

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290019

研究課題名(和文)アルツハイマー病の病態形成機構における細胞内/外品質管理機構の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation for role of intracellular/extracellular quality control system in pathogenesis of Alzheimer's disease

研究代表者

斉藤 貴志 (Saito, Takashi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・副チームリーダー

研究者番号：90360552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の病理形成に関わる分子機構を明らかにするために、我々が開発した次世代型ADモデルマウス(APP KI)を軸に、細胞内および細胞外のタンパク質分解・代謝制御機構に着目して、AD病理形成機構の解析を行った。その結果、旧型ADモデルマウスで得られていた結果は、多くの点で再現性が得られず、APP KIマウスではじめて新たな制御機構が存在していることが示唆された。今後、AD創薬のための新たな介入ポイントを見出せる可能性がありさらなる解析が強く望まれる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms for pathogenesis of Alzheimer's disease, we investigated a role of intracellular and extracellular quality control system in next generation AD mouse models, Amyloid precursor protein (APP) knockin (KI) mice, which we developed. The results taken by using existed AD mouse models which were APP overexpressing model in almost case could not be reproduced by using APP KI mice due to artifacts of APP overexpressing mouse models. Thereby, APP KI mouse models would be new world standard model for AD research community and be useful for elucidation of molecular mechanisms under pathogenesis of AD.

研究分野：神経科学

キーワード：脳老化 アルツハイマー病 モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

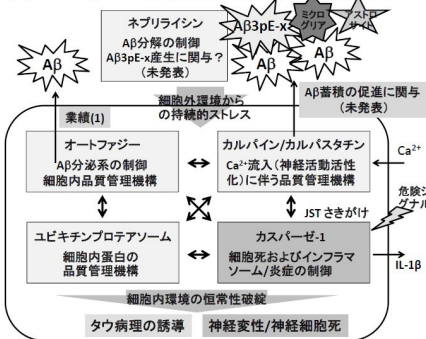
老化・加齢とは、代謝・品質管理機構の恒常性の破綻の結果おこる一つの表現型であり、加齢を最大の危険因子とするアルツハイマー病(AD)は、加齢に先立っておこる代謝・品質管理機構の制御不全や恒常性の乱れに起因していると考えられた。家族性ADは、遺伝子変異に伴うアミロイドβペプチド(Aβ)42の産生・比率の乱れ(増加)に起因しており、更にAβの神経細胞内外の蓄積に伴う細胞ストレス・機能不全を伴う悪循環を形成することで、脳細胞の代謝・品質管理機構の破綻を引き起こす可能性が示唆されていた。孤発性ADも同様に、家族性遺伝子変異という内包された主因がなくても、Aβ蓄積と加齢による長期に渡る細胞外環境からの持続的ストレスにより、脳細胞の代謝・品質管理機構の破綻を引き起こすことが十分に考えられる。特に神経細胞は、分裂後細胞であるため、体細胞系よりも品質管理機構に強く依存していることが明確である。

細胞内環境管理機構には、図1に示すように、

オートファジーやユビキチンプロテアソーム系による細胞

内のタンパク質や細胞死の制御、カルパイン(Ca<sup>2+</sup>により活性化する細胞内システインプロテアーゼ)/カルパスタチン(カルパインの内因性阻害物質)系による細胞内環境のリモデリング、そしてカスパーゼ系が関与する細胞死や炎症(インフラマソーム)を制御する系、などの時空間的制御の異なるタンパク質分解系が存在しており、細胞内環境の恒常性が保たれている。そこには、各系統間の相互作用が存在しており、各系統の単独または連動した乱れが、他の系統へ影響を及ぼしていると考えられる。そのため、各分解系の影響を個々に観察、検証を行ったとしても、統合的理解は得られないと考えられた。ADとの関連性を理解するためには、実験系の軸となる蓋然性の高いマウスモデルを構築し、そのマウスと各分解系に関連する因子の遺伝子改変マウスとの交配を行い、相互比較を行うことが必要となり、我々が開発した新規ADモデルを使用できる以前の解析では、上

