

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21713

研究課題名(和文) アミロスフェロイドによる内皮eNOS活性の抑制機構解明を目指した研究

研究課題名(英文) The activity of endothelial NO synthase is suppressed by amylospheroid

研究代表者

笹原 智也 (Sasahara, Tomoya)

公益財団法人先端医療振興財団・その他部局等・研究員(研究員・PDクラス)

研究者番号：30735345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管アミロイド血症ではアミロイドにより血管内皮機能が障害されるが、様々なアミロイドオリゴマーのいずれが原因かは明らかにされていない。本研究では非常に強い神経毒性を有するASPDに着目し、ASPDが血管内皮のeNOSに対して毒性作用を有するかを検討した。本研究ではASPDが細胞膜のNa⁺、K⁺-ATPase alpha 3に結合し、『ミトコンドリアでのROS遊離量の増加/PKC活性化/Thr495-eNOSリン酸化』および『ミトコンドリアでのROS遊離量の増加/eNOS単量体化』によりeNOSから遊離するNO量が低下し、血管機能が障害されることを明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Amyloid-beta have been reported to cause cerebrovascular endothelial dysfunctions, but it has not been clarified what kind of amyloid-beta oligomer elicits endothelial toxicity. Here we verified the effects of ASPD, 30-mer amyloid-beta assemblies, to eNOS activity. ASPD suppressed NO release, and phosphorylated eNOS at Thr495, suggesting eNOS inactivation. PKC inhibitor abolished ASPD-induced Thr495-eNOS phosphorylation. ASPD-induced PKC activation was inhibited by ROS scavenger. Additionally, we found that ASPD induced ROS production in mitochondria. Knockdown of ASPD-binding Na⁺, K⁺-ATPase alpha 3 inhibited ASPD-induced Thr495-eNOS phosphorylation. Using rat aortic rings, ASPD attenuated carbachol-induced vasorelaxation. In summary, we elucidated the effects of ASPD and revealed its mechanisms in cerebrovascular endothelium. Our results suggest that ASPD play roles on cerebrovascular dysfunctions by suppressing eNOS activity.

研究分野：循環器薬理

キーワード：アミロイドタンパク 血管内皮 eNOS アミロスフェロイド 一酸化窒素 血管機能障害 脳アミロイド血管症 Na⁺/K⁺-ATPase alpha 3

1. 研究開始当初の背景

脳アミロイド血管症 (cerebral amyloid angiopathy, CAA) では主に老化により脳の微小血管に種々の蛋白質が沈着し、その結果血管機能障害に伴う血管壁脆弱化により脳血管からの出血が認められるようになる (Grinberg LT *et al.*, *Exp Gerontol*, 2012)。沈着する蛋白質は複数報告されているが、多くの場合にアミロイド β タンパク質 (amyloid β protein, A β) の沈着が認められる。CAA では A β 沈着による血管障害が主な症状であるが、加えて様々な病気を増悪する危険因子でもある。特に超高齢社会を迎えた日本において CAA が認知機能低下を引き起こすアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の危険因子である点は看過出来ない。AD では脳実質への A β 沈着が認められるが、その沈着は脳だけに限定されず、A β が脳から血管へと排出されると血管内腔にも A β が沈着する。即ち AD において CAA は併発する合併症でもある。以上のことから CAA の治療は血管障害を回避するだけでなく、AD の増悪を予防・阻止するという観点からも非常に重要であるが、未だ CAA 治療薬が存在しないことから CAA 治療薬の開発が望まれる。

