

## 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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590951

研究課題名（和文）  $\beta$  セクレターゼの機能制御に基づくアルツハイマー認知症の新治療法開発に向けた研究研究課題名（英文） A study toward development of novel Alzheimer therapies based on the regulation of  $\beta$ -secretase function

研究代表者

荒木 亘（ARAKI WATARU）

（独）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部・室長

研究者番号：60311429

研究成果の概要（和文）：

$\beta$  セクレターゼ (BACE1) は  $\beta$  アミロイドタンパク ( $A\beta$ ) の生成に必須な膜結合プロテアーゼで、アルツハイマー認知症の重要な治療標的である。BACE1 の脂質ラフト局在と  $A\beta$  産生の関連について検討し、BACE1 によるアミロイド前駆体タンパク (APP) の切断は主に脂質ラフト外で起こることを明らかにした。関連タンパクによる BACE1 の制御に関する研究では、LDL receptor-related protein 1 (LRP1) がタンパク相互作用を介して、BACE1 のタンパク発現を抑制的に制御することを見出した。さらに、BACE1 阻害化学物質の探索研究を行い、新規な候補化合物を同定した。

研究成果の概要（英文）：

$\beta$ -secretase (BACE1) is a membrane-bound protease that is essential for the production of  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta$ ) and is an important therapeutic target for Alzheimer dementia. We investigated the relationship between lipid raft localization of BACE1 and  $A\beta$  production, and demonstrated that BACE1 cleavage of amyloid precursor protein (APP) occurs mainly in non-raft membrane domains. Our study on the regulation of BACE1 by its interacting proteins revealed that LDL receptor-related protein 1 (LRP1) negatively regulates BACE1 protein expression through physical interaction. Furthermore, we performed exploratory studies to search for BACE1 inhibitory chemicals and identified novel candidate compounds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：認知症、アルツハイマー病、アミロイド、 $\beta$  セクレターゼ、脂質ラフト、LRP1

## 1. 研究開始当初の背景

$\beta$  セクレターゼ (BACE1) はアルツハイマー認知症 (AD) の病原的因子である

$\beta$  アミロイドタンパク ( $A\beta$ ) の生成に必須な膜結合プロテアーゼであり、AD の重要な治療標的の一つと考えられて

いる。BACE1の阻害は有効性が高く、安全なAD治療法になる可能性がある。本研究者は、そのような認識の下、研究開始時まで、神経細胞におけるBACE1の制御メカニズムに焦点を当てた研究を実施してきた。

脂質ラフトと呼ばれるコレステロール、スフィンゴ脂質に富む膜領域にはBACE1やγセクレターゼが局在しているため、脂質ラフトはAβ生成部位として重要視されている。しかし、神経細胞内において、BACE1が脂質ラフトに局在化する機序、BACE1のラフト局在とAβ生成の関連、BACE1の脂質ラフトにおける制御機構はまだ不明な点が多かった。

翻訳後修飾の一つであるパルミトイル化は膜タンパクの脂質ラフト移行を制御する役割を持つと考えられ、BACE1がパルミトイル化修飾を受けることが知られていた。実際、我々は、BACE1のパルミトイル化欠損変異体を発現する神経芽細胞腫細胞(SH-SY5Y)を用いた研究で、BACE1の脂質ラフト移行がパルミトイル化により制御されることを示唆するデータを得ていた。

我々は、膜タンパク Reticulon 3 (RTN3)、RTN4-B/CがBACE1の制御因子であることを報告し、その制御メカニズムについても検討を行ってきた。また、脂質ラフトに存在する膜タンパクの一つである LDL receptor-related protein 1 (LRP1)がAPP及びBACE1と密接な関連を持つとの報告がなされていた。

一方、BACE1活性を阻害する低分子化合物はADの創薬候補となりうる。BACE1阻害剤の開発研究は製薬企業等により行われていたが、ヒトに対して有効性の確認されたものは報告がなかった。独自の探索研究により、新たなBACE1阻害化合物が得られる可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記のような背景を考慮し、神経細胞におけるBACE1の脂質ラフトへの局在化機序、BACE1の脂質ラフト局在とAβ産生の関連性を明確化すること、さらに、LRP1などのBACE1関連分

