

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700399

研究課題名（和文） ACE 活性低下が引き起こす脳内神経細胞死の分子機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of the molecular mechanism underlying the neuronal death induced by ACE inhibition in APP transgenic mouse

研究代表者

鄒 鞏 (ZOU KUN)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：40450837

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病(AD)では、アミロイド β 蛋白 ($A\beta$)の脳内蓄積機構の解明が重要な課題となっている。我々は、Angiotensin-converting enzyme(ACE)が、神経毒性の強い $A\beta_{42}$ を神経保護作用をもつ $A\beta_{40}$ に変換する活性($A\beta$ 変換活性)を有することを見いだした。更に、 $A\beta$ 変換活性とアンギオテンシン変換活性が ACE の異なるドメインに存在することを明らかにした。(Zou et al., *J Neurosci*, 27:8628-35, 2007; Zou et al., *Rev Neurosci*, 19:203-212, 2008; Zou et al., *J Biol Chem*, 284:31914-20, 2009)。一部の ACE 阻害剤は、 $A\beta$ 変換活性をより強く阻害し、アルツハイマー病の発症に関与している可能性が考えられた。本研究は、これらの結果を踏まえ、ACE 抑制が脳内神経細胞死に関連するか否かを検討した。

ACE 阻害剤のカプトプリルを低濃度(lowc aptopril)と高濃度(high captopril)を二種類の投与を APP tg マウスへ 11 カ月間連続投与し、17 カ月齢マウス脳内のアミロイド沈着を thioflavin S 染色で検討した。加齢対照群マウスの海馬および大脳皮質にアミロイド沈着が検出されたが、過剰用量のカプトプリルが APPtg マウスの海馬および大脳皮質のアミロイド沈着を顕著に増強した。さらに、臨床に応用されている用量においても、アミロイド沈着の増強が認められた。これらの結果から、ACE 抑制が脳内アミロイド沈着を促進することが示唆された。さらに、我々は、アルツハイマー病で良く見られるもう一つの病理像、tau のリン酸化が起きている否かを検討した。対照群に比べ、低濃度カプトプリル投与群では、脳梁神経細胞の tau リン酸化増強の傾向を示したが、有意差が認められなかった。高濃度カプトプリル投与群では、脳梁神経細胞の tau リン酸化が顕著に増強された。これらの結果から、ACE 阻害が引き起こしたアミロイド沈着の増加が tau リン酸化を促進したと考えられる。また、高濃度カプトプリル投与群は大脳皮質の神経細胞が明らかに減少し、その局在が乱れていることを判明した。APPtg マウス脳内では、顕著な神経細胞死が通常認められていないが、ACE 活性抑制 APPtg マウス脳の病理像では、神経細胞死を含めアルツハイマー病患者脳の病理像と極めて類似していた。このことは、ACE 活性低下が $A\beta_{42}$ 沈着の増加を招き、アルツハイマー病の発症と関連していることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Amyloid β -protein 1-42 ($A\beta_{42}$), as well as the elevation of the ratio of $A\beta_{42}$ to the

shorter major form of A β 40, has been identified as important in early events in the pathogenesis of Alzheimer's disease. We have reported that A β 40 has neuroprotective effects against metal-induced oxidative damage and A β 42-induced neuronal death. We then identified angiotensin-converting enzyme (ACE) as an A β 42-to-A β 40-converting enzyme and found that ACE inhibition enhances A β 42 deposition. ACE is one of the most commonly targeted enzymes by inhibitors in elderly hypertensive populations. To investigate whether ACE inhibition leads to neurodegeneration in the brain of Alzheimer's disease mouse model, we performed a long-term treatment of Tg2576 mice with a high or a low dose of ACE inhibitor. The treatment with high dose ACE inhibitor significantly reduced blood pressure and resulted in a lower survival rate of mice compared with the control and the low-dose treatment. In addition to the increase of A β 42 deposition, other Alzheimer-like pathologies were also found in the brain of the high-dose ACE inhibitor treatment group, such as a thinner cerebral cortex, an enlarged lateral ventricle and enhanced tau phosphorylation. These results suggest that potent inhibition of ACE may be a risk factor for the development of Alzheimer's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療、アルツハイマー病、アミロイドベータ蛋白

