

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0258

研究課題名（和文）アルコール摂取がもたらす認知機能障害の分子基盤

研究課題名（英文）Identification of novel mechanisms of alcohol-related dementia

研究代表者

照沼 美穂 (Terunuma, Miho)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50615739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：慢性的なアルコール摂取は、肝機能障害による高アンモニア血症を発症させる。研究代表者は、肝機能障害による高アンモニア血症が生じると、脳の恒常性維持に重要な役割を果たすアストロサイトに炎症反応が起こり、さらにアンモニアによる刺激がアストロサイト内でのアルツハイマー病原因因子アミロイドの産生を誘導することを見出した。このアストロサイトによるアミロイドの産生機序を調べたところ、アストロサイトの細胞膜に発現するアミロイド前駆タンパク質APPが細胞内に取り込まれ、小胞体に輸送されることで起きることを突き止めた。この機構は新規アルツハイマー病発症機構であるとして、米国科学雑誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドはアルツハイマー病の原因因子として長年注目されてきているが、神経細胞が産生し、細胞外に排出することで脳内に蓄積され、それが病理学的所見として観察されていると考えられてきた。研究代表者が本研究で見出したのは、脳内で最も数が多いグリア細胞であるアストロサイトがアミロイドを産生する機構であり、新規の病態発症機序と考えられる。本研究での高アンモニア血症によるアルツハイマー病の発症の可能性を示す研究データは、日常生活においても高タンパク食の食事などでも起こり得る高アンモニア血症とアルツハイマー病との関連性を示すものであり、社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：Chronic alcohol consumption can lead to the development of hyperammonemia due to liver dysfunction. We identified that liver failure-associated hyperammonemia induces neuroinflammation which can be described by the increased number of reactive astrocytes in the brain. We also identified that ammonia stimulation induces the production of amyloid beta, a critical initiator that triggers the progression of Alzheimer's disease. Using primary cultured astrocytes prepared from rat embryo, we found the mechanisms of amyloid beta production; ammonia enhances amyloid precursor protein (APP) endocytosis from the plasma membrane, induces transportation of APP to the endoplasmic reticulum, where two enzymes cleave APP to generate amyloid beta peptides. We reported these mechanisms as a novel mechanism driving Alzheimer's disease.

研究分野：神経化学、生化学

キーワード：アストロサイト アルツハイマー病 アルコール 認知機能

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）は認知症患者の半数以上を占める疾患であり、超高齢社会を迎えた我が国の医療費や介護費増加の原因として社会問題となっている。AD のリスク要因であるアルコールの慢性的な過剰摂取やストレスは、肝機能を低下させて高アンモニア血症を引き起こす。脳に移行したアンモニアは、アストロサイトによって解毒される。しかしながら、高アンモニア血症になると血液脳関門のアンモニア透過性が亢進し、アストロサイトの機能を障害する。実際、AD 患者の脳ではアンモニアの上昇と脳の炎症反応である反応性アストロサイトの増加が報告されており、アンモニアと AD 発症との関連性が示唆されている。

アストロサイトは毒性のあるアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを産生して細胞外に放出し、神経細胞を保護している。この細胞は脳内でアンモニアとグルタミン酸を代謝する唯一の細胞であり、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の脳内濃度を調節する重要な細胞である。最近、マウスやラットの実験により、過剰なアルコールの長期間の摂取はアストロサイトの機能破綻や神経伝達障害を起こすとの報告がされたが、その機序は明らかではない。慢性的なアルコール摂取は肝機能を低下させることから、血中アンモニア濃度の増加やアルコールがアストロサイトの機能破綻と AD 原因因子の増加に直接関与し、これらの病態生理学的な分子機構が AD の発症や憎悪に関与するのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

アルコールやストレスと AD 発症の関連性は長らく議論されているが、動物行動学や細胞生物学的手法を用いて包括的に発症機序を検討した研究はまだない。アルコール性肝硬変や AD 患者の脳ではアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを産生するグルタミン合成酵素 GS の著しい減少が認められ、アンモニアやグルタミン酸の代謝障害が示唆される。加えて申請者らは、アストロサイトがアンモニア刺激によって AD 関連因子を発現する可能性を見出した。このことから、本研究は慢性的なアルコールの摂取や肝機能不全による高アンモニア血症がもたらすアストロサイトの機能破綻と AD 関連因子群の発現機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

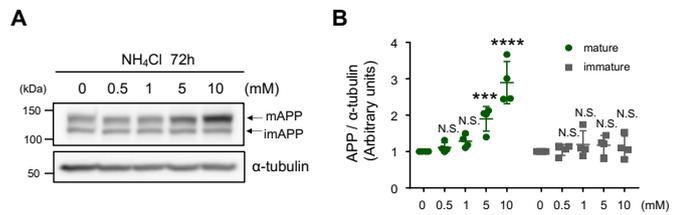
肝機能を障害させた高アンモニア血症モデルマウスやラット胎児の大脳皮質から分離培養した初代培養アストロサイトを用い、行動解析、*ex vivo* 解析や *in vitro* 解析を行う。同一マウスの実験では、行動変化から細胞内の分子変化までを一括で解析することで、新規 AD 発症機序の分子機構の提唱を目指す。

4. 研究成果

① 培養アストロサイトによる実験

培養アストロサイトにアンモニア刺激を加えた時のアミロイド前駆タンパク質 APP の発現変化を検討したところ、アンモニアの濃度依存的に APP の発現量が上昇することを見出した（図 1）。アンモニアは一般的にリソソーム内の pH を上昇させることでタンパク質の分解を阻害すると言われていることから、細胞内の pH を化学的に上昇させて APP の発現量を調べたが、変化はなかった。このため、APP の発現上昇は pH によるものではなく、アンモニアそのものによ

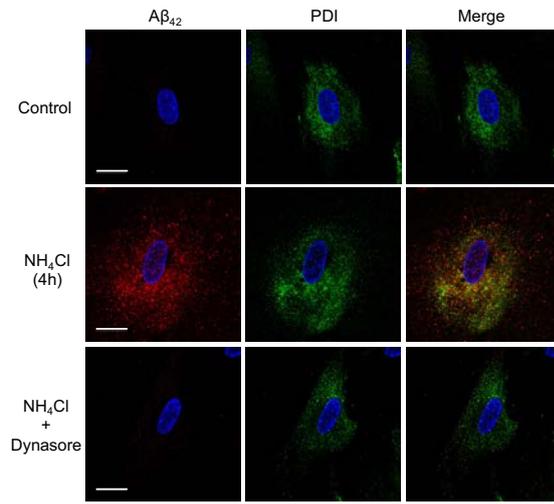
ることが判明した。また、発現が上昇した APP は細胞膜に発現する成熟 APP (mAPP) であり、未熟な APP (imAPP) の発現量には影響がないこともわかった (図 1)。



(図 1) アンモニア刺激による成熟 APP の発現上昇

アンモニア刺激により増加する成熟 APP が細胞膜で増えているのか、それとも細胞内で増えているのかを生化学的手法と免疫染色学的手法を用いて検討したところ、細胞内に蓄積していることがわかった。また、アンモニア刺激により、細胞膜上の成熟 APP はクラスリン誘導性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることも判明した。取り込まれた成熟 APP は一部リソソームに移動して分解されるが、多くは小胞体に輸送されていた。加えて、小胞体内に蓄積された成熟 APP は、βセクレターゼと γセクレターゼという 2 つの酵素によって切断され、その結果、アミロイド β が産生されることもわかった (図 2)。

このアミロイド β は凝集性が高いアミロイド β 42 と呼ばれるもので、アストロサイトの小胞体から分泌されることなく、細胞内に蓄積し、アストロサイトの細胞死を誘導すると考えられた。エンドサイトーシスの阻害薬である Dynasore を用いると、アミロイド β 42 の小胞体内での蓄積は起きなかったことから、細胞膜上の成熟 APP から産生されていることが示された。

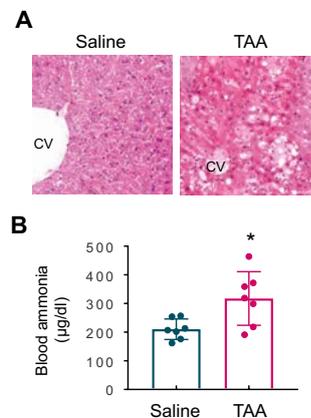


(図 2) アンモニア刺激による培養アストロサイトの小胞体 (PDI) 内でのアミロイド β 42 の蓄積

② 高アンモニア血症モデルマウスによる実験

チオアセトアミド (TAA) を投与して肝臓障害を与えたマウスは、投与後 24 時間で高アンモニア血症になる (図 3)。このマウスの脳では、炎症所見としての反応性アストロサイトの増加や神経細胞マーカーである NeuN の発現減少が認められた。さらに、神経変性も認められた。

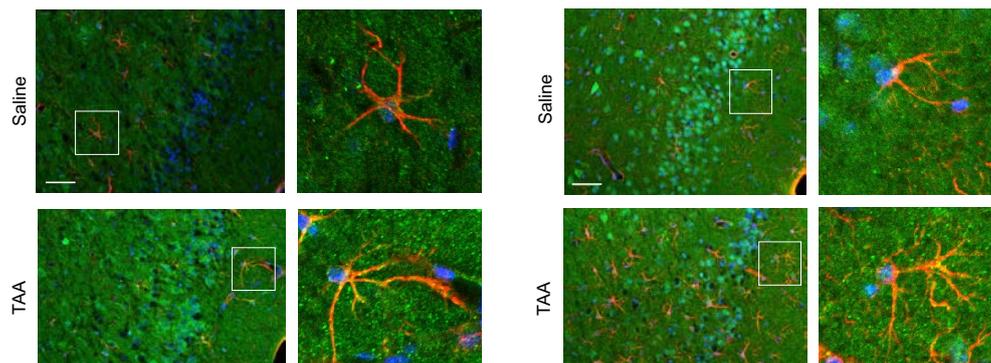
次にアストロサイトにおける APP とアミロイド β の蓄積を二重免疫染色法にて確認した。その結果、高アンモニア血症のアストロサイトでは APP とアミロイド β が共に蓄積している像を認めた。この結果は、培養アストロサイトでの研究結果をサポートするものであり、血中のアンモニアによって引き起こされたと考えられた (図 4)。今後は、マイルドなアンモニア血症や、高タンパク質食餌による断続的な



(図 3) 高アンモニア血症マウスの肝臓 (A) の所見と血中アンモニア濃度 (B)

と考えられた (図 4)。今後は、マイルドなアンモニア血症や、高タンパク質食餌による断続的な

アンモニア血症が、認知機能を含むうつや不安などの精神状態にどのような影響を与えるかなどについても研究を行っていきたい。



(図4) 高アンモニア血症マウス (TAA) のアストロサイト内のAPP (左) とアミロイド β (右) の上昇

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Li X, Terunuma M, Deeb TG, Wiseman S, Pangalos MN, Nairn AC, Moss SJ, Slesinger PA.	4. 巻 40
2. 論文標題 Direct Interaction of PP2A Phosphatase with GABAB Receptors Alters Functional Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2808-2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2654-19.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshihara M, Tsujimura T, Suzuki T, Nagoya K, Shiraishi N, Magara J, Terunuma M, Inoue M.	4. 巻 319
2. 論文標題 Sustained laryngeal transient receptor potential vanilloid 1 activation inhibits mechanically induced swallowing in anesthetized rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	6. 最初と最後の頁 412-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00082.2020. Epub 2020 Aug 5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kiyokawa Y, Sato M, Noguchi H, Inada E, Iwase Y, Kubota N, Sawami T, Terunuma M, Maeda T, Hayasaki H, Saitoh I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Drug-Induced Naive iPS Cells Exhibit Better Performance than Primed iPS Cells with Respect to the Ability to Differentiate into Pancreatic -Cell Lineage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9092838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Li X, Terunuma M, Deeb TG, Wiseman S, Pangalos MN, Nairn AC, Moss SJ, Slesinger PA.	4. 巻 40(14)
2. 論文標題 Direct Interaction of PP2A Phosphatase with GABAB Receptors Alters Functional Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2808-2816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2654-19.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 TERUNUMA Miho	4. 巻 94
2. 論文標題 Diversity of structure and function of GABA _B receptors: a complexity of GABA _B -mediated signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 390 ~ 411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.94.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu A, Iida I, Nasu Y, Ito G, Harada F, Kishikawa S, Moss SJ, Maeda T, Terunuma M	4. 巻 298
2. 論文標題 Ammonia induces amyloidogenesis in astrocytes by promoting amyloid precursor protein translocation into the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 照沼美穂
2. 発表標題 アストロサイトを介したアルツハイマー病態増悪機構
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Formation and detoxification of ammonia in the human body
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松彩夏, 岸川咲吏, 飯田和泉, 照沼美穂
2. 発表標題 アンモニアはアストロサイトにおいてアミロイド の産生を誘導する
3. 学会等名 新潟歯学会例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯田和泉, 阿部学, 崎村建司, 照沼美穂
2. 発表標題 カイン酸型グルタミン酸受容体サブユニットGluK2及びGluK5サブユニット欠損マウスの行動解析
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・NPBPPP合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松彩夏, 飯田和泉, 原田史子, 岸川咲吏, 照沼美穂
2. 発表標題 アンモニアとアルツハイマー病発症の関連の検討
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Izumi Iida, Sari Kishikawa, Genki Ito, Yusuke Nasu, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia promotes amyloid beta42 production in astrocytes
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Expression of astrocytic glutamine synthetase is regulated by YAP
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miho Terunuma, Izumi Iida, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura
2. 発表標題 GluK3-containing Kainate receptors influence the anxiolytic-like activities
3. 学会等名 第10回武田科学振興財団 薬科学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松彩夏, 岸川咲史, 飯田和泉, 照沼美穂
2. 発表標題 アンモニアによる新規アルツハイマー病関連因子蓄積のメカニズム
3. 学会等名 第60回新潟生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸川咲史, 照沼美穂
2. 発表標題 アストロサイトに発現するグルタミン合成酵素の発現調節機構
3. 学会等名 第60回新潟生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Sari Kishikawa, Izumi Iida, Fumiko Harada and Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia increases the expression of amyloid precursor protein in astrocytes.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia-induced regulation of glutamine synthetase stability in astrocytes.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会/第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia induces Alzheimer's disease pathology in astrocytes.
3. 学会等名 ISN-ASN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Sari Kishikawa, Genki Ito, Izumi Iida and Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia-mediated induction of Alzheimer's disease pathology in astrocytes.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Formation and detoxification of ammonia in the human body.
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 照沼美穂
2. 発表標題 脳健康と食生活
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川咲史, 照沼美穂
2. 発表標題 アストロサイトのアンモニア代謝調節機構の解明
3. 学会等名 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonium-induced GS degradation undergo proteasome independent pathways
3. 学会等名 WCP2018(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Miho Terunuma
2. 発表標題 The effect of hyperglycemia on brain cells.
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 照沼美穂
2. 発表標題 Regulatory mechanism of glutamate metabolism in CNS health and disease
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 照沼美穂
2. 発表標題 アンモニアが脳に与える影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 那須優介, 照沼美穂
2. 発表標題 The role of extracellular glutamine concentration in regulating astrocytic glutamine synthetase expression
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Nasu, Miho Terunuma
2. 発表標題 The role of extracellular glutamine concentration in regulating astrocytic glutamine synthetase expression
3. 学会等名 Society for Neuroscience
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岸川 咲史 (Kishikawa Sari) (50781358)	福岡歯科大学・口腔歯学部・特別研究員 (37114)	
研究分担者	飯田 和泉 (渡辺和泉) (Iida Izumi) (80751031)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------