子の持つBACE1制御作用とそのメカニズムを明らかにすることを第一の目的とした。

さらに、BACE1活性阻害作用を持つ低分子化合物を独自の方法により、探索、同定し、得られた候補化合物のAβ産生抑制効果について、培養細胞系などを用いて検証し、新規BACE1阻害剤の候補を得ることを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) BACE1の脂質ラフト局在化の機序、BACE1のラフト局在とAβ生成の関連性の解析

ラット初代培養大脳皮質神経細胞は既報に従い、無血清培地で培養した。C末にタグを付加した野生型(WT)BACE1、またはC末部の4個のCysをAlaに置換したパルミトイル化欠損変異体(CA4)を発現する組換えアデノウイルスを作製した。野生型(WT)、Swedish変異型(SW)APPの組換えアデノウイルスも作製した。対照として、emptyアデノウイルスを使用した。

これらの組換えアデノウイルスを、培養神経細胞に感染させ、2日後に細胞、培養上清を回収した。対照として、細胞中のBACE1、APPなどのタンパク発現をウエスタンブロット法により解析した。脂質ラフトはショ糖密度勾配遠心法により分画し、同様にウエスタンブロット解析した。培養上清中のAβ40、Aβ42はサンドイッチELISA法で定量した。

(2) LRP1とBACE1の関連性の解析

LRP1ノックアウト細胞、野生型細胞はATCCから入手した。LRP1の機能を保持した短縮型であるLRP-L4のcDNA(N末部にHAタグあり)、LRP1のC末部に対する特異抗体を、研究協力者Lakshmana博士から取得した。次いで、LRP-L4の組換えアデノウイルスを作製した。

HEK293細胞に、BACE1及びLRP-L4を一過性に共発現させ、LRP-L4のBACE1に対する影響を調べた。ラット初代培養大脳皮質神経細胞に、組換えアデノウイルスを用いて、BACE1とLRP-L4を共発現させ、同様の解析を行った。免疫共沈法により、LRP-L4とBACE1の結合性を分析した。

BACE1 及び LRP-L4 を共発現した HEK293 細胞を用いて、BACE1、LRP-L4 の細胞内局在について、免疫組織化学的に解析した。

(3) RTN3 による BACE1 制御に関する研究  
初代培養神経細胞に RTN3 を過剰発現する系を確立するため、C 末に Myc タグを有する RTN3 の組換えアデノウイルスを作製した。RTN3 の脂質ラフト分布をショ糖密度勾配遠心法で分析した。

(4) 新規 BACE1 阻害化合物の探索

① 化合物アレイを用いたスクリーニング

Myc-His タグを有する可溶性 BACE1 (sBACE1) を過剰発現する CHO 細胞を樹立した。この細胞の細胞溶解液から、sBACE1 をヘパリンカラム、抗 His カラム、抗 Myc カラムを用いて、精製した。精製 sBACE1、及び市販の精製可溶性 BACE を用いて、研究協力機関において、化合物アレイ (8 種、約 23,000 化合物) を用いた BACE1 結合性化合物のスクリーニングを行った。

②  $\beta$  セクレターゼ活性アッセイ系を用いたスクリーニング

研究協力者から、化合物ライブラリーの提供を受けた。蛍光標識基質ペプチド、市販精製可溶性 BACE1 を用いた  $\beta$  セクレターゼ活性アッセイ系 (Ermolieff et al, Biochemistry 2000) に、ライブラリーの化合物を終濃度 10  $\mu$  g/ml で添加し、蛍光強度を 355 nm(excitation)、460nm(emission) で測定した。

③ 陽性化合物の  $A\beta$  産生抑制効果の検討

APP(SW) を安定発現する SH-SY5Y 細胞、または初代培養神経細胞に、陽性化合物を添加し、上清中の  $A\beta$  を定量した。

(5) その他

コレステロールは脂質ラフトの維持に重要であり、 $A\beta$  産生との関連も示唆されている。その観点から、コレステロール合成阻害薬スタチンの  $A\beta$  産生低下作用について、初代培養神経細胞をスタチン (ピタバスタチン、アトロバスタチン、0.2~5  $\mu$  M) で 4 日間処理する系を用いて、検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 神経細胞における BACE1 の脂質ラフト局在化の機序、BACE1 のラフト局在と  $A\beta$  生成の関連性の解析

CA4 発現神経細胞では、WT 発現神経細胞に比べて、脂質ラフト画分の BACE1 レベルが著しく低下していた。WT、CA4 を発現する神経細胞からの内因性  $A\beta$  40、 $A\beta$  42 の分泌量は共に、対照の 2 倍程度に増加していた。APP を同時に過剰発現させた場合も、WT、CA4 は同程度に  $A\beta$  産生を増加させた。BACE1 切断による APP の代謝産物  $\beta$ -C 末断片 ( $\beta$ -CTF) の分布について検討したところ、大部分が非脂質ラフト画分に分布しており、WT、CA4 発現細胞で明らかな差は認められなかった。さらに、APP(SW) だけを発現した細胞においても、 $\beta$ -CTF は主にラフト外に分布していた。

従って、神経細胞において、BACE1 は脂質ラフト局在に関係なく  $A\beta$  を産生しうること、 $\beta$ -CTF が主に非脂質ラフト画分に分布することが明らかとなり、BACE1 は脂質ラフト外で主に APP を切断していることが推定された。

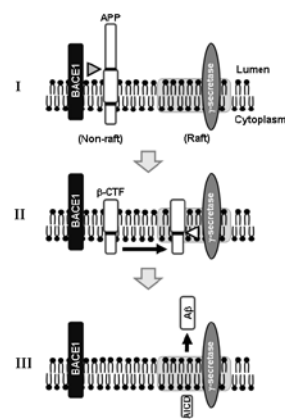


図 1  $A\beta$  産生の動的モデル

以上の研究結果に基づき、 $A\beta$  産生の動的モデルを提唱した。すなわち、APP は BACE1 により主に脂質ラフト外で切断される。次に  $\beta$ -CTF が脂質ラフトへ移行し、同部位で  $\gamma$  セクレターゼによる  $\gamma$  切断が起こり、 $A\beta$  が生成する。(図 1 参照)  $\beta$ -CTF の移送メカニズムの解明は今後の課題といえる。

上記に加えて、WT、CA4 発現神経細胞の上清中の可溶性 BACE1 の分析の結果、BACE1 の細胞外切断にパルミトイル化が関与することが示唆された。また、WT、CA4

発現 SH-SY5Y 細胞の解析から、BACE1 の 2 量体形成にはパルミトイル化は関与しないことが示された。

以上の研究成果は Brain and Behavior 誌に発表した。

#### (2) BACE1 と LRP1 の関連性の解析

脂質ラフトに存在する膜タンパクの一つである LRP1 に着目し、BACE1 と LRP1 の分子の関係性について検討を行い、以下の結果が得られた。i) LRP1 ノックアウト細胞中の BACE1 のタンパク質の発現量は、野生型細胞に比べて有意に増加していた。ii) BACE1 と LRP-L4 の共発現実験の結果、HEK293 細胞、初代培養神経細胞において、LRP-L4 の発現量に比例して、BACE1 のタンパクレベルが顕著に減少した。iii) APP(SW)、BACE1、LRP-L4 を共発現した神経細胞では、APP(SW) と BACE1 を共発現した細胞よりも、BACE1 レベルが低下すると共に、A $\beta$  分泌量が減少した。これらのデータから、LRP1 は BACE1 のタンパク発現レベルを抑制的に制御する作用を持つことが示唆された。