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)では、脳内神経細胞死及びアミロイド β 蛋白(A β)蓄積の機構の解明が重要な課題となっている。我々は、(i) 血圧調節に重要なアンギオテンシン変換酵素(ACE)が、毒性の強いA β 42をA β 40に変換する活性(A β 変換活性)を有すること、(ii) A β 変換活性とangiotensin変換活性は、ACEの異なる

ドメインに存在することを明らかにした。我々は、ACE阻害剤であるカプトプリルをAPPトランスジェニックAPPtgマウスに長期投与したところ、APPtgマウス脳において、A β 42の沈着が著明に増強されることを見出し(Zou et al, *J Neurosci*, 27:8628--35, 2007)、ACE活性低下とA β 42沈着との関連が示唆された。また、疫学的調査から、ACEのI

polymorphism(血清 ACE の低下をもたらす)が AD 発症の危険因子となっていることが報告されている(Lehmann *et al.*, *Am J Epidemiol*, 162:305-17, 2005)。一部の ACE 阻害剤は、A β 変換活性をより強く阻害し、AD の発症に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、ACE の AD 発症との関わりを解明するため、ACE 活性低下による脳内神経細胞死の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ACE 阻害剤のカプトプリルを低濃度(lowcaptopril)と高濃度(high captopril)を二種類の投与を APPtg マウスへ投与し、すなわち、軽度 ACE 阻害と重度 ACE 阻害の影響を検討した。

(2) ACE 活性低下による脳内神経細胞死の誘導機構を明らかにする。APPSwInd x ACE 欠損を交配させ、APPSwInd・ACE(+/-)ならびに APPSwInd を持たない ACE(+/-)マウスを作成した。

(3) ACE 下流因子 angiotensin II の関与を明らかにするために、加齢の angiotensin II receptor (AtgrIa)欠損および AgrIa 欠損・APPtg マウス脳を解析する。

マウス脳を PBS で還流後、半側脳を病理検討用に固定し、残りの半球を凍結保存した。脳標本はアミロイド沈着を評価するために Thioflavin-S 染色、抗 A β 40 ならびに A β 42 特異的抗体による免疫組織染色を行った。脳内神経細胞死の有無を神経細胞のマーカー NeuN 免疫染色、ならびにシナプスマーカー MAP2 と synaptophysin 免疫染色で検討した。Tau のリン酸化を特異抗体 AT-8 の免疫組織染色で検討した。

4. 研究成果

ACE 阻害剤のカプトプリルを低濃度(lowcaptopril)と高濃度(high captopril)を二種類の投与を APPtg マウスへ 11 カ月間連続投与し、17 カ月齢マウス脳内のアミロイド沈着を thioflavin S 染色で検討した。加齢対照群マウスの海馬および大脳皮質にアミロイド沈着が検出されたが、過剰用量のカプトプリルが APPtg マウスの海馬および大脳皮質のアミロイド沈着を顕著に増強した。さらに、臨床に応用されている用量においても、アミロイド沈着の増強が認められた。これらの結果から、ACE 抑制が脳内アミロイド沈着を促進することが示唆された。

さらに、我々は、アルツハイマー病で良く見られるもう一つの病理像、tau のリン酸化が起きている否かを検討した。対照群に比べ、低濃度カプトプリル投与群では、脳梁神経細胞の tau リン酸化増強の傾向を示したが、有意差が認められなかった。高濃度カプトプリル投与群では、脳梁神経細胞の tau リン酸化が顕著に増強された。これらの結果から、ACE 阻害が引き起こしたアミロイド沈着の増加が tau リン酸化を促進したと考えられる。また、ACE 阻害剤が直接 tau リン酸化を促進するか否かは APPtg ではないマウスで調べる必要がある。

