

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26461746
 研究課題名(和文) プレセニリン セクレターゼによるアミロイド 切断が細胞内のどこで起こるか？

研究課題名(英文) Mechanism of presenilin/gamma secretase to produce amyloid beta

研究代表者

田上 真次 (Tagami, Shinji)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40362735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞から誘導した神経細胞を用いて、A₄₂切断や 切断などが起こる仕組みを詳細に検討した。そしてA₄₂が産生される際に副産物として産生される数アミノ酸ペプチ (byproduct) を細胞内で検出、定量化することに成功した。

セクレターゼの主たる構成分子プレセニリン1に病的突然変異がある家族性AD4例および非認知症患者のCSFサンプル数十例中のA₄₂、APL1₂₈などの測定を行った。その結果、家族性AD脳では大量のA₄₂が蓄積しているにも関わらず、A₄₂産生量自体は増加していないこと、主たる分子種であるA₄₀の産生量が低下し、A₄₂の割合が増えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Beta APP-CTF stubs undergo endoproteolysis by gamma secretase at the epsilon cleavage sites. Gamma secretase sequentially cleaves the resultant substrate every some amino acid residues, thus generating secreted Abeta. We could quantify the small residual peptides generated during sequential cleavages upon Abeta production inside the cells. By this analysis, we could evaluate the activity of gamma secretase to produce amyloid beta.

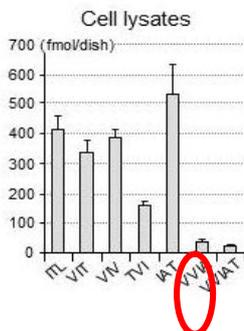
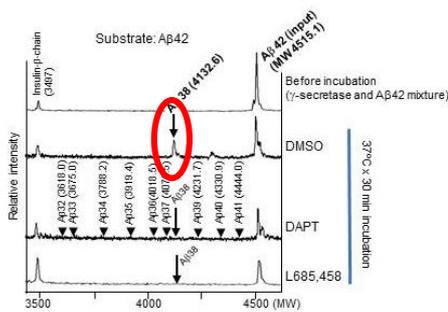
Substantial amounts of Abeta42 accumulate in brains of Presenilin 1 (PS1) mutations-associated with familial AD(FAD). We analyzed CSF APL1beta levels, a non-amyloidogenic surrogate marker of Abeta42 in PS1-FAD patients and in non AD controls. Importantly, CSF APL1beta28 was not significantly higher. However, shorter CSF APL1beta25/27 were significantly lower in PS1-FAD patients. These data suggest that in PS1-FAD patients massive Abeta42 accumulation in PS1-FAD brain occurs without an apparent increase in Abeta42 secretion.

研究分野：アルツハイマー病研究

キーワード：アルツハイマー病 オマーカー 切断 セクレターゼ アミロイド プレセニリン APL1 アルツハイマー病バイ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)脳に特異的に認められる老人斑の主たる構成成分は 42 アミノ酸からなる Aβ42 であり、AD 病理の本体はこの Aβ42 の凝集過程にあるのではないかと考えられている。Aβ は前駆体である βAPP が BACE と γ セクレターゼによる段階的蛋白分解を受けて産生される。重要なことに近年、γ セクレターゼによる切断の正確さがプレセニリン(PS)や βAPP の病原性突然変異だけではなく、薬剤により変化することがわかった。これらの薬剤は γ セクレターゼ修飾薬(GSM)と呼ばれ、凝集性・細胞毒性が高い Aβ42 産生を選択的に阻害するため有望視されている。しかしこれらの薬剤の作用機序は不明であり、さらには Aβ 産生機構自体も未解明であった。我々は驚くべきことに、γ セクレターゼによる最終分泌産物であると考えられていた Aβ42 や Aβ43 が、実は γ セクレターゼの基質となり、さらに凝集性が乏しい Aβ38 などに切断されることを発見した(図、上; 試験管内の反応、Aβ42 から Aβ38 が出来る下; 培養細胞内に Aβ42 が Aβ38 に切断された時に同時に出来るペプチド、VVIA を検出)(参考文献 1))。



重要なことに GSM は Aβ42、Aβ43、Aβ38 反応を促進した。GSM は γ セクレターゼから Aβ42 が解離する速度を遅延させ(Kd を低下させる)、かつ γ セクレターゼが Aβ42 を切断する効率を促進していた(Kcat を促進させる)。この研究により GSM がどのように Aβ42 産生を阻害するのかの端緒が開けた。この研究成果をさらに進展させる目的で、本研究を開始した。

並行して、我々は AD のバイオマーカー開発に携わってきた。CSF 中の Aβ42 は AD の理想的なバイオマーカーであるが、残念なことに非常に凝集性が高いため、その値は脳内 Aβ42 産生を反映していない。むしろ家族性および孤発性 AD 脳脊髄液中では Aβ42 量や Aβ42 の比率は低下している(参考文献 2))。従って、AD 病理を研究するにおいて、非常に重要な家族性 AD 脳内で Aβ42 産生量が增大しているかどうか、また総 Aβ 中の Aβ42 の占める割合(Aβ42 比)が本当に増大しているのかもわかっていない。

我々は近年、Aβ42 と同じ機序で産生される APL1828 を発見した(参考文献 3))。APL1828 は Aβ42 とは異なり、脳内に凝集していない。従って脳脊髄液中の APL1828 の量は脳内 APL1828 産生量を反映していると考えられる。また重要なことに我々は γ セクレターゼは、Aβ42 や Aβ43 を Aβ38 に切断するように、APL1828 を APL1825 に切断することを発見した(参考文献 1))。従って脳脊髄液中の APL1828 や APL1825 の量を測定することで脳内の Aβ42 の切断・代謝効率を推定できる可能性がある。

参考文献

1) Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, Nakayama T, Ihara Y, Takeda M: gamma-secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on

presenilin/gamma-secretase function to cleave Aβ42 and Aβ43. Cell Rep 2013;3:42-51.

2)Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al.: Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. Ann Neurol 1995;38:643-648.

3)Yanagida K, Okochi M, Tagami S et al.: The 28-amino acid form of an APLP1-derived Aβ-like peptide is a surrogate marker for Aβ42 production in the central nervous system. EMBO Mol Med 2009;1:223-235.

2 . 研究の目的

AD 脳に特異的に認められる老人斑の主たる構成成分は 42 アミノ酸からなる Aβ42 であり、Aβ42 が凝集し始めることが AD 病理の引き金になるのではないかと考えられている。Aβ42 を含む Aβ 各分子種は以下のようなメカニズムで産生される。まず Aβ の前駆体である βAPP が BACE による細胞外シェディングを受けて CTF-β となる。次いでプレセニリン γ セクレターゼが CTF-β の細胞膜と細胞質の境界付近から切断を開始し、数アミノ酸ずつ段階的に膜の中央部に切断が進むことにより、数種類の Aβ 分子種が産生される。本研究ではこの研究成果をさらに発展させ、Aβ42 切断や γ 切断などが起こる仕組みを詳細に検討した。

また、本研究では γ セクレターゼの中心的構成分子であるプレセニリンに病的突然変異をもつ家族性 AD や変異のない孤発性 AD 患者、および非認知症患者の脳脊髄液中の APL1828 や APL1825、および Aβ 各分子種などの定量を進め、AD 脳内で

Aβ42 がどのように代謝されているのかを推定を試みた。

3 . 研究の方法

Aβ42 切断や γ 切断の仕組みを検討する実験に関しては、βAPP を過剰発現した HEK 細胞やヒト iPS 細胞から誘導した大脳皮質神経細胞を用いて Aβ42 切断や γ 切断などが起こる時に、同時に細胞内に産生される数アミノ酸のペプチドの同定および定量化を LC/MS/MS 装置を用いて解析した。

Aβ42 切断が家族性 AD 脳内でどのように変化しているのかを調べる実験に関しては、家族性 AD、孤発性 AD 患者および非認知症患者の脳脊髄液中サンプル中の測定可能なすべての分子種 (APL1825,27,28 および Aβ42,43,40,38,37 など) を ELISA 法で測定した。

4 . 研究成果

βAPP を過剰発現した HEK 細胞やヒト iPS 細胞から誘導した大脳皮質神経細胞を用いて、Aβ42 切断や γ 切断などが起こる仕組みを詳細に検討した。そして Aβ が産生される際に副産物として産生される 3-4 アミノ酸ペプチド (γ バイプロダクトと命名) を細胞内で検出、定量化することに成功した。これら γ バイプロダクトは細胞内に留まり、Aβ のように分泌されない。よって、従来、γ セクレターゼの活性指標とされてきた分泌 Aβ 量に代わる、新たな γ セクレターゼの活性指標となる可能性がある (論文投稿中)

γ セクレターゼの主たる構成分子であるプレセニリン 1 に各々異なる病的突然変異がある家族性 AD (FAD) 4 例および非認知症患者の脳脊髄液中サンプル数十例中の Aβ42、APL1828 などの測定を行った。その結果、家族性 AD 脳では大量の Aβ42 が蓄積しているにも関わらず、Aβ42 産生量

自体は増加していないこと、主たる分子種である Aβ40 の産生量がむしろ低下し、Aβ42 の割合が増えることが FAD 病理の引き金になっている可能性が示唆された（主な論文発表の 3）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Mizuta N, Yanagida K, Kodama T, Tomonaga T, Takami M, Oyama H, Kudo T, Ikeda M, Takeda M, Tagami S, Okochi M. Identification of Small Peptides in Human Cerebrospinal Fluid upon Amyloid-Degradation. *Neurodegener Dis.* Vol.17 2017 p103-109
2. Omi T, Tanimukai H, Kanayama D, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Morihara T, Sato M, Yanagida K, Kitasyoji A, Hara H, Imaizumi K, Maurice T, Chevallier N, Marchal S, Takeda M, Kudo. Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor. *Cell Death Dis.* 5:e1332. doi: 10.1038/cddis.2014.301.
3. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Arai T, Kuwano R, Ikeuchi T, Takeda M. Relative ratio and level of amyloid-42 surrogate in cerebrospinal fluid of familial Alzheimer disease patients with presenilin 1 mutations. *Neurodegener Dis.* Vol.13 2014 p166-170

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Shinji Tagami, Masayasu Okochi, Kanta Yanagida, Takashi Kodama, Takeshi Ikeuchi, Takashi Morihara, Tetsuaki Arai, Toshihisa Tanaka, Masatoshi Takeda. Levels of an amyloid beta42 surrogate marker in CSF of familial Alzheimer disease patients. XVI World Congress of Psychiatry. Madrid, September 11, 2014
2. 田上 真次 大河内 正康 佐野 聖三 柳田 寛太 児玉 高志 水田 直樹 朝長 毅 武田 雅俊末梢血中の A₄₂ サロゲートマーカー、APL1 28 の開発状況について 第 33 回 日本認知症学会 学術総会 パシフィコ横浜 会議センター 平成 26 年 12 月 1 日
3. 大河内 正康 田上 真次 柳田 寛太 武田 雅俊 セクレターゼの阻害と促進 第 33 回 日本認知症学会 学術総会 「シンポジウム 11A 産生制御によるアルツハイマー病根本治療戦略の進歩」 パシフィコ横浜 会議センター 平成 26 年 11 月 30 日
4. 大河内 正康 柳田 寛太 大山 洋 児玉 高志 高見 真子 井原 康夫 阪口 岳 田上 真次 武田 雅俊 iPS 由来ヒト大脳皮質神経細胞の A₄₂ 産生に関連する性質

第 33 回 日本認知症学会 学術総会
パシフィコ横浜 会議センター 平成 26 年
11 月 30 日

5. 柳田 寛太 大山 洋 大河内 正康
田上 真次 児玉 高志 水田 直樹
阪口 岳 武田 雅俊 -secretase
modulator は AD 由来の iPS 細胞にも効果がある 第 33 回 日本認知症学会 学術総会
パシフィコ横浜 会議センター 平成 26 年
12 月 1 日

6. 児玉 高志 大河内 正康 田上 真次
柳田 寛太 水田 直樹 高見 真子
井原 康夫 武田 雅俊細胞内に存在する A
由来のオリゴペプチドの LC-MS/MS による
測定 第 33 回 日本認知症学会 学術総会
パシフィコ横浜 会議センター 平成 26 年
11 月 30 日

7. 水田 直樹 大河内 正康
田上 真次 柳田 寛太 児玉 高志
佐野 聖三 朝長 毅 森原 剛史 田中
稔久 武田 雅俊 脳脊髄液中の A₄₂ 分解産
物の同定 第 33 回 日本認知症学会 学術
総会 パシフィコ横浜 会議センター 平
成 26 年 12 月 1 日

8. Shinji Tagami Shozo Sano Kanta
Yanagida Takashi Kodama Naoki Mizuta
Takeshi Tomonaga Masatoshi Takeda
Masayasu Okochi Development of Abeta42
surrogate marker in peripheral blood. 12th
World Congress Of Biological Psychiatry
14 - 18 June 2015 / Greece, Athens.

9. 田上 真次 柳田 寛太 児玉 高志
新井 哲明 池内 健 武田 雅俊 大河
内 正康 家族性アルツハイマー病の脳内で A₄₂
産生は亢進しているか? 第 34 回 日
本認知症学会 学術総会 リンクステーシ
ョンホール青森 平成 27 年 10 月 3 日

10. 柳田 寛太 田上 真次 児玉 高
志 岡本 徹 松浦 善治 武田 雅俊
大河内正康 CRISP/CAS9 法による
Presenilin1/2 ダブルノックアウト細胞の作
製 第 34 回 日本認知症学会 学術総会
リンクステーションホール青森 平成 27 年
10 月 2 日

11. 児玉 高志 大河内 正康 田上 真
次 柳田 寛太 森原 剛史 田中 稔
久 朝長 毅 工藤 喬 武田 雅俊ヒト
血漿中に存在する A₄₂ ペプチドのサロゲ
ートマーカー APL1 の LC/MS/MS による測定 第 34
回 日本認知症学会 学術総会 リンクステ
ーションホール青森 平成 27 年 10 月 2 日

12. 田上 真次 アルツハイマー病診断・予
防・治療の今後の展望について 精神心
理的フレイルの側面から 第 4 回先進漢方
治療研究会 梅田スカイビル タワーウエ
スト 36 階 平成 27 年 11 月 7 日

13. Shinji Tagami Disease Modifying
therapy of Alzheimer's disease in the near
future - from the aspect of
psychological frailty - The 18th

International Congress of Oriental
Medicine 2016 Okinawa Convention Center
Room B1 2016年4月17日(日)

14. Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takeshi
Tomonaga, Takeshi Ikeuchi, Masaaki
Waragai, Masatoshi Takeda, Manabu Ikeda,
Masayasu Okochi A brain-derived A 42
surrogate marker in peripheral blood.
Neuroscience meeting 2016, Nov.14 2016,
San Diego USA

〔図書〕(計3件)

1. 田上 真次 大河内 正康認知症のバ
イオマーカー 髄液ならびに血液
臨床精神医学 Vol.45 p405-410, 2016
2. 田上 真次 大河内 正康 最新のアル
ツハイマー病の血液バイオマーカー開発
医学のあゆみ Vol.257 p519-524 2016
3. 田上 真次 里 直行 トピックス
アルツハイマー病と生活習慣病について
関西産研会誌 銀杏 Vol.47 p75-80 2017

〔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：

公開状況(計1件)

名称：アルツハイマー病の診断方法および診
断薬
発明者：田上 真次、大河内正康他
権利者：国立大学法人大阪大学
種類：公開特許公報(A)
番号：特開2012-85602(P201
2-85602A)
取得年月日：平成24年5月10日
国内外の別：国内および国際

〔その他〕

ホームページ等
<http://www2.med.osaka-u.ac.jp/psy/about/staff/tagami.html>
<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/view?l=ja&u=6275>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田上 真次 (TAGAMI SHINJI)
大阪大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40362735

(2)研究分担者

大河内 正康 (OKOCHI MASAYASU)
大阪大学大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90335357