

令和元年6月13日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06965

研究課題名(和文) 生体を模倣する試験管内アミロイド線維形成反応系の構築と反応機構の解析

研究課題名(英文) Development of in vitro amyloid fibril formation systems that mimic the physiological fibrillogenesis conditions in vivo and their application to the analysis of fibril formation mechanism

研究代表者

長谷川 一浩 (Hasegawa, Kazuhiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：60324159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性疾患であるアミロイド症を引き起こす各種アミロイド線維、特にアルツハイマー病 アミロイド(A_β)および 2-ミクログロブリン(2-m)アミロイド(透析アミロイド)に焦点を当て、生体内環境を忠実に模倣した試験管内アミロイド線維形成反応系を構築する。アミロイドでは、脳アミロイド血管症の沈着局所に共沈している蛋白質群の作用機序を、生理的条件に近づけた試験管内重合反応系を用いて解析した。また、脳中の生理濃度(nM)に近いA_β蛋白質モノマー濃度で重合反応を行う高感度型反応系の構築を検討した。2-mアミロイドでは、重合核形成因子の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)患者が急増しており、根本的な予防法・治療法の開発が急務である。A_β蛋白質(A_β)は、ADの病態の最上流部にあるとされている。アミロイド線維形成など、A_βの脳内での挙動を解明する為に、試験管内で正確に再現することが必要。現状では、脳内の生理濃度(nM)よりかなり高濃度のA_βを用いて解析しており、反応機構の再現が不完全な可能性がある。より低濃度で反応する試験管内反応系を構築し、重合、オリゴマー形成、共存蛋白質群との相互作用などを正確に再現し、予防・治療法の開発に役立てる。2-mアミロイドでも生体における重合機序が完全には解明されておらず、試験管内重合反応系の構築が必要。

研究成果の概要(英文)：We evaluate the roles of the various biological molecules or reaction conditions in the amyloid fibril formation using amyloid fibril formation systems in vitro. (1) We examined the effects of apoE and clusterin on the fibril formation of Alzheimer's disease amyloid- β peptide (A β) using the previously developed near-physiological A β fibril formation system for evaluating the efficiency of protein components to induce the nucleation of A β peptide. We found that physiological concentrations of apoE and clusterin delayed the initiation time of amyloid growth kinetics in a concentration-dependent manner. (2) To further decrease the concentration of A β peptide in the reaction, we developed a high-sensitive system, in which the elongation of amyloid fibrils by sub-micromolar concentrations of A β peptide can be detected. (3) We tried to identify the proteins which induce the nucleation of beta2-microglobulin amyloid, but the reaction system was not sufficient to detect them.

