

令和元年6月20日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09669

研究課題名(和文) A 依存性の神経活動亢進によるアルツハイマ - 病の病態促進機序の解明

研究課題名(英文) Neuronal activity affects AD pathophysiology

研究代表者

春日 健作 (Kasuga, Kensaku)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70547546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット大脳皮質由来初代神経培養細胞を用いて、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の添加濃度及び時間を段階的に設定し、アミロイド前駆体タンパク (APP) のprocessingを解析した。グルタミン酸100  $\mu$ Mでは添加2時間で全長型APPの発現が一過性に低下し、これに伴いAPP C末端断片 (CTF<sub>197</sub>) も発現が低下した。一方、グルタミン酸0.1  $\mu$ Mでは添加2時間でCTF<sub>197</sub> の発現増加、添加24時間でA $\beta$  の増加がみられた。さらにこのA $\beta$  の増加はNMDA受容体を阻害することで抑制された。これらの結果から、持続的な神経興奮の抑制がアルツハイマー病の新たな治療ターゲットとなることが示唆された。

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) の主要な病理変化の一つは神経細胞外に沈着する  $\beta$ -アミロイド (A $\beta$ ) から構成される老人斑である。

本研究は、持続的な神経細胞の興奮がA $\beta$  産生亢進を介しAD病態に関与することを示した。さらに、NMDA受容体の阻害によりA $\beta$  産生を抑制することを明らかにしたことから、持続的な神経興奮の抑制がADの新たな治療ターゲットとなることが示唆された。

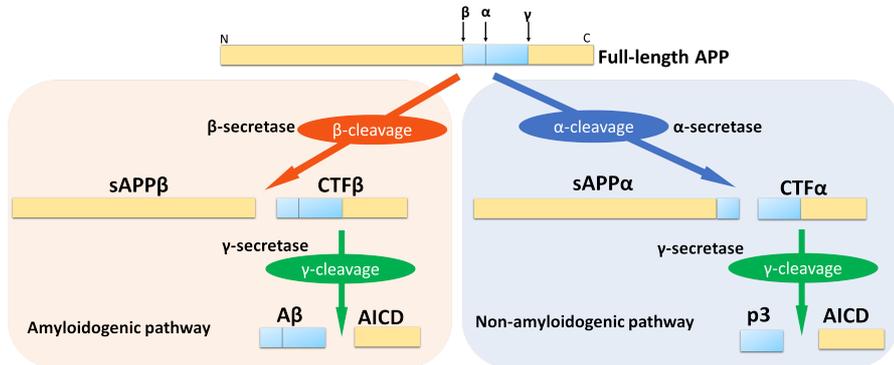
研究成果の概要(英文)：To clarify the association between Alzheimer's pathophysiology and neuronal activity, we analyzed the processing of amyloid precursor protein (APP) under various conditions of glutamatergic activation using primary culture of rat cortical neurons. At 100  $\mu$ M glutamate, the expression of full-length APP transiently decreased after 2 hours of activation, with decreased APP C-terminal fragment (CTF<sub>197</sub>). In contrast, at 0.1  $\mu$ M glutamate, the expression of CTF<sub>197</sub> increased after 2 hours activation, and levels of A $\beta$  elevated after 24 hours activation. Furthermore, this elevation of A $\beta$  was suppressed by inhibiting the NMDA receptor. These results suggest that suppression of sustained neural activation would be a novel therapeutic target for Alzheimer's disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 Alzheimer's disease 神経活動 neuronal activation APP processing A $\beta$  NM  
DA受容体

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(以下 AD)は病理組織学的に、老人斑と神経原線維変化に特徴づけられる。老人斑を構成するアミロイドβ (以下 Aβ)は、アミロイド前駆体蛋白(以下 APP)が細胞内でβセクレターゼおよびγセクレターゼによる切断を受けることにより産生され、細胞外に放出される。一方、APPがαセクレターゼによる切断を受けると、Aβは産生されない(右図)。



