

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04055

研究課題名(和文)異常凝集体の細胞内形成と分泌によるアルツハイマー病神経細胞死の伝播

研究課題名(英文) Propagation of Alzheimer's disease neuronal cell death by intracellular formation and secretion of abnormal aggregates

研究代表者

星 美奈子 (HOSHI, Minako)

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(副センター長・部長クラス)

研究者番号：30374010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の神経細胞死は、生理的に産生されているアミロイド(A β)が凝集し毒性を獲得することで起こる。しかし、A β 凝集体がいかに形成され、いかに細胞死を起こし、病変が脳内でいかに伝播するかは不明である。本研究では、申請者らが患者脳から発見したA β 凝集体ASPDに焦点を合わせ上記の解明を目指した。その結果、A β は全ての神経細胞で産生されるが、ASPDは特定の神経細胞内で産生され分泌され、ナトリウムポンプNAK3に結合しNAK3発現神経細胞を死に至らしめることなどを明らかにした。そして、ASPDとNAK3との結合を阻止するシードペプチドを探索し得ることが出来、創薬への基盤も開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、A β の凝集体形成が、単純にA β の濃度だけで決まっている訳ではないことが初めて明確に示された。アルツハイマー病の治療法開発としては、神経細胞の保護機能がある生理的A β を全て除去することは好ましくない。これにかわる新たな治療法が求められているが、それに対する新たな可能性を提示出来た。また、実際に形成された凝集体と、その標的となるナトリウムポンプの結合を阻止するシードペプチドを発見したことは、創薬への現実的な一歩となる成果である。さらに、ナトリウムポンプは、パーキンソン病など他の神経変性疾患の病態とも関連することから、本研究の成果は他の神経変性疾患にも敷衍可能である。

研究成果の概要(英文)：Neuronal cell death in Alzheimer's disease occurs when physiologically produced amyloid β -protein (A β) aggregates and exerts toxicity. However, it is unclear how A β aggregates are formed, how cell death occurs and how lesions propagate in the brain. In this study, we focused on the A β aggregate termed ASPD, found by the applicants in the patient's brain, and aimed to clarify the above. As a result, it was revealed that A β is produced in all neuronal cells, but ASPD are produced and secreted in a certain type of neurons, bind to sodium pump NAK3, and causes NAK3-expressing nerve cells to degenerate. We also searched and identified a seed peptide that blocks the binding between ASPD and NAK3, which opened the basis for drug discovery.

研究分野：病態医化学

キーワード：ナトリウムポンプ 神経変性疾患 神経細胞死 アルツハイマー病 タンパク質-タンパク質相互作用 ペプチド創薬

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の神経細胞死は、生理的に産生されているアミロイドβ (Aβ) が凝集し毒性を発揮することで起こる。しかし、Aβ凝集体がいかに形成され、いかに細胞死を起こし、病変が脳内でいかに伝播するかは不明である。本研究では、申請者らがアルツハイマー病患者脳から見出したAβ異常凝集体「アミロスフェロイド (ASPD)」(Hoshi et al. PNAS2003)の神経細胞死機構解明(Ohnishi et al. PNAS2015)から、上記を解明することで、**ASPD 形成と伝播機構の解明へと新たな展開**を目指した。

2. 研究の目的

申請者らは、Aβ 30個が規則的に折り畳まれた球状体 ASPD (Parthasarathy et al. JACS2015)が、表面の突起で神経の生存と機能に必須なシナプスタンパク質 Na, K-ATPase α3 (NAKα3) に選択的に結合 (Kd 7.8 nM)、その機能を阻害し細胞死を起こすことを証明し、アルツハイマー病の新たな神経細胞死機構を提示した(Ohnishi et al. PNAS2015)。フランスから独立に、パーキンソン病の原因となるαシヌクレイン異常凝集体が NAKα3 に結合し機能を阻害するという報告(Shrivastava et al. EMBO2015)があった。驚いたことに、その結合部位は ASPD と共通であり、**NAKα3 を介する神経細胞死が神経変性疾患に共通な病態として脚光を浴びている。**

本研究では、ASPD が NAKα3 に選択的に結合する構造基盤を理解するとともに、NAKα3 の局在と真の機能を解明する。さらに、ASPD 形成機構から神経細胞死の伝播機構を解明することを目的とする。アルツハイマー病で起こる成熟神経細胞の死を分子レベルで総合的に理解することで、分子病態の理解に基づく治療法開発の基盤を提供したいと考えた。具体的には以下の課題の達成を目指した。

