

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570129

研究課題名(和文) 生体を模倣する試験管内アミロイド線維形成反応系の構築

研究課題名(英文) Development of in vitro amyloid fibril formation systems that mimic the physiological fibrillogenesis conditions in vivo

研究代表者

長谷川 一浩 (Hasegawa, Kazuhiro)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60324159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内でのアミロイド線維形成機構を解明する為に、生体内環境を模倣した試験管内線維形成系を構築し解析した。アルツハイマー病 アミロイド(A $\beta$ )線維の重合核形成の際に、気液界面を排除し低濃度A $\beta$ ペプチドを添加し、蛋白質をコートしたセファロースビーズを攪拌子として反応させることで、自発的な核形成を抑えた重合反応系を構築した。これを用いて、ある種の細胞外マトリックス成分がA $\beta$ 線維の形成を促進することを示した。A $\beta$ 線維の重合反応を更に生理条件に近づけるため、反応セルに低濃度のA $\beta$ ペプチドを連続的に供給して重合させる開放型の反応系を試作した。

研究成果の概要(英文)：We constructed several amyloid fibril formation systems in vitro to evaluate the roles of the various biological molecules or reaction conditions in the amyloid fibril formation. The key findings of this study are as follows: (1) We developed a near-physiological Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) fibril formation system for evaluating the efficiency of protein components to induce the nucleation of A $\beta$ -peptide. To suppress spontaneous A $\beta$  nucleation, the system includes protein coated Sepharose beads and low concentration of A $\beta$  peptide solution without air in the reaction vessel. Using the system, we indicated several basement membrane components accelerate A $\beta$  fibril formation in vitro. (2) To further decrease the concentration of A $\beta$  peptide in the reaction, we are developing an open flow system, where near physiological concentrations of A $\beta$  peptide are continuously supplied to the reaction surface.

研究分野：生物科学

キーワード：蛋白質 脳神経疾患 病理学 アミロイド アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) アミロイド線維形成機構の研究状況

蛋白質は一般に自ら折れ畳み、機能型天然構造を形成するのに対し、ある種の蛋白質は細胞内外で凝集体を形成し、神経変性疾患やアミロイド症などの難治性疾患を引き起こす。このうちアミロイドは、20種類を超える前駆体蛋白質モノマーが異常な立体構造をとり、幅 10-20 nm の線維として凝集し細胞外に蓄積したものである。われわれは、アルツハイマー病  $\beta$  アミロイド(A $\beta$ )および  $\beta$ 2-ミクログロブリン( $\beta$ 2-m)アミロイド(透析アミロイド)等の各種アミロイドについて、試験管内における前駆体蛋白質(A $\beta$  ペプチド,  $\beta$ 2-m)からのアミロイド線維形成反応系を開発してきた。これらを用いて線維形成反応が、重合核形成過程とそれに続く線維伸長過程より構成される、重合核依存性重合モデルで説明できることを示してきた。さらに、核形成・線維伸長・線維安定化の各過程において前駆体蛋白質・線維と様々な生体分子・有機化合物との分子間相互作用が重要な役割を果たすこと、また、各過程がアミロイド毎に特徴的な挙動を示すことを示してきた。

### (2) 課題：アルツハイマー病 $\beta$ アミロイド線維形成機構の解析

アルツハイマー病  $\beta$  アミロイドの前駆体蛋白質である A $\beta$  ペプチドは、脳実質に蓄積しアルツハイマー病の原因になるとされているほか、脳血管、特にその基底膜にもアミロイドとして蓄積し出血を引き起こす(脳アミロイドアンギオパシー)。脳脊髄液中の A $\beta$  ペプチド濃度は nM オーダーと低いため、A $\beta$  線維形成には細胞膜や細胞外マトリックスなどの成分が関わると考えられる。この生体因子を探索する試験管内実験系の構築を試みた。A $\beta$  モノマーは試験管内の中性 pH 緩衝液中でインキュベートすると自発的に核形成し線維を形成する。この際、核形成過程が律速段階になっている(つまり、重合核が形成されない限り、線維は形成されない)ところが、現在用いられている試験管内重合反応系では、高濃度の A $\beta$  ペプチド(10-100  $\mu$ M) を、気液界面の存在する状況で反応させることが一般的である。一方、われわれは最近、A $\beta$ 1-40 ペプチドを自発的に重合させる際に、10  $\mu$ M 以上では気液界面がなくても A $\beta$  単独で重合すること、5  $\mu$ M 以下では気液界面が極めて強く核形成を誘起し、界面に最初にアミロイドが形成されることを見出した(A. Morinaga, K. Hasegawa, et al, Critical role of interfaces and agitation on the nucleation of A $\beta$  amyloid fibrils at low concentrations of A $\beta$  monomers, Biochim. Biophys. Acta. 1804 (2010) 986-995. )。これを回避するために気液界面をなくすと、攪拌子を用いて攪拌しないと重合しなくなるが、プラスチックなどの疎水性の高い攪拌子を用いると、その疎水性表面で核形成してしまう。そこで、核形成を誘起しにくい攪拌子を見出

