

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293168

研究課題名(和文)生活習慣病治療薬によるアルツハイマー病治療戦略の基盤構築

研究課題名(英文)Basic research for the clinical application of drugs for a life style disease to treat Alzheimer's disease.

研究代表者

山本 浩一 (Yamamoto, Koichi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00528424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：降圧薬のアンジオテンシンII1型受容体(AT1)拮抗薬(ARB)は観察研究においてアルツハイマー病(AD)進展抑制作用を有する事が示唆されるが、その機序は明らかでない。一方、AGE受容体(RAGE)はアミロイド(A_β)と結合し、AD進展に関与する事が知られている。本研究では、A_βがRAGEを介してAT1を活性化することがAD発症メカニズムの一つであり、ARBがそれを抑制するという仮説の証明を目的とした。その結果、細胞実験においてA_βによるAT1活性化機構が証明され、ARBがその現象を一部抑制する事が証明された。一方、動物実験は完結せず更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Previous observational studies have implied that angiotensin II type 1 receptor (AT1) blocker (ARB) is superior to the other types of antihypertensives in attenuating the progression of Alzheimer's disease (AD). The receptor of AGE (RAGE) is shown to be involved in the pathogenesis of AD by binding to amyloid (A_β). In this study, we planned to clarify the hypotheses that A_β activates AT1 via an interaction between AT1 and RAGE on cellular membrane, and that ARB prevents the progression of AD by inhibiting the interaction. In vitro analysis revealed that the binding of A_β to RAGE activates cellular signaling and undergoes endocytosis by activating AT1, and that ARBs partially inhibited the phenomenon. Further investigation will be required to investigate whether this phenomenon contributes to the progression of AD using mice models.

研究分野：老年医学

キーワード：アルツハイマー病 アンジオテンシンII受容体 AGE受容体 降圧薬

1. 研究開始当初の背景

本邦の認知症患者は現在 300 万人を越え今後も増加傾向にあることが予想される。認知症の原因疾患として最も多いものはアルツハイマー病(AD)であり、その社会的影響の大きさから AD に対する有効な治療法の構築は国家戦略的にも重要な課題に位置づけられる。AD の発症病理は簡略的には脳内へのアミロイド β (A β)の蓄積と続発する Tau の異常リン酸化に伴う神経原繊維変化であり、近年 A β ワクチンや A β 凝集阻害剤等、AD の発症病理に即した治療法が試みられてきた。しかしこれらの治療法はいずれも有効性が確認されておらず臨床応用には至っていない。一方、高血圧は血管性認知症の強い危険因子であるが、最近の研究により A β の沈着等 AD の病態形成に関与することが明らかになりつつある。このため降圧療法による認知症発症抑制効果が期待されるが、降圧薬による認知症発症抑制効果は単一の大規模臨床試験では認められずメタ解析で傾向が認められる程度である。その理由の一つとして近年注目されているのが降圧薬間の認知症発症抑制効果の差であり、アンジオテンシン II(AII)1 型受容体(AT1)拮抗薬(ARB)が他の降圧薬に較べ認知症発症、認知機能悪化や剖検脳の AD 病変を明らかに抑制することが報告されている。この効果は ARB と同様に AII を抑制する ACE 阻害薬には認められず、ARB は AII による AT1 活性化抑制作用とは独立した AD 発症抑制作用を有する事が示唆される。しかし従来の概念ではその機序は説明困難であり ARB による AD 治療の基礎的基盤は構築されていない。我々は AII 非依存性の AT1 活性化についての研究を行っており、これまでに酸化 LDL が細胞膜上の酸化 LDL 受容体(LOX-1)と結合する事で G 蛋白共役型受容体である AT1 を活性化することを明らかにした(2015 FASEB journal)。我々はこの結果を踏まえ AT1 を活性化する他の候補分子として最終糖化産物 (AGE)と AGE 受容体(RAGE)に着目し検討を行っている。RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型の受容体であるが RAGE とリガンドの結合が細胞内シグナル伝達を活性化する機構は明らかでない。また、RAGE は A β と結合し AD を促進する事が報告されており、AD 治療薬としての RAGE 阻害薬の開発も進められている。

2. 研究の目的

AB が RAGE を介して AT1 を活性化することが AD 発症メカニズムの一つであり、ARB がそれを抑制するという仮説を証明し ARB を用いた AD 治療法の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