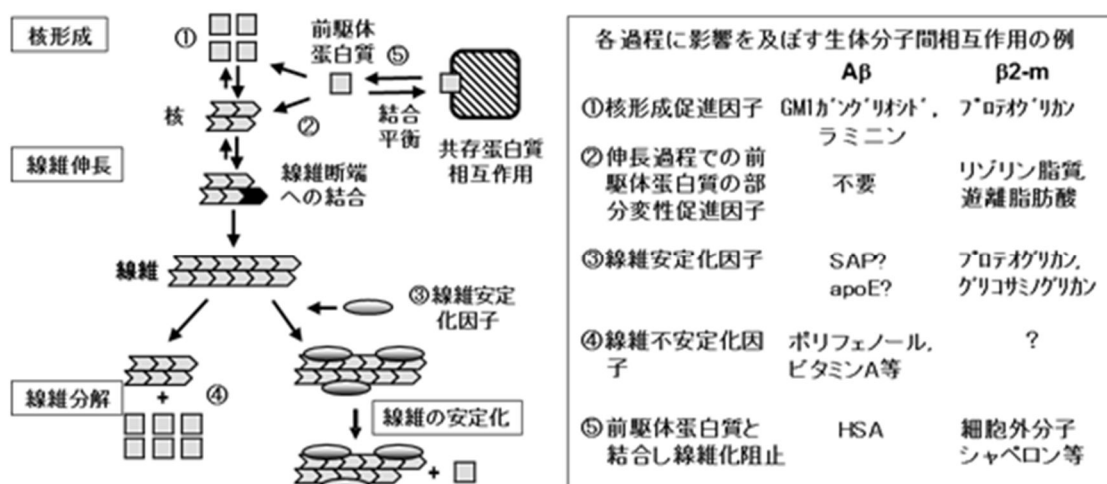
研究分野：生物物理学

キーワード：蛋白質 変性とフォールディング 病理学 アミロイド アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイド線維形成機構の研究状況

アミロイドは、20種類を超える前駆体蛋白質モノマーが異常な立体構造をとり、幅 10-20 nm の線維として凝集し、細胞外に蓄積し疾患を引き起こすものである。我々は、 $A\beta$ や $\beta 2-m$ アミロイド等の各種アミロイドについて、試験管内における前駆体蛋白質($A\beta$ 蛋白質, $\beta 2-m$)からのアミロイド線維形成反応系を開発してきた。これらを用いて線維形成反応が、重合核形成過程とそれに続く線維伸長過程より構成される、重合核依存性重合モデルで説明できることを示してきた。さらに、核形成・線維伸長・線維安定化の各過程において前駆体蛋白質・線維と様々な生体分子・有機化合物との分子間相互作用が重要な役割を果たすこと、また、各過程がアミロイド毎に特徴的な挙動を示すことを示してきた(図1)。



(図1) アミロイド線維形成の過程と分子間相互作用

(2) 現時点で解決する必要がある課題とその対応

$A\beta$ 蛋白質は脳実質に蓄積し、アルツハイマー病の原因になるとされている。また脳血管、特にその筋層の基底膜にもアミロイドとして蓄積し、出血を引き起こす(脳アミロイドアンギオパシー、CAA)。最近、脳脊髄液が血管周囲腔を通して脳実質と流通していることが示され、この過程で $A\beta$ 蛋白質が沈着すると提唱されている。 $A\beta$ 蛋白質モノマーは試験管内の中性 pH 緩衝液中でインキュベートすると自発的に核形成し線維を形成する。ところで、現在用いられている試験管内重合反応系では、高濃度の $A\beta$ 蛋白質(10-100 μM) を、気液界面の存在する状況で反応させることが一般的である。一方、脳・脳脊髄液中の $A\beta$ 蛋白質濃度は nM オーダーと低い。 $A\beta$ 線維形成には細胞膜、細胞外マトリックス、体液中の共存蛋白質等の生体成分が促進・抑制的に関わると考えられる。

しかし高濃度の $A\beta$ 蛋白質は単独で自発的に重合する為、生体成分との相互作用の検出は難しいと考えられる。そこで $A\beta$ 蛋白質濃度を低下させた試験管内線維形成反応系の構築を試みた。その結果、生体因子による低濃度 $A\beta 40$ 蛋白質の重合核形成促進を検出できる反応系の構築に成功した。この反応系は、極めて強く核形成を誘起する気液界面を除去し、 $A\beta$ 蛋白質単独で自発的な核形成が起きにくい 5 μM 以下にし、さらに、核形成を誘起しにくい担体(セファロースビーズ)の表面に核形成誘起能を評価したい蛋白質を固定し攪拌することを特徴とする。これにより、核形成を抑制するとされてきたラミニンなどの基底膜蛋白質が、核形成を促進することを示した。このように $A\beta$ 蛋白質は、生理的な条件から外れている高濃度や気液界面等の存在下では、生体とは異なった挙動を示す可能性が高い。

本研究課題では、さらに低濃度(nM レベル)での重合反応を可能とする方法を開発すること、また、それを用いて $A\beta$ 蛋白質の重合機構を詳細に解析すること、さらに、生理的な濃度の範囲内で、脳内の共存蛋白質との相互作用を改めて解析することを目的とした。

