

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800015

研究課題名(和文)アルツハイマー病アミロイドオリゴマーの代謝機構及び神経細胞障害性に関する研究

研究課題名(英文)Study for the metabolism and neurotoxicity of amyloid beta peptide oligomers

研究代表者

橋本 唯史 (Hashimoto, Tadafumi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：30334337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病アミロイドオリゴマー(A $\beta$ )の脳内代謝を解明するため、1,000 kDaカットオフ微小透析膜プローブを用いたin vivo 微小透析膜実験法を樹立した。APP tgマウス脳海馬において検討したところ、アミロイド斑蓄積前に比べ、アミロイド蓄積後にA $\beta$ の代謝速度が遅くなることが分かった。また老人斑結合タンパク質CLAC tgとAPP tgの二重tgマウスでは脳間質液中のA $\beta$ 濃度が低下することが分かった。この結果から老人斑がA $\beta$ の代謝に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらにsplit-luciferaseを用いA $\beta$ とapoEの結合を簡便に高感度に測定可能な実験系を樹立した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of the metabolism of amyloid beta peptide (A $\beta$ ) oligomers in the brain, we have developed in vivo microdialysis technique using a 1,000 kDa cut-off microdialysis probe. Using this technique, we identified that the clearance rate of A $\beta$  in the brain of plaque-bearing APP transgenic mice was significantly slower than that in the brain of plaque-free APP transgenic mice. We also identified that the level of ISF A $\beta$  in the brain of APP / CLAC double transgenic mice was significantly lower than that of APP transgenic mice. These observations suggested that amyloid plaque affect the metabolism of A $\beta$  monomer and oligomers in the brain. We have also developed an easy and high-sensitive method to evaluate the interaction between A $\beta$  and apoE using a split-luciferase complementation assay.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳神経疾患 神経科学 アルツハイマー病 アミロイド タンパク質 アポリポroteinE

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は認知症を殊勝状とする進行性の神経変性疾患である。近年AD発症機構として amyloid  $\beta$  peptide (以下A $\beta$ )の凝集課程の中間体で、可溶性A $\beta$ オリゴマーが神経細胞に障害性を与え、その結果認知機能低下、さらにADを引き起こすと考えられるA $\beta$ オリゴマー仮説が提唱された。しかし、A $\beta$ オリゴマーが脳内でのどのようにして形成されるか、さらにA $\beta$ オリゴマーがどのようにして神経細胞死を引き起こすか、そのメカニズムは全く不明であった。

アポリポ蛋白E (apoE)には apoE2, apoE3, apoE4の3つの遺伝多型が存在し、そのうち apoE4はADの最も強い遺伝的発症危険因子であることが知られている。しかし apoE4がどのようなメカニズムでAD発症を引き起こすかは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、A $\beta$ オリゴマーの形成課程、さらに神経細胞障害性を与える分子機構を解明することを目的とし、特に1) A $\beta$ 結合タンパク質 apoE 及び CLAC が A $\beta$ オリゴマーの代謝に及ぼす影響を明らかにする。2) どのような分子種の A $\beta$ オリゴマーがどのような機構で神経細胞障害性を与えるか明らかにすることに焦点を絞り研究を行った。

### 3. 研究の方法

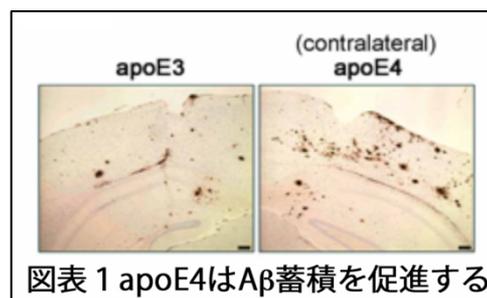
脳内 A $\beta$ オリゴマー量は極めて少なく、その動態を明らかにすることは困難であった。本研究では脳内の A $\beta$ オリゴマーの動態を解明するため、新たに 1,000 kD カットオフの微小透析膜プローブを AD モデルマウスである APP トランスジェニック (tg)マウス脳海馬に埋め込み、脳間質液中の物質動態をモニターする *in vivo* 微小透析膜法の開発し、利用する。また、脳内に A $\beta$ オリゴマーを注入し、A $\beta$ の蓄積を評価する *in vivo* seeding 実験を行い、apoE、CLAC の A $\beta$ 線維化への影響を *in vivo* レベルで評価する。さらに神経細胞に A $\beta$ オリゴマーを投与し、dendritic spine の減少を評価することにより、A $\beta$ オリゴマーの神経細胞障害性について解明する。

