

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617007

研究課題名(和文) 発症予防を目指したアルツハイマー病の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of underlying mechanism to develop Alzheimer's disease

研究代表者

中川 敏幸 (NAKAGAWA, Toshiyuki)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の90%以上は遺伝子変異がなく、発症機構が不明のままである。そこで、アルツハイマー病の危険因子(糖尿病、肥満)に関連する小胞体ストレスシグナルからアミロイド- $\beta$  産生機構の解明を目的とした。

本研究では、*in vitro*において、小胞体ストレスは  $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進し、アミロイド- $\beta$  産生を増加させること、また、ケルセチンはeIF2 特異的な脱リン酸化関連遺伝子(GADD34)を誘導し、アミロイド- $\beta$  産生を抑制することを明らかにした。さらに、加齢及びアルツハイマー病モデル(APP23)マウス脳にて、リン酸化eIF2 の発現が増加していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Gamma-secretase produces amyloid-beta (Ab) in the brain from Ab precursor protein, which is critical for the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). The endoplasmic reticulum (ER) stress causes unfolded proteins, which are processed by unfolded protein response (UPR). Pathogenesis of obesity and diabetes, which are risk factors for AD, is related to ER stress. However, whether ER stress is engaged in the development of AD remains obscure. In this research, I showed that ER stress activated gamma-secretase, leading to augmentation of Ab through induction of activating transcription factor 4 (ATF4). Ab secretion was repressed *in vitro* by quercetin, which induced the growth arrest and DNA damaged-inducible gene (GADD)34. In addition, we found that phosphorylated eIF2 $\alpha$  and ATF4 were increased in the brain of AD model mice APP23. These results suggest that ER stress signaling may be disturbed in the brain of AD.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：小胞体ストレス ATF4 GADD34 eIF2 $\alpha$  アミロイド- $\beta$

## 1 . 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の病態は遺伝子変異の解明から飛躍的な発展を遂げている。しかし、アルツハイマー病の 90% 以上は遺伝子変異がなく、発症機構が不明のままである。よって、治療は一時的な対症療法が主体である。そこで、病態の解明と新たな治療・予防法の解明が急務であり、世界中で関連研究がなされている。しかし、ほとんどの研究が神経機能に対するアミロイド-β (Aβ) の関わりを対象としている。

本研究は、アルツハイマー病の危険因子 ( 加齢、糖尿病、肥満 ) に関連するストレスシグナルとアミロイド-β 産生との関わりに焦点を絞る点で、従来の研究とは全く異なる位置づけとなる。

研究代表者等の先行研究 ( 科学研究費 ) により、以下のような成果を得た。

アミロイド-β 産生に影響するプレセニリン-1 発現を評価する *in vitro* と *in vivo* の実験系を確立した ( *BBRC*. 352:722-727, 2007 ) 。

オートファジー機能低下が GCN2-eIF2-ATF4 シグナル経路を活性化し、アミロイド-β 産生を促すことを明らかにした ( *Autophagy*. 6:345-352, 2010 ) 。

レスベラトロールの新たな役割として、オートファジー活性化を介したアミロイド-β 産生阻害作用を明らかにした ( *Autophagy*. 6:345-352, 2010 ) 。

以上の成果と小胞体ストレスに関する先行研究 ( 研究代表者等、*Nature* 403, 98-103, 2000、*JCB* 150, 887-894, 2000 )、さらに、加齢に伴うオートファジー機能の低下と糖尿病や肥満における小胞体ストレスの誘導を考え合わせ、これらに共通する ATF4 の活性化がアルツハイマー病の発症に関連するのではないかと考えるに至った。

## 2 . 研究の目的

これまでの研究では、オートファジー機能低下及び小胞体ストレス刺激がプレセニリン-1 発現を増加させる ( マウス個体 )、

ATF4 の発現調節によりアミロイド-β 産生を制御できる ( 培養細胞 ) という新たな現象を明示できた。しかし、アルツハイマー病で ATF4 がどのように作用しているかは不明である。本研究は、アルツハイマー病モデルマウスにおいて、アミロイド-β 産生と認知・記憶障害に対する ATF4 の役割を明確にすることを目的とした。さらに、食品成分ケルセチンのアミロイド-β 産生に対する作用機構を明らかにする。

## 3 . 研究の方法

1. アミロイド-β 産生が亢進したオートファジー機能低下細胞を用い、ケルセチンのアミロイド-β 産生に対する作用を解析する。
2. アミロイド-β 産生と認知・記憶障害に対