長期血液透析の合併症である $\beta 2-m$ アミロイドの試験管内線維形成反応では、核と $\beta 2-m$ を

中性 pH の溶液中で混合しただけでは線維に組み込まれない。伸長するためには β 2-m が部分的に変性する必要がある。生体内因子としてはリゾリン脂質等が試験管内でこの作用を有することを示した。今後、これらの生理的な反応機序を解析する必要がある。

2. 研究の目的

難治性疾患であるアミロイド症を引き起こす各種アミロイド線維、特にアルツハイマー病 β アミロイド($A\beta$)および β 2-ミクログロブリン(β 2-m)アミロイド(透析アミロイド)に焦点を当て、生体内環境を忠実に模倣した試験管内アミロイド線維形成反応系を構築する。

(1) $A\beta$ では、従来の反応系より大幅に濃度を下げて、生理濃度に近づけた $A\beta$ 蛋白質モノマー濃度で重合反応を行う高感度反応系を構築しつつあり、これにより生理条件下で存在する共存蛋白質などとの相互作用(平衡反応)を直接解析することが可能になると推定される。これらの試験管内反応系を用いて生体内でのアミロイド線維形成に必須の反応機構を解明し、薬剤の開発など予防・治療に役立てることを目指す。

既に開発した重合反応系を利用しつつ、 $A\beta$ の高感度反応系を発展・確立させる。これらを用いて、図1のような、脳・脳脊髄液中における $A\beta$ 蛋白質と各種共存蛋白質の相互作用と挙動を表す試験管内モデルを構築し、それを薬剤の開発に利用することを目的とするものである。このため 脳・脳脊髄液中で $A\beta$ 蛋白質と反応していることが報告されているHSA、トランスサイレチン、アポリポ蛋白質 E 等により線維形成・伸長がどのように影響を受けるか解析する。HSAをはじめとして各共存蛋白質は低分子・脂質・ホルモン等を結合する。リガンドの結合が $A\beta$ 蛋白質との相互作用にどう影響するかを調べる。細胞外マトリックス成分のどれが $A\beta$ の核形成等に重要か等を探索・検討する。

(2) β 2-m アミロイドについて、リゾリン脂質等の線維伸長を誘起する因子が、生体内で機能していることを解明すると共に、プロテオグリカン等の他の因子が線維伸長に作用しているか探索する。見出した因子を用いて、試験管内反応系を構築し、線維形成を抑制する薬剤を探索する。

3. 研究の方法

(1) $A\beta$ 蛋白質の重合反応系の改良と核形成を誘起する生体因子の探索

核形成反応；これまでの研究により、 $A\beta$ 蛋白質の試験管内重合反応において、従来一般的に用いられてきた反応条件自体が、核形成を誘起することが判明した。すなわち、 $A\beta$ 蛋白質が、反応容器の気液界面で核形成する為、反応容器から空気を無くした。また、高濃度の $A\beta$ 蛋白質濃度では、気液界面が無くても自発的に核形成してしまうため、 $5\ \mu\text{M}$ とした。さらに、核形成を誘起しにくい攪拌子として、NHS 活性化セファロースを見出し、そこに細胞外マトリックス成分蛋白質等を固定することで、生体因子による低濃度 $A\beta$ の重合核形成促進を検出できる反応系を構築した。重合したアミロイド線維の検出には、アミロイド線維に特異的に反応する蛍光物質であるチオフラビン T を用いた。

線維伸長反応(従来型で高感度化した反応系)；伸長反応を測定する際には、超音波破碎したアミロイド線維をシードとし、比較的低濃度である $5\ \mu\text{M}$ の $A\beta$ 1-40モノマーを用いた。反応容器にシードとモノマーを入れ、チオフラビン T を予め添加しておき、マイクロプレートリーダーにより、リアルタイムで線維伸長反応を定量測定した。