図1: アミロイドβと細胞内/外環境の恒常性維持



記関連性に明確な連動性は認められず、解釈も混沌としていた。

### 2. 研究の目的

我々が開発した新規ADモデルマウスを軸に、細胞内/外環境の品質管理機構(ネプリライシン、カルパイン、オートファジー、ユビキチンプロテアソーム等の時空間制御の異なる蛋白質分解系)に関連する各因子の遺伝子改変マウスとの交配を行い、病理形成の加速・減速等の相互比較を行う。これにより、品質管理機構の破綻・正常化によるアミロイドβの制御からADの病理形態形成の分子機構について包括的に検討を行う。最終的には、究極のADモデルマウス作製のための基盤とし、新規創薬標的を見だし、ADの予防・治療・発症遅延・診断法の開発に展開することを最大の目的とする。

### 3. 研究の方法

研究計画をスムーズに遂行するために、まず、初期段階からマウスの大規模飼育を開始した。老化疾患研究において最も弊害となるのが“マウス飼育に掛かる時間”の問題であり、解析に際しては必ず若齢から老齢にかけての“マウスの加齢”による効果を検討する必要があるためである。我々が開発した、APP KI (APP(NL-F) KI および APP(NL-G-F) KI) マウス、(また KI マウスとの比較として既存の APP 過剰発現系モデルである APP23 マウスも使用) の交配相手として、ネプリライシン(NEP)-KO、カルパスタチン(Cast)-KO、コンディショナル Atg7 欠損(cAtg7-KO)マウスとの交配を行った。

これまでに自ら進めてきたADモデルマウス解析の経験に基づいて、各種交配マウスから適時(3ヶ月毎に)脳のサンプリングを行い、生化学的(高感度ELISA法、western blot法)、免疫組織化学的(ADのアミロイドβおよびタウオパチーの病理マーカーの抗体等を用いて蛍光多重染色法等)、行動学的解析(Y迷路テスト)を中心に行った。また病理変化が、実際の病理にどれだけ忠実であるかを、患者の組織サンプルを用いて比較を行った。

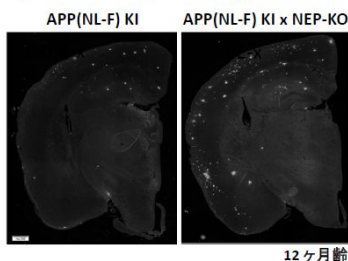
### 4. 研究成果

#### <NEP-KOマウスとの交配>

APP(NL-F)-KIマウスとNEP-KOマウスを交配した結果、以前APP23マウスとNEP-KOを交配して得られた時の結果同様に、NEP-KO群においてアミロイドβ病理の加速が

認められ、再現性が得られた。特に、毒性 A $\beta$  亜種である A $\beta$ 3pE-x が、NEP-KO 群で有意に増加することを見出した (図 2)。A $\beta$ 3pE-x 形成には、

図2: ネプリライシン欠損によるA $\beta$ 3pE-x種の蓄積亢進



グルタミンシクラーゼ (QC およびその類似酵素 isoQC) の関与が示唆されてきた。しかし、APP-KI マウスと QC および isoQC の欠損マウスとの交配を行った結果、QC、isoQC をダブルで欠損させたとしても A $\beta$ 3pE-x の産生は抑制されなかった。これは、既存の結果を覆す結果であり、今後の詳細な解析が待たれる。結果的に、NEP 欠損によりなぜ A $\beta$ 3pE-x が増加するのかという分子メカニズムの詳細については不明のままである。この説明は、毒性亜種 A $\beta$ 3pE-x の形成機構の解明は、そこに関与する分子を創薬標的として設定することが可能となるため、今後の解析が待たれる。

