

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390079

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病標的膜タンパク質が誘導する成熟神経細胞の死の研究

研究課題名(英文) A study on the molecular mechanisms of neurodegeneration induced by high-mass amyloid-beta assembly, amylospheroids (ASPD)

研究代表者

星 美奈子 (HOSHI, Minako)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員

研究者番号：30374010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円、(間接経費) 4,530,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病ではアミロイド (A $\beta$ ) が凝集し異常構造体を形成し、神経毒性を獲得する。代表者らは、アルツハイマー病(AD)患者脳より世界で初めて、神経細胞死の直接原因となる異常構造体A $\beta$ 凝集体「アミロスフェロイド(ASPD)」の単離に成功し、さらにその標的分子として成熟神経細胞にのみ発現するシナプス膜タンパク質を新たに同定した。本研究では動物個体、患者脳、成熟神経細胞を用いて総合的に検証することで、ASPDが標的分子の機能を阻害し、異常なカルシウム流入により細胞死を起こすことを分子レベルで解明した。さらに標的分子が新規の創薬ターゲットになることも解り、新たな創薬への基盤を提示出来た。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta protein (A $\beta$ ) plays a central role in Alzheimer's disease (AD). To elucidate the molecular identities of pathogenic A $\beta$  oligomers and their neuronal targets responsible for neurodegeneration, we have previously isolated highly toxic A $\beta$  assemblies termed amylospheroids (ASPD) from AD patient brains. Patient-derived ASPD were toxic to human mature neurons and their amount in AD susceptible regions well correlated with pathological severity of AD. In this study, we found that ASPD neurotoxicity requires Ca<sup>2+</sup> influx. We also found that voltage gated calcium channels (VGCC) are involved in ASPD neurotoxicity. Interestingly, the abnormal Ca<sup>2+</sup> overload induced by ASPD activated two tau protein kinases, and increased the phosphorylation of tau. Importantly, we found that ASPD-binding to the ASPD target protein on mature neuronal surface impairs its activity, responsible for the above abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and to the severe neurodegeneration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：認知症 神経細胞死 構造異常 カルシウム ミトコンドリア タウ

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、高齢化する我が国が、率先して取り組むべき課題である。その原因は、脳内で  $\beta$  アミロイド ( $A\beta$ ) が集合体を作り、神経のシナプスを侵し、最終的に細胞が脱落することによると考えられた。しかしながら、シナプス変性だけを起こす  $A\beta$  集合体は単離されても、今まで神経細胞死を起こす  $A\beta$  集合体は患者から単離されたことはなかった。また、齧歯類疾患モデルでは、 $A\beta$  集合体は充分量存在するが、脳の障害はシナプス変性までで神経細胞は脱落せず、認知障害も軽症である。この疾患初期段階モデルである既存の齧歯類モデルを基に開発された複数の薬剤は、いずれも臨床治験では認知症の改善に至っていない。従って、治療のためには、本研究が目的とする、シナプス変性以降に起きる神経細胞死の分子機構のヒト脳における解明が必要であると考えられた。

研究代表者は、患者脳より初めて、齧歯類モデルには存在しない、極めて強い神経毒性を持つ球状の  $A\beta$  集合体 = アミロソフェロイド (ASPD) の単離に成功した (Noguchi *et al.* JBC2009)。この患者特異的  $A\beta$  集合体の構造は他とは異なり、その結果として異なる神経細胞死機構を持つことも明らかとなった。

上記に加え、研究代表者は、ASPD 標的分子として、成熟神経細胞にのみ発現するシナプス膜タンパク質を新たに同定した。標的分子は、シナプス毒性の作用点であるグルタミン酸受容体とは異なる分子で、神経の機能と生存に重要である可能性が高い。これは、グルタミン酸受容体阻害剤 (NMDA 受容体、AMPA 受容体、代謝型受容体等) はどれも ASPD 毒性を阻止出来ないことと整合性があり、ASPD はこの膜タンパク質の機能を障害することで、従来とは異なる機構で劇的な神経細胞死を起こしていると考えられた。

## 2. 研究の目的

上記に基づき、以下の課題を推進した。

**課題 1** : 標的分子の中枢神経特異的ノックアウトマウスを作製し、個体の行動解析 (京大・先端技術センターに依頼) 及び組織化学的解析、必要に応じて電気生理学的解析 (生理研・重本研に依頼) により標的分子の機能を解析する。さらに、標的分子の欠損により神経細胞が ASPD 毒性に耐性になるか、逆に標的分子の発現により神経前駆細胞等が ASPD 毒性に感受性を示すかを検証し、標的分子が神経細胞死の作用点であることを証明する。

