

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19036

研究課題名(和文)酸化ストレス防御によるアルツハイマー病治療原理の確立

研究課題名(英文)Mechanisms of redox perturbation in the mouse model of Alzheimer's disease

研究代表者

橋本 翔子 (Hashimoto, Shoko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50632890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)において、「酸化ストレス」が病態加速因子であることが提唱されている。酸化ストレスを防御するため、抗酸化物質グルタチオンが働くが、その量は老化や疾患に伴い減少する。ADモデルマウスであるAPPノックインマウス(APP-KI)においてもグルタチオン量は減少していた。本課題では、APP-KIにおけるグルタチオン減少のメカニズム、グルタチオン量減少がAD病理進行へ及ぼす影響を解析した。その結果、ADによる神経炎症はグルタチオン減少を介して酸化ストレスの悪化を引き起こすこと、さらに酸化ストレスの悪化はさらなる神経炎症を引き起こして神経細胞死を惹起することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is demonstrated to play an important role in the etiology of Alzheimer's disease (AD). In order to defense against oxidative stress, organisms possess glutathione as an important antioxidant. However, glutathione level is decreased with ageing and progression of diseases including AD. We found that glutathione level is also lowered in App-knockin (App-KI) mice. In this study, we elucidated the mechanism by which glutathione level was decreased in App-KI, and the effect of glutathione reduction on AD progression. Consequently, we concluded that neuroinflammation induced by amyloid pathology decreased glutathione level, and resulted in further activation of neuroinflammation and neuronal cell death. The vicious cycle of neuroinflammation and oxidative stress may play an important role in AD progression.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 酸化ストレス グルタチオン 神経炎症

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は認知症の最も多くを占める病気である。AD を引き起こす最大の危険因子は老化であるため、超高齢社会である現在、治療法の開発が急がれている。AD の病理学的特徴としては、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) から切り出されてできるアミロイド (A $\beta$ ) の沈着 (老人斑)、過剰リン酸化 Tau タンパク質の凝集から成る神経原線維変化形成、神経細胞死に伴う大脳皮質や海馬の萎縮がみとめられる。また、AD の病理進行には、A $\beta$  の沈着やそれに伴って惹起される神経炎症 (ミクログリアやアストロサイトの活性化) によって発生する活性酸素が蓄積することによって引き起こされる、酸化ストレスが大きく関与すると考えられている。したがって、これまでに多くの抗酸化剤が AD 治療薬の候補として挙がり、知見が進められてきたが、治療に効果的なものは未だに同定されていない。その理由として、抗酸化剤は脳へ到達する前に分解や希釈されるなどして、脳で機能を発揮できない可能性がある。

生体内には酸化ストレス防御システムとして、抗酸化物質であるグルタチオンが備わっている。しかしながら、グルタチオンの量や GCLC の量は老化や疾患の進行に伴って減少することが報告されており、グルタチオン量の減少が、AD の進行に大きく関わっていると考えられる。そのため、研究代表者はグルタチオンの AD における重要性を解析し、グルタチオン標的とした AD 治療戦略を樹立することが重要だと考えた。

生体内におけるグルタチオンの合成は、Glutamyl-Cysteine ligase (GCL) によって律速される。GCL は catalytic subunit (GCLC) と modifier subunit (GCLM) の二量体からなる酵素である。そこで、AD における GCL の挙動を解析すること、GCL を遺伝子操作によって増減させることにより、グルタチオンの AD 病理における重要性を明らかにする必要性があった。

### 2. 研究の目的

(1) グルタチオン量減少が AD の進行にどのような影響を及ぼすのか

(2) グルタチオンを増加させることが、AD の進行を抑制する方法として有効であるか

(1,2) を AD モデルマウスを用いて検証することを目的とした。将来的には、グルタチオンを標的とした AD 治療戦略を立てることを目標とした。

### 3. 研究の方法

AD モデルマウスと、グルタチオン欠乏マウスとを交配し、掛け合わせマウスの病理解析を行った。AD モデルマウスとしては、当該研究室で樹立した APP ノックイン (APP-KI) マウスを用いた。このマウスでは、アミロイド病理、及び酸化ストレスを惹起する神経炎症も

みられる。また、従来のマウスは APP を過剰発現させていたが、ノックイン手法によって作製されたこのマウスは、よりヒトに近い病理像を示すため、AD のメカニズム及び創薬研究をする上で非常に良いモデルである。

グルタチオン量が減少しているマウスは、3種類取得した。具体的には、グルタチオン合成酵素である GCLC 及び GCLM のノックアウトを CRISPR-Cas9 の技術によって作製した。また、GCLC のコンディショナルノックアウトマウス (cKO) を導入した。GCLC-cKO マウスは、CaMKII-Cre マウスと交配させることで、脳特異的に GCLC をノックアウトさせることができる。

APP-KI と GCLM-KO、GCLC-KO (ヘテロ接合体) あるいは GCLC-cKO を交配させたマウスを取得し、脳を摘出後、AD 病理を生化学的・組織化学的に解析した。