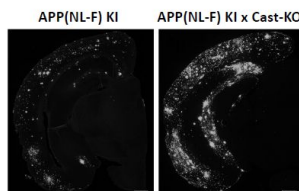
#### < Cast-KO マウスとの交配 >

以前、APP23 マウスと Cast-KO マウスの交配を行った結果、Cast-KO 群においてアミロイド病理の亢進およびタウ病理の亢進等が確認できた。さらに、APP23xCast-KO 群は、原因不明の早期致死という表現系を示した。しかし、APP(NL-F)-KI x Cast-KO マウスは、早期致死を全く示さなかった (発表論文 15)。この結果は、APP23 のような APP 過剰発現系が示す結果は、Artifact の要素が多分に含まれることを示した。さらに、APP 過剰発現マウスを用いて得られて来た結果の一部が、やはり Artifact であったことが APP(NL-F)-KI マウスを用いることで明らかとなった。具体的には、カルパインの活性化に伴う細胞内キナーゼ系 p35/p25 は、APP 過剰発現系では、細胞死を誘導する因子として重要視されていたが、APP-KI マウスの系ではその再現性は得られなかった (発表論文 4)。

一方、APP23xCast-KO マウスで認められたアミロイド病理の亢進は、APP-KI の系でも再現された (図 3)。APP(NL-F)-KI x Cast-KO マウスは、

図3: カルパイン(カルバスタテン欠損)が関与するA $\beta$ 蓄積の亢進

APP(NL-F)-KI 単独よりも、記憶学習能の低下



も認められた (発表論文 15)。これら共通事項から、細胞内プロテアーゼ：カルパイン系が細胞内での活性であるにも関わらず、細胞外のアミロイド病理に影響することが明らかとなった。ここから見出される分子メカニズムを解明することで、蓋然性高い抗病理を促す機構を解明できると期待できる。

#### < cAtg7-KO マウスとの交配 >

以前、APP23 マウスと cAtg7-KO マウスの交配を行った結果、cAtg7-KO 群において A $\beta$  の分泌低下を示し、オートファジーが A $\beta$  の分泌制御を行っている可能性が示唆されていた。また電子顕微鏡レベルの解析でも、オートファジーの不全により細胞内に A $\beta$  が溜まることが示された (発表論文 13)。一方、cAtg7-KO マウスと APP(NL-F)-KI マウスの交配においても、A $\beta$  の分泌阻害は認められ、オートファジー不全によるアミロイド病理の低下は認められた。しかし、APP23 マウスの時に示していた、細胞死の増加という表現系は再現できず、やはり APP 過剰発現系では Artifact が混在していることが明らかとなった (投稿準備中)。現状、オートファジーと AD 病理形成との関連性はまだ明確に示されていないが、これまで報告してきたように、細胞内品質管理機構は、細胞外の病理形成とも関連していることが明らかとなった。さらに、APP-KI マウスを用いることで、蓋然性高く評価できることも明らかとなり、今後、APP 過剰発現系からの実験系のパラダイムシフトを推奨・啓発することが重要であり、AD 予防・治療のための解析を加速していくことが強く望まれる。

#### 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 15 件)

1. M.Y. Batiuk, F. de Vin, S.I. Duqué, C. Li, T. Saito, T.C. Saido, M. Fiers, T.G. Belgard, M.G. Holt: An immunoaffinity-based method for isolating ultrapure adult astrocytes based on ATP1B2 targeting by the ACSA-2 antibody. *Journal of Biological Chemistry* (in press). (査読有り)
2. F.X. Guix, R. Sannerud, F. Berditchevski, A. Arranz, K. Horr , A. Snellinx, A. Thathiah, T. Saito, T. Saido, R. Sundaresan, M. Overduin, S. Kumar-Singh, E. Radaelli, N. Corthout, J. Colombelli, S. Tosi, S. Munck,

- I.H. Salas, W. Annaert, B. De Strooper: Tetraspanin 6: a pivotal protein of the Multiple Vesicular Body determining exosome release and lysosomal degradation of Amyloid Precursor protein fragments. *Molecular Neurodegeneration* 12:25 (2017). (査読有り)
3. P. Fazzari, K. Horre, A.M. Arranz, C.S. Frigerio, **T. Saito**, T.C. Saido and B. De Strooper: *PLD3* gene and processing of APP. *Nature* 541, E1-E2 (2017). (査読有り)
  4. **T. Saito**, Y. Matsuba, N. Yamazaki, S. Hashimoto and T.C. Saido: Calpain activation in Alzheimer's model mice is an artifact of APP and presenilin overexpression. *Journal of Neuroscience* 36, 9933-9936 (2016). (査読有り)
  5. K. Fujita, K. Motoki, K. Tagawa, X. Chen, H. Hama, K. Nakajima, H. Homma, T. Tamura, H. Watanabe, M. Katsuno, C. Matsumi, M. Kajikawa, T. Saito, T.C. Saido, G. Sobue, A. Miyawaki and H. Okazawa: HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 6, 31895 (2016). (査読有り)
  6. S. Veugelen, **T. Saito**, T.C. Saido, L. Chávez-Gutiérrez and B. De Strooper: Familial Alzheimer disease mutations in presenilin generate amyloidogenic A $\beta$  peptide seeds. *Neuron* 90, 410-416 (2016). (査読有り)
  7. A. Masuda, Y. Kobayashi, N. Kogo, **T. Saito**, T.C. Saido and S. Itohara: Cognitive deficits in single App knock-in mouse models. *Neurobiology of Learning and Memory* 135, 73-82 (2016). (査読有り)
  8. Y. Kizuka, M. Nakano, S. Kitazume, **T. Saito**, T.C. Saido, N. Taniguchi: Bisecting GlcNAc modification stabilizes BACE1 protein under oxidative stress conditions. *Biochemical Journal* 473, 21-30 (2016). (査読有り)
  9. Y. Huang, A. Skwarek-Maruszewska, K. Horr , E. Vandeweyer, L. Wolfs, A. Snellinx, **T. Saito**, E. Radaelli, N. Corthout, A. C. Lo, L. Van Aerschot, Z. Callaerts-Vegh, D. Trabzuni, K. Bossers, J. Verhaagen, M. Ryten, S. Munck, R. D'Hooge, D.F. Swaab, J. Hardy, T.C. Saido, B. De Strooper and A. Thathiah: GPR3 modulation of the amyloid plaque burden and memory in Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine* 7, 309ra164 (2015). (査読有り)
  10. H. Hama, H. Hioki, K. Namiki, T. Hoshida, H. Kurokawa, F. Ishidate, T. Kaneko, T. Akagi, **T. Saito**, T.C. Saido and A. Miyawaki: ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. *Nature Neuroscience* 18, 1518-1529 (2015). (査読有り)
  11. H. Zhang, L. Wu, E. Pchitskaya, O. Zaharova, **T. Saito**, T.C. Saido and I. Bezprozanny: Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 35, 13275-13286 (2015). (査読有り)
  12. Y. Kizuka, S. Kitazume, R. Fujinawa, **T. Saito**, N. Iwata, T.C. Saido, M. Nakano, Y. Yamaguchi, Y. Hashimoto, M. Staufenbiel, H. Hatsuta, S. Murayama, H. Manya, T. Endo and N. Taniguchi: An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 7, 175-189 (2014). (査読有り)
  13. P. Nilsson, M. Sekiguchi, T. Akagi, S. Izumi, T. Komori, K. Hui, K. S rgjerd, M. Tanaka, **T. Saito**, N. Iwata and T.C. Saido: Autophagy-related protein 7 deficiency in APP transgenic mice decreases A $\beta$  in multivesicular bodies and induces A $\beta$  accumulation in the Golgi. *American Journal of Pathology* 185, 305-313 (2014). (査読有り)
  14. P. Nilsson, **T. Saito** and T.C. Saido: New mouse model of Alzheimer's. *ACS Chemical Neuroscience* 5, 499-502 (2014). (査読有り)
  15. **T. Saito**, Y. Matsuba, N. Mihira, J. Takano, P. Nilsson, S. Itohara, N. Iwata and T.C. Saido: Single APP knockin mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 17, 661-663 (2014). (査読有り)
- 〔招待講演〕(計 9 件)
1. 第 31 回日本薬物動態学会年会(松本キッセイ文化ホール・2016 年 10 月 13 日):「次世代型アルツハイマー病モデルマウスの開発」
  2. 第 6 回日本認知症予防学会学術集会(東北大学百周年記念会館・2016 年 9 月 24