### 4. 研究成果

(1) apoE4 は A $\beta$ の protofibril から fibril への変換を促すことにより A $\beta$ のアミロイド蓄積を促進することを明らかにした。

ApoE4 はこれまでに A $\beta$ オリゴマー形成をアイソフォーム特異的に促進することを見いだした(Hashimoto, J. Neurosci., 2012)。A $\beta$  protofibril は A $\beta$ 凝集中間体で、A $\beta$ オリゴマーの一つである。本研究ではこれまでに樹立した *In vitro*において A $\beta$ の protofibril 及び fibril 形成を測定する実験系 (Hori, Hashimoto, J. Biol. Chem., 2007) を使い、apoE がアイソフォーム特異的に A $\beta$  protofibril 形成にどのような影響を与える

か *in vitro* で検討した。その結果、apoE2, apoE3 は A $\beta$ の protofibril から fibril 形成を抑制するが、apoE4 にはその効果が少ないことが分かった。次に A $\beta$  protofibril を用い、A $\beta$  protofibril を APP tg マウス脳に注入し、アミロイド形成を促す *in vivo* seeding 実験系を樹立した。そして A $\beta$  protofibril と apoE の複合体を APP tg マウス脳に注入したところ、apoE4 は他 apoE アイソフォームに比べ、A $\beta$ 蓄積を促進することが確かめられた(図表 1、論文投稿準備中)。これらの結果は apoE4 が A $\beta$  protofibril から fibril への形成を促し、アミロイド蓄積を促進することにより AD 発症に関与する可能性を示唆するものである。



図表 1 apoE4はA $\beta$ 蓄積を促進する

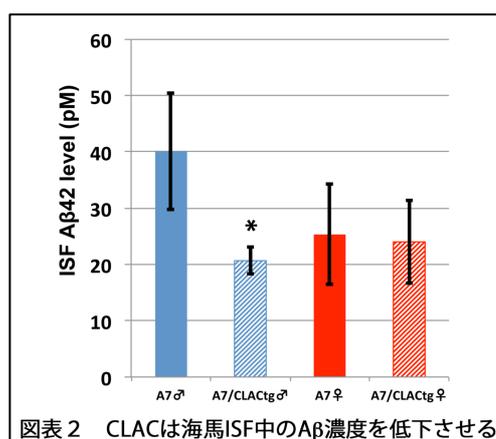
(2) 1,000kDa cut-off 微小透析膜プローブを用いた脳間質液中 A $\beta$ 測定技術の開発

脳内 A $\beta$ オリゴマーの動態を解明するため、1,000kDa cut-off 微小透析膜プローブを APP tg マウス脳に挿入し、ISF サンプルを回収、A $\beta$ 特異 ELISA を用いて A $\beta$ 濃度を測定し、ISF 中の A $\beta$ の測定に成功した。そこで A $\beta$ 産生を阻害する  $\gamma$ -secretase 阻害剤である compound E を投与したところ半減期約 1 時間で ISF 中 A $\beta$ 濃度が低下することがわかり、さらに compound E を除くことで、A $\beta$ が増加することがわかり、*in vivo* レベルで A $\beta$ のクリアランスを測定することが可能となった。そこで、本実験系を用いてアミロイド斑形成前の若齢 APP tg マウスとアミロイド斑形成後の高齢 APP tg マウス間で A $\beta$ クリアランス速度を測定したところ、アミロイド斑形成後の APP tg マウスでは A $\beta$ クリアランスが低下していることが明らかになった。近年 AD 患者において、放射性同位体アミノ酸を用いた解析から、AD 患者では A $\beta$ のクリアランスが低下していることが報告された (Mawuenyega, Science, 2010)。今回の結果は AD 患者での知見を支持するものである。