A β は単量体では毒性を持たないが、重合することで毒性を持つ多種多様な重合体を形成する。CAA でも様々な A β 重合体が血管内腔に沈着していると考えられるが、フィブリルを除き未だにどの様な種類の A β 重合体が血管内腔に沈着しているかは明らかにされていない。毒性をもつ A β 重合体は複数報告されているが、その中で極めて神経毒性が高く、AD 患者脳での蓄積が確認され、かつ神経細胞死を直接誘導する唯一の A β 重合体としてアミロスフェロイド (amylospheroids, ASPD) が挙げられる。AD 患者脳での ASPD 蓄積量は AD 病態の重症度と相関が認められ、また脳内の全 A β 量に対して ASPD はその大半を占めることから、AD での神経細胞死に対する ASPD の影響が大きいことが伺える (Noguchi A *et al.*, *JBC*, 2009, Ohnishi T *et al.*, *PNAS*, 2015)。ASPD は AD において脳で蓄積することは明らかにされているが、脳微小血管内腔で ASPD が形成されるのか、もしくは脳で形成された ASPD が血管へと排出され血管内腔に沈着するかは不明である。しかしながら、毒性が極めて高く、A β 全体に対する割合も高い ASPD が CAA での血管機能障害にも寄与している可能性は高いと考えられる。以上のことから、血管機能に対する ASPD 毒性を検討することは CAA の病態解明の大きな突破口となる可能性が高い。

2. 研究の目的

多くの循環器疾患では疾患に伴う血管機能障害が認められ、特に血管内皮の機能低下を原因とした血流調節機能の破綻が観察される。内皮型一酸化窒素合成酵素 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) は内皮に特異的に発現

する酵素であり、eNOS から遊離する一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は非常に強力な血管弛緩因子である。eNOS の活性低下による NO 遊離量の低下は血管の収縮弛緩能に大きな影響を及ぼし、結果血流調節能が低下してしまう。加えて CAA では eNOS の活性が低下していることが報告されており (Santhanam AV *et al.*, *J Neurochem*, 2015)、ASPD による eNOS 活性への影響を検討する意義は大きいと考察される。

以上のことから本研究では脳微小血管内皮細胞の eNOS に注目し、その活性が ASPD によりどの様に抑制されるか、加えて ASPD による eNOS 活性低下が血管の弛緩能を低下させるかを解明する。

3. 研究の方法

(1) パラフィン固定したヒト死後脳の薄切切片を用いた脳微小血管での ASPD 沈着の検討 (新潟大学 脳研究所に実験を委託) :

新潟大学 脳研究所に保管されているパラフィン固定されたヒト死後脳の前頭葉の薄切切片を A β 抗体で免疫組織染色し、脳の微小血管内腔に A β の沈着が認められるヒト脳サンプルを選出した。その後同サンプルの連続切片を ASPD 抗体 (rpASPD2) で免疫組織染色し、A β 沈着が認められた血管で ASPD 抗体により染色されるかを検討した。

(2) 培養ヒト脳微小血管内皮細胞を用いた ASPD による eNOS 活性の抑制作用とその機構の解明 :

① 実験毎に A β から slow rotation 法を用いて ASPD を作成した (Hoshi M *et al.*, *PNAS*, 2003)。その評価として抗 ASPD 抗体 (rpASPD1) を用いた dot blot 法により ASPD の状態を確認した。加えて電子顕微鏡での検鏡で直径 15~20 nm の ASPD 粒子が認められるかを確認した。

② eNOS からの NO 遊離量を蛍光指示薬 diaminofluorescein (DAF) により測定した。培養したヒト脳微小血管内皮細胞 (human brain microvascular endothelial cells, hBMVEC) を ASPD で 1~6 時間刺激し、その後 DAF を細胞に負荷し、1 μ M carbachol で細胞を刺激した。carbachol 刺激前後の DAF 蛍光強度を共焦点顕微鏡により測定し、carbachol 刺激前後での DAF 蛍光強度の差を NO 遊離量として算出した。また実験に応じて細胞からの活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の遊離を蛍光指示薬 CellROX を用いて検討した。

