

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：16K15224
研究課題名(和文)新規アルツハイマーモデルマウスの開発

研究課題名(英文)Role of MITOL in Alzheimer's disease

研究代表者

柳 茂(YANAGI, Shigeru)

東京薬科大学・生命科学部・教授

研究者番号：60252003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアユビキチンリガーゼMITOLはアルツハイマー病のリスク遺伝子の可能性が示唆されていた。今回、アルツハイマー病モデルマウスと神経特異的MITOL欠損マウスを交配させて、神経特異的MITOL欠損アルツハイマー病モデルマウスを作製し、病態を解析した結果、毒性の高い可溶性のアミロイドβが増加による症状の増悪が観察された。MITOLはアミロイドβの凝集性を制御することによりアルツハイマー病の増悪を抑制していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although mitochondrial ubiquitin ligase MITOL is suggested as a risk factor for Alzheimer's disease (AD), implication of MITOL in the pathology of AD is unknown. Here we generated and analyzed neuron-specific MITOL-knockout AD model mice. We found that MITOL knockout increases high toxic soluble amyloid-beta, resulting in exacerbation of symptoms of AD. This result suggests that MITOL regulates aggregation or conformation of amyloid-beta, thereby attenuating cytotoxicity of amyloid-beta.

研究分野：生化学

キーワード：ユビキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の病態理解のため、これまで大きく二種類のマウスが作製された。一つは Amyloid- β 産生を誘発する遺伝子変異を持つマウス (A β マウス) である。しかしながら、A β マウスは老人斑の形成メカニズムを解明する上で有用であるが、Tau の過剰リン酸化を示さないため、老人斑以降の病態を反映していなかった。もう一つは Tau の遺伝子変異を持つマウス (Tau マウス) である。Tau マウスは過剰リン酸化 Tau による神経原線維変化を示すが、Amyloid- β が産生されないこと、又 Tau の遺伝子変異がアルツハイマー病において報告されていないことより、本来の病態である「Amyloid- β 誘導性の過剰リン酸化 Tau」を検証することができず、その分子機構の解明・効果的治療法の判定は困難であった。

申請者はミトコンドリア外膜に局在するユビキチンリガーゼ MITOL を世界に先駆けて発見し (EMBO J. 2006) 解析をすすめてきた (Mol Biol Cell. 2009, Mitochondrion 2011, Mol Cell. 2013)。MITOL はミトコンドリア ROS の産生を制御して細胞老化を抑制する酵素であり (Park YY et al. J Cell Sci. 2010) 実際にケラチノサイト特異的 MITOL 欠損マウスにおいて、テロメア短縮・白髪を含む老化所見が得られている (図 A)。さらに、近年アルツハイマー病のゲノムワイド関連解析より、MITOL がリスク遺伝子候補の一つであることが示唆された (Bartram L et al. Nat Genet. 2007)。老化によりリン酸化 Tau が増加することから、「老化が Amyloid- β のよる Tau の過剰リン酸化を促進する」と考え、MITOL 欠損により新たなモデルマウスの作製できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の二大病理所見である「Amyloid- β による老人斑」及び「過剰リン酸化 Tau による神経原線維変化」の分子機構解明は根本治療を目指す上で避けて通れない重要命題である。

しかしながら、既存のモデルマウスは Amyloid- β を産生するものの、Tau の過剰リン酸化を示さないため、病態における Amyloid- β と Tau の因果関係を検証することは困難であった。本研究では過剰リン酸化 Tau が加齢に伴って増加することに着目し、老化を抑制するミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL の欠損により、老化促進アルツハイマー病モデルマウスを作製した。このモデルマウスは Amyloid- β 依存的な Tau のリン酸化を示すため、「Amyloid- β と Tau の病的関係性」の解明が期待でき、アルツハイマー病における今後の研究戦略の中核を担うことが予想される。

3. 研究の方法

(初年度)

新規モデルマウスとしての基盤構築：初年度は、MITOL の欠損による老化促進によって、Amyloid- β 誘導性の過

剰リン酸化 Tau にどのような影響を及ぼすか解析し、新規モデルマウスとしての妥当性を検証する。

1. 老化促進レベルの検証：現在、私たちは Cre-loxP システムを利用した MITOL 欠損マウスを多種、所有している。そこでマウス脳における老化レベルを検証するため、SA- β -Gal 染色を行う。また老化の指標として幹細胞における分裂能の低下が知られているため、BrdU の腹腔内投与や Ki67 染色によって幹細胞の分裂能を比較する。

