

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461300

研究課題名(和文) セクレターゼの異常亢進病態及び分子制御の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological upregulation of beta-secretase and its molecular regulation

研究代表者

荒木 亘 (Araki, Wataru)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第6部・室長

研究者番号：60311429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー認知症(AD)の脳において、アミロイドタンパク(A β)の生成に必須なプロテアーゼであるセクレターゼ(BACE1)の異常な発現増加がみられる。また、A β オリゴマーがAD病態の誘導因子であることが示唆されている。本研究では、初代培養神経細胞のモデル系を用いて、BACE1とA β の関連性を検討した。その結果、A β オリゴマーは翻訳後メカニズムを介して、BACE1を神経突起内に増加させ、発現亢進を引き起こすことを明らかにした。さらに、BACE1の分子制御に関する研究において、LRP1がBACE1のエンドソーム輸送、リソソーム分解の調節を介して、BACE1発現を抑制することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The β -secretase BACE1 is an essential protease for production of amyloid β -protein (A β), whose expression is aberrantly increased in Alzheimer's disease (AD) brains. A β oligomers are suggested to be an inducer of AD pathology. In the present study, we investigated the relationship between BACE1 and A β , using a primary neuron model system. We have demonstrated that A β oligomers induce BACE1 upregulation through a post-translational mechanism involving its augmentation in neuritic compartments. Our study on the molecular regulation of BACE1 has also revealed that LDL receptor-related protein 1 (LRP1) downregulates BACE1 through modulation of its endosomal transport and lysosomal degradation.

研究分野：神経分子病態学

キーワード：アルツハイマー病 認知症 アミロイド セクレターゼ オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー認知症 (AD) は最も頻度の高い神経変性認知症疾患であり、その分子病態において、神経毒性を持つアミロイドペプチド (A β) の脳内蓄積が発症の一次的な原因と考えられている。A β は、アミロイド前駆体タンパク (APP) が膜結合プロテアーゼであるセクレターゼ BACE1 (Beta-site APP cleaving enzyme 1) 及びセクレターゼ複合体により切断を受けて生成する。BACE1 は重要な治療標的の一つであり、その阻害は有望な治療戦略と考えられている。

AD 脳において、BACE1 の発現が増強していることから、BACE1 は病態機序にも関与していると推定される。BACE1 は転写、転写後 (mRNA の安定性)、翻訳、翻訳後の各レベルでの制御がなされていることが知られている。しかし、AD 脳における BACE1 発現増強のメカニズムは明らかではなかった。

最近の研究から、A β の可溶性集合体である A β オリゴマーが、神経・シナプス障害の病原的因子として重要視されており、タウ異常を含めた神経変性誘導作用を持つことが示唆されている。しかし、その神経障害作用のメカニズムについては、まだ十分な解明はなされていない。また、AD 脳にみられる病的な BACE1 発現増加の要因として A β が関与している可能性がある。

一方、我々はこれまでの研究で、BACE1 の活性や発現がその相互作用タンパクにより制御されることを見出し、その制御に関わるタンパクとしては、膜タンパク Reticulon 3 (RTN3) 及び LDL receptor-related protein 1 (LRP1) を同定してきていた。特に、前者については、マウスモデルを用いた研究で、RTN3 発現が APP マウス脳の A β 蓄積を軽減する効果を持つことを明らかにしていた (Araki ら、2013)。

2. 研究の目的

上記のような背景を考慮し、本研究では、AD 病態における BACE1 発現の異常亢進に着目し、神経細胞モデル系を用いて A β と BACE1 発現の関連性について明らかにすることを主な目的とした。さらに、A β 神経障害作用の特性についても検討した。

また、BACE1 の関連タンパクである RTN3、LRP1 に焦点を当て、BACE1 の成熟化後の分子制御について、培養神経細胞を用いて解析するとともに、動物モデルを用いて検証することを試みた。

3. 研究の方法

(1) BACE1 の異常発現亢進のメカニズム

ラット初代培養大脳皮質神経細胞は既報に従い、無血清培地で培養した。

A β 1-42 ペプチド (Peptide Inst) を用いて、既報に従い、A β オリゴマー、A β フィブリル (100 μ M) を調整した。

培養 9 日目に、調整した A β オリゴマー、フィブリルを、培養液で 2.5 μ M に希釈し、神経細胞に添加した。2~3 日後に細胞を回収・固定して、ウエスタンブロット、RT-PCR、免疫細胞化学などで解析した。細胞生存は CCK8 アッセイで評価した。

また、外因性 BACE1 の発現に対する A β の影響を調べるため、培養 8 日目に BACE1 の組換えアデノウイルスを感染させた神経細胞を用いて、同様の実験を行った。

BACE1、APP、ADAM10 などのタンパク発現は、ウエスタンブロットで評価した。APP C 末断片は APP 抗体による免疫沈降-ウエスタンブロットで調べた。