③ ASPD で 6 時間刺激した hBMVEC から総蛋白質を RIPA buffer を用いて回収した。回収したサンプルを還元式 SDS-PAGE により分離し、各種 eNOS リン酸化体抗体を用いた western blot 法で eNOS のリン酸化体を検出した。また実験に応じて PKC リン酸化体抗体あるいは非還元式 SDS-PAGE 法を用いた。

また実験に応じて ASPD 刺激前に、各種阻害薬 (Y-27632 (10 μ M), compound C (10 μ M), bisindolylmaleimide I (5 μ M), calphostin C (0.3 μ M), U-73122 (10 μ M), BAPTA-AM (30 μ M), tempol (3 mM), apocynin (20 μ M), YCG-063 (50 μ M), mito-tempol (100 μ M)) を ASPD 刺激の 1 時間前に、あるいは lipofectamine3000 を用いて *ATP1A3*-siRNA を ASPD 刺激 72 時間前に、hBMVEC に前処置あるいは導入した。

(3) ASPD がラット血管リングの血管弛緩能を抑制するかを検討 (神戸学院大学 循環器薬理学教室にて実験を実施):

日本 SLC より 7 週齢雄性 Wistar ラットを購入し、24 時間以上動物飼育室内で馴化させた動物を実験に用いた。イソフルラン吸入麻酔下で脱血死させたラットから胸部大動脈を摘出し、2~3 mm の血管リング標本を作成した。血管リング標本を血管マグナス装置に設置し、その張力変化を記録した。血管リング標本を Krebs-Henseleit 溶液中で馴化させた後、ASPD を 1 時間血管リング標本に処置し、その後血管収縮弛緩反応を観察した。phenylephrine (1 μ M) で血管リング標本を収縮させ、その後 carbachol (累積添加: 0.001 μ M ~ 100 μ M) で弛緩させた。得られた血管弛緩反応のシグモイド曲線から回帰分析により carbachol による血管弛緩反応の ED₅₀ 値を算出した。本実験は神戸学院大学生命倫理に関する規定及び同大学実験動物実験指針を遵守し、実験を行った。

(4) 統計処理:

本研究結果は多重比較検定と post-hoc test Scheffe's F-test の組み合わせ、あるいは Student's t-test により統計処理し、*P* 値 0.05 未満を有意な差として検出した (**P*<0.05, ***P*<0.01)。

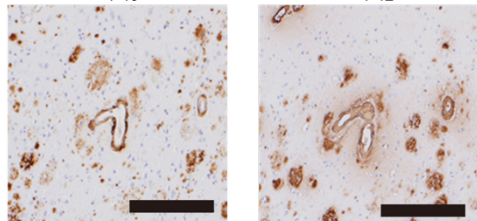
4. 研究成果

(1) CAA 症状を示したヒト脳微小血管内腔で ASPD の沈着が認められた:

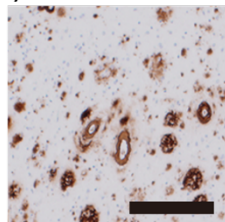
前頭葉は CAA 好発部位であり、かつ

Fig. 1

A) Anti- β_{1-40} Antibody B) Anti- β_{1-42} Antibody



C) Anti-ASPD Antibody

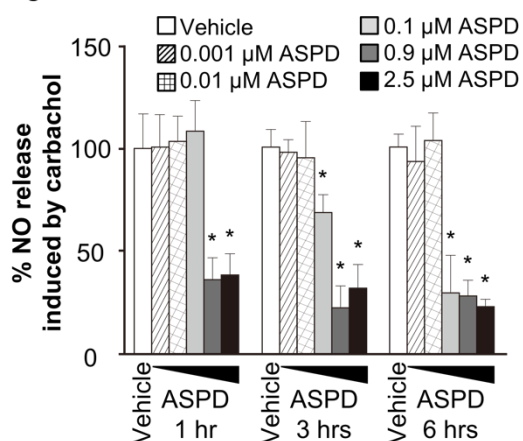


ASPD 好沈着部位である。そこで前頭葉の免疫組織染色で血管内腔に沈着する β 内に ASPD が存在するかを検討した。新潟大学 脳研究所に依頼し、ヒト死後脳の前頭葉のパラフィン切片を β_{1-40} 抗体あるいは β_{1-42} 抗体で免疫組織染色した。染色した両抗体で微小血管内腔に染色が認められたサンプルを見つけ出すことに成功し (Fig. 1AB)、さらに同サンプルの連続切片を ASPD 抗体で染色すると、 β 抗体で染色された微小血管内腔において ASPD 抗体による染色が認められた (Fig. 1C)。本結果は CAA 患者の脳微小血管内腔に ASPD が沈着することを示唆している。

(2) ASPD は hBMVEC からの NO 遊離を抑制した:

培養した hBMVEC に ASPD を添加し、NO 蛍光指示薬 DAF を用いて NO 遊離量の経時的变化を観察した。0.1 μ M ASPD は処置後 1 時間では NO 遊離に影響しないが、3 時間後には僅かに遊離量の減少が認められ、6 時間後には遊離量が大きく低下した (Fig. 2)。0.1 μ M 以上の ASPD 濃度 (0.9 μ M, 2.5 μ M) では処置後 1 時間から強く NO 遊離を抑制し、その効果は 6 時間後まで継続していた (Fig. 2)。この ASPD による NO 遊離量の抑制は ASPD 抗体である mASD3 を前処置することにより惹起されなくなった (Data not shown)。本結果は ASPD が脳微小血管内皮からの NO 遊離を抑制することを示唆している。

Fig. 2

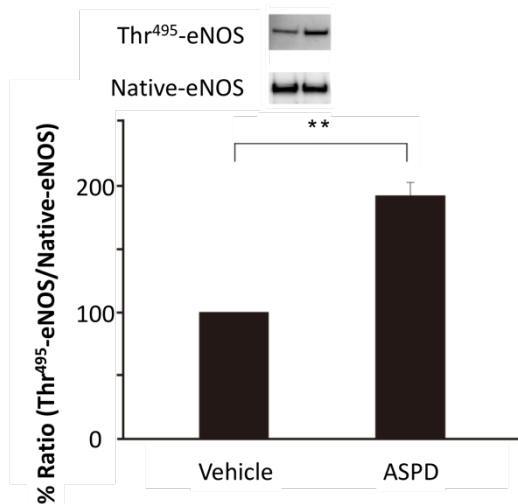


(3) ASPD は eNOS の Thr⁴⁹⁵ をリン酸化した:

eNOS 活性は主にリン酸化・脱リン酸化や Ca²⁺/カルモジュリンとの複合体形成により制御されている (Heiss EH *et al.*, *Curr Pharm Des*, 2014, Fleming I *et al.*, *Circ Res*, 2001)。本研究では ASPD 刺激により様々ある eNOS リン酸化部位の内、どこがリン酸化・脱リン酸化されるかを検討するために、0.9 μ M ASPD で 6 時間刺激した hBMVEC の総蛋白質を SDS-PAGE 法にて分離し、さらに各種 eNOS リン酸化抗体を用いた western blot 法にて eNOS リン酸化・脱リン酸化部位を探索した。

1 μM ASPD 刺激は eNOS の活性化部位である Ser¹¹⁷⁷ には影響せず (Data not shown)、抑制部位である Thr⁴⁹⁵ リン酸化体量を増加した (Fig. 3)。本結果は脳微小管血管内皮での ASPD による NO 遊離の抑制は eNOS の Thr⁴⁹⁵ リン酸化による活性低下が原因であることを示唆している。