次いで、HEK293 細胞において、BACE1 と LRP-L4 の結合を免疫共沈法により確認した。また、免疫組織化学により、BACE1 と LRP-L4 が細胞内で共局在することが判明した。さらに、BACE1 の発現量を一致させた条件では、BACE1 と LRP-L4 の共発現細胞において、BACE1 のみの発現細胞に比べて、細胞膜表面の BACE1 が減少し、BACE1 の安定性も低下していた。従って、LRP1 による BACE1 の制御には、タンパク相互作用を介した BACE1 の細胞内局在・輸送や安定性の変化が関与している可能性が考えられた。

また、LRP1 ノックアウト、野生型細胞を用いた解析から、BACE1 の脂質ラフト移行は LRP1 の有無により影響されないことが分かった。

以上より、BACE1 の制御分子としての LRP1 の意義を明らかにすることができた。今後、この研究を継続し、成果を論文としてまとめる予定である。

#### (3) RTN3 による BACE1 制御に関する研究 RTN3がBACE1を抑制する神経細胞内部位

と脂質ラフトの関連を明確にするための研究を行った。神経細胞において、内因性RTN3はほとんどが脂質ラフト外に分布していた。RTN3がBACE1を制御する細胞内部位と脂質ラフトの関連については、組換えアデノウイルスを用いてRTN3、APP、BACE1を共発現させる系を構築し、検討中であるが、結論的なデータを得るには至っていない。

RTN3 の生体における BACE1 活性抑制作用を明らかにするための、APP トランスジェニックマウス、RTN3 トランスジェニックマウスを用いた研究（大塚製薬との共同研究）の論文を、Curr Alzheimer Res 誌に発表した。

#### (4) 新規 BACE1 阻害化合物の探索

##### ①化合物アレイを用いたスクリーニング

精製 sBACE1 と化合物アレイを反応させるスクリーニングを実施したが、特異性の高い BACE1 阻害化合物候補は得られなかった。

##### ② $\beta$ セクレターゼ活性アッセイ系を用いたスクリーニング

約 450 種の化合物のスクリーニングにより、7 種類の比較的活性の弱い陽性化合物が得られた。それらの類似化合物約 70 種のスクリーニングにより、構造的に類似した新規 BACE1 阻害化合物 2 種 (IC<sub>50</sub> ~7  $\mu$ M) と、すでに報告のある BACE1 阻害化合物 1 種 (IC<sub>50</sub> ~4  $\mu$ M) を同定した。

##### ③陽性化合物の A $\beta$ 産生抑制効果の検討

2 種の新規化合物の A $\beta$  産生抑制効果を検討した。その結果、APP(SW)発現 SH-SY5Y 細胞、初代培養神経細胞ともに、5  $\mu$ M の濃度で、軽度の A $\beta$  産生抑制効果を確認できた。なお、同濃度では、細胞内 APP 発現、細胞生存に対する影響は認められなかった。

#### (5) その他

ピタバスタチン、アトロバスタチンは A $\beta$  低下作用を持つこと、その作用には APP の成熟化、668 位のリン酸化の変調が関与すること、その作用はコレステロール低下とは別の機序を介することを明らかにした。

(Neurochem Res 2013; 筑波大学との共同研究)

#### 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 4 件)

①Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A: Statins reduce amyloid  $\beta$ -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res* 38: 589-600, 2013 DOI: 10.1007/s11064-012-0956-1

②Araki W, Oda A, Motoki K, Hattori K, Itoh M, Yuasa S, Konishi Y, Shin R-W, Tamaoka A, Ogino K: Reduction of  $\beta$ -amyloid accumulation by reticulon 3 in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res* 10, 135-142, 2013 DOI: 10.2174/1567205011310020003

③Motoki K, Kume H, Oda A, Tamaoka A, Hosaka A, Kametani F, Araki W: Neuronal  $\beta$ -amyloid generation is independent of lipid raft association of  $\beta$ -secretase BACE1: Analysis with a palmitoylation-deficient mutant. *Brain and Behavior* 2: 270-282, 2012 DOI: 10.1002/brb3.52

④Araki W: Potential repurposing of oncology drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *BMC Medicine* 11, 82, 2013 DOI: 10.1186/1741-7015-11-82