課題1 : ASPD が NAKα3 の構造と機能に与える影響を、マウスによる病理学的解析、モデル細胞による電位感受性色素を用いた機能解析で解明する。NAKα3 結合に関わる ASPD 表面構造は溶液及び固体 NMR により決定する。マウス脳により NAKα3 の局在と機能の解明を行う。

課題2 : ASPD 表面に結合し、NAKα3 との相互作用を阻止するペプチド配列の全てのアミノ酸残基を置換し構造活性相関を解析し、今後の創薬基盤となる最適化を行う。

課題3 : 成熟神経細胞を用いて ASPD 形成機構を解明し、Aβ 産生の鍵を握る presenilin との関係解明し、神経細胞死の伝播機構の解明の糸口とする。

3. 研究の方法

各課題について、以下の方法で取り組んだ。

課題1 : 化学合成または大腸菌由来の安定同位体標識 Aβ から ASPD を調製し溶液及び固体 NMR により NAKα3 結合に関わる ASPD 表面構造を決定する(イリノイ大学石井教授、名古屋大学廣明教授との共同研究)。酵母を用いた NAKα3 発現系(ワイスマン研究所 Karlish 教授との共同研究)を活用し、ASPD 結合が NAKα3 構造のどこに影響するのかを電位感受性色素を用いた機能解析で解明する。最近見出した ASPD 発現モデルマウスを用いて、ASPD 発現領域と NAKα3 発現領域、神経細胞死の領域が相関するか解析する(福井大学深澤教授との共同研究)。

課題2 : ASPD 表面に結合し NAKα3 との相互作用を阻止するペプチドのコア配列に系統的にアミノ酸置換を入れ、成熟神経細胞を用いて今後の創薬基盤となる最適配列の絞り込みを行う。

課題3 : 成熟神経細胞にヒト APP を発現させたモデル系により、ASPD が細胞内のどこで形成され、分泌されているのか、APP 代謝との相関はどうなっているのかを解明する。Presenilin との関係については解析系を構築しているルーベン大学 De Strooper 教授との共同研究で行う予定。

4. 研究成果

上記課題について、以下、それぞれの成果を得た。

課題1 : ASPD を調製するためには、凝集シードを含まない高品質の Aβ を原材料とすることが必須である。化学合成 Aβ について、これまで確立してきた実験的蓄積を生かし、大腸菌からも高品質の安定同位体標識 Aβ を調製する方法を確立した。これを用いて、ASPD の表面構造について今までよりさらに一歩進んだ理解が得られた。本成果については、論文投稿を目指して結果をブラッシュアップしている(イリノイ大学石井教授、名古屋大学廣明教授との共同研究)。

また、最近見出した ASPD 発現モデルマウスを用いて、ASPD 発現領域と NAKα3 発現領域、神経細胞死の領域が相関することを見出した。現在、定量的解析を奨めている。

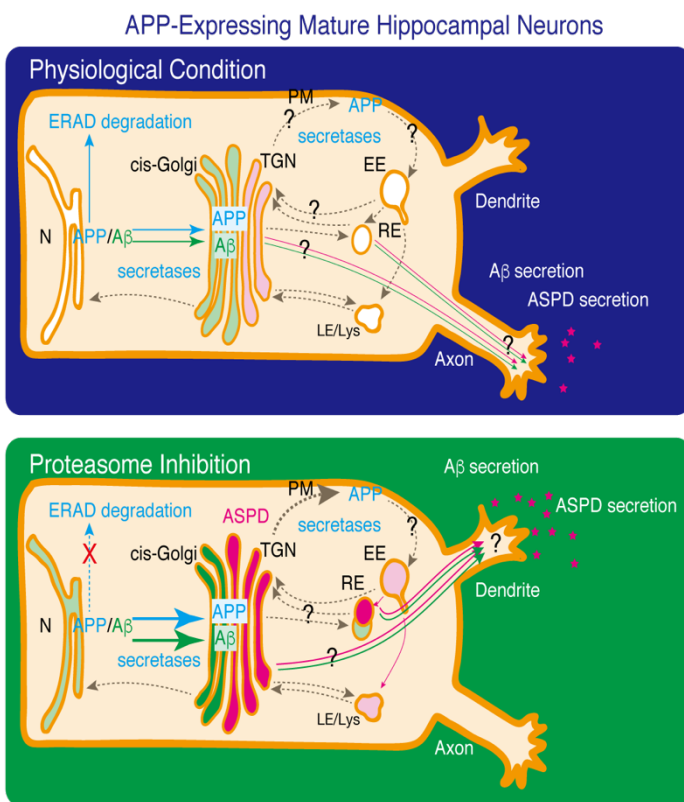
ASPD の標的分子である NAKα3 の発現については、in situ 用いた解析から、驚いたことに NAKα3 選択的な神経細胞群が存在することが解ってきた。また、神経細胞種により NAKα1/NAKα3 の発現比にはかなり差があることも分かり、それぞれがどう役割分担をしているのか興