- 日):「アミロイドをターゲットとした認知症予防の試み」
3. 福島県立医大特別講演(福島県立医大・2016年7月22日):「遺伝子改変マウスを用いた認知症の病理メカニズムの解析」
  4. 東北大学脳科学シンポジウム(東北大学薬学部・2015年12月5日):「アルツハイマー病モデルマウスの新展開」
  5. 東北大学加齢研セミナー(東北大学彼医学研究所・2015年9月9日):「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発とその応用」
  6. 九州薬科学研究教育連合主催合宿研修・創薬研究講義(九州地区国立大学九重共同研修所・2015年7月17~20日):「アルツハイマー病の予防・治療・診断法の確立を目指して」
  7. 東京都医学総合研究所セミナー(東京都医学総合研究所・2015年3月31日):「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」
  8. 大分薬学ネットワーク研究会(大分市ソレイユ・2014年10月8日):「アルツハイマー病の予防・治療・早期診断に向けてのブレイクスルー」
  9. 東北大学薬学研究科セミナー(東北大学薬学部・2014年4月22日):「次世代型アルツハイマー病モデルマウスの開発から応用へ」

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 日本認知症学会(国際フォーラム・東京2016年12月1日)  
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」**齊藤貴志**
2. Society for Neuroscience (SanDiego, USA: 2016年11月13日)  
「Biology of Time: Humanization of entire murine tau gene for a better model of AD」  
**Takashi Saito** and Takaomi C. Saido
3. The 39<sup>th</sup> Annual meeting of the Japan Neuroscience Society (Yokohama: 2016年7月20日)  
「Somatostatin receptors regulate brain A $\beta$  levels via the modulation of neprilysin activity」**Takashi Saito (Organizer)**, Per Nilsson, Naomasa Kakiya and Takaomi C. Saido
4. BMB2015(神戸国際会議場・兵庫 2015年12月4日)  
「アルツハイマー病病態形成における

神経炎症の役割」**齊藤貴志(オーガナイザー)**

5. 日本認知症学会(リンクス青森・青森2015年10月4日)  
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」**齊藤貴志**、西道隆臣

〔図書〕(計 1 件)

**Takashi Saito**: Chronic neuroinflammation underlying pathogenesis of Alzheimer's disease. Springer Book [Chronic Inflammation: Mechanisms and regulation (Editors: Kiyoshi Takatsu and Masayuki Miyasaka)] Chapter 50, p661-671 (2016)

〔その他〕

<受賞>(計 1 件)  
平成27年度 日本認知症学会・学会賞

<アウトリーチ活動>(計 5 件)

1. 理研Days「アルツハイマー病ってなに?」(科学技術館2016年12月18日)
2. 宇土高校創立記念講演「繋ぐことの大切さ」(熊本県立宇土高等学校2016年10月21日)
3. 理研一般公開2016「アルツハイマー病研究の新展開」(2016年4月23日)
4. 理研一般公開2015「どうしてアルツハイマー病になるのか?」(2015年4月18日)
5. 理研一般公開2014「アルツハイマー病を知ろう!」(2014年4月19日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤貴志 (SAITO, Takashi)  
理化学研究所・神経蛋白質制御研究チーム・副チームリーダー  
研究者番号: 9036055

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号:

(4)研究協力者(計 2 名)

松葉由紀夫(MATSUBA, Yukio)

三平尚美(Mihira, Naomi)

理化学研究所・神経蛋白制御研究チーム・  
テクニカルスタッフ