

平成 22 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17025057

研究課題名（和文）Seed 仮説に基づくアルツハイマー病の病態解明ならびに治療薬開発

研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying A β assembly in Alzheimer brain: pathological and therapeutic significance of an endogenous seed for amyloid

研究代表者

柳澤 勝彦 (YANAGISAWA KATSUHIKO)

国立長寿医療センター（研究所）・副所長

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病のアミロイド β 蛋白質（A β ）の重合には神経細胞膜の糖脂質であるガングリオシドに結合した A β (GA β)がアミロイドの”種”として働いていると考えられる。本研究では、GA β の形成に神経細胞内の膜輸送の障害が関わり、ガングリオシドが密集した特異な膜ドメインが形成されることが必要であることを確認した。また GA β の”種”作用の抑制により脳内におけるアミロイド形成を阻害する新しい治療法の開発を検討した。

研究成果の概要（英文）：Molecular and Cell-biological mechanisms underlying generation of a ganglioside-bound A β (GA β), an endogenous seed for Alzheimer amyloid, were investigated. Results of our study suggest that first, endocytic pathway abnormality of neurons is responsible for GA β generation probably through formation of ganglioside-clustered unique membrane microdomains, and second, inhibition of the seed activity of GA β in the brain can be a novel, promising therapeutic strategy for Alzheimer disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	19,700,000	0	19,700,000
18年度	20,700,000	0	20,700,000
19年度	19,800,000	0	19,800,000
20年度	17,600,000	0	17,600,000
21年度	16,700,000	0	16,700,000
総計	94,500,000	0	94,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイド蛋白、ガングリオシド、アポリポ蛋白、シナプス、マイクロドメイン、遺伝的変異型

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

AB 凝集機構の解明はアルツハイマー病 (AD) 研究の主要課題の一つである。しかしながら、脳内において AB が凝集しアミロイドとして蓄積する分子機序の詳細は未だ解明されていない。家族性 AD に見出された遺伝子変異には AB の産生を亢進させるものがあり、神経細胞外液中の AB 量増加が AD 発症の一要因と考えられる。しかしながら、患者の大部分を占める孤発性 AD において、脳内の可溶性 AB 量が発症に先行して増加していることを示す明確な事実はなく、また、AB が特定の脳領域を好んで凝集し、アミロイドとして蓄積する事実も可溶性 AB 量の増加のみでは説明できない現象である。本研究代表者は、先に、早期の AD 病変を示す脳に選択的に GAB が形成されていることを見出し、また GAB は可溶性 AB とは異なる構造を有する内因性 seed であるとの仮説を提唱し、AB の凝集と蓄積という蛋白質の病理現象が、神経細胞等により構成される膜脂質環境の影響下で進行する可能性を論じてきた。加えて、膜脂質環境の如何により神経毒性を発揮する AB 凝集体の形成も誘導されうる可能性も示した。

2. 研究の目的

アルツハイマー病脳における神経細胞変性を誘導する物質的基盤はアミロイド β 蛋白質 (Aβ) の凝集体である。しかしながら、Aβ 凝集の分子機序の詳細は未解明である。本研究代表者は、脳内において Aβ は神経細胞膜脂質の一つである GM1 ガングリオシド (GM1) と結合し、可溶性 Aβ の凝集を促進する seed になりうることを示す事実を見出し、GM1 結合型 Aβ (GAB) =seed とする仮説を提唱した。本研究は、GAB に焦点をあて、その形成機構の解明を通して AD 発症病態の本質に迫ると同時に、GAB を標的とする新規治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞膜上における GAB 形成機構の解明: 神経突起末端における GAB 誘導性のアミロイド形成の細胞生物学的基盤と考えられる endocytosis 障害の実態について、薬剤処理ならびに siRNA 投与等により培養神経細胞を対象に検討を加える。特に、孤発性アルツハイマー病発症の危険因子である脳老化、

アポリポ蛋白 E4 関連コレステロール代謝障害と細胞内 endocytosis 障害との接点について、病態生化学的に検討する。

(2) 抗体模倣性低分子化合物の開発: GAB に特異的に結合し Aβ 重合を効率よく抑制する抗 GAB 抗体の反応性を模倣した低分子化合物の作製を、これまでに得られた GAB の分子構造情報、NMR 解析情報等を基に、分子設計の手法により試みる。また同低分子化合物探索を目的とするスクリーニング系の構築を細胞系ならびに非細胞系の両者に関して試みる。スクリーニング系の構築がなされた場合には、入手可能な化合物ライブラリーならびに天然物ライブラリーを対象に、創薬リードの探索実験を開始する。