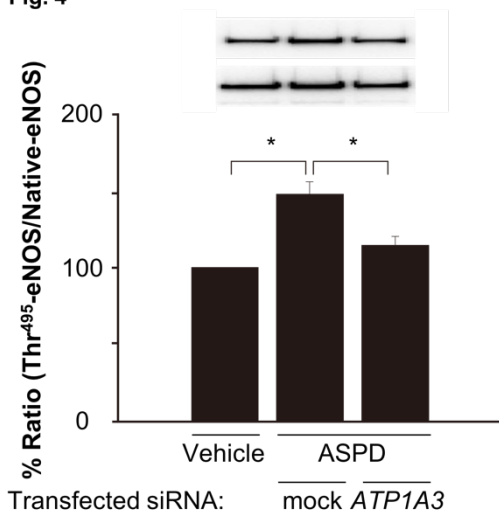
Fig. 3



(4) ASPD は細胞膜 NAK α 3 への結合を介して Thr⁴⁹⁵-eNOS をリン酸化する：

成熟神経細胞では ASPD は細胞膜表面に発現するトランスポーター Na⁺, K⁺-ATPase alpha 3 subunit (NAK α 3) に結合し、細胞内 Ca²⁺ 過負荷を引き起こした結果、アポトーシスを誘導することが報告されている (Ohnishi T *et al.*, *PNAS*, 2015)。hBMVEC でも同様に NAK α 3 を介した反応であるかを調べるために、NAK α 3 遺伝子 *ATP1A3* の siRNA を hBMVEC に導入し、ASPD による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化が抑制されるかを検討した。mock-siRNA を導入した hBMVEC では 0.9 μM ASPD 刺激により Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化体量は増加したが、*ATP1A3*-siRNA を導入した hBMVEC では増加は認められなかった (Fig. 4)。本結果は脳微小管血管内皮での

Fig. 4

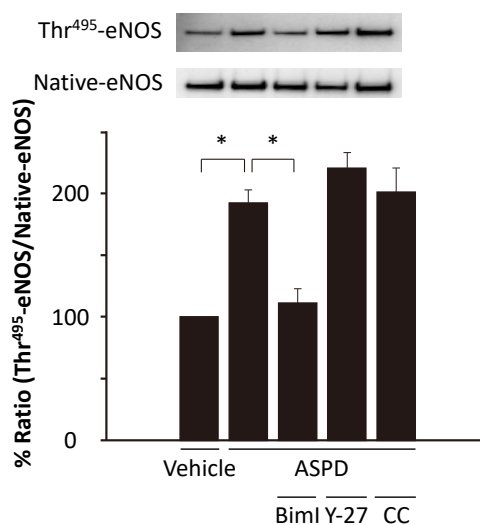


ASPD による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化は、ASPD が細胞膜表面に発現した NAK α 3 に結合することで下流の機構が活性化した結果であることを示唆している。

(5) ASPD 刺激による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化には PKC が関与する：

次に ASPD による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化反応の eNOS の上流機構について検討した。eNOS の Thr⁴⁹⁵ は Protein kinase C (PKC) や Rho kinase、AMP kinase などによってリン酸化される (Heiss EH *et al.*, *Curr Pharm Des*, 2014)。そこでこれら酵素に対する各種阻害薬を用いて Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化への影響を検討した。0.9 μM ASPD で 6 時間刺激した hBMVEC での Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化体量の増加は、Rho kinase 阻害薬 Y-27632 や AMP kinase 阻害薬 compound C では変化が認められなかったが、PKC 阻害薬 bisindolylmaleimide I の前処置によりリン酸化体量の増加が抑制された (Fig. 5)。加えて bisindolylmaleimide I とは別の機構で PKC を阻害する calphostin C でも同様に ASPD による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化の抑制が確認された (Data not shown)。本結果は脳微小管血管内皮での ASPD による Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化は PKC による反応であることを示唆している。

Fig. 5



(BimI: bisindolylmaleimide I, Y-27: Y-27632, CC: compound C)