細胞内 BACE1、APP の局在は、特異的抗体を用いた免疫細胞化学で解析した。

(2) A β オリゴマーによる神経細胞障害メカニズム

Caspase 3、eIF2 の活性化は cleaved caspase 3 抗体、リン酸化 eIF2 抗体、eIF2 抗体によるウエスタンブロットで評価した。小胞体ストレス反応の指標として、GRP78 を用いた。

A β とタウの関連について、総タウ抗体、リン酸化タウ抗体 (AT8、PHF1)、非リン酸化タウ抗体 (Tau-1) cleaved tau 抗体を用いた免疫細胞化学で分析した。

(3) BACE1 の分子制御に関する研究

生体における RTN3 による BACE1 機能制御に関する研究

共同研究施設 大塚製薬 Qs'研究所より提供された APP トランスジェニック (Tg) マウス、及び独自に作製した RTN3 Tg マウス (Araki ら、2013) の交配により、ダブル Tg マウスを作出した。それらのマウス

(8~9ヶ月令)を用いて、バーンズ迷路試験を実施した。

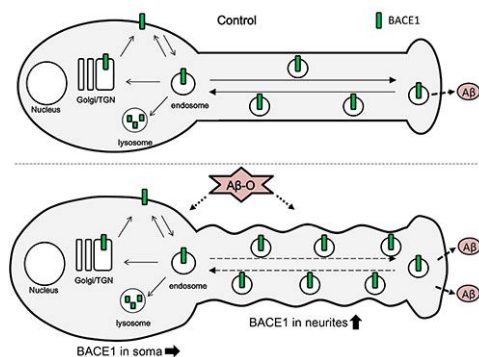
LRP1によるBACE1発現制御メカニズム(継続研究)

2012年度までの研究で、HEK293細胞、ラット初代培養神経細胞の両細胞で、LRP1と同等の機能を保持する短縮型LRP-L4の過剰発現がBACE1タンパクの発現を抑制することを見出した。そのメカニズムを明らかにするため、上記実験系において、LRP-L4の発現がBACE1の細胞内局在に及ぼす影響について、主に免疫細胞化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) BACE1の異常発現亢進のメカニズム

この系において、2~3日間のAオリゴマー処理により、内因性BACE1タンパク発現が有意に増加するが、APP、セクレターゼ(ADAM10)のレベルは変化しないこと、BACE1のmRNAレベルに有意な変化がないこと、アデノウイルスベクターで発現させた外因性BACE1のレベルも同様に増加することが判明した。従って、Aオリゴマーは翻訳後レベルの調節を介してBACE1発現亢進を引き起こすと考えられた。次いで、その機序に関して、BACE1特異抗体を用いる免疫細胞化学的検討の結果、AオリゴマーによりBACE1の免疫反応性の有意な増加が認められた。MAP2との2重染色の結果、軸索、樹状突起とともにBACE1免疫反応性が増強していた。従って、Aオリゴマーにより、BACE1の神経突起内蓄積が起こることが推定された(下図)。さらに、APP C末断片の解析から、AオリゴマーはAPPのアミロイド産生性プロセシングの増加を引き起こすことが示唆された。



以上から、Aオリゴマー刺激により、BACE1の増加を介して、A産生の増幅が起こること、この悪循環がAD病態に関与していることが示唆される。

以上の研究成果は、下記(2)の結果の一部と合わせて、Mol Brain誌に発表した。

(2) Aオリゴマーによる神経細胞障害メカニズムの特性

2~3日間のAオリゴマー処理によりcleaved caspase3、リン酸化eIF2が有意に増加したが、Aフィブリル処理では増加しなかった。Aオリゴマーによりアポトーシス活性化などのストレス応答が惹起されたが、細胞生存の低下は軽度であった。Aオリゴマー処理細胞では、GRP78レベルは不変であったことから、典型的な小胞体ストレス反応は寄与していないことが示唆された(Mamadaら、Mol Brain 2015)。

また、Aとタウの関連についての検討から、Aオリゴマー処理により、タウのリン酸化及びカスパーゼ切断の有意な増加が起こることが示された。

以上に加えて、Aオリゴマーによる神経細胞障害の防御作用を持つ物質の探索的研究も実施した。

今後、Aオリゴマーの神経障害作用の特質や防御についての研究を継続する予定である。

(3) BACE1の分子制御に関する研究

生体におけるRTN3によるBACE1機能制御に関する研究

RTN3の生体におけるBACE1活性、A産生抑制が認知機能障害に及ぼす影響を明らかにするため、APP Tg、RTN3 Tg、APP/RTN3 Tg、non-Tgマウスを用いて、バーンズ迷路試験を実施したが、明確な結論を得るには至らなかった。

LRP1によるBACE1発現制御メカニズム

BACE1とLRP-L4を共発現させた細胞、BACE1のみを発現させた細胞を、二重または三重免疫蛍光染色し比較した結果などから、LRP1は神経細胞・非神経細胞において、相互作用を介してBACE1の初期エンドソームから後期エンドソームへの細胞内輸送を促