(3) 本研究課題の遂行により得られた知見ならびに当該研究期間内に他の研究者により報告された GAB 関連の情報を総合し、アルツハイマー病発症における seed 仮説について統括的検証を加える。

4. 研究成果

(1) 脳領域特異的な Aβ 蓄積におけるガングリオシドの役割: 脳内における Aβ 蓄積には、部位ないしは領域特異性があることが知られている。即ち、大脳の実質においては連合野皮質を好んで蓄積し老人斑を形成する。最近の研究では、楔前部や後部帯状回が最も早期に Aβ が蓄積する領域である可能性が示されている。一方、頭蓋内小動脈壁も Aβ 蓄積の好発部位であり、その結果、アミロイドアンギパチーが形成される。これらの Aβ 蓄積の部位特異性は遺伝的変異型 Aβ で特に顕著であり、Dutch 型 Aβ (E22Q) と Arctic 型 Aβ (A22G) は同一部位のアミノ酸置換であるにも関わらず、前者は血管壁を、後者は脳実質を好んで蓄積する。本研究においては、これらの Aβ 蓄積の部位特異性はこれらの部位の細胞膜脂質環境、特にガングリオシド分子種の違いにより決定されるとの仮定のもとに実験を行い、脳実質、血管壁ならびに血管周囲から蓄積する変異型 Aβ は、それぞれ、GM1、GM3 ならびに GD3 ガングリオシドの存在下で著しく凝集すること、また、GM1、GM3 ならびに GD3 ガングリオシドは培養細胞等を用いた実験から、神経突起末端部 (シナプス前膜)、血管壁平滑筋細胞表面ならびに血管周囲アストログリアに選択的に発現されることを

J. Neurochem. 95, 1167-1176 (2005) (査読有)

10. Oikawa N, Yamaguchi H, Ogino K, Taki T, Yuyama K, Yamamoto N, Shin R-W., Furukawa K, Yanagisawa K. Gangliosides determine the amyloid pathology of Alzheimer disease. Neuroreport. 20, 143-1046 (2009) (査読有)

11. Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Chloroquine-induced endocytic pathway abnormalities: cellular model of GM1-ganglioside-induced A β fibrillogenesis in Alzheimer's disease. FEBS Lett. 580, 6972-6976 (2006) (査読有)

12. Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. J. Neurochem. 105, 217-224(2008) (査読有)

13. Yuyama and Yanagisawa K. Late endocytic dysfunction as a putative cause of amyloid fibril formation in Alzheimer's disease. J. Neurochem. 109, 1250-1260 (2009) (査読有)

14. Yamamoto N, Fukata Y, Fukata M, Yanagisawa K. GM1-ganglioside-induced A β assembly on synaptic membranes of cultured neurons. Biochim. Biophys. Acta. 1768, 1128-1137 (2007) (査読有)

15. Yamamoto N, Matusbara T, Sato T, Yanagisawa K. Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid β -protein fibrillogenesis. Biochim. Biophys. Acta. 1778, 2717-2726 (2008) (査読有)

16. Yamamoto N, Yokoseki T, Shibata M, Yamaguchi H, Yanagisawa K. Suppression of A β deposition in brain by peripheral administration of Fab fragments of anti-seed antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 45-47(2005) (査読有)

[学会発表] (計 17 件)

1. 湯山耕平、柳澤勝彦. アルツハイマー病におけるGM1ガングリオシド誘導性アミロイド β 蛋白質重合に関与する後期エンドサイトーシス障害. 第52回日本神経化学学会大会. 2009年6月22日, 渋川.

2. 柳澤勝彦. Pathological significance of ganglioside cluster in Alzheimer disease.

3. 第51回日本脂質生化学会シンポジウム Lipid metabolism and its pathophysiology in CNS. 2009年7月30日, 名古屋.

4. 山本直樹、松原輝彦、湯山耕平、佐藤智典、柳澤勝彦. シナプス前膜の年齢依存的なGM1 ganglioside集積ドメイン形成はA β 線維化を促す. 第51回日本神経化学学会大会, 2008年9月12日, 富山.

5. 湯山耕平、山本直樹、柳澤勝彦. A β 線維化に関与するGM1ガングリオシド集積を誘導するエンドサイトーシス経路障害. 第51回日本神経化学学会大会, 2008年9月12日, 富山.