(6) ASPD はミトコンドリアからの ROS 遊離促進を介して PKC を活性化する：

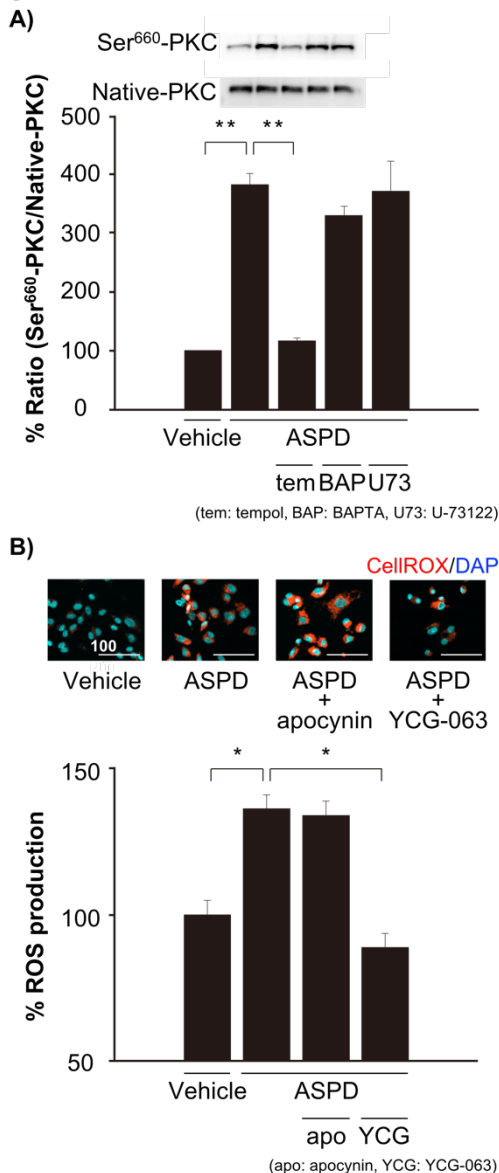
ASPD は PKC を介して eNOS をリン酸化していた。引き続き PKC の上流機構について検討した。PKC は phospholipase C (PLC) や細胞内 Ca²⁺, ROS によって活性化することが知られている (Cosentino-Gomes D *et al.*, *Int J Mol Sci.*, 2012)。PKC は活性化の過程で Ser⁶⁶⁰ を自己リン酸化することから、Ser⁶⁶⁰-PKC リン酸化体量を指標に PKC 活性化に対する各種阻害薬の効果を検討した。1.8 μM

ASPD で hBMVEC を 6 時間刺激すると Ser⁶⁶⁰-PKC リン酸化体量の増加が認められ、この増加は細胞内 Ca²⁺ キレート剤 BAPTA や PLC 阻害薬 U-73122 では影響されなかったが、ROS スカベンジャー tempol により抑制された (Fig. 6A)。

tempol 処置により ASPD 刺激による PKC 活性化が抑制されたことから、ROS 遊離が PKC 活性化に関与していると考察された。そこで ASPD 刺激により ROS 遊離が促進されるかを ROS 蛍光指示薬 CellROX を負荷した hBMVEC を用いて検討した。1 μM ASPD 刺激後 1 時間で僅かな ROS 遊離量の増加が認められ、刺激後 3 時間でピーク達し、少なくとも 6 時間後までピーク量の ROS 遊離量が持続した (Data not shown)。

細胞内での ROS は主に NADPH oxidase (NOX) あるいはミトコンドリアで産生され、遊離する (Santilli F *et al.*, *Vascul Pharmacol.* 2015)。ASPD 刺激による ROS 遊離元を明らかにするために、各種阻害薬を前処置した hBMVEC を 1 μM ASPD で 3 時間刺激し、