**課題 2** : 標的分子特異的抗体により患者脳に

おいて標的タンパク質の機能や存在量が疾患の重症度や ASPD 量と相関するかを免疫組織化学的 (新潟大脳研)、生化学的に解析する。**課題 3** : ASPD 毒性は成熟神経細胞に選択的であり、その細胞死は DNA 断片化を伴うが、神経突起と細胞体が粉々になるという従来のアポトーシスとは全く異なる形態学的変化を起こすため、その分子機構はアポトーシスとは異なる可能性が示された。そこで、標的分子を起点とする神経細胞死シグナル伝達機構を分子レベルで解明することで、成熟神経細胞特異的な細胞死メカニズムを解明する。また ASPD 毒性はタウ病態 (異常リン酸化) に繋がることを示唆されていたが (Hoshi *et al.* PNAS2003)、成熟神経細胞においてもこの病態が起きるかを解析する。

倫理問題に配慮し、しかるべき手続きを経てその範囲で以下を実施する。

## 3. 研究の方法

研究課題は、新規標的分子の**課題 1** 動物における機能解析、**課題 2** 患者脳での病態解析、**課題 3** 神経細胞死分子機構の解明、である。申請者の総括の下、研究室メンバー (学位取得者: 大西、井上、小村; 修士取得者: 中村)、京大先端技術センター、新潟大脳研、理研発生・再生科学総合研究センター動物資源開発室 (理研 CDB) の協力を仰ぎ、各研究者の実験的蓄積を生かした以下の *in vivo* 及び *in vitro* の実験により成熟神経特異的細胞死の分子実体に迫る。

**課題 1** ①標的分子の中枢神経特異的ノックアウトマウスを構築し、行動解析 (先端技術センター)、組織解析、生化学的解析などにより表現型を明らかにし、標的分子の機能を解明する。

②標的分子の欠損により成熟神経細胞が ASPD 毒性に耐性になるか、逆に標的分子の発現により非神経細胞や神経前駆細胞等が ASPD 毒性に感受性を示すようになるかを解析し、標的分子が神経細胞死の作用点であることを明らかにする。

**課題 2** 標的分子特異的抗体の作製による剖検脳の病理学的、生化学的解析

**課題 3** ASPD による標的分子の機能障害により細胞内カルシウム濃度が二相性に上昇し神経は死に至る (大西・星、未発表データ)。これは ASPD 特異的であり、 $A\beta$  投与では認められないため、

①薬理的解析により細胞内カルシウム動態異常に関わるチャンネルを特定する。

②カルシウム濃度上昇によるカルパイン活性

化が ASPD による成熟神経細胞死に重要であることを既に見出している。カルパインは、活性化サブユニットの切断により脳内のサイクリン依存性キナーゼ (CDK5) の活性化することが知られており、これがタウのリン酸化に繋がる可能性が考えられた。そこで成熟神経細胞において標的分子の下流のシグナル伝達機構を解明し、タウの異常へと至るシグナル伝達経路を解明し、アミロイドとタウの関係を明らかにする。

③将来的な臨床応用開発に向けて、①での知見を元に、低分子阻害剤によるカルシウム上昇の阻止により成熟神経細胞死を防げるかを検討する。平行して、ASPD による標的分子との結合を阻止するペプチドのスクリーニングを phage display を用いて行う (神戸大との共同研究)。

#### 4. 研究成果

**課題 1** ①②ASPD は標的分子の機能を阻害することが明らかになった。そこで、標的分子の中枢神経特異的ノックアウトマウスを構築し、ASPD 毒性に耐性になるかどうか検証を行おうと試みたが、標的分子が成熟神経細胞の生存及び機能にエッセンシャルな分子であることが明らかとなり、個体を得ることが難しいことが明らかとなった。そこで、標的分子に対する miRNA を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを、自治医科大学村松慎一博士に作出して貰い、これをラット初代培養神経細胞に処理したところ、ASPD 投与により標的分子が障害を受けた場合と全く同様の特徴的な神経細胞死が起こることが明らかになった。