6. 及川尚人、木村展之、柳澤勝彦. カニクイザル脳におけるアルツハイマー病関連蛋白 (A β 、タウ) の解析. 第27回日本認知症学会, 2008年10月11日, 前橋.

7. Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Michikawa M, Yanagisawa K. A ganglioside-induced soluble A β assembly causes neuronal death through NGF receptors. 37th Society for Neuroscience Annual Meeting. 2007年11月5日, サンディエゴ, アメリカ.

8. 湯山耕平、山本直樹、柳澤勝彦. エンドサイトーシス経路異常によるGM1ガングリオシドの細胞外放出の促進. 第50回日本神経化学学会大会, 2007年9月10日, 横浜.

9. 山本直樹、湯山耕平、柳澤勝彦. 老齢マウス脳シナプス膜中の特異なGM1 ganglioside集積ドメイン. 第50回日本神経化学学会大会, 2007年9月10日, 横浜.

10. 山本直樹、湯山耕平、柳澤勝彦. GM1-ganglioside-induced A β assembly at neuritic terminals of nerve growth factor-treated PC12 cells. 第49回日本神経化学大会, 2006年9月14日, 名古屋.

11. 湯山耕平、山本直樹、柳澤勝彦. GM1 ganglioside accumulation in PC12 cells treated with chloroquine: a cellular model of A β assembly. 第49回日本神経化学大会, 2006年9月14日, 名古屋.

12. 山本直樹、松原悦朗、前田純裕、高島明彦、丸山和佳子、道川誠、柳澤勝彦. A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly

causes neuronal death. 第29回日本分子生物学会年会, 2006年12月6日, 名古屋.

13. Yanagisawa K. Pivotal roles of lipids in generating an endogenous seed for Alzheimer amyloid. 7th International Conference on Alzheimer's Disease and Parkinson Disease. Sorrento, 2005年5月9-14日, イタリア.

14. 柳澤勝彦. アミロイドβ蛋白重合とガングリオシド. 第28回日本神経科学大会シンポジウム「糖鎖科学と神経科学の融合による新展開」. 2005年7月27日, 横浜.

15. Yamamoto N, Hirabayashi Y, Amari M, Yamaguchi H, Romanov G, Nostrand W, Yanagisawa K. Assembly of hereditary variant amyloid β-protein in the presence of gangliosides. 第48回日本神経化学会, 2005年9月28日, 福岡.

16. 柳澤勝彦. 膜マイクロドメインとアルツハイマー病: GM1 ガングリオシド集積の意味. 第28回日本分子生物学会, 2005年12月10日, 福岡.

17. 柳澤勝彦. 膜マイクロドメインとアルツハイマー病: GM1 ガングリオシド集積の意味. 第28回日本分子生物学会, 2005年12月10日, 福岡.

[図書] (計5件)

1. Yanagisawa K. Pivotal roles of cholesterol and gangliosides in aggregation of amyloid β-protein. In: Research Progress in Alzheimer's Disease (edited by Miao-Kun Sun: published by Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, USA) (in press) 2010

2. Yanagisawa K. Yuki N. Glycoconjugates and neurological diseases. In: Comprehensive Glycoscience 495-513, 2007 (edited by Kamerling J.P., Boons G-J., Lee Y.C., Suzuki A. and Taniguchi N.: published by Elsevier)

3. Yanagisawa K. Ganglioside and Alzheimer's disease. In: Sphingolipid Biology. 309-317, 2006 (edited by Hirabayashi Y, Igarashi Y and Merrill AH; published by Springer, Tokyo, Japan)

4. Yanagisawa K. Cholesterol and Aβ cascade: pathological implication of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. In: Recent Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases 133-137, 2005 (edited by Hanin I, Casabelos R and Fisher A; published by Taylor & Francis)

5. Yanagisawa K. Cholesterol and amyloid β fibrillogenesis. In: Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Aspects of Amyloid β 179-202, 2005 (edited by Robin Harris and Falk Fahrenholz; published by Springer-Verlag, Heidelberg, Germany)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 可溶性アミロイドβ蛋白重合体の調整法ならびに毒性評価法

発明者: 柳澤勝彦、山本直樹

権利者: ヒューマンサイエンス振興財団

種類: 特許権

番号: 特願 2006-155632

出願年月日: 平成18年6月5日

国内外の別: 国内、国外

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤勝彦 (YANAGISAWA KATSUHIKO)

研究者番号: 10230260

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

湯山耕平 (YUYAMA KOHEI)

研究者番号: 80415546