$A\beta$ 蛋白質の新規重合反応系の構築；上記の従来型の反応系では、 $A\beta$ 蛋白質の濃度を $5\ \mu\text{M}$ 以下にすることは難しい。そこで、反応容器並びに検出系を各種検討し、低濃度でも重合反応を生じさせることのできる新規高感度反応系を開発した。

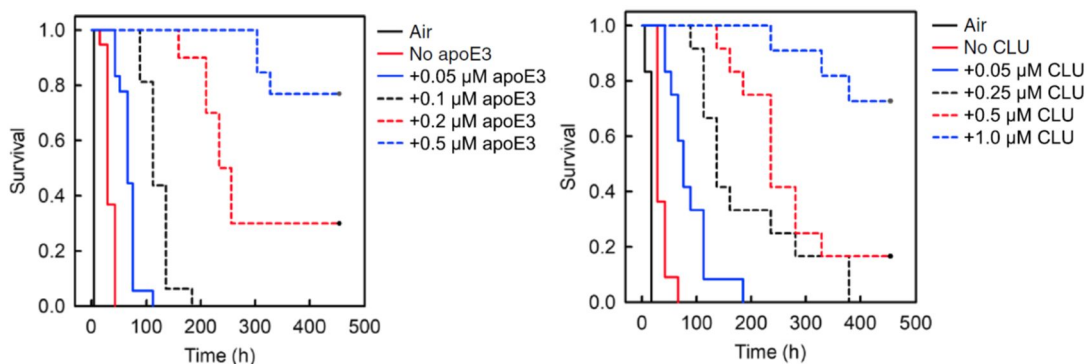
(2) β 2-m アミロイドの核形成を検出するための試験管内反応系

β 2-m は $A\beta$ 蛋白質と同様に、アミロイド線維形成において重合核依存性重合反応をおこなう。また $A\beta$ 蛋白質の線維形成反応系と同様にチオフラビン T を用いて、アミロイド線維を特異的に検出することができる。一方、 $A\beta$ 蛋白質と異なり、中性 pH の生理的環境下で伸長するためには β 2-m が部分的に変性する必要がある。生体内に存在する変性を誘起する因子としては、リゾリン脂質・遊離脂肪酸等が同定されているが、今回は遊離脂肪酸を使用した。 $A\beta$ 蛋白質と同様な、気液界面を排除した重合核形成反応系を試作し、核形成因子の探索が可能か検討した。

4. 研究成果

(1) β アミロイド線維形成の初期過程に及ぼす生体分子の検出と反応機構。

脳アミロイドアンギオパシー(CAA)の形成過程における β アミロイドと生体分子の相互作用を解析した。最初に、プロテオーム解析により、CAA 患者の血管に β アミロイドとともに沈着している蛋白質を解析した。CAA 患者ではアポリポ蛋白 E(apoE)とクラスチン(CLU)が増加していることが判明した。これらの蛋白質は重合抑制あるいは促進に働くのか相反する研究結果が報告されている。



(図2) apoE, CLU は アミロイドの初期凝集過程を抑制する。 Kaplan-Meier 生存曲線

今回、 $5\mu\text{M}$ の低濃度 $\text{A}\beta$ 蛋白質を用いて、伸長過程並びに、核形成を含む初期重合過程に対する効果を検討した。初期重合過程を検討する際には、先に開発した、気液界面を排除した反応系を適用した。その結果、伸長過程並びに、核形成を含む初期重合過程のいずれでも、生理濃度の apoE、CLU が重合を抑制することを示した(図2、業績1)。

