的比較を行う。

【病態との関連性の解析】

老化促進による Tau の過剰リン酸化が病態に与える影響について組織学的・行動学的解析を行う。既知の A マウスは空間学習に大きな異常を示さないことが知られており、これがヒトにおける AD の臨床所見と一致しないことが一つの問題であった。予備的成果であるが、樹立した老化促進 A マウスは空間学習試験 Barnes maze test により顕著な学習障害を示したため、よりヒト AD に近い病態を示すと考えられる。また物体認知記憶を検証する Novel object recognition test や空間作業学習を評価する Y-maze test によって AD の病態を多面的に検証する。また Nissl 染色や HE 染色を用いて形態学的な神経細胞への影響についても解析を進める。

2. A による Tau 過剰リン酸化の分子機構解明

神経初代培養において、A の細胞外添加は Tau のリン酸化を部分的に亢進させることが知

られている(Stancu IC et al. Mol Neurodegener. 2014)。そこで野生型と MITOL 欠損マウス海馬を用いた神経初代培養を用いて、A β 添加時の Tau のリン酸化状態の変化を検討する。構築された初代培養検証系に関して、Kinase inhibitor の低分子化合物ライブラリーを併用し、A β による Tau のリン酸化誘導に関連するキナーゼの同定を試みる。得られたキナーゼの候補分子群について、上記で示した老化促進 A β マウスにおけるパスウェイ解析結果を踏まえて、候補となるシグナル経路とキナーゼを厳選する。候補分子のキナーゼ活性について老化促進 A β マウスを用い確認することで、実際の AD 脳内における Tau の過剰リン酸化について、必須なキナーゼを同定する。

3. ミトコンドリアを標的にした治療薬剤を同定するために、MITOL を活性化する薬剤をスクリーニングできるアッセイ系を樹立する

方法としては MITOL のプロモーターに NANO-LUC テクノロジーで検出できるようにクリスパー-CAS9 を用いて挿入する。このアッセイ系を用いて MITOL を活性化する薬剤をスクリーニングする。

4. 研究成果

1 年目

他の業務に費やす時間が多かったため、本計画推進に時間がとれなかった。

2 年目以降

アルツハイマー病は、記憶や思考能力が徐々に失われ、最終的に日常的な行動にも支障を来たす病気であり、現在においても、アルツハイマー病の発症メカニズムの詳細は明らかにされておらず、有効な治療戦略は確立されていない。私たちは以前、アルツハイマー病モデルマウスを用いて、ミトコンドリア機能の低下により、毒性の高い A β オリゴマーが蓄積し、アルツハイマー病態が悪化することを明らかにしました(Commun Biol 2021)。今回、ミトコンドリアを活性化する MITOL に着目し、MITOL を活性化する薬剤をスクリーニングできるアッセイ系の樹立し、このアッセイ系を用いて MITOL を活性化する薬剤をスクリーニングしたところ、複数の薬剤を同定することができた。そこで、異常タウを発現したアルツハイマー病のモデル細胞に投与したところ、異常タウの凝集を劇的に抑制することを見出した。今後、アルツハイマー病モデルマウスを用いて、認知症の改善の有無を解析する予定である。

ミトコンドリアを活性化する MITOL に着目し、MITOL を活性化する薬剤をスクリーニングできるアッセイ系を用いて MITOL を活性化する薬剤をさらにスクリーニングした。その結果、MITOL の発現を 2 倍以上に増加させる薬剤マイトルピンの同定に成功した。さらに、細胞培養を用いて酸素消費量を比較したところ、マイトルピンはミトコンドリアの呼吸活性を 3 倍以上増加させることが明らかとなった。そこで、異常タウを発現したアルツハイマー病のモデル細胞に投与したところ、異常タウの凝集を顕著に抑制することを見出した。この分解は MITOL による分解の可能性が示唆された。さらに、タウの凝集を誘導させたアルツハイマー病モデルマウスに経口投与したところ、脳内のタウ凝集塊の顕著な減少を見出した。これらの結果より、マイトルピンがアルツハイマー病の治療薬になることが示唆された。今後はアルツハイマー病モデルマウスを用いて、認知症の改善の有無について行動解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104582 ~ 104582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104582	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 Ito Naoki, Takahashi Takara, Shiiba Isshin, Nagashima Shun, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 171
2. 論文標題 MITOL regulates phosphatidic acid-binding activity of RMDN3/PTPIP51	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 529 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab153	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0件

〔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
---------	---------