Fig. 6



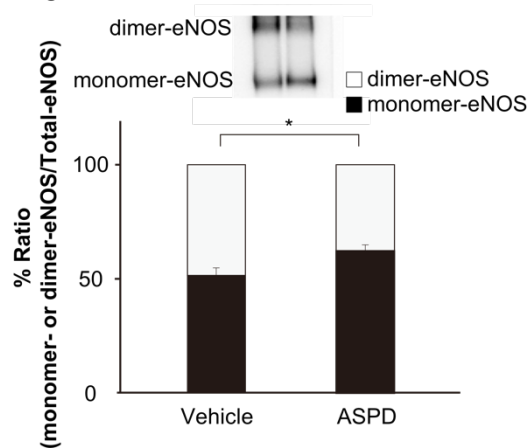
ASPD による ROS 遊離量の増加が阻害薬の前処置により抑制されるかを検討した。ASPD 刺激による ROS 遊離量の増加は NOX 阻害薬 apocynin では抑制されなかったが、ミトコンドリア選択的 ROS スカベンジャー YCG-063 により抑制された (Fig. 6B)。加えて化学的に異なる構造を持つミトコンドリア選択的 ROS スカベンジャー mito-tempol でも同様に ASPD 刺激による ROS 遊離量の増加が抑制された (Data not shown)。

本結果は脳微小管血管内皮を ASPD で刺激すると、ミトコンドリアでの ROS 遊離が促進され、その結果 PKC が活性化されることを示唆している。

(7) ASPD は eNOS 二量体を単量体化する：

eNOS は通常二量体で存在し NO を遊離するが、内皮が障害を受けると単量体へと乖離し、ペルオキシナイトライトと呼ばれる ROS を産生するようになる (Schmidt TS *et al.*, *Clin Sci*, 2007)。そこで ASPD による eNOS 活性への影響について、実験結果 (3)~(6) の様に eNOS リン酸化だけではなく、ASPD による eNOS 単量体化作用についても評価した。1.9 μM ASPD で 6 時間刺激した hBMVEC の RIPA 抽出総蛋白質サンプルを非還元式 SDS-PAGE で分離し、eNOS 抗体にて eNOS 単量体と二量体を検出すると、ASPD 処置により eNOS 二量体の減少と単量体の増加が認められた。eNOS 単量体化は ROS 刺激により促進されることから、ミトコンドリアでの ROS 遊離量の増加が eNOS 単量体化の原因と考えられる。本結果は脳微小管血管内皮細胞において ASPD が eNOS 単量体化を促進することを示唆している。

Fig. 7



(8) ASPD 処置によりラット血管リングは血管弛緩能が低下した：

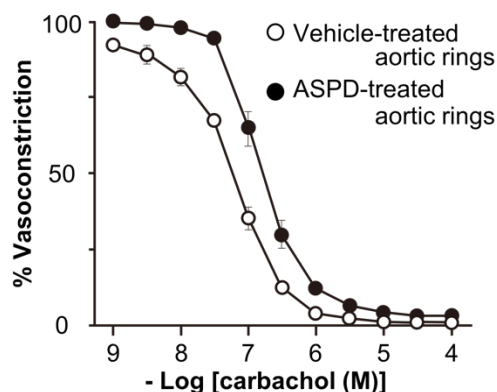
研究成果 (2) ~ (8) では培養細胞を用いて ASPD による内皮 eNOS 活性への影響とその機構について検討したが、上記の実験のみでは実際の血管機能、特に ASPD が eNOS 活性を抑制することから血管弛緩能に影響するかは判断できない。そこでラットの胸部大動脈から作成した血管リング標本を用いて、

ASPD 処置により血管弛緩能の低下が認められるかを検討した。1.3 μ M ASPD を処置した血管リング標本を α_1 受容体アゴニスト phenylephrine で収縮させ、その後ムスカリン受容体アゴニスト carbachol を累積添加することで血管を弛緩させると、ASPD 処置血管では血管弛緩反応の低下が認められた (carbachol 弛緩反応の ED₅₀: ASPD 無処置 73.1 \pm 5.2 nM、ASPD 処置 167.5 \pm 13.6 nM)(Fig. 8)。この ASPD 処置血管での carbachol による血管弛緩反応の抑制は、ASPD 抗体 (mASD3) の処置により抑制された (carbachol 弛緩反応の ED₅₀: mASD3 前処置 ASPD 処置 93.8 \pm 14.8 nM)(Data not shown)。