する ATF4 の役割を明確にするために、アルツハイマー病モデルマウス ( APP23 ) と加齢マウスを用い、脳内 ATF4 の発現をウエスタンブロット解析にて行う。

## 4 . 研究成果

ヒトアミロイド前駆体タンパク質遺伝子を安定的に発現する細胞株を用い、アミロイド-β 産生に対する小胞体ストレスの作用およびフラボノイドの一種であるケルセチンによる制御機構を検討した。

( 1 ) 培養細胞において、小胞体ストレス刺激 ( ツニカマイシン処理 ) 後に、 $\beta$ -セクレターゼの活性中心であるプレセニリン-1 の発現量をウエスタンブロット法にて、さらに Aβ<sub>42</sub> 測定を ELISA 法にて行った。ツニカマイシン刺激によりプレセニリン-1 の発現が増加し、活性型である N 末及び C 末断片も増えていた。また、Aβ<sub>42</sub> 産生の増加と Notch シグナルの亢進も認め、 $\beta$ -セクレターゼ活性の促進が確認された。興味あることに、小胞体ストレスによる  $\beta$ -セクレターゼ活性化は、Aβ<sub>42</sub> のみならず Aβ<sub>40</sub> の増加を認め、Aβ<sub>42</sub> が優位であった。

( 2 ) 培養細胞に 25μM ケルセチン処理を行った。ケルセチン処理は、小胞体ストレス刺激によるアミロイド-β 産生を有意に抑制した。さらに、小胞体ストレス刺激による Aβ<sub>42</sub> 産生増加とケルセチンによる Aβ<sub>42</sub> 産生抑制は、プレセニリン-1 発現量と相関していることが明らかとなった。

( 3 ) ケルセチンの作用機構を解明するため、小胞体ストレス関連遺伝子の発現を RT-PCR にて検討した。ケルセチンは、IRE1p に結合し、活性化することから IRE1 のターゲットである xbp-1 のスプライシングを測定した。ケルセチン処理により、明らかに xbp-1 のスプライシングが亢進していた。さらに、興味あることに、eIF2 特異的な脱リン酸化関連遺伝子 ( GADD34 ) の発現が増加していることを明らかにした。ツニカマイシン刺激後などの小胞体ストレス応答にて GADD34 は誘導されるが、ケルセチン処理のみでも GADD34 の転写が誘導されることがわかった。

( 4 ) 転写因子 ATF4 の翻訳は、リン酸化 eIF2 発現量に依存する。小胞体ストレス刺激 ( ツニカマイシン処理 ) により eIF2 がリン酸化され、特異的に ATF4 mRNA が翻訳されるため ATF4 タンパク質は増加する。しかし、ケルセチン処理によりその濃度依存的に ATF4 発現量は抑制された。

( 5 ) 野生型加齢マウス ( 生後 2 年 ) と若いマウス ( 生後 2 ヶ月 ) の脳におけるリン酸化 eIF2 発現をウエスタンブロットにて比較検討した。加齢マウスにおいて、リン酸化 eIF2 発現の有意な増加を認めた ( 図 1 )。これは、加齢に伴う小胞体ストレスの活性化または eIF2 特異的な脱リン酸化関連遺伝子 ( GADD34 および CREP ) の機能低下が示唆される。

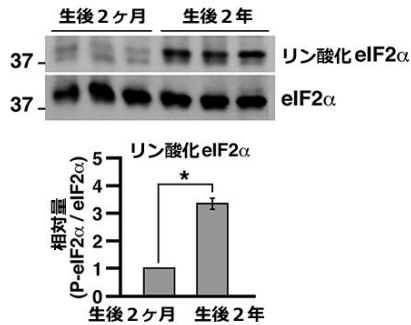


図 1 マウス脳におけるリン酸化 eIF2 発現

(6) アルツハイマー病モデルマウス (APP23) と野生型マウスの脳において、リン酸化 eIF2 と転写因子 ATF4 の発現量を比較検討した。APP23 脳において、明らかにリン酸化 eIF2 と ATF4 の発現量の増加を認められた (図 2)。この結果は、加齢に伴うリン酸化 eIF2 発現増加がより早期に見られ、脳内の小胞体ストレス及び小胞体ストレス応答の異常が示唆される。

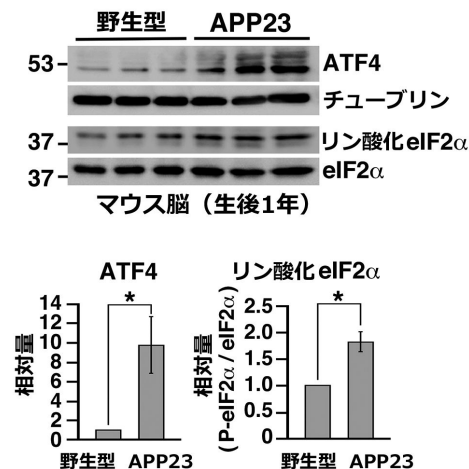


図 2 アルツハイマー病モデルマウス (APP23) における ATF4 とリン酸化 eIF2 の増加

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計 6 件)