(3) CLAC は脳幹質液中の A $\beta$ 濃度を低下させることを見いだした

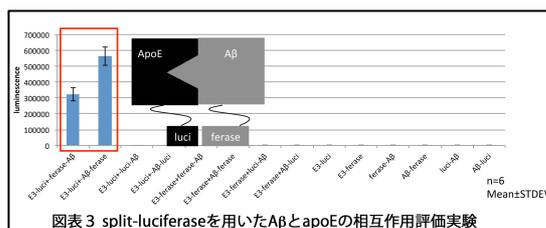
CLAC は老人斑アミロイド構成因子であり、線維化した A $\beta$ と特異的に結合する (Hashimoto, EMBO J, 2002)。またこれまでに CLAC を神経細胞に過剰発現させた APP tg マウスでは、びまん性の A $\beta$ 蓄積が消失し、代わりにコンパクトな形状の A $\beta$ 蓄積が増加することが明らかになっていた(論文投稿準備中)。

備中)。しかしそのメカニズムは不明であった。(2)で開発した *in vivo* 微小透析膜法を用いて CLAC が  $A\beta$  クリアランスに与える影響について検討した。その結果 CLAC/APP 二重 tg マウスでは APP tg マウスに比べ、♂マウスにおいて脳間質液中  $A\beta$  が低下することが分かった (図表 2、未発表データ)。これまでの検討から CLAC は  $A\beta$  産生に影響を与えないことから、CLAC による  $A\beta$  蓄積様式の変化は脳内  $A\beta$  クリアランスに影響を与えていることを示唆する知見である。なお、本検討で ♀マウスでは違いが認められなかった。これは APP tg マウスでは既に十分の内因性 CLAC が蓄積しているためであると考えられ、今後さらに詳細に検討する。



(4) apoE と  $A\beta$  の結合を評価する新規測定技術の開発

(1)の検討から  $A\beta$  と apoE の相互作用は  $A\beta$  のオリゴマー化、凝集、蓄積に重要な影響を与えていると考えられる。そこで、両者の結合を阻害することを目的として、apoE と  $A\beta$  の相互作用を評価する実験系の樹立を行った。apoE のアミノ末端に *Gaussia luciferase* のアミノ末端を、 $A\beta$  のアミノ末端に *Gaussia luciferase* のカルボキシ末端を融合させた cDNA を作成し、HEK293 細胞に共遺伝子導入した。その培養上清を測定したところ、両者を遺伝子導入させた場合にのみ luciferase の発光が確認された (図表 3)。またこの培養上清をゲルろ過カラムで分離したところ 200 kDa 以上のサイズであったことから、apoE は lipidation を受けていることを確認した。以上の結果 apoE と  $A\beta$  の結合と特異的、簡便、かつ高感度に測定する実験系が樹立でき、今



後両者の結合を特異的に阻害する小化合物の探索を行う。

## 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 9 件)

1. RNA aptamer probes as optical imaging agents for the detection of amyloid plaques. Christian T Farrar, Christopher M William, Eloise Hudry, Tadafumi Hashimoto, Hyman BT, *PLOS One*, 9(2), e89901, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone0089901, 査読有

2. CLAC-P/collagen type XXV is required for the intramuscular innervation of motoneurons during neuromuscular development., Tomohiro Tanaka, Tomoko Wakabayashi, Hiroaki Oizumi, Shu Nishio, Takashi Sato, Akihiro Harada, Daisuke Fujii, Yuko Matsuo, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, *J. Neurosci.*, 34(4), 1370-1379, 2014, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2440-13.2014, 査読有

3. Human ApoE isoforms delivered via gene transfer differentially modulate Alzheimer's disease by affecting amyloid deposition, clearance, and neurotoxicity., Eloise Hudry, Jonathan Dashkoff, Allyson Lee, Shuko Takeda, Robert M. Koffie, Tadafumi Hashimoto, Maria Scheel, Tara Spires-Jones, Michal Arbel-Ornath, Rebecca Betensky, Beverly L Davidson, Bradley T Hyman, *Sci. Trans. Med.*, 5(212). 212ra161, 2013, DOI: 10.1126/scitranslmed.3007000, 査読有