味深いところである。これについては今年度、論文として出版することが出来た (Murata et al. *J. Comp. Neurol.* 2020 in press)。NAK α 3 ポンプについては、NAK α 1 ポンプなどと配列の相同性が高いことから良い抗体がなく、そもそも脳内の生理的な分布が殆ど解析されていないことが解った。また、ASPD が NAK α 3 ポンプに結合しその活性を阻害するメカニズムは、これまで予想されていなかった新たなメカニズムであることが解った。そこで、本研究では実際に各種神経変性疾患の患者脳及び正常脳において NAK α 3 神経細胞の分布や発現を解析し、ヒト脳における NAK α 3 神経細胞の生理的機能と病態における関与を検証することをめざし、ヒトに対する NAK α 3 選択的抗体を確立することを目指し、確立に成功した。

課題 2 : これまで NAK α 3 ポンプは生存にあまりに必須であるため神経変性疾患に関わると思われていなかったが、星らの報告に続いて、パーキンソン病や ALS においても、異常な凝集体が NAK α 3 ポンプに結合することでその活性を阻害し神経細胞死を引き起こすことが相次いで報告されるに至った。しかも、パーキンソン病の原因となる α シヌクレインの凝集体が NAK α 3 ポンプに結合する部位は、ASPD が NAK α 3 ポンプに結合する部位とほぼ同一であることから、我々が発見した神経細胞死のメカニズムは神経変性疾患に共通な経路であることが強く示唆された。我々は、ASPD が NAK α 3 に結合する部位をミミックした 4 アミノ酸残基のペプチドが、ASPD 表面を覆うことで NAK α 3 に結合することを阻止し、毒性を阻害することを見出している (Ohnishi et al. *PNAS*2015)。そこで、本研究では、スクリーニングのための定量的評価系を構築し、4 アミノ酸残基の 1 位から 4 位全てのアミノ酸を置換したライブラリーを構築し、評価を行った。その結果、毒性を阻害するために必要な配列を明らかにすることに成功した。本結果は、今後の創薬に繋がる一歩となる。さらに新たに脳の微小血管由来内皮細胞において、NAK α 3 に結合することで ASPD が血管の機能を阻害していることが解った。これについては論文を投稿した。

課題 3 : A β は、前駆体である APP が細胞内を運搬される過程で、N 末端と C 末端が切断酵素により切断されることで産生される。従って、A β 産生は細胞内の運搬システムと密接に関係すると考えられる。神経細胞は、複雑な形態を取り、部位ごとに機能を分担していることから、細胞内のタンパク質輸送は普通の細胞とは異なる制御機構があり、より複雑である。しかし、これまでの多くの解析は神経ではない普通の細胞で行われてきた。そこで、我々は成熟神経細胞にヒト APP を発現させたモデル系

により、ASPD が細胞内のどこで形成され、分泌されているのか、APP 代謝との相関はどうなっているのかを解析した。その結果、驚いたことに、A β は神経細胞の種類を問わず産生されているが、ASPD は興奮性神経細胞の内部のトランスゴルジネットワークに主に蓄積しており、抑制性神経細胞では認めれないことが解った。そして、神経細胞内で形成された ASPD は、何らかの方法で分泌され、外に出る。そして、シナプスに発現している NAK α 3 に結合し、その活性を阻害することで神経細胞死を誘導することを明らかにした。これは神経細胞内で A β 凝集体形成がいかに関わり、いかに伝播するかを明らかにした初めての解析である (Komura et al. *iScience* 2020)。



上記のとおり、予定通り計画を進め、目的の成果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komura, H., Kakio, S., Sasahara, T., Arai, Y., Takino, N., Sato, M., Satomura, K., Ohnishi, T., Nabesima, Y., Muramatsu, S., Kii, I., and Hoshi, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Alzheimer Abeta Assemblies Accumulate in Excitatory Neurons upon Proteasome Inhibition and Kill Nearby NAK ⁺ Neurons by Secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 452-477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.isci.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yiling Xiao, Isamu Matsuda, Masafumi Inoue, Tomoya Sasahara, Minako Hoshi, Yoshitaka Ishii	4. 巻 295 (2)
2. 論文標題 NMR-based site-resolved profiling of β -amyloid misfolding reveals structural transitions from pathologically relevant spherical oligomer to fibril.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 458-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 笹原智也、里村香織、星美奈子
2. 発表標題 Toxic amyloid- β assemblies, amylospheroids, inactivate eNOS through a NAK ⁺ -mediated ROS/PKC pathway in human brain microvascular endothelial cells
3. 学会等名 「日本薬理学会」「国際薬理・臨床薬理学会」合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Komura, H., Arai, Y., Matsumura, S., Hoshi, M.
2. 発表標題 Proteasomal dysfunction accelerates amyloid-beta to form secretable toxic Alzheimer's assemblies in trans-Golgi of excitatory neurons
3. 学会等名 Gordon Research Conference / Neurobiology of Brain Disorders（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kakio, S., Arai, Y., Satomura, K., Hoshi, M.
2. 発表標題 Analysis of cell-type differences in APP processing and Abeta production
3. 学会等名 Gordon Research Conference / Neurobiology of Brain Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasahara, T., Satomura, K., Kakita, A., Hoshi, M.
2. 発表標題 Toxic amyloid-beta assemblies, amylospheroids, inactivate eNOS through NAK alpha3-mediated mitochondrial ROS production in human brain microvascular endothelial cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference / Neurobiology of Brain Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minako Hoshi
2. 発表標題 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 3 is a Death Target of Alzheimer Amyloid- Assembly What Shall We Do Next towards A Better Understanding of Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 3's Role in Health and Disease?
3. 学会等名 The 6th Symposium on ATP1A in Disease 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Minako Hoshi
2. 発表標題 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 3 and Alzheimer's Disease
3. 学会等名 The 15th International Conference on Na,K-ATPase and Related Transport ATPase (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 星 美奈子
2. 発表標題 ナトリウムポンプとアルツハイマー (Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 3 Is a New Death Target of Alzheimer Amyloid- Assembly What Shall We Do Next Towards A Better Understanding of Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase 3 's Role In Health And Disease?)
3. 学会等名 子細胞生物学研究所セミナー (東京大学)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 星 美奈子
2. 発表標題 生化学者が進めてきたアルツハイマー病研究の道のり：基礎から応用また基礎へ
3. 学会等名 生化学若い研究者の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 美奈子
2. 発表標題 ナトリウムポンプとアルツハイマー病
3. 学会等名 東北大学加齢医学研究所セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 美奈子
2. 発表標題 ナトリウムポンプと神経変性疾患の新たな関係
3. 学会等名 第30回日本医学会総会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹原 智也, 里村 香織, 他田 真理, 柿田 明美, 星 美奈子
2. 発表標題 Toxic amyloid- assemblies, amylospheroids, inhibit endothelial NAK 3 activity, resulting in the inhibition of eNOS activity in human brain microvascular endothelial cells
3. 学会等名 薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 星美奈子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 アルツハイマー病発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発	

1. 著者名 Minako Hoshi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 408
3. 書名 Molecular Biology of Neurodegenerative Diseases: Visions for the Future, Volume 168 1st Edition (Chapter Two: Tracking down a missing trigger for Alzheimer's disease by mass spectrometric imaging based on brain network analysis)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

アルツハイマー病の神経毒性物質の形成と伝搬機構を解明 - 発症に繋がる新たなメカニズムを提案 - http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/190301_1.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	廣明 秀一 (Hiroaki Hidekazu) (10336589)	名古屋大学・創薬科学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	垣尾 翔大 (Kakio Shota) (10789085)	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・PDクラス) (84503)	
研究分担者	笹原 智也 (Sasahara Tomoya) (30735345)	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・PDクラス) (84503)	
研究分担者	久保 厚子 (Kubo Atsuko) (70647792)	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・PDクラス) (84503)	