ヒト脳内において最も早期に Aβ が沈着する領域は、default mode network と呼ばれる安静時脳活動の高い領域と一致することが分かっている。また、AD モデルマウス脳を電氣的に刺激し神経活動を亢進させることで、脳間質液中の Aβ 量が増加することが報告されている。

### 2. 研究の目的

AD の早期病態では、Aβ の蓄積部位からシナプス投射を受けるニューロンの活動が亢進しており、過剰な神経活動の亢進は、その後の認知機能障害の進行と相関する。本研究は、早期 AD の脳内を模倣した *in vitro* のアッセイ系を新規に構築し、AD の治療開発への研究基盤を確立することが目的である。

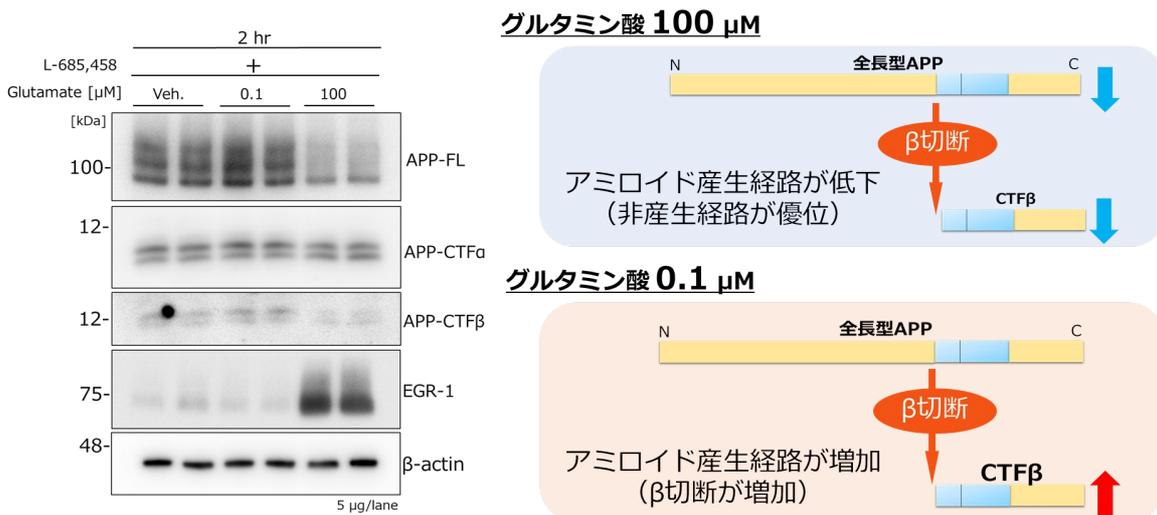
### 3. 研究の方法

中枢神経系で主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を用いた *in vitro* の系により、神経細胞興奮が APP からの Aβ 産生にどのような機序を介して影響するか、さらには興奮の程度や持続時間による Aβ 産生への影響を検証した。

神経細胞興奮の程度と興奮の持続時間に依存した APP プロセッシングの変化を捉えるため、ラット大脳皮質由来初代神経培養細胞 (胎生 17 日)を用いて薬剤添加刺激により検討した。グルタミン酸の添加濃度及び時間を段階的に設定し、添加刺激後に細胞溶解液及び培養上清を回収し、蛋白発現をウエスタンブロット法および ELISA 法により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)高濃度および低濃度グルタミン酸による APP プロセッシングへの影響



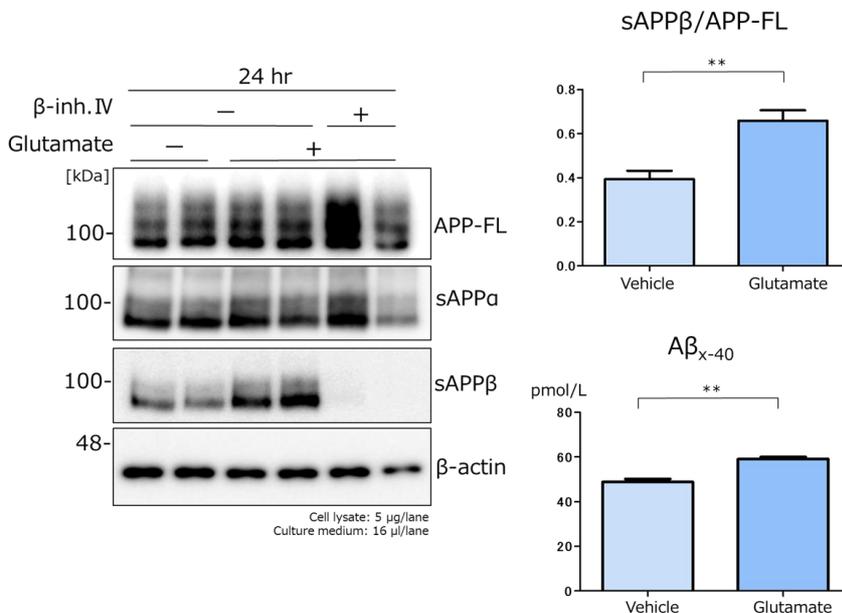
グルタミン酸刺激を 2 時間行い、APP プロセッシングを評価した。この際、APP C 未断片 (以下 APP-CTFs) は、産生後すみやかにγセクレターゼにより分解されるため、γセクレターゼ阻害剤によりγ切断を抑制した上でグルタミン酸刺激を行った。

グルタミン酸 100 μM 刺激では全長型 APP (以下 APP-FL) の発現低下が明らかであった。さらに APP-CTFβ の発現も低下していた。

一方、グルタミン酸 0.1 μM では APP-CTFβ の発現増加を認めた。

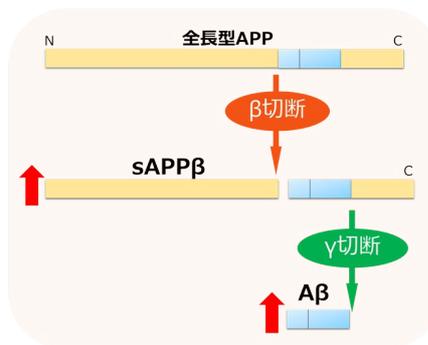
これらのことから、グルタミン酸 100 μM での刺激条件ではβ切断の抑制がみられた一方で、グルタミン酸 0.1 μM ではβ切断が亢進することが示唆された。

(2)低濃度グルタミン酸による長時間刺激の APP プロセッシングへの影響



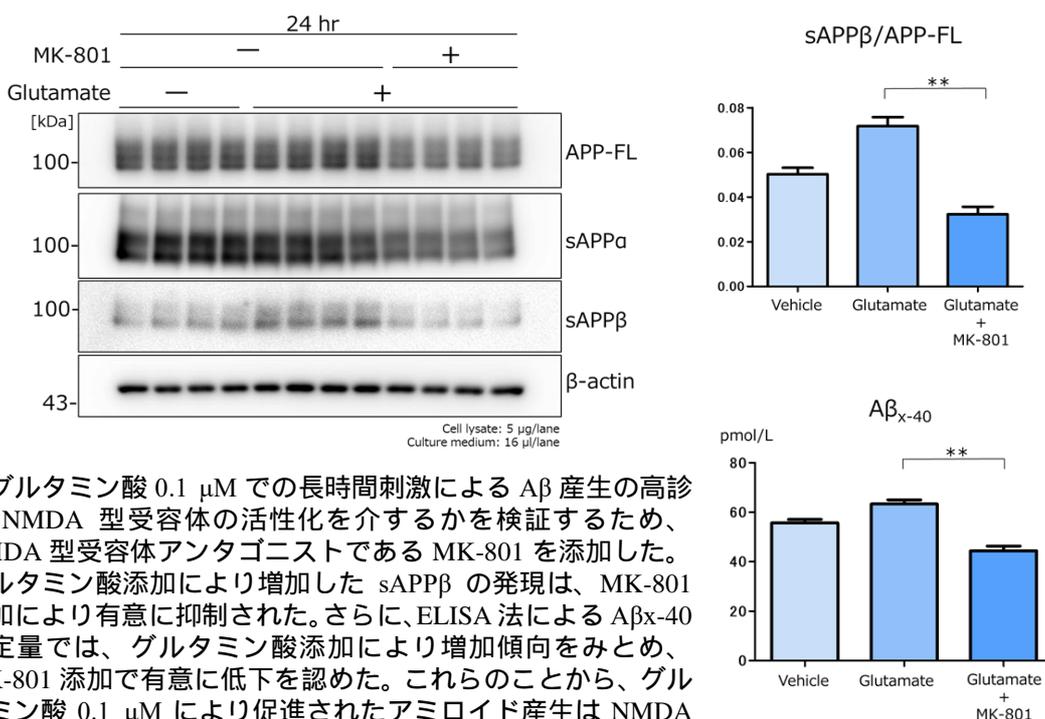
次に、β切断の亢進が示唆されたグルタミン酸 0.1 μM での刺激を、より長時間行い、APP プロセッシングへの影響を解析した。

グルタミン酸 0.1 μM を添加し 24 時間刺激したところ、sAPPβ の増加を認めた。さらに、β セクレターゼ阻害剤を添加することにより β 切断を抑制すると sAPPβ の消失とともに、APP-FL の発現増加傾向を認めた。また、ELISA 法により培養上清中の Aβ<sub>x-40</sub> を定量したところ、グルタミン酸 0.1 μM、24 時間刺激により、有意な増加を認めた。これらのことから、グルタミン酸 0.1 μM による持続的な神経細胞興奮は β 切断の亢進を介して、Aβ 産生を亢進させることが示唆された。



アミロイド産生経路が増加 (β切断が増加)

(3)神経活動依存性の Aβ 産生亢進への NMDA 型受容体アンタゴニストによる効果



グルタミン酸 0.1 μM での長時間刺激による Aβ 産生の高値が NMDA 型受容体の活性化を介するかを検証するため、NMDA 型受容体アンタゴニストである MK-801 を添加した。グルタミン酸添加により増加した sAPPβ の発現は、MK-801 添加により有意に抑制された。さらに、ELISA 法による Aβ<sub>x-40</sub> の定量では、グルタミン酸添加により増加傾向をみとめ、MK-801 添加で有意に低下を認めた。これらのことから、グルタミン酸 0.1 μM により促進されたアミロイド産生は NMDA 型受容体の活性化を介していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

2018年

- 1) 学会名：第37回日本認知症学会学術集会  
演題名：神経細胞興奮が  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) processing へ及ぼす影響  
発表者：石黒敬信、春日健作、斎藤健智、目崎直実、三浦健、小野寺理、池内健

2017年

- 2) 学会名：第36回日本認知症学会学術集会  
演題名：神経細胞興奮が  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) processing へ及ぼす影響  
発表者：石黒敬信、春日健作、斎藤健智、目崎直実、三浦健、小野寺理、池内健
- 3) 学会名：World Congress of Neurology 2017  
演題名：THE EFFECT OF NEURONAL ACTIVITY ON  $\beta$ -AMYLOID PRECURSOR PROTEIN (APP) PROCESSING IN CULTURED CELLS  
発表者：Ishiguro T, Kasuga K, Saito K, Mezaki N, Miura T, Onodera O, Ikeuchi T

## 6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし
- (2) 研究協力者 なし

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。