- Masashi Ueda, Shimo Li, Masanori Itoh, Yoshika Hayakawa-Yano, Miao-xing Wang, Miki Hayakawa, Ryoko Hasebe-Matsubara, Kazunori Ohta, Eri Ohta, Akihito Mizuno, Yoko Hida, Munekazu Matsumoto, Huayue Chen, Toshiyuki Nakagawa. Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading to caspase-7 activation through Bax. *Biochem Biophys Res Commun.* 443:1232-1238, 2014. 査読有
- Xujun Han, Yuh Shiwa, Masanori Itoh, Tohru Suzuki, Hirofumi Yoshikawa, Toshiyuki Nakagawa, Hiroko Nagano. Molecular cloning and sequence analysis of an extracellular protease from four bacillus strains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 870-873, 2013. 査読有
- Shimo Li, YoshikaHayakawa-Yano, MasanoriItoh, MasashiUeda, Kazunori Ohta, YoshihiroSuzuki, AkihitoMizuno, EriOhta, YokoHida, Miao-xing Wang, ToshiyukiNakagawa. Olfaxin as a novel Prune2 isoform predominantly expressed in olfactory system. *Brain research* 1488, 1-13, 2012. 査読有
- Ohta K, Mizuno A, Li S, Itoh M, Ueda M, Ohta E, Hida Y, Wang MX, Furoi M, Tsuzuki Y, Sobajima M, Bohmoto Y, Fukushima T, Kobori M, Inuzuka T, Nakagawa T. Endoplasmic reticulum stress enhances -secretase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 416: 362-366, 2011. 査読有
- 太田和徳, 中川敏幸. 認知症. *Functional Food.* 5: 47-51, 2011 査読無
- 太田和徳, 中川敏幸. ケルセチンとアルツハイマー病. *Functional Food.* 5: 135-138, 2011 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Masanori Itoh, Eri Ohta, Yoko Hida, Miao-xing Wang, Masashi Ueda, Kazunori Ohta, Shimo Li, Akihito Mizuno, Tomomi Sunayama, Toshiyuki Nakagawa.  
CUL4B PROMOTES APAF-1 POLYUBIQUITINATION FOR CASPASE-9 ACTIVATION.  
Cold Spring Harbor Asia. Suzhou ( 宿州 ) China. April 16, 2013.
2. Kazunori Ohta, Akihito Mizuno, Shimo Li, Masanori Itoh, Masashi Ueda, Yoko Hida, Miao-xing Wang, Wan-yu Lo, Toshiyuki Nakagawa.  
Activation of gamma-secretase by endoplasmic reticulum stress.  
42nd ANNUAL MEETING Neuroscience.  
New Orleans, USA, Oct 15, 2012.
3. Kazunori Ohta, Akihito Mizuno, Shimo Li, Masashi Ueda, Masanori Itoh, Eri Ohta, Yoko Hida, Miao-xing Wang, Manabu Furoi, Yukihiro Tuzuki, Mituaki Sobajima, Yoshimasa Bohmoto, Tatsuya Fukushima, Toshituki Nakagawa. Endoplasmic reticulum stress leads to increase gamma-secretase activity and beta-amyloid production.  
第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 3P - 701 (2011 年 12 月 15 日).
4. Masanori itoh, Shimo Li, Kazunori Ohta, Masashi Ueda, Yoko Hida, Yoshihiro Suzuki, Eri Ohta, Akihito Mizuno, Miao-xing Wang, Toshiyuki Nakagawa.  
A novel regulation mechanism of synaptic transmission by presynapse-localizing Caymanataxia-related protein, Caytaxin.  
第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 1 P-0921 (2011 年 12 月 13 日).
5. S.LI, M.ITOH, K.OHTA, M.UEDA, A.MIZUNO, E.OHTA, Y.HIDA, M.WANG, K.YAKEUCHI, T.NAKAGAWA.  
The expression and localization of Prune2 and its novel isoform in the central nervous system.  
41<sup>th</sup> ANNUAL MEETING Neuroscience2011, Washington DC, USA (Nov.12, 2011).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~neurobio/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中川 敏幸 (NAKAGAWA, Toshiyuki)  
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 00271502