して反応系を再構築する必要が生じたため、本研究において実行した。そして、従来の高濃度 A $\beta$  ペプチドを用いた反応系を用いて、生体分子による重合核形成を評価しようとすると、上記の各種の要因が核形成を促進してしまい、細胞外マトリックス成分をはじめとした生体分子による比較的弱い核形成誘起効果をマスクしてしまっている可能性があることが示された。

### (3) 課題：透析アミロイドーシス

長期血液透析の合併症である  $\beta$ 2-m アミロイドの試験管内線維形成反応では、核と  $\beta$ 2-m を中性 pH の溶液中で混合しただけでは線維に組み込まれない。伸長するためには  $\beta$ 2-m が部分的に変性する必要があり、生体内因子としては遊離脂肪酸やリゾリン脂質が試験管内でこの作用を有することを示した。今後、生理的な反応機序を解析する必要がある。また他のアミロイド共存物質、例えばプロテオグリカン等が相乗効果を示すかどうかを探索する必要がある。

## 2. 研究の目的

難治性疾患であるアミロイド症を引き起こす各種アミロイド線維、特にアルツハイマー病  $\beta$  アミロイドおよび  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド(透析アミロイド)の形成機構を解析する。これまでの研究により、アミロイド線維形成反応が重合核依存性重合機構に従い、重合核形成が律速過程であること、線維形成過程において前駆体蛋白質・線維と様々な生体分子・有機化合物との相互作用が重要であることを示してきた。本研究では、生体内環境を忠実に模倣した試験管内アミロイド線維重合反応系を構築する。これを用いて生体内での線維形成機構を解明し、また、アミロイド症の治療法の開発を試みる。特に A $\beta$  では生理濃度に近づけるためにモノマー濃度を低下させた場合、重合には界面と攪拌が必須であることが判明した。生体内でこの役割を果たす成分・界面構成物質を探索検討し、生体内でのアミロイド線維形成に必須の反応機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) A $\beta$ ペプチドの閉鎖型の重合反応系の改良と核形成を誘起する生体因子の探索

これまでの研究により、A $\beta$  ペプチドの試験管内重合反応において、従来一般的に用いられてきた条件が、自発的な核形成をもたらすことが判明した。A $\beta$  ペプチドが、反応容器の気液界面で核形成する為、キャップを工夫することにより反応容器から空気を無くした。また、A $\beta$  ペプチド濃度が 10  $\mu$ M 以上では、気液界面が無くても自発的に核形成してしまうため、5  $\mu$ M 以下にした。さらに、核形成を誘起しにくい攪拌子として、NHS 活性化セファロースを見出し、そこに細胞外マトリクス成分蛋白質等を固定することで、生体因

子による低濃度 Aβ の重合核形成促進を検出できる反応系を構築した。重合したアミロイド線維の検出には、アミロイド線維に特異的に反応する蛍光物質であるチオフラビン T を用いた。

(2) Aβ ペプチドの開放型の重合反応系の構築  
上記閉鎖反応系では、Aβ ペプチドの濃度を 5 μM 以下にすることは難しい。そこで、反応容器を各種検討し、さらにその反応容器に低濃度の Aβ ペプチド溶液を連続的に添加することで、反応容器内での累積 Aβ ペプチド量を増加させ、低濃度でも重合反応を生じさせることのできる開放型反応系を試作した。

#### 4. 研究成果

(1) Aβ 線維形成を誘起する生体因子を探索する為の、試験管内反応系の構築、ならびに、生体因子の探索結果 (研究業績 文献 2)  
本研究では老人斑のみならず、脳アミロイドアンギオパチーに関わる β アミロイドも視野に入れ、Aβ1-40 ペプチドによるアミロイド線維形成について検討を行った。上述のように、Aβ 線維形成の重合核形成を誘起する生体因子を探索することを目標とした。生体因子による核形成誘起能は比較的弱いことが予想される。これらの重合核形成誘起能を正確に評価するためには、試験管内重合反応系自体に存在する、比較的強い重合誘起因子を探して除去する必要がある。これまでの研究により、反応容器に存在する気液界面、10 μM 以上の濃度の Aβ1-40 が自発的な核形成を誘起することを見出し、反応容器を工夫し気泡を完全に排除した。また、Aβ ペプチドを 5 μM 以下にして、自発的には重合しないよう改良している。