(2) 脳内における生理濃度(nM)により近い濃度の $\text{A}\beta$ 蛋白質の重合を検出する試み。

上述の閉鎖反応系では、 $\text{A}\beta$ 蛋白質濃度を $5\mu\text{M}$ まで減らしたのではあるが、これ以上減らすと重合の測定が不安定になる。そこで、高感度型反応系の開発を行った。反応装置を数通り試作し、線維伸長反応、並びに、核形成反応に対応する反応系をそれぞれ構築した。また、検出装置も新たに構成し、定量精度を向上させる方法の開発も行った。これらの検討により、線維伸長反応においては、脳中の生理濃度に近づけた、マイクロモラー以下の濃度の $\text{A}\beta_{1-40}$ 蛋白質による線維量増加のシグナルをとらえることが可能となった。更に検討を進めて高感度化することで、脳実質環境ときわめて類似した条件下において、共存物質であるアルブミン、apoE 等が $\text{A}\beta$ 蛋白質の重合に実際にどの程度影響を及ぼしているのかを定量的に評価できると考える。発展的な研究としては、これらの試験管内反応系を用いて生体内でのアミロイド線維形成に重要な影響を及ぼす生体因子を同定し、アミロイド線維形成の反応機構を解明し、薬剤の開発など予防・治療に役立てることを目指す。

(3) $\beta 2\text{-m}$ アミロイドの核形成因子の探索の試み。

上述の $\text{A}\beta$ 蛋白質の核形成を検出する方法を応用し、 $\beta 2\text{-m}$ アミロイドの核形成を検出する反応系を構築した。ここでは、試験管内アミロイド線維形成反応の際に、 $\beta 2\text{-m}$ にアミロイド原性の部分的な構造変化を生じさせる生体因子の一つとして同定されている、遊離脂肪酸を添加した。また、以前の研究により、ある種の蛋白質群は、 $\beta 2\text{-m}$ モノマーを酸性の部分変性させた線維形成条件下で、 $\beta 2\text{-m}$ アミロイドの核形成を誘起することが示されている。これらの蛋白質を、担体に固定して、重合反応を行った。しかし、当該蛋白質群を固定したビーズでは核形成を誘起することができなかった。このことから、遊離脂肪酸などのアミロイド原性構造変化因子が、生理的な条件下で作用するような新規実験系の開発が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Arishima H, Kikuta KI, Yamashita T, Inoue Y, Ueda M, Ando Y, Wilson MR, Hamano T, Nakamoto Y, Naiki H. Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- β aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. Acta Neuropathol Commun. 2019 Jan 28;7(1):12. 査読有, doi: 10.1186/s40478-019-0662-1.

2. Ozawa D, Nomura R, Mangione PP, Hasegawa K, Okoshi T, Porcari R, Bellotti V, Naiki H. Anti-amyloidogenic and pro-amyloidogenic chaperone effects of C-reactive protein and serum amyloid P component. *Amyloid*. 2017 Mar;24(sup1):28-29. 査読無, doi:10.1080/13506129.2017.1295943.
3. Ozawa D, Nomura R, Mangione PP, Hasegawa K, Okoshi T, Porcari R, Bellotti V, Naiki H. Multifaceted anti-amyloidogenic and pro-amyloidogenic effects of C-reactive protein and serum amyloid P component in vitro. *Sci Rep*. 2016 Jul 6;6:29077. 査読有, doi: 10.1038/srep29077.
4. Naiki H, Okoshi T, Ozawa D, Yamaguchi I, Hasegawa K. Molecular pathogenesis of human amyloidosis: Lessons from β_2 -microglobulin-related amyloidosis. *Pathol Int*. 2016 Apr;66(4):193-201. 査読無, doi: 10.1111/pin.12394. Review.

〔学会発表〕(計1件)

D.Ozawa, R.Nomura, P.P.Mangione, K.Hasegawa, T.Okoshi, R.Porcari, V.Bellotti, H.Naiki
Anti-amyloidogenic and pro-amyloidogenic chaperone effects of C-reactive protein and serum amyloid P component. The XVth International Symposium on Amyloidosis.
Uppsala (Sweden) 20160703

〔図書〕(計0件)

該当無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

該当無し

○取得状況(計0件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：内木 宏延

ローマ字氏名：Naiki, Hironobu

所属研究機関名：福井大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10227704

(2)研究者協力者

研究協力者氏名：遠藤 芳徳

ローマ字氏名：Endo, Yoshinori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。