

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293075

研究課題名(和文)新規アルツハイマー病創薬ターゲットによる神経細胞死メカニズム解明とその阻止

研究課題名(英文)Elucidation of a neurodegenerative mechanism induced by a new Alzheimer's disease drug target and its inhibition

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は神経が細胞死を起こすことで認知機能の低下を起こす疾患であるが、成熟神経の細胞死の原因とそのメカニズムは不明であった。今回、長らくアルツハイマー病の原因と考えられてきたアミロイドが、30個集まった凝集体、アミロスフェロイドが、成熟神経細胞の生存と機能に必須であるナトリウムポンプに結合し、その機能を抑制することで細胞死を起こすことを初めて明らかにした。さらに、アミロスフェロイドに結合するペプチドが、ナトリウムポンプへの結合を阻止することで、細胞死を抑制することを示し、治療への道筋を拓いた。また、アミロスフェロイドの立体構造についても解明し、特異的な立体構造で有ることを示した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is a disorder that causes cognitive decline due to death of mature neurons, but the cause and mechanism of this death of mature neurons had been unknown. In this work, we showed for the first time that an assembly, a 30-mer of amyloid- protein, (which we termed amylospheroids) binds to the sodium pump essential for the survival and function of mature neurons and cause death of mature neurons by suppressing the pump function through this binding. In addition, we showed that peptides that bind to amylospheroids inhibit the death of mature neurons by blocking amylospheroids' binding to the sodium pump, and opened up a path to treatment. We also clarified the tertiary structure of amylospheroids and showed that amylospheroids had a specific three-dimensional structure.

研究分野：病態医化学

キーワード：神経細胞死 神経変性疾患 ナトリウムポンプ 立体構造

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、シナプス変性を経て、成熟神経細胞が死に至り初めて発症する。 $\beta$ アミロイド ( $A\beta$ ) 集合体 (2量体・12量体) は、NMDA 受容体を障害しシナプスを変性するが、神経細胞死は起こさない。従って、**アルツハイマー病を発症させる成熟神経細胞死を誘導する原因分子とそのメカニズムを解明し、その上に治療法を開発することが必要とされている。**

申請者は、患者脳に蓄積する様々な  $A\beta$  集合体の中から、初めてヒト成熟神経細胞に死をもたらす  $A\beta$  集合体「アミロスフェロイド (ASPD)」を単離した (JBC2009)。ASPD は約 30 個の  $A\beta$  が集合し特異な立体構造を取っている。最近、申請者は、ASPD がこの特異な立体構造を介して、成熟神経細胞にのみ発現し神経の静止膜電位の保持に必須であるシナプス膜タンパク質「 $Na^+/K^+-ATPase \alpha 3$  サブユニット (NAK $\alpha 3$ )」に選択的に結合し、その機能を阻害することで成熟神経細胞の劇的な死を導くことを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究は、神経細胞における NAK $\alpha 3$  の機能を解明し、アルツハイマー病で起こる成熟神経細胞死を分子レベルで理解することを目的とする。さらに、ASPD が選択的に NAK $\alpha 3$  に結合する構造基盤を解明し、ASPD の結合阻害による細胞死の阻止を目指す。最終的に以下の3つの課題の達成により分子病態の理解に基づく治療法開発の基盤を提供したい。

**課題 1** : 溶液及び固体 NMR を NAK $\alpha 3$  結合に関わる ASPD 表面構造を決定する。NAK $\alpha 1$  の X 線結晶構造解析より計算科学により NAK $\alpha 3$  構造モデルを構築し、相互作用領域を特定する。

**課題 2** : ASPD 表面に結合し NAK $\alpha 3$  との相互作用を阻止するペプチドを探索し、今後の創薬基盤となる最適かつ最小の配列の絞り込みを行う。

**課題 3** : ASPD と NAK $\alpha 3$  の相互作用による細胞死シグナル伝達の分子レベルでの理解、特にアルツハイマー病のもう一つの特徴であるタウの異常との関連を解明する。

### 3. 研究の方法

研究課題は、新規標的分子の**課題 1** 構造基盤の解明、**課題 2** 構造理解に基づく神経細胞死の阻止、**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、小村、松村、西山; 修士取得者: 坂井、山下; 技術員:

里村、西條)、名古屋大学廣明教授、愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター澤崎教授、イリノイ大学石井教授、Nanyang Technological University 平尾助教の協力を仰ぎ、各研究者の実験的蓄積を生かした以下の実験によりアルツハイマー病で起こる成熟神経死メカニズムを解明し、その阻止を目指す。