一方、気液界面を無くしたことにより、攪拌子を用いて反応させる必要が生じたが、それ自体が核形成を誘起しにくい攪拌子を用いる必要がある。本研究では、このような攪拌子の探索から開始した。その結果、N-ヒドロキシスクシンイミド活性化セファロースビーズが誘起能が弱く、また蛋白質等の高分子のアミノ基を用いて固定できるため最適であることを見出した。さらに反応系に脳脊髄液中での生理濃度である 0.2-0.3 mg/ml の血清アルブミン(HSA)を添加することで、非特異的な核形成が抑制されることを見出した。このようにして、ビーズに細胞外マトリクス成分蛋白質等を固定し、アミロイド線維に特異的な蛍光物質チオフラビン T と HSA を添加し、回転攪拌(1 rpm)しながら反応させることで、生体因子による低濃度 Aβ ペプチド(5 μM 以下)の重合核形成促進を検出できる反応系を構築した。重合の検出には、蛍光マイクロプレートリーダーと蛍光実体顕微鏡による凝集像の検出を併用した(図 1)。また、“重合を開始する時間”を指標とする Kaplan-Meier 生存時間分析を用いて、重合の促進を統計的に解析した。その結果、蛋白質を固定

しない攪拌子では重合に数日以上かかるが、基底膜モデルである Matrigel を固定した攪拌子では 1-2 日以内で重合を開始した(図 2)。Matrigel の構成成分でもある、基底膜成分；ラミニン、フィブロネクチン、IV 型コラーゲンでも重合を促進した。

〔位置づけとインパクト〕

従来の報告では、ラミニンなどは重合を抑制するとされていた。これらの報告では、従来型の高濃度 Aβ を気液界面存在下で重合させる反応系が用いられていた。反応系の改良により、比較的弱い生体因子の核形成誘起能を正確に評価できるようになったと考えている。また、気液界面による重合は 1 日以内に生じ、生体因子に先行するために効果判定を妨げることが改めて示された。

〔今後の展望〕

以下に述べるように、脳内の Aβ 濃度は 1 nM オーダーであり、改良型の反応系であってもまだ高濃度であり、これより反応濃度を低下させるためには改良が必要である。

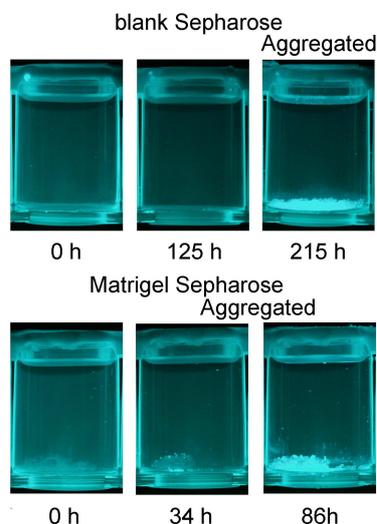


図 1. 反応セル内のセファロースビーズ表面でのアミロイド線維形成(蛍光顕微鏡像)の例。

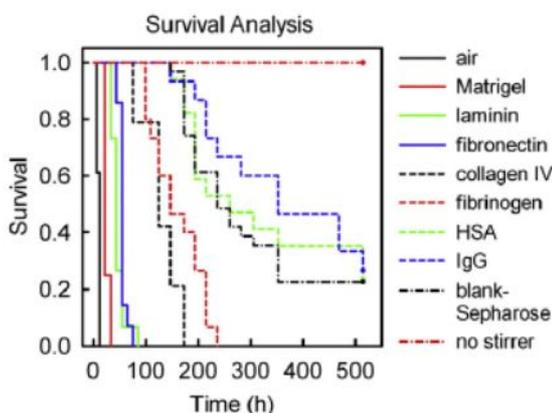


図 2. 細胞外マトリクス成分によるアミロイド線維形成促進；生存時間分析。

(2) 生体条件にさらに近づけた、開放型の A $\beta$  線維試験管内重合反応系の構築の試み  
脳脊髄液中での A $\beta$  ペプチド濃度は 1 nM オーダーである。また、脳内では、細胞によって産生された A $\beta$  ペプチドが長時間にわたって、老人斑の沈着局所である脳実質や、血管壁に連続的に供給され、また、流出していると考えられる。即ち、生体内においては、開放型の反応が生じていると考えられる。従来の反応系は、一定量の A $\beta$  ペプチドを容器に添加して、そのまま最後まで反応させる閉鎖型の反応系であり、このために濃度を低下させると重合を観測できなかった可能性が高い。実際に上記の閉鎖型反応系で検出できる A $\beta$  ペプチドの濃度を検討したが、1  $\mu$ M 程度以下にはできないことが判明した。そこで、更に低濃度の A $\beta$  ペプチド濃度で重合反応を行わせる系の構築を試みた。反応局所へ A $\beta$  ペプチドを連続的に送液する開放型反応系を作成するために、反応容器、送液システム、定量検出系の組み合わせを検討し、試作型反応系を構築した。この開放型反応系を用いると、最も低い場合で 0.1  $\mu$ M オーダーの A $\beta$  ペプチドの伸長反応を観察できる可能性がある。尚この反応系では、脳脊髄液中の生理濃度の血清アルブミンを吸着防止剤として添加している。A $\beta$  ペプチドと血清アルブミンの結合平衡を考慮すると、遊離の A $\beta$  ペプチドのみが重合に関与している可能性が考えられる。以前に、A $\beta$  ペプチド単独で線維の伸長が観測できる最低濃度である臨界モノマー濃度を測定したところ、約 20 nM であった (Hasegawa K, et al., Biochemistry 41, 13489-13498, 2002)。今回 HSA 共存下で線維伸長が観測できる最低 A $\beta$  濃度の際の計算上の遊離 A $\beta$  濃度は、臨界モノマー濃度に近いと推定される。今後更に確認と詳細な検討を進める。

#### 〔位置づけとインパクト〕

上記のように、重合に用いる A $\beta$  ペプチド濃度を低下させることで、生理的条件下での生体分子間の相互作用を直接評価できる可能性がある。この反応系を用いることで、生体内において重要な因子を同定することができ、生体内における複雑な生体因子間相互作用を含む反応をより正確に再現することが可能になると考えられる。

#### 〔今後の展望〕

アルツハイマー病や脳アミロイドアンギオパチーの治療法開発を最終目標として、生理条件に近い  $\beta$  アミロイド線維の重合反応系の開発を続ける予定である。

### (3) 透析アミロイドーシスの線維形成機構の解析

$\beta$ 2-m アミロイドでは、前駆体蛋白質である  $\beta$ 2-m は、天然状態の構造のままではアミロイド線維に組み込まれず、何らかの部分変性が必要であることが判明している。 $\beta$ 2-m の変性中間体を形成する因子が線維の形成・伸長を促進する鍵になると考えられる。生体内に存

在する物質としては遊離脂肪酸とリゾリン脂質にこの変性作用があることが示されており、因子の候補として考えられる (Hasegawa K, et al., Biochem J. 416(2): 307-315, 2008. Ookoshi T, Hasegawa K, et al., Nephrol Dial Transplant. 23(10): 3247-3255, 2008)。

本研究では研究期間の最初に、これらの因子のほかに、疎水性表面などの因子が、タンパク質部分変性を生じさせることで線維を伸長させるかどうかを検討した。 $\beta$ 2-m アミロイド線維を担体に固定化し、そこに  $\beta$ 2-m モノマーを変性因子と共存させて連続的に添加するという  $\beta$ 2-m アミロイド線維形成の開放型反応系の構築を試みた。しかし、この時点では十分な安定性が得られず、検討を保留した。その後、本研究において開放型の A $\beta$  線維試験管内重合反応系の開発過程で得られた知見を応用することで、この安定性の問題を解決できる可能性があり、今後再検討を行うことも考えている。

$\beta$ 2-m の変性中間体を直接検出する方法を開発する為、部分変性  $\beta$ 2-m を検出するプローブの作成を計画した。しかし、不安定化因子により立体構造が変化する  $\beta$ 2-m の部位が、核磁気共鳴法等によっても特定できておらず検出方法を絞り込むことが難しい。そのため、アミロイド線維形成の際に構造変化する領域を特定せずに、その構造変化を検出する一連の立体構造認識特異抗体等を、全領域にわたって作成することも計画したが、コスト等の問題により、現段階では一旦保留した。

#### 〔今後の展望〕

今後、既存の  $\beta$ 2-m 変異体、例えば、トリプトファンを導入した変異体を利用するなどの方法を検討する。これにより、脂肪酸やリゾリン脂質によるアミロイド線維形成機構を解析する。また、既存の部分変性因子の他に、例えば沈着局所の細胞外マトリクス成分(プロテオグリカン等)や界面活性物質が部分変性効果や線維形成の相乗効果をもたらすかどうかを、既に構築した試験管内  $\beta$ 2-m アミロイド線維伸長反応系を用いて探索する。