これらのマウス脳内に神経細胞死が起きているかを検討するために、我々は、成熟神経細胞マーカー NeuN の特異抗体と A β 42 の特異抗体を用いて二重蛍光免疫染色を行った。高濃度カプトプリル投与群は大脳皮質の神経細胞が明らかに減少し、その局在が乱れていることを判明した。さらに、A β 42 の沈着が増加していることが明らかとなった。APPtg マウス脳内では、顕著な神経細胞死が通常認められていないが、ACE 活性抑制

APPtg マウス脳の病理像では、アルツハイマー病患者脳の病理像と極めて類似していた。このことは、ACE 活性低下とアルツハイマー病発症を関連していることを示唆した。

我々は、in vivo で ACE の AD 発症との関わりを解明するため、ACE 欠損・APPtg マウス及び ACE 下流因子 angiotensin II receptor Ia(AtgrIa)欠損・APPtg マウスを作成した。これらのマウスを解析に必要な月齢まで飼育維持している。一部必要な月齢に達したマウスについては、脳内神経細胞死の有無ならびに A β 沈着への影響を解析中である。

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 3 件)

1. Zou K*, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T, Terayama Y, Takahashi S and Komano H. Differential appearance of serum A β 43 and A β 42 in the patients with Alzheimer's disease. *Translational Medic.* 1:103, 2011.
2. Marutani T, Maeda T, Tanabe C, Zou K, Araki W, Kokame K, Michikawa M and Komano H. ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1810**:790-798, 2011.
3. Zou K*, Michikawa M, and Komano H. A novel A β -converting activity of angiotensin-converting enzyme and its role in Alzheimer's disease. *Seikagaku*, **82**: 1120-1124, 2010.

* Corresponding author

[学会発表] (計 8 件)

1. 鄒鵬. A β 変換酵素. 特別シンポジウム「アルツハイマー病: 創薬に向けての新たな展

開」日本薬学会第 132 年会 平成 24 年 3 月 (北海道札幌市)

2. 鄒鵬. (招待講演) アンギオテンシン変換酵素の新しい顔: A β 変換酵素. 塩野義製薬株式会社主催—第一回動脈硬化懇話会、平成 23 年 11 月 (大阪府堺市)

3. 鄒鵬. アンギオテンシン変換酵素の新しい顔: A β 変換酵素. 日本認知症学会主催—認知症研究を知る若手研究者の集まり、平成 23 年 7 月 (愛知県大府市)

4. 鄒鵬、劉俊俊、劉姝余、田邊千晶、前田智司、渡邊淳、道川誠、駒野宏人. A β 43 変換活性における ACE の二つ活性ドメインの役割. 第 54 回日本神経化学学会大会、平成 23 年 9 月 (石川県加賀市)

5. 鄒鵬、劉俊俊、渡邊淳、劉姝余、田邊千晶、前田智司、大葉龍太郎、道川誠、駒野宏人.

Two active domains of ACE are essential for A β 43-converting activity. 第 23 回国際神経化学会国際会議、平成 23 年 8 月 (アテネ)

6. 鄒鵬、劉俊俊、劉姝余、田邊千晶、前田智司、道川誠、駒野宏人. Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain. 第 29 回日本認知症学会学術集会、平成 22 年 11 月 (名古屋)

7. 鄒鵬、劉俊俊、劉姝余、田邊千晶、前田智司、道川誠、駒野宏人. ACE 阻害によるアルツハイマー病モデルマウス脳内変化の解析. 第 53 回日本神経化学学会、第 33 回日本神経科学大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会、平成 22 年 9 月 (神戸)

8. 鄒鵬、劉姝余、劉俊俊、田邊千晶、前田智司、道川誠、駒野宏人. Potent inhibition of ACE leads to Alzheimer-like pathology in APP transgenic mouse brain. 2010 年国際アルツハイマー病協会国際会議 平成 22 年 7 月 (ホノルル)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄒鵬 (ZOU KUN)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：40450837

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

駒野 宏人 (KOMANO HIROTO)

岩手医科大学・薬学部神経科学講座・教授

研究者番号：40170378

道川 誠 (MICHIKAWA MAKOTO)

国立長寿医療センター研究所

アルツハイマー病研究部・部長

研究者番号：40270912