ARB が AD の治療薬である基礎的根拠を構築することを目標として 4 つの戦略に基づく計画・方法を立案する。

戦略1 RAGE リガンドによる AT1 活性化機構

の証明

戦略1では本研究計画の基礎となる RAGE と AT1 が細胞膜上で複合体を形成することで RAGE リガンドが AT1 を活性化するという仮説の証明を行う。

a. AGE による細胞内シグナル活性化が RAGE, AT1 依存性であることの証明

AGE 刺激による NRK-52E 細胞における炎症性遺伝子発現や蛋白発現の変化が RAGE, AT1 の siRNA や ARB 投与で抑制されるかを real time PCR 法や Western blotting で確認する。

NRK-52E 細胞は AGE 刺激により上皮間葉移行(EMT)により繊維芽細胞の形質に転換することが知られる。AGE 刺激時の EMT が RAGE, AT1 の siRNA や ARB 投与で抑制されるか免疫染色や Western blotting で確認する。

b. RAGE, AT1 が細胞膜上で複合体を形成することの証明

RAGE, AT1 の結合を 共免疫沈降法、in situ PLA 法、BRET により確認する。

NRK-52E 細胞や遺伝子改変 CHO 細胞から膜蛋白を抽出して共免疫沈降法で AT1, RAGE の共沈を確認する。

先行研究で用いた In situ PLA 法で RAGE, AT1 の近接性を NRK-52E や遺伝子改変 CHO 細胞を用いて確認する。

Cos7 細胞に RAGE, AT1 に YFP や luciferase を付加したベクターを導入して二分子間の BRET を各種組み合わせで検討する。

c. AGE による細胞内シグナル活性化が AT1 活性化の下流にあることの証明

AGE が AT1 依存性に G 蛋白を活性化することを証明する。G 蛋白の活性化は G α q 下流の IP1(活性化で増加)、G α i 下流の cAMP(活性化で減少)を定量評価する。NRK-52E 細胞では AT1 の siRNA や ARB を用いて検討し、遺伝子改変 CHO 細胞間で比較検討を行う。

AGE による G 蛋白の活性化が AT1 の活性化に伴うものであることを示すために、先行研究で用いた G 蛋白の活性化能が低下している変異 AT1 を用いる。変異 AT1 を遺伝子導入した Cos7 細胞では AT1 を導入した細胞に較べて AGE 刺激に伴う G 蛋白の活性化が減弱することを確認する。

戦略2 A による神経系細胞傷害性シグナル活性化への AT1 の関与の証明

戦略2では戦略1を基に A が惹起する神経系細胞傷害性の細胞内シグナル活性化に AT1 が関与することを示す。A は RAGE 非依存性の経路も活性化するため、AT1 阻害が A による神経系細胞内シグナル伝達を RAGE 阻害と同等度に抑制することを示すことを目標とする。

a. A が RAGE, AT1 依存性に細胞内シグナルを活性化することの証明

遺伝子改変 CHO 細胞を用いて A 1-40 や A 1-42 による G 蛋白や MAP キナーゼ、Nf κ B の活性化が CHO-RAGE-AT1 細胞でのみ生じ

ることを証明する。

b. A が AT1 依存性に神経細胞の細胞内シグナルを惹起することの証明

永久継代神経細胞や購入した初代培養細胞を用いた検討

RAGE トランスジェニックマウスを用いた検討では A が RAGE 依存性に MAP キナーゼを活性化することが示されている。また A による RAGE を介した長期増強(LTP)の障害は p38MAP キナーゼ依存性であることが報告されている。まず永久継代神経細胞(SH-SY5Y 細胞、N2a 細胞)、次いで初代培養細胞(LONZA より購入)を用いて、A 1-40 や A 1-42 刺激時に生じる MAP キナーゼ活性化が抗 RAGE 抗体と同等度に ARB で抑制されるか検討する。

マウス初代培養神経系細胞を用いた検討

戦略 4 で使用する AT1a 欠損マウス、RAGE 欠損マウス、野生型マウス新生仔の大脳皮質から神経細胞を初代培養する。A 刺激による MAP キナーゼ活性化が野生型マウスの神経細胞に比し AT1a 欠損マウス、RAGE 欠損マウスの神経細胞で同等度に抑制されていることを示す。同様の検討は初代培養ミクログリア細胞を用いても行う。

c. RAGE リガンドが RAGE-AT1 依存性に Tau リン酸化を誘導することの証明

Tau の過剰リン酸化は Tau の凝集や神経細胞死を介して AD を進展させる重要な病理変化であり、AT1 がこれに関与するかを検討する。

AGE が RAGE を介した GSK-3 の活性化により Tau を過剰リン酸化することが報告されている³。SH-SY5Y 細胞を AGE で刺激したときの GSK-3 や Tau のリン酸化が ARB や AT1 の siRNA で抑制されるか検討する³。

A が AT1 を介して Tau をリン酸化し得るか確認するために遺伝子改変 CHO 細胞(図 1)に Tau を遺伝子導入し、A を産生する遺伝子改変 HEK293 細胞⁴ と共培養し、Tau のリン酸化が CHO-RAGE-AT1 細胞でのみ生じるか確認する。

戦略 3 A 細胞内移行への AT1 活性化の関与の証明

戦略 3 では背景に記述した如く A の RAGE を介する細胞内移行が arrestin 依存的 AT1 細胞内移行(internalization)に付随することを証明する。本研究では In cell analyzer 6000(GE)を用いる。

a. RAGE が AT1- arrestin 依存的に細胞内移行することの証明

arrestin2 は AT1 活性化時に AT1 へ結合し AT1 の endocytosis を引き起こすがその動態を GFP タグした arrestin2 で観察することができる⁵。そこで遺伝子改変 CHO 細胞に arrestin2-GFP を導入し AGE 刺激による動態をライブイメージングで観察する。arrestin2 の細胞内移動が CHO-RAGE-AT1 細胞のみで起こることを想定する。

Cos7 細胞に arrestin2-GFP を、AT1、RAGE のいずれかに mcherry をタグしたベクターと共に導入し AGE 刺激により生じる FRET シグナルの動態をライブイメージングで観察する。AT1、RAGE 複合体が arrestin2 と共に細胞内移行することを想定する。

b. A が RAGE-AT1 依存性に細胞内移行することの証明

A を産生しない遺伝子改変 CHO 細胞を A 存在下で培養した 3,6,24 時間後に免疫染色や Western blotting で細胞内 A を検出する。CHO-RAGE-AT1 細胞のみで細胞内 A が検出されることを想定する。

戦略 4 ARB による AD 進展抑制作用の機序の検討

AD モデルマウスへの ARB 投与が認知機能低下を抑制することはこれまでも報告されている。戦略 4 では戦略 1-3 で得られた結果を元に ARB によるマウス AD の進展抑制作用が AII 非依存性の AT1 活性化の抑制が主体であることを証明する。AII 非依存性の AT1 活性化を観察しうるモデル動物として AII を産生しないアンジオテンシノゲン(AGT)欠損マウスを使用し、AT1a 欠損マウスと比較する。

a. AT1 阻害が A の BBB 通過を抑制することの証明

過去の研究に従い 12 週齢のマウスに経静脈的に [125IA] (1-40)を注入し脳組織中の RI 量を検出する⁶。AT1a 欠損マウスや野生型マウスへの ARB 投与で脳内 A 移行が減弱することを示す。

b. ARB が AII 非依存性の AT1 活性化抑制により AD 進展を抑制することの証明

認知症モデルマウスである APP23 トランスジェニックマウス(APP23 マウス)を用いた交配により三種のマウスを準備する。APP23 マウスは糖尿病(DM)発症により認知機能悪化が加速することより⁷、自然経過群に加え、ストレプトゾトシン(STZ)による DM 誘導群を作成し各群を ARB 投与群と vehicle 群に分ける。自然経過群では 6, 12 ヶ月後、DM 誘導群では 3,6 ヶ月後に行動実験(Morris 水迷路、Open field テスト)を行う。その後マウスを解剖し脳の組織学的、免疫組織学的検討を行う。評価項目は共同研究者の過去の報告に従う⁷。本実験では 認知機能低下は AT1 欠損で抑制されるが AGT 欠損では抑制されない、ARB は(AGT 欠損による)AII 非存在下での AT1 活性化抑制により認知機能を改善することを示すことを目標とする。

4. 研究成果

戦略 1-4 の成果を以下にまとめる。尚、研究方法に記載した研究立案時と異なる実験プロトコルを用いて施行した検討もある。

戦略 1 RAGE と AT1 を発現しない Chinese Hamster Ovary (CHO)細胞に RAGE 単独、AT1 単独、RAGE+AT1、RAGE+非活性型変異 AT1(AT1mt)、RAGE+AII2 型受容体(AT2)を安定的に発現する細胞を作成した(それぞれ、