次に NAK 阻害薬である ouabain が ASPD と同様に血管弛緩反応を抑制するかを検討した。ouabain はラット NAK に対して低濃度 (100 nM) では NAK α 3 を選択的に阻害し、それ以上の濃度では NAK α 1 (20 nM) あるいは NAK α 2 (400 nM) も阻害するようになる。低濃度 ouabain を血管リング標本に前処置することで ASPD と同様に NAK α 3 のみを選択的に阻害した。carbachol による血管弛緩反応は 100 nM ouabain 処置血管リング標本で抑制が認められた (carbachol 弛緩反応の ED₅₀: 100 nM ouabain 処置 214.7 \pm 38.1 nM)(Data not shown)。

本結果は ASPD が NAK α 3 への結合を介して血管の血管弛緩能を抑制することを示唆している。

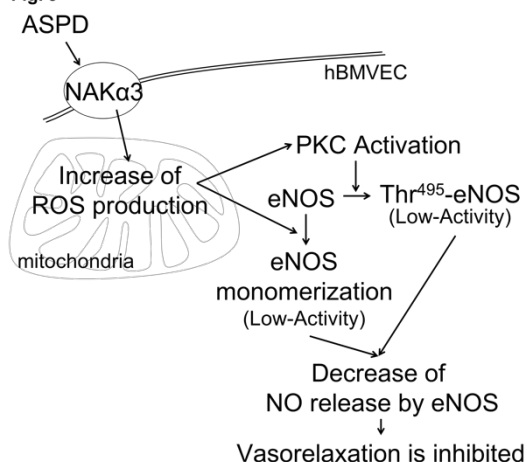
Fig. 8



(9) 本研究では脳微小血管内皮での ASPD 毒性を明らかにし、その機構を解明した：

以上の研究成果 (1) ~ (8) を総括すると、CAA 患者の脳微小血管内腔で ASPD の沈着が認められ、沈着した ASPD が血管内皮の『NAK α 3/ミトコンドリア ROS/PKC/Thr⁴⁹⁵-eNOS リン酸化』、及び『NAK α 3/ミトコンドリア ROS/eNOS 単量体化』の 2 つの経路を介して eNOS 活性を抑制し、血管弛緩能が障害されることを解明した (Fig. 9)。本研究成果を元に、将来的な CAA 治療医薬品の開発に繋がるものと期待する。

Fig. 9



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)

[学会発表] (計 3 件)

① 笹原智也、Toxic amyloid-beta assemblies, amylospheroids, inactivate eNOS through a NAK alpha 3-mediated mitochondrial ROS production in human brain microvascular endothelial cells.、Neurobiology of Brain Disorders (Gordon Research Conference)(国際学会)、2018 年

② 笹原智也、Toxic amyloid- β assemblies, amylospheroids, inactivate eNOS through a NAK α 3-mediated ROS/PKC pathway in human brain microvascular endothelial cells.、第 91 回日本薬理学会年会 (第 18 回国際薬理・臨床薬理学会議と合同開催)(国際学会)、2018 年

③ 笹原智也、アミロイド β アセンブリー「アミロスフェロイド」はヒト由来脳微細血管内皮において NAK α 3 を介した PKC 活性化により eNOS 活性を低下する (Toxic amyloid- β assemblies, amylospheroids, inhibit eNOS activity through NAK α 3-mediated PKC activation in human brain microvascular endothelial cells)、第 90 回日本薬理学会年会大会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹原 智也 (SASAHARA, Tomoya)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員 (研究員・P Dクラス)

研究者番号：30735345