**課題 1** ①特定のアミノ酸残基に安定同位体標識を入れた  $A\beta$  を化学合成し、ASPD を調製する。固体 NMR 解析により各アミノ酸残基が ASPD 内部でどのような二次構造を取るかを明らかにする。

②大腸菌を用いて可溶性の高い安定同位体標識標的  $A\beta$  を大量に得て ASPD を調製し、溶液 NMR 解析を行う。NAK $\alpha 3$  との選択的結合を可能にしている ASPD 表面の特異的な立体構造を解明する。

③pig NAK $\alpha 1$  (NAK $\alpha 3$  と 96% 相同) の X 線結晶構造解析の結果から計算科学により NAK $\alpha 3$  の分子構造モデルを構築し、上記の結果から得られた ASPD の構造モデルから、相互作用部位について分子動力学シミュレーションを行い、相互作用領域を特定する。

**課題 2** ①コムギ無細胞タンパク質合成技術によりリボソーム上に NAK $\alpha 3$ 、及び特定した ASPD 相互作用部位に変異を入れた NAK $\alpha 3$  を発現させた系を構築する。

②表面プラズモン共鳴装置により上記と ASPD の定量的結合解析系を構築する。ファージディスプレイ法により ASPD 結合ペプチドのライブラリーを構築し、NAK $\alpha 3$ -ASPD の相互作用を阻害し神経細胞死を阻止するペプチドを探索し、神経細胞死を阻止する最小単位のペプチドを特定する。

**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阻害剤による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。

いくつかの実験には着手しており、期間内に大部分は達成出来ると考えている。成果は、積極的に公開し社会に還元していく予定である。

#### 4. 研究成果

本研究により、溶液及び固体 NMR を用いることで ASPD の立体構造の一部を解明することに成功した。ASPD はコアの部分の外に突起のように表面に出ている部分があり、それでターゲットと相互作用していることが明らかになった。コアの部分及び外に出ている突起の部分のいずれもこれまで報告されてきた他のアミロイド  $\beta$  由来の凝集体とは異なることが明確になった。

ASPD 結合ペプチドについては、ファージディスプレイを用いて探索を行った結果、ターゲット分子である NAK $\alpha$ 3 と類似した配列が、ASPD 表面に結合し、NAK $\alpha$ 3 との結合を競合的に阻害することで神経細胞死を阻止することが解った。また、コアとなる配列も同定することに成功した。

最後にタウについては、NAK $\alpha$ 3 を抑制した下流においてタウのリン酸化が亢進していること、また、細胞内のタウの量が減少していることを見出した。上記の神経細胞死を阻止する ASPD 結合ペプチドはタウのリン酸化も阻止することから、確かに細胞死に繋がる経路の下流にタウがあることが解った。

上記のとおり、予定していた計画を順調に進めることが出来ただけではなく、アルツハイマー病の新たな創薬ターゲットとして NAK $\alpha$ 3 を見出し、かつ、低分子医薬品の開発に繋がるシーズを見出すことに成功した。

上記に加えて、線維についても、患者由来の線維をシーズとして、オリジナルな構造をミミックした線維を試験管内で再構築出来る手法を確立し、それにより特定の A $\beta$ 種だけで形成される、過去に報告のない新たな構造体を試験管において見出した (Xio et al. *Nat. Str. Mol. Bio.* 2015)。この手法を生かして解析を試みている。

#### 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)

Xiao, Y., Ma, B., McElheny, D., Parthasarathy, S., Long, F., Hoshi, M., Nussinov, R., and \*Ishii, Y. (2015) **A $\beta$  (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimers's disease** *Nature Str. Mol. Biol.* 22, 499-505 advanced on line publication  
Parthasarathy, S., Inoue, M., Xiao, Y., Matsumura, Y., Nabeshima, Y., Long, F., Hoshi, M., and \*Ishii,

Y. (2015) **Structural Insight into an Alzheimer's Brain-Derived Spherical Assembly of Amyloid $\beta$  by Solid-state NMR** *J. Amer. Chem. Soc.* 137, 6480-6483