逆に標的分子の発現により非神経細胞や神経前駆細胞等が ASPD 毒性に感受性を示すようになるかを解析しようとしたが、これについても様々な系を試みたが、標的分子を本来発現しない細胞の細胞膜に人工的に発現させることは非常に困難であることが明らかとなった。標的分子の発現制御については今後の課題であるが、標的分子により細胞の ATP の約 7 割が消費されてしまうため、何らかの機構により細胞膜への発現が阻害されていると考えられた。そこで、ASPD が標的分子に直接結合することを示すために共沈実験を行い、ASPD の存在に依存して標的分子が共沈してくることを示した。さらに、濃度依存的に標的分子に ASPD は結合するが、その最大結合量は標的分子の細胞膜上への存在量とほぼ一致すること、さらに、ASPD の濃度依存的結合と一致して、下流でカルシウム流入が起こることを明らかにした。また、成熟神経細胞

の細胞膜の分子で、他に ASPD に結合する分子は同定出来ないことも示した。さらに、ASPD が主に作用すると考えられる標的分子上の部位を明らかにすることに成功し、その部位を模したペプチドの競合阻害により、ASPD 毒性が阻止されることを明らかとした。上記を総合すると、標的分子が神経細胞死の作用点と考えられることを示した。

**課題 2** 標的分子のヒト脳での分布、及び病態との相関を調べるために病理学的解析を行った。まず、成熟神経細胞の初代培養を用いて適切な染色条件を確立した後、剖検脳を用いた解析を行った。その結果、正常脳において標的分子は神経細胞の軸索や細胞体、神経突起に発現していることが明らかとなった。部位としては、大脳皮質、海馬、小脳と幅広い領域で発現していることがわかった。AD 脳においては、AD で障害を受けることが報告されている大脳皮質や海馬では標的分子を発現する神経細胞が脱落していることがわかったが、AD ではあまり障害を受けない小脳では標的分子の発現に変化はなかった。そこで、この組織における ASPD の量を調べたところ、大脳皮質や海馬には多くの ASPD が蓄積していたが、小脳では正常脳と同じレベルの僅かな ASPD しか蓄積していないことが明らかとなり、ASPD の蓄積に比例して標的分子を持つ神経が失われていることが示唆された。

上記を裏付けるために標的分子の *in situ* による解析を行った。その結果、免疫組織学的解析結果と基本的には一致する結果を得ることが出来た。過去の文献を検索した結果、AD 脳において標的分子の発現が約半分になるといふ *in situ* の解析結果の報告があり、さらに、標的分子の活性についても AD では減少するという報告が複数あることがわかった。過去の研究においては、標的分子の量や活性の減少が、AD の結果なのか原因なのかは明らかとなっていなかったが、本研究により、これが AD 脳における神経細胞死の原因と考えられることを示すことが出来た。

#### **課題 3**

①阻害剤による薬理的解析により、ASPD により標的分子が障害されることで神経細胞が過興奮の状況になり、膜電位依存性カルシウムチャンネルの内、神経細胞のプレシナプスに存在する N-type を経由して神経細胞死が起こることを見出した。さらに、その下流では小胞体ではなく、ミトコンドリアのカルシウム代謝異常が起こることを明らかにした。これにより、二相性のカルシウム異常が起こることがわかった。

②さらにタウについて解析をしたところ、AD 脳でタウを主にリン酸化する tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  と tau protein kinase II/cyclin-dependent protein kinase 5 が活性化しており、それによりタウのリン酸化が細胞死に先立って亢進していることが明らかになった。

③phage display により複数種類の ASPD 結合ペプチドが同定された。そのうち、ASPD の毒性を阻害するペプチドは標的分子の細胞外ドメインの主な ASPD 結合部位と考えられる部分と類似していることが明らかとなった。

上記のとおり、計画したとおり順調に研究を遂行し、予定していた課題を達成した。それにより、ASPD がなぜ成熟神経細胞に特異的に、しかも非常に特異的な細胞死を起こすかについて分子レベルで明らかにすることが出来た。この分子メカニズムは、これまでAD 脳で明らかになっていた知見と良く合致しており、なぜAD 脳で成熟神経細胞が死に至るかについて初めて明解な説明が可能となった。これらを取り纏めて現在論文を投稿中である。さらに ASPD の標的分子が新規の創薬ターゲットになることが示され、新たな創薬への基盤を提示することが出来た。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

### 【2013】

小池佑佳、大内東香、佐藤朋江、新保淳輔、佐藤晶、佐々木修、渋谷宏行、岡本浩一郎、柿田明美、五十嵐修一 (2013 Jun).

MRI で髄膜造影を呈し脳生検で診断した脳アミロイド $\beta$  関連血管炎の1例.

Brain and Nerve 2013; 65 (6): 693-697.

Brain Nerve 2013;65:693-7.

Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2013 Dec; Epub 2013 Jun 19).

Valosin-containing protein immunoreactivity in tauopathies, synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease.

Neuropathology 2013; 33 (6): 637-644..

### 【2012】

Sato, K., Maeda, T., and Hoshi, M. (2012) **Asn<sup>27</sup> is Essential for the Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ (1-42) Peptide** International J. of Peptide Res. And Therapeutics 18, 341-345

Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M,

Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2012 May; Epub 2012 Feb 9).

Optineurin immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions of polyglutamine diseases (Huntington's, DRPLA, SCA2, SCA3) and intranuclear inclusion body disease.

Acta Neuropathologica 2012; 123 (5): 747-749.

Fujiwara T, Morimoto K, Kakita A, Takahashi H (2012 July, Epub 2012 Mar 30).

Dynein and dynactin components modulate neurodegeneration induced by excitotoxicity.

Journal of Neurochemistry 2012; 122 (1): 162-174.

J Neurochem 2012;122:162-74.

Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, Ugawa Y, Nishizawa M, Takahashi H, Kakita A (2012 Aug).

Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer disease.

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 2012; 71 (8): 750-759.

Matsui C, Inoue E, Kakita A, Arita K, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Yamada A, Takai Y, Takahashi H (2012 November; Epub 2012 Mar 8).

Involvement of the  $\gamma$ -secretase-mediated EphA4 signaling pathway in synaptic pathogenesis of Alzheimer's disease.

Brain Pathology 2012; 22 (6): 776-787.

Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2013 Jan; Epub 2012 Dec 13).

Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases.

J Neuropathol Exp Neurol 2013; 72 (1): 18-28.

Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2013 Jan 4; Epub 2012 Nov 14).

Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia.

Biochemical and Biophysical Research Communications 2013; 430 (1): 394-399.

Biochem Biophys Res Commun 2013;430:394-9.

Doi 10.1016

Wen Y, Miyashita A, Kitamura N, Tsukie T, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Kakita A, Takahashi H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamaguchi H, Akazawa K, Ihara Y, Kuwano R (2013 January 1; Epub 2013 Mar 1).

*SORL1* is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease.

Journal of Alzheimer's Disease 2013; 35 (2): 387-394.

J Alzheimers Dis 2013;35:387-94

#### 【2011】

Matsumura, S., Shinoda, K., Yamada, M., Yokojima, S., Inoue, M., Ohnishi, T., Shimada, T., Kikuchi, K., Masui, D., Hashimoto, S., Sato, M., Ito, A., Akioka, M., Takagi, S., Nakamura, Y., Nemoto, K., Hasegawa, Y., Takamoto, H., Inoue, H., Nakamura, S., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., Kinjo, M., and Hoshi, M. (2011)

Two distinct amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses *J. Biol. Chem.* 286, 11555-11562

Hiroaki, H., Umetsu, Y., Nabeshima, Y., Hoshi, M., Kohda, D. (2011) A Simplified Recipe For Assigning Amide NMR Signals Using Combinatorial <sup>14</sup>N Amino Acid Inverse-Labeling *J. Struct. Functional Genomics* 12, 167-174

Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2011 Sept; Epub 2011 Jun 6). Alteration of autophagosomal proteins (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease.

Neurobiology of Disease 2011; 43 (3): 690-697.

Neurobiol Dis 2011;43:690-7.

Orimo S, Uchihara T, Kanazawa T, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H (2011 Dec; Epub 2011 Jun 23).

Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease.

Neuropathology and Applied Neurobiology 2011; 37 (7): 791-802.

Neuropathol Appl Neurobiol 2011;37:791-802.

〔学会発表〕 (計 6 件)

【主な招待講演のみ記載】

#### < 国際 >

Minako Hoshi (2013.11.1) **How Does An Amyloid  $\beta$ -Protein Assembly Kill Mature Neurons In Alzheimer Disease Brain? 6<sup>th</sup> Asian Aging Core for Longevity (AACL) conference in Kyoto**

Aging Research Forum between Japan and Korea, organized by Prof. Mori and Dr. Nabeshima  
Kyoto (招待講演)

Hoshi, M., Ohnishi, T., Inoue, M., Hiroaki, H., Nabeshima, Y., Kakita, A. (2011年9月21日)  
A new toxic target for a high-mass amyloid  $\beta$ -protein assembly with a unique toxic structure  
"International conference on Alzheimer's disease: Return to the Basics" at Annual meeting for Japanese Biochemical Societies, organized by Professors Iwata and Hoshi  
Kyoto (オーガナイザー兼招待講演)

#### < 国内 >

星 美奈子 (2013年6月5日)  
病態解明に基づくアルツハイマー病新規治療法の研究開発；基礎研究から大学発ベンチャーでの創薬へ  
第28回老年精神医学会 (日本大阪) 大会長：中村祐 (香川大医学部)  
会長基調講演 (招待講演)

星 美奈子 (2013年6月14日)  
アルツハイマー病の根本治療を目指した新規治療法の研究開発  
第13回日本蛋白質科学会年会 (鳥取)  
ワークショップ：アミロイド凝集の統一的理解を目指して—分子から細胞の視点まで—  
オーガナイザー：八木寿梓、茶谷絵理  
(招待講演)

Minako Hoshi (2012年4月5日)  
High-Mass Amyloid  $\beta$ -Protein Assembly With Unique Toxic Surfaces From Patient Brains Towards Rational Therapy For Alzheimer Disease  
'Advances in Aging Research 2012', organized by Professors Komuro and Nabeshima  
Osaka (招待講演)

Minako Hoshi (2011年9月21日)  
A New Toxic Target For A High-Mass Amyloid  $\beta$ -Protein Assembly With A Unique Toxic Surface  
'A Return to the Basics - Molecular Decoding of the Alzheimers Disease Pathogenesis'  
the 2011 annual meeting for the Japanese

Biochemical Society  
Organized by Professors Iwata and Hoshi  
Kyoto (オーガナイザー、招待講演)

○出願状況 (計 3 件)

名称：アミロスフェロイドが結合して成熟神経細胞死を誘発する標的分子、アミロスフェロイドが誘導する神経細胞死を抑制する方法及び物質、及びそれらの利用

発明者：星 美奈子

権利者：TAOヘルスライフファーマ株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2012/083271 (WO2013/099806)

出願年月日：2012年12月21日

国内外の別：PCT (JP, EP, CN, KR に移行済)

名称：A NEUROTOXIC TARGET FOR AMYLOSPHEROID, A METHOD AND A MATERIAL FOR REDUCING THE NEUROTOXICITY OF AMYLOSPHEROID, AND A USE OF THE SAME

発明者：HOSHI Minako

権利者：HOSHI Minako

種類：PATENT

番号：US 13/729152

出願年月日：2012年12月28日

国内外の別：US

名称：合成アミロスフェロイドの製造方法

発明者：星 美奈子

権利者：TAOヘルスライフファーマ株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2012/082831 (WO2013/094614)

出願年月日：2012年12月18日

国内外の別：PCT (JP, EP, CN に移行済)

○取得状況 (計 4 件)

名称：抗体及びその利用

発明者：星 美奈子、内藤 幸嗣、井手野 祥次

権利者：TAOヘルスライフファーマ株式会社

種類：特許

番号：特許 4820757

取得年月日：2011年9月9日

国内外の別：日本

名称：Antibody and use thereof

発明者：HOSHI Minako, NAITO Koji, IDENO Shouji

権利者：TAO Health Life Pharma Co., Ltd.

種類：PATENT

番号：8,168,188

取得年月日：2012年1月5日

国内外の別：US

名称：抗体及びその利用

発明者：星 美奈子、佐藤 道夫、井手野 祥次、内藤 幸嗣、保理江 智、野田 宗宏、堀井 肇  
権利者：TAOヘルスライフファーマ株式会社

種類：特許

番号：特許 5185946

取得年月日：2013年1月25日

国内外の別：JP

名称：Antibody and use thereof

発明者 HOSHI Minako, SATO Michio, IDENO Shoji, NAITO Koji, HORIE Satoshi, NODA Munehiro, HORII Hajime

権利者：TAO Health Life Pharma Co., Ltd.

種類：PATENT

番号：8,445,649

取得年月日：2013年5月21日

国内外の別：US

6. 研究組織

(1)研究代表者

星 美奈子 (HOSHI, Minako)

公益財団法人先端医療振興財団・客員上席  
研究員 (京都大学・大学院医学研究科・特  
定准教授)

研究者番号：30374010

(2)研究分担者

大西 隆之 (OHNISHI, Takayuki)

公益財団法人先端医療振興財団・研究員  
研究者番号：30418959

井上 雅文 (INOUE, Masafumi)

公益財団法人先端医療振興財団・研究員  
研究者番号：10586655

※平成24年度まで

柿田 明美 (KAKITA, Akiyoshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：80281012