### (4) まとめ

上記のように、アルツハイマー病  $\beta$  アミロイド線維に関して、A $\beta$  線維形成を誘起する生体因子を探索する為の試験管内反応系の構築、ならびに、生体因子の探索、生体条件にさらに近づけた開放型の A $\beta$  線維試験管内重合反応系の構築の試みを行った。また、透析アミロイドーシスの線維形成機構の解析を行った。今後、これらの複数のアミロイド線維に関する結果をお互いにフィードバックしながら、アミロイド線維形成の全容を解明し、予防・治療法の開発につなげることを目指す。

## 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3件)

J.Sawashita, B.Zhang, K.Hasegawa, M.Mori, H.Naiki, F.Kametani, K.Higuchi. C-terminal sequence of amyloid-resistant type F apolipoprotein A-II inhibits amyloid fibril formation of apolipoprotein A-II in mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読あり, 112(8), 2015, E836-E845, DOI: 10.1073/pnas.1416363112.

内木 宏延, 長谷川 一浩, 小澤 大作, 大越 忠和, ヒトアミロイド線維形成・沈着の分子機構, Dementia Japan, 審査無, 28(3), 2014, 275-282.

Hasegawa K, Ozawa D, Ookoshi T, Naiki H. Surface-bound basement membrane components accelerate amyloid- $\beta$  peptide nucleation in air-free wells: An in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. Biochim Biophys Acta, 査読あり, 1834(8): 2013, 1624-1631. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.011.

〔学会発表〕(計8件)

大越 忠和, 山口 格, 小澤 大作, 長谷川 一浩, 内木 宏延, 滑膜線維芽細胞に対する  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の細胞毒性メカニズムの解析。第2回日本アミロイドーシス研究会学術集会、アミロイドーシスの新規治療への挑戦。2014.08.22, KKR ホテル東京 (東京都千代田区)。

T.Ookoshi, D.Ozawa, K.Hasegawa, H.Naiki, A novel cytotoxic mechanism of amyloid fibrils: Endocytosis-dependent necrosis and apoptosis of rabbit synovial fibroblasts by  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibrils. XIVth International Symposium on Amyloidosis, Amyloid: Insoluble, but Solvable, 2014.4.27-5.1, Indianapolis (USA),

大越 忠和, 長谷川 一浩, 小澤 大作, 内木 宏延,  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維は滑膜線維芽細胞内に取り込まれ毒性を発揮する-形態解析を中心に-, 第103回日本病理学会総会, 2014.04.24-26, 広島国際会議場 (広島市)。

長谷川 一浩, 小澤 大作, 大越 忠和, 内木 宏延, ビーズ表面に結合した細胞外マトリクス成分は、気液界面非存在下でアルツハイマー病  $\beta$  アミロイド線維の核形成を促進させる, 日本生物物理学会第51回年会, 2013. 10.28-30, 京都国際会議場 (京都)。

大越 忠和, 長谷川 一浩, 小澤 大作, 内木 宏延,  $\beta$ 2-ミクログロブリンアミロイド線維の線維芽滑膜細胞に対する細胞毒性の検討, 第102回日本病理学会総会, 2013.6.6-8,, ロイトン札幌 (札幌)。

澤下仁子, 張 蓓茹, 亀谷富由樹, 長谷川 一浩, 森 政之, 内木宏延, 樋口京一: マウス F 型 apoA-II の C 末ペプチドは老化アミロイドーシス高発症マウスのアミロイド沈着を軽減する。第27回老化促進モデルマウス

(SAM) 研究協議会, 2012. 7.6-7, 東京大学 (東京)。

小澤大作, 長谷川一浩, 李 映昊, 櫻井一正, 柳 浩太郎, 大越忠和, 後藤祐児, 内木宏延: 細胞外シャペロンによるアミロイド線維形成抑制機構の解明。第12回日本蛋白質科学会年会, 2012.6.20-22, 名古屋国際会議場 (名古屋)。

Ozawa D, Hasegawa K, Ookoshi T, Naiki H: Molecular mechanisms of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid fibril formation. XIIIth International Symposium on Amyloidosis, 2012.5.6-10, Groningen (the Netherlands)。

〔図書〕(計0件)

該当無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当無し

○取得状況(計0件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 一浩 (Hasegawa, Kazuhiro)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 60324159

(2)研究分担者

内木 宏延 (Naiki, Hironobu)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号: 10227704

(3)連携研究者

該当無し