進し、そのリソソーム分解を誘導することで BACE1 を抑制的に制御していることが示唆された。この研究成果は eNeuro 誌に発表した。

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4件)

Mamada N, Tanokashira D, Hosaka A, Kametani F, Tamaoka A, Araki W: Amyloid β -protein oligomers upregulate the β -secretase, BACE1, through a post-translational mechanism involving its altered subcellular distribution in neurons. Mol Brain 8: 73, 2015 DOI: 10.1186/s13041-015-0163-5

Tanokashira D, Motoki K, Minegishi S, Hosaka A, Mamada N, Tamaoka A, Okada T, Lakshmana MK, Araki W: LRP1 down-regulates the Alzheimer's β -secretase BACE1 by modulating its intraneuronal trafficking. eNeuro 2(2) e0006-15, 2015 DOI: 10.1523/ENEURO.0006-15.2015

Araki W, Tamaoka A: Amyloid beta-protein and lipid rafts: focused on biogenesis and catabolism. Front Biosci (Landmark Ed), 20, 314-324, 2015 DOI: 10.2741/4311

以上すべて査読あり

Araki W: Meet our editorial board member. Curr Neuropharmacol 14(1):1, 2016 DOI:10.2174/1570159X1401160122124528

〔学会発表〕(計10件)

Tanokashira D, Mamada N, Tamaoka A, Araki W: The reversibility of neurotoxicity induced by amyloid- β oligomers. BMB2015, 神戸, 12.2, 2015

儘田直美, 田之頭大輔, 保坂 愛, 玉岡 晃, 亀谷富由樹, 荒木 亘: アミロイドオリゴマーによる BACE1 発現増強のメカニズム 第34回日本認知症学会学術集会, 青森, 10.2, 2015

荒木 亘, 儘田直美, 保坂 愛, 田之頭大輔, 亀谷富由樹, 石井一弘, 玉岡 晃: The molecular mechanism by which A β oligomers induce BACE1 up-regulation. 第56回日本神経学会学術大会, 新潟, 5.21, 2015

儘田直美, 保坂 愛, 田之頭大輔, 石井一弘, 玉岡 晃, 荒木 亘: アミロイドタンパクの BACE1 発現増強効果. 第33回日本認知症学会学術集会, 横浜, 11.30, 2014

田之頭大輔, 儘田直美, 玉岡 晃, Lakshmana Madepalli, 荒木 亘: The subcellular localization of endogenous BACE1 and LRP1 in primary neurons. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 11.25, 2014

荒木 亘, 保坂 愛, 儘田直美, 田之頭大輔, 玉岡 晃: アミロイドタンパクによる BACE1 の発現亢進. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 9.12, 2014

荒木 亘, 本木和美, 田之頭大輔, 儘田直美, 玉岡 晃, Lakshmana Madepalli: BACE1 の発現と脂質ラフト局在に対する LRP1 の影響 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 5.24, 2014

田之頭大輔, 嶺岸正治, 本木和美, Lakshmana Madepalli, 保坂 愛, 儘田直美, 岡田尚巳, 玉岡 晃, 荒木 亘: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) による BACE1 の抑制メカニズム. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 12.4, 2013

荒木 亘, 嶺岸正治, Lakshmana Madepalli, 本木和美, 保坂 愛, 岡田尚巳, 玉岡 晃: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) による BACE1 の抑制的制御. Neuro2013, 京都, 6.20, 2013

保坂 愛, 嶺岸正治, 玉岡 晃, 荒木 亘: アミロイド蛋白による BACE1 の発現亢進. 第54回日本神経学会学術大会, 東京, 5.31, 2013

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index-lab1.html>

6. 研究組織

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

(1)研究代表者

荒木 亘 (ARAKI, WATARU)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第六部・室長
研究者番号：60311429

(2)連携研究者

玉岡 晃 (TAMAOKA, AKIRA)
筑波大学 人間総合科学研究科・教授
研究者番号：50192183
関口 正幸 (SEKIGUCHI, MASAYUKI)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第四部・室長
研究者番号：80260339

(3) 研究協力者

荻野 晃一 (OGINO, KOICHI)
大塚製薬 Qs'研究所・主任研究員
ラクシュマナ マデパリ (LAKSHMANA,

MADEPALI)

Torrey Pines Institute for Molecular Studies・
Associate Member

亀谷 富由樹 (KAMETANI, FUYUKI)
東京都医学総合研究所・主任研究員
田之頭 大輔 (TANOKASHIRA, DAISUKE)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第六部・流動研究員
儘田 直美 (MAMADA, NAOMI)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第六部・研究生
山本 詞子 (YAMAMOTO, FUMIKO)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第六部・研究生
荒木 由美子 (ARAKI, YUMIKO)
国立精神・神経医療研究センター 神経研究
所 疾病研究第六部・研究生