CHO-RAGE, CHO-AT1, CHO-RAGE-AT1, CHO-RAGE-AT1mt, CHO-RAGE-AT2 とする)。AII による AT1 活性化時には G 蛋白依存性経路として *Gaq*, *Gai*, *Gα12/13* が活性化する事が知られており、本研究では *Gaq* 下流の IP1(活性化で増加)、*Gai* 下流の cAMP(活性化で減少)を定量評価した。その結果、RAGE リガンド (HMGB1, AGE) 刺激により、CHO-RAGE-AT1 では濃度依存性に cAMP の減少を認め、その他の細胞では最大濃度のリガンド刺激でも減少を認めなかった。一方、RAGE リガンドは CHO-RAGE-AT1 において最高濃度でも IP1 濃度に影響を及ぼさなかった。これらの結果より、RAGE リガンドと RAGE の結合は AT1 を活性化させるが、G 蛋白依存性経路は AII 刺激時と異なる事が明らかになった。またこの反応は種々の ARB で抑制される事が示された。両受容体の共局在は免疫沈降法や in situ PLA 法を用いて示されたが、更に BRET 法による検出を行う予定にしている。NRK52E 細胞の検討に関しては研究方法に記載した予測通り RAGE リガンドによる細胞反応が ARB や AT1 の siRNA で抑制される結果が得られた。

戦略 2 戦略 1 と同様の方法で、 $A\beta_{1-42}$ を用いた刺激実験を行った。その結果、他の RAGE リガンドと同様に $A\beta_{1-42}$ は *Gai* 依存性の cAMP 減少作用を CHO-RAGE-AT1 細胞でのみ認め、*Gaq* 経路には影響を及ぼさなかった。神経細胞を用いた $A\beta$ の細胞傷害作用の検討は研究期間中に実験系が確立できず、今後の課題となった。

戦略 3 細胞に蛍光 $A\beta_{1-42}$ (Hylite Fluor-555 labeled)を一定時間投与後洗浄し、翌日に細胞内への $A\beta$ の取り込みを、顕微鏡を用いて定量評価した。その結果、CHO-RAGE-AT1 では CHO-RAGE, CHO-AT1, CHO-RAGE-AT2 に比し著明な取り込みの増加を認めた。CHO-RAGE-AT1mt での取り込みは CHO-RAGE-AT1 と同等であり、 $A\beta$ の細胞内取り込みには G 蛋白依存性経路が関与しない事が示された。また、RAGE-mApple(赤色)と AT1-eGFP(緑色)を共発現した CHO 細胞を、超高解像度顕微鏡を用いて live imaging し、リガンド投与時の細胞膜面の動態を観察した。その結果、細胞膜面では RAGE, AT1 の蛍光が merge しており、リガンド刺激時に消失(細胞質中へ移動)する像が観察された。このように、 $A\beta$ の細胞内移行に RAGE, AT1 複合体が関与する事を強く支持する結果を得た。

戦略 4 本研究では AT1 欠損マウス、AII を産生しない AGT 欠損マウス、野生型マウスを AD モデルマウスの APP マウスを交配して行う計画を立案した。但し、AGT 欠損マウスの交配に難渋し、産子が得られない状態が継続した。同マウスの性質である著しい低ナトリウム血症と生育環境からの胎生致死が要因として考えられたが、解決できなかった。一方、AT1 欠損マウス/APP マウスと APP マウスの比較実験を進めたが、これらのマウスの

交配でも期待した産仔数が得られず、実験の遅延が続いた。現在、検討を行っているが、研究期間中に結論を得ることができなかった。

上記の結果から本研究で得られた成果をまとめると下記の通りである。

1. RAGE は LOX-1 と同様に AT1 と細胞膜上で複合体を形成し、RAGE リガンドの刺激は AT1 を G 蛋白選択的に活性化する。
2. $A\beta$ は他の RAGE リガンドと同様に AT1 を G 蛋白選択的に活性化した。
3. $A\beta$ が RAGE, AT1 依存性に細胞内移行し細胞内に蓄積する機構が存在することが証明された。

本研究により、既に確立されている RAGE による AD 進展機序に AT1 活性化が大きく関与する事を示唆する成果が得られたことは意義深い。一方、動物実験等は研究計画通りに進まず、生体内での役割の証明が本成果の臨床応用への課題として残された。本研究の成果は、数報の論文として報告予定であり準備を進めている。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 浩一 (YAMAMOTO, Koichi)
大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 講師
研究者番号: 00528424

(2)研究分担者

楽木 宏実 (RAKUGI, Hiromi)
大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 教授
研究者番号: 20252679

沢村 達也 (SAWAMURA, Tatsuya)
信州大学 学術研究院医学系 教授
研究者番号: 30243033

里 直行 (SATO, Naoyuki)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 其他部局等 部長
研究者番号：70372612