Ohnishi, T., Yanazawa, M., Sasahara, T., Kitamura, Y., Hiroaki, H., Fukazawa, Y., Kii, I., Nishiyama, T., Kakita, A., Takeda, H., Takeuchi, A., Arai, Y., Ito, A., Komura, H., Hirao, H., Satomura, K., Inoue, M., Muramatsu, S., Matsui, K., Tada, M., Sato, M., Saijyo, E., Shigemitsu, Y., Sakai, S., Umetsu, Y., Goda, N., Takino, N., Takahashi, H., Hagiwara, M., Sawasaki, T., Iwasaki, G., Nakamura, Y., Nabeshima, Y., Teplow, D.B., and \*Hoshi, M.  
(2015) **Na,K-ATPase  $\alpha$ 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- $\beta$  assembly** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112, E4465-E4474

Shigemitsu, Y., Iwaya, N., Goda, N., Matsuzaki, M., Tenno, T., Narita, A., Hoshi, M., \*Hiroaki, H.

(2016) **Nuclear magnetic resonance evidence for the dimer formation of beta amyloid peptide 1-42 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol**, *Analytical Biochemistry.* 498, 59-67

星美奈子 (2016) アルツハイマー病神経細胞死の新たなターゲット分子 NA+K+-ATPase ポンプの  $\alpha$ 3 サブユニット 医学のあゆみ 第 258 巻 3 号 7/16, 247-248

ヒトアルツハイマー病 (AD) 患者由来アミロイド  $\beta$  凝集体による新たな神経細胞死機構の解明と病態解明に基づく AD 新規治療法の研究開発、星美奈子 (2014 年 6 月 12 日) 第 56 回日本老年医学会学術集会 (福岡) (基調講演)

新規アルツハイマー病創薬ターゲットの発見と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、星美奈子 (2014 年 12 月 9 日) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所所内セミナー: 分子回路系神経科学セミナーシリーズ第 10 回

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子の発見、星美奈子 (2015 年 10 月 20 日) 東京大学大学院農学生命科学研究科 田之倉優教授主催 第 4 回食品薬品生物構造学研究会 (静岡) (招待講演)

アルツハイマー病患者脳由来のアミロイド  $\beta$  凝集体アミロスフェロイドの発見から成熟神経細胞の分子機構の解明までの道のり、星美奈子 (2015 年 12 月 17 日) 明治大学大学院 構造細胞生物学持論/細胞生物学持論 (招待講演)

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たな分子メカニズムの発見と革新的治療法の開発、星美奈子 (2016 年 1 月 9 日) 第 4 回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research) (東京) (招待講演)

アルツハイマー病患者脳由来のアミロイド

$\beta$ 凝集体アミロスフェロイドの発見から成熟神経細胞死の分子機構の解明までの道のり、星美奈子(2016年2月1日)新潟大学脳神経研究会(新潟)(招待講演)

新たなアルツハイマー病の発生機構、星美奈子(2016年6月10日)バイオファイナンスギルド第14期 第14回セミナー(東京)(日経BP社 Biotechnology Japan)(招待講演)  
球になると毒になる?アルツハイマー病の脳でなぜ神経細胞が死ぬのか?(2016年6月11日) Lecture series no.140 京都大学総合博物館(京都)(招待講演)

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3 Is a New Death Target of Alzheimer Amyloid- $\beta$  Assembly, Hoshi, M., 4<sup>th</sup> International European Neurodegenerative Diseases & Optogenetics Europe-2015 Meeting, Nov 2-3 2015, University of Cambridge, UK (招待講演)

Neurotoxic, high-mass amyloid beta assemblies, amylospheroids, are formed in the Golgi apparatus of neurons that express amyloid precursor proteins with familial Alzheimer mutations, Komura,H., Arai,Y., Matsumura,S., Hoshi,M., Gordon Research Conference / Neurobiology of Brain Disorders, Aug 7 2016, PGA Catalunya Business and Convention Centre  
ATP1A3 as target of beta-amyloid assembly, Hoshi,M., 5<sup>th</sup> Symposium on ATP1A3 in Disease, UCL Institute of Neurology,London,UK (招待講演)

Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 3 Is a New Death Target of Alzheimer Amyloid- $\beta$  Assembly, Hoshi, M., KU LEUVEN, Belgium, Nov 5, 2015

[雑誌論文] (計 5件)

[学会発表] (計 13件)

[図書] (計 1件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

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、その他部局等・研究員

研究者番号: 30374010

(2) 研究分担者

廣明 秀一 (Hiroaki, Hidekazu)

名古屋大学、創薬科学研究科・教授

研究者番号: 10336589

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )