

令和元年6月7日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19472

研究課題名(和文)スフィンゴ脂質変動によるAβ蛋白のリソソーム系への輸送切替と分解亢進

研究課題名(英文)Modification of trafficking/degradation of Aβ protein by sphingolipids

研究代表者

村山 俊彦(MURAYAMA, Toshihiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90174317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は、進行性の記憶障害や認知機能障害などを臨床的特徴とした神経変性疾患であり、高齢化に伴って発症する例が多い。日本や各国で高齢化人口が増大しており、患者数も増大している。現在までに幾つかの進行抑制薬が開発されているが、十分な治療効果を得るには至っていない。本疾患は脳内でのアミロイドβの異常蓄積が引き金となって、脳内炎症を起こし、神経細胞が脱落すると考えられている。本研究では、アミロイドβの産生ではなく、分解系を亢進する細胞処置の可能性を検討した。その結果、スフィンゴ脂質代謝を修飾する薬物がアミロイドβ毒性を軽減させる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、スフィンゴ脂質の変動を用いアミロイド(Aβ)-βの細胞障害性を減少できる可能性が示された。ADの治療薬としては、アセチルコリン系ニューロンの活性を高めるアセチルコリン分解酵素阻害薬や、神経毒性を示すグルタミン酸受容体の遮断薬などが臨床応用されている。しかしこれらは、各ニューロンに対して活性化作用や保護作用を示すものであり、Aβレベルの制御ではない。本研究は、分解系を亢進してAβのレベル・毒性を低下させる可能性を示した。Aβの分解・毒性軽減が可能となれば、新ルートのAD治療薬の開発につながり、学術・社会的な意義が高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Patients with Alzheimer's Disease (AD), that is characterized with memory impairment and dementia, are increasing in many countries including Japan dependent on the ageing.

AD is associated with extracellular amyloid deposits in the brain. The major constituent of amyloid deposits is amyloid beta protein (Aβ). Aβ can directly induce neuronal cell death and show cytotoxicity via the inflammatory responses in the brain. In this study, we examined the possibility to decrease Aβ toxicity by an enhancing intracellular degradation of Aβ. Sphingolipids, which are a class of lipids containing a sphingosine base, are components of intracellular vesicles. Modification of sphingolipids levels in vesicles can determine the rate and direction of vesicular transport in cells, thus the modification may change the transport of vesicles containing Aβ to lysosomes. I found that an inhibitor of sphingolipid metabolism reduced the cytotoxicity of Aβ in a model cell line.

研究分野：生化学的薬理学

キーワード：スフィンゴ脂質代謝 セラミド セラミドキナーゼ アミロイドペプチド 神経細胞 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の治療薬として、脳内のアセチルコリン (ACh) レベルを上昇させる ACh 分解酵素 (エステラーゼ) 阻害薬 (ドネペジル、ガランタミン) や NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬 (メマンチン) が臨床応用されている。これらの薬物は神経細胞の活性化・維持を目的とした AD の臨床症状の進行抑制薬であり、A-beta レベルの低下には直結しない。根本的な治療薬の開発を目指した研究、すなわち細胞障害性の高い A-beta の生成抑制を目指した研究、生成された A-beta の分解を目指した研究が、関連する個々の酵素・蛋白質を標的として行われている。本研究では、A-beta が GM1 ガングリオシドなどのスフィンゴ脂質と会合・結合すること、エンドサイトーシスや細胞内物質