### 4. 研究成果

(1) 本研究を進める上で、まず APP-KI マウスにおけるグルタチオン量を調べたところ、APP-KI マウスは野生型に比べてグルタチオン量が低いことを発見した。そこで、当初の研究計画にはなかったが、APP-KI マウスにおいてグルタチオン量が減少しているメカニズムの解析を行った。GCLC の発現は神経炎症下で増加する炎症性サイトカインである TGF $\beta$ 1 によって抑制される。そのため、APP-KI における TGF $\beta$ 1 量とその下流シグナル因子の量を検討したところ、コントロールマウスと比較して増加がみとめられた。このことから、アミロイド病理による神経炎症の惹起は、グルタチオン低下により酸化ストレスを亢進させることが明らかになった。

(2) CRISPR-Cas9 の技術を用いて、GCLC 及び GCLM の 1 ~ 数塩基を脱落させることで、ノックアウトマウスを樹立することに成功した。実際に GCLC あるいは GCLM タンパク質が欠損していること、そして脳及び血液におけるグルタチオン量が減少していることを確認することができた。さらに、グルタチオン量の減少が AD 病理に及ぼす影響を調べるため、APP-KI X GCLM/C-KO あるいは GCLC-cKO の病理を解析した。その結果、3 ヶ月齢の APP-KI X GCLC-cKO X CamKII-Cre において、ミクログリア及びアストロサイトの激しい活性化がみとめられた。さらに 8 ヶ月齢になると、神経細胞死に伴う顕著な脳萎縮を示した。一方、グルタチオンの低下が軽度である GCLM-KO 及び GCLC-KO (ヘテロ接合体) X APP-KI では激しい神経炎症の活性化や脳の萎縮はみとめられなかった。

このことから、局所的な激しいグルタチオン低下や長期的なグルタチオン低下による酸化ストレスを亢進は、神経炎症のさらなる活性化、神経細胞死に繋がることが示唆された。神経炎症 酸化ストレスの悪循環の蓄積が AD の進行において重要な役割を果たすと考

えられる。

(3)当初、グルタチオンを増加させることが、ADの進行を抑制する方法として有効であるか、GCLC及びGCLMをADモデルマウスに過剰発現することで検証する予定であった。具体的にはアデノ随伴ウイルスを用いてGCLC及びGCLM遺伝子をADモデルマウスの脳へ導入して過剰発現させ、AD病理が改善されるか否かを検証する予定であった。蛍光タンパク質であるGFP遺伝子をアデノ随伴ウイルスを用いて導入し、脳に過剰発現させる系を確立することに成功した。その後、GCLC及びGCLM遺伝子を導入する予定であったが、成果を得るまでには至らなかった。しかし、この実験では成果を得ることができなかった代わりに研究結果の実験を進め、新しい発見をすることができた。

#### 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 2件)

Shoko Hashimoto and Takaomi C. Saido  
Critical Review: Involvement of Endoplasmic reticulum stress in the etiology of Alzheimer's disease. Open Biology, 8: 180024, 2018, (査読付き総説)

Shoko Hashimoto, Ayano Ishii, Naoko Kamano, Naoto Watamura, Takashi Saito, Toshio Ohshima, Makoto Yokosuka, and Takaomi C. Saido  
Endoplasmic reticulum stress responses in mouse models of Alzheimer disease: overexpression paradigm versus knock-in paradigm J. Biol. Chem., 293(9)3118-3125, 2018 (査読付き論文)

[学会発表](計 7件)

橋本翔子、釜野直子、石井綾乃、斉藤貴志、西道隆臣  
「グルタチオン量減少がアルツハイマー病病理に及ぼす影響の解析」  
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)  
2017年12月6日~9日、神戸

橋本翔子、釜野直子、松葉由紀夫、村松慎一、斉藤貴志、西道隆臣  
「新規アルツハイマー病関連因子による神経変性メカニズムの解明」  
第36回日本認知症学会学術集会  
2017年11月24日~11月26日、金沢

Shoko Hashimoto, Naoko Kamano, Yukio Matsuba, Per Nilsson, Shin-ichi

Muramatsu, Takashi Saito, and Takaomi C. Saido

The role of a novel Tau binding protein in the progression of Alzheimer's disease

EMBL Symposia: Mechanism of Neurodegeneration

2017年7月14日~17日、ハイデルブルク(ドイツ)

橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣

「グルタチオン減少がアルツハイマー病病理に及ぼす影響の解析」

第35回日本認知症学会学術集会

2016年12月1日~3日、東京

Shoko Hashimoto, Takashi Saito, and Takaomi C. Saido

“Mechanism of glutathione reduction in the 2<sup>nd</sup> generation mouse model of Alzheimer's disease”

SOCIETY for NEUROSCIENCE 2016

2016年11月12日~16日、サンディエゴ(アメリカ)

橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣

「次世代型アルツハイマー病モデルマウス脳におけるグルタチオン量減少メカニズムの解析」

第88回日本生化学会大会

2015年12月1日~4日、神戸

橋本翔子、斉藤貴志、西道隆臣

「APPノックインマウスにおけるグルタチオン量減少メカニズムの解析」

第34回日本認知症学会学術集会

2015年10月2日~4日、青森

[図書](計 1件)

Shoko Hashimoto, Per Nilsson, and Takaomi C. Saido

“Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging” Chapter 19 Catabolism and Anabolism of Abeta Springer (2015)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 翔子 (HASHIMOTO, Shoko)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50632890