4. RNA binding mediates neurotoxicity in the transgenic Drosophila model of TDP-43 proteinopathy., Ryoko Ihara, Koji Matsukawa, Yusei Nagata, Hayato Kunugi, Shoji Tsuji, Takahiro Chihara, Erina Kuranaga, Masayuki Miura, Tomoko Wakabayashi, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo, *Hum. Mol. Genet.*, 22, 4474-4484, 2013, DOI: 10.1093/hmg/ddt296, 査読有

5. Microfluidic chemotaxis platform for differentiating the roles of soluble and bound amyloid-beta on microglia accumulation., Hansang Cho, Tadafumi Hashimoto, Elisabeth Wong, Yukiko Hori, Levi B Wood, Lingzhi Zhao, Kevin M Daigis, Bradley T Hyman, Daniel Irimia, *Sci. Rep.*, 3, 1823. 2013, DOI: 10.1038/srep01823, 査読有

6. Brain interstitial oligomeric amyloid beta increases with age and is resistant to

clearance from brain in a mouse model of Alzheimer's disease., Shuko Takeda, Tadafumi Hashimoto, Alberto Serrano-Pozo, Allyson D Roe, Tara L Spires-Jones, Bradley T Hyman, **FASEB. J.**, 27(8), 3239-3248, 2013, DOI: 10.1096/fj.13-229666, 査読有

7. Neuronal activity and secreted amyloid beta lead to altered amyloid beta precursor protein and presenilin 1 interactions., Xuejing Li, Kengo Uemura, Tadafumi Hashimoto, Navine Nasser-Ghodsi, Muriel Arimon, Christina M Lill, Isabella Palazzolo, Dimitri Krainc, Bradley T Hyman, Oksana Berezovska, **Neurobiol. Dis.**, 50, 127-134, 2013, DOI: 10.1016/j.nbd.2012.10.002, 査読有

8. Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid beta peptide., Tadafumi Hashimoto, Alberto Serrano-Pozo, Yukiko Hori Kenneth W Adams, Shuko Takeda, Adrian O Banerji, Akinori Mitani, Daniel Joyner, Diana H Thyssen, Brian J Bacskai, Matthew P Frosch, Tara L Spires-Jones, Mary Beth Finn, David M Holtzman, Bradley T Hyman, **J. Neurosci.**, 32, 15181-15192, 2012, DOI:10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012, 査読有

9. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system., Hwan-Ching Tai, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P Frosch, Tara L Spires-Jones, Bradley T Hyman, **Am. J. Pathol.**, 181, 1426-1435, 2012, DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.06.033, 査読有

[学会発表] (計 24 件)

1. Tadafumi Hashimoto, Hayato Kunugi, Koji Matsukawa, hirokazu Uchigami, Ryoko Ihara, Takahiro Chihara, Masayuki Miura, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Two distinct pathways leading to degeneration in transgenic Drosophila melanogaster overexpressing human FUS. Alzheimer's Association International Conference July 14, 2013, Boston, USA

2. Tadafumi Hashimoto, Daisuke Fujii, Mayu Kashiwagi, Yuko Matsuo, Yusuke Matsura, Tomoko Sakakura, Hisatomo Kowa, David Westaway, Tomoko

Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo: Remodeling of the morphology of beta-amyloid plaques by CLAC in the brains of transgenic mice. Society for Neuroscience Oct 15, 2012, New Orleans, USA.

3. Tadafumi Hashimoto, Alberto Serrano-Pozo, Yukiko Hori, Hwan-Ching Tai, Kenneth W Adams, Shuko Takeda, Daniel Joyner, Diana H Thyssen, Brian J Bacskai, Matthew P Frosch, Tara L Spires-Jones, Mary Beth Finn, David M Holtzman, Bradley T Hyman: Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid beta peptide. Gordon Research Conferences, Neurobiology of brain disorders, Aug 2012, Easton, USA

[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://www.alzforum.org/news/research-news/apoE4-promotes-av-oligomerization?id=3302>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 唯史 (HASHIMOTO, Tadafumi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師  
研究者番号 : 30334337

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者