以上すべて査読あり

[学会発表] (計 10 件)

①嶺岸正治, Madepalli Lakshmana, 本木和美, 保坂 愛, 岡田尚巳, 玉岡 晃, 荒木 亘:  $\beta$  セクレターゼ (BACE1) の low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) による抑制的制御. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 12.14, 2012

②保坂 愛, 荒木 亘, 織田彰子, 富所康志, 玉岡 晃: スタチンのアミロイド  $\beta$  蛋白産生抑制のメカニズムの検討. 第 31 回日本認知症学会学術集会, つくば, 10.27, 2012

③ Araki W, Motoki K, Oda A, Hosaka A, Tamaoka A, Kametani F: Cleavage of amyloid precursor protein by BACE1 occurs mainly in non-raft membrane domains in neurons. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry / The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, 10.1, 2012

④保坂 愛, 荒木 亘, 織田彰子, 富所康志, 玉岡 晃: スタチンのアミロイド  $\beta$  蛋白産生低下作用に関する研究. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 5.23, 2012

⑤ 本木和美, Madepalli K Lakshmana, 玉岡

晃, 岡田尚巳, 荒木 亘:  $\beta$ アミロイドタンパク産生における low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP-1)の役割. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.14, 2011

⑥荒木 亘, 本木和美, 織田彰子, 亀谷富由樹, 玉岡 晃:  $\beta$ セクレターゼの脂質ラフト局在と  $\beta$ アミロイド産生. 第 30 回日本認知症学会学術集会, 東京, 11.11, 2011

⑦Araki W, Oda A, Motoki M, Hattori K, Itoh M, Yuasa S, Konishi Y, Shin R-W, Tamaoka A, Ogino K: Reduction of beta-amyloid accumulation by reticulon 3 in transgenic mice. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2011, Paris, 7.18, 2011

⑧荒木 亘, 本木和美, 織田彰子, 玉岡 晃:  $\beta$ セクレターゼのパルミチル化と脂質ラフト移行・ $\beta$ アミロイド産生の関連. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 5.20, 2011

⑨本木和美, 久米秀明, 織田彰子, 玉岡 晃, 亀谷富由樹, 荒木 亘:  $\beta$ セクレターゼのパルミチル化が脂質ラフト局在と  $\beta$ アミロイド産生に及ぼす影響. BMB2010, 神戸, 12.7, 2010

⑩荒木 亘, 織田彰子, 本木和美, 服部功太郎, 伊藤雅之, 湯浅茂樹, 小西吉裕, 辛 龍雲, 玉岡 晃, 荻野晃一: アルツハイマー病モデルマウスにおける  $\beta$ アミロイド蓄積の Reticulon 3 による抑制. *Neuro* 2010, 神戸, 9.3, 2010

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 亘 (ARAKI WATARU)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部・室長

研究者番号: 6 0 3 1 1 4 2 9

(2) 連携研究者

玉岡 晃 (TAMAOKA AKIRA)

筑波大学 人間総合科学研究科・教授

研究者番号: 5 0 1 9 2 1 8 3

亀谷 富由樹 (KAMETANI FUYUKI)

東京都医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：70186013

(3) 研究協力者

ラクシュマナ マデパリ (LAKSHMANA  
MADEPALI)

Torrey Pines Institute for Molecular  
Studies・Associate Member

岡田 尚巳 (OKADA TAKASHI)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

斎藤 臣雄 (SAITO TAMIO)

理化学研究所 ケミカルバイオロジー研究  
基盤施設・チームヘッド

本木 和美 (MOTOKI KAZUMI)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 疾病研究第六部・流動研究員

嶺岸 正治 (MINEGISHI SEIJI)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 疾病研究第六部・流動研究員

織田 彰子 (ODA AKIKO)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 疾病研究第六部・研究生

保坂 愛 (HOSAKA AI)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 疾病研究第六部・研究生

荒木 由美子 (ARAKI YUMIKO)

(独)国立精神・神経医療研究センター 神経研  
究所 疾病研究第六部・研究生