2. 過剰リン酸化 Tau の評価：予備的な実験結果より、MITOL 欠損マウスとアルツハイマー病モデルマウスの交配に成功している。ウエスタンブロット法・免疫染色法にて過剰リン酸化 Tau の量的比較を行う。また過剰リン酸化 Tau は凝集性を持つため、界面活性剤不溶性の特性を持つ (Kimura T et al. J Biol Chem. 2010)。そのためマウス海馬を溶解度により分離し、不溶性 Tau の検出を試みる。さらにマウスの神経細胞を取り出して初代培養を行うことで、Tau の機能不全によるミトコンドリア及びエンドソームの輸送障害について、ライブイメージングを用いて検討する。(次年度)

Amyloid- β による Tau 過剰リン酸化の分子機構の解明：前年度の研究が予定通りに進めば、Amyloid- β による Tau 過剰リン酸化機構において「老化」が重要なファクターであることが予測される。そのため、老化に伴うどのような機能的変化が必要な因子となるか、詳細な分子機構の解明を目指す。

1. 老化促進因子のスクリーニング：MITOL がミトコンドリアに局在することを踏まえると、Amyloid- β から Tau の過剰リン酸化を仲介する重要因子はミトコンドリア機能に関連を持つ可能性が高い。具体的な原因候補因子を同定するため、野生型と MITOL 欠損マウスにおける遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ法により網羅的に探索する。ミトコンドリアを初発とした細胞老化機構について、活性酸素種を含む多彩な経路が提唱されているが (Cui H et al. J Signal Transduct. 2012) MITOL 欠損マウスで誘発される経路がどのような因子に依存するか解明する。ここで得られた結果の妥当性を qRT-PCR 法にて再確認し、予測される老化経路の検討をウエスタンブロット法を主軸に行う。

2. 神経培養細胞による検証モデルの構築とスクリーニング：神経培養細胞において、Amyloid- β 処理による Tau の過剰リン酸化が認められることが知られている (Stancu IC et al. Mol Neurodeger. 2014)。そこで CRISPR/Cas9 法を用いて MITOL を欠損したヒ

ト神経培養細胞を樹立し、Amyloid- 処理に伴う Tau の過剰リン酸化がマウスと同様に増加するか検討する。構築された神経培養細胞の検証モデルに関して、低分子化合物ライブラリー、及び siRNA ライブラリーを活用し、過剰リン酸化 Tau への影響と新規原因候補因子の探索を行う。

4. 研究成果

現在の日本社会において、75 歳以上の 4 人に 1 人が認知症を罹患しており、今後さらに増え続けることが予想されるため、その根本的な治療法の確立が求められている。アルツハイマー病は、認知機能障害を呈する神経疾患であり、アミロイド の産生および蓄積によるアミロイド の線維化が発症原因だと考えられてきた。今回私たちは、アルツハイマー病のゲノムワイド関連解析より MITOL がアルツハイマー病のリスク遺伝子候補として同定されたことから、MITOL の大脳皮質・海馬・嗅球特異的な欠損マウスを作製し、アルツハイマー病モデルマウスである APP^{swe}/PSEN1^{dE9} マウスを掛け合わせることで、アルツハイマー病における MITOL の生理的役割について検討した。その結果、MITOL 欠損アルツハイマー病モデルマウスにおいてアミロイド 線維およびアミロイド プラークの減少が認められたが、予想に反して、病態は有意に悪化していた。近年、アミロイド プラークを形成せずに重篤なアルツハイマー病を発症する遺伝子変異(大阪変異)家系が発見されたことから、凝集中間体であるオリゴマーを神経障害の原因とするアミロイド オリゴマー仮説が提唱された。これまでの結果より、MITOL 欠損アルツハイマー病モデルマウスではアミロイド オリゴマーが増加することが考えられ、アミロイド がプラーク化せず、オリゴマーが蓄積することにより病態悪化を引き起こすと推測される。このことはミトコンドリアがアミロイド の凝集メカニズムに関与するというアルツハイマー病発症の新しい知見であり、治療法の開発に期待ができる。

私たちはアルツハイマー病(AD)における MAM の役割を中心に解析を行った。AD モデルマウスにおいて発症前の早期から MITOL の mRNA 量、タンパク質量が増加することを見出した。したがって AD における MAM の過形成は、MITOL の発現増加による Mfn2 の過剰活性化が関与していると推測される。そこで、AD における MAM の過形成が病態に及ぼす影響を明らかにするために、神経特異的な MITOL 欠損マウスと AD モデルマウスを交配することにより MAM 形成が抑制された AD モデルマウスを作製した。

まず MAM による A の直接的な制御として報告されている A の産生と凝集性について検討した。MITOL 欠損 AD モデルマウスでは APP 切断による A の産生量に顕著な違いは

認められなかったが、老人斑の形成は顕著な減少が観察された。この結果は、MAM に A の凝集を誘導する seed が存在するという仮説を支持した。最も注目すべきことに、MITOL 欠損 AD モデルマウスでは非凝集性の A が増加しており、なかでも可溶性の A オリゴマーの増加が検出された。MITOL 欠損 AD モデルマウスでは老人斑の形成が減少したため、AD の発症が抑えられると予測されたが、代償的に A オリゴマーが蓄積すること、また A オリゴマーが高い神経毒性を示すことを考慮すると、むしろ AD が早期発症する可能性も考えられた。実際に MITOL 欠損 AD モデルマウスでは、AD の早期発症を示唆する結果が得られている。MAM がどのような分子機構によって A seed として機能するかについては不明であるが、今後、中枢神経系における MAM の生理機能や AD における役割が解明されれば、AD の新しい病態像が見えてくるだろう。

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 6 件)

武田啓佑、柳 茂

アルツハイマー病における MAM の本当の役割

Bioclinica 32(8), 44-49 (2017)

武田啓佑、柳 茂

小胞体-ミトコンドリア接触場の形成制御とアルツハイマー病

医学のあゆみ 260(1), 24-30 (2017)

Fukuda, T., Nagashima, S., Abe, T., Kiyonari, H., Inatome, R. and Yanagi, S.
Rescue of CAMDI deletion-induced delayed radial migration and psychiatric behaviors by HDAC6 inhibitor.

EMBO. Rep. 17(12), 1785-1798 (2016)

DOI: 10.15252/embr.201642416 査読有り

Matsushita, N., Suzuki, M., Ikebe, E., Nagashima, S., Inatome, R., Asano, K., Tanaka, M., Matsushita, M., Kondo, E., Iha, H., and Yanagi, S.

Regulation of B cell differentiation by the ubiquitin-binding protein TAX1BP1.

Sci. Rep. 6:31266 (2016)

DOI: 10.1038/srep31266 査読有り

徳山剛士、柳 茂

ミトコンドリアダイナミクスの破綻による心臓老化

細胞 48(11), 12-15, (2016)

長島 駿、武田啓佑、徳山剛士、柳 茂

MITOL によるミトコンドリアダイナミクス制御と神経疾患
脳 21 19(3), 17-23 (2016)

〔学会発表〕(計 9 件)

Shigeru Yanagi, Role of mitochondrial ubiquitin ligase MITOL in mitochondrial dynamics and aging-related diseases. International Meeting on RECQ Helicases and Related Diseases 2018, 2018, 2/17, Chiba (招待講演)

徳山剛士、武田啓佑、松野圭悟、塩田実優、松下暢子、稲留涼子、柳 茂: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL は Drp1 の制御を通して心臓老化を防いでいる 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 2017, 12/9, 神戸

椎葉一心、武田啓佑、稲留涼子、柳 茂: ミトコンドリアユビキチンリガーゼ MITOL による Parkin のユビキチン化を介したマイトファジーの制御機構 第 17 回日本ミトコンドリア学会年. 2017, 11/22, 京都

Shigeru Yanagi, Role of MITOL in NO Signalling and Cardiovascular Diseases. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan 2016, 5/21, 仙台 (招待講演)

柳 茂、長島 駿、徳山剛士、武田啓佑、稲留涼子: MITOL/MARCH5 によるミトコンドリアダイナミクス制御と MAM 機能制御 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) シンポジウム. 2017, 12/9, 神戸

柳 茂、長島 駿、武田啓佑、徳山剛士: MAM の新たな役割と疾患との関連 第 17 回日本ミトコンドリア学会年会 シンポジウム. 2017, 11/22, 京都 (招待講演)

柳 茂: ミトコンドリアと老化 Molecular Cardiovascular Conference 2016, 9/2, 東京 (招待講演)

柳 茂: ミトコンドリアのダイナミクスの制御機構 ART FORUM 2016 2016, 9/15, 軽井沢 (招待講演)

Shigeru Yanagi, Role of MITOL in mitochondrial dynamics and diseases. The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) & The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial

Research and Medicine (J-mit), 11/1, 品川 (招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
柳 茂 (YANAGI, Shigeru)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号: 60252003

研究者番号:

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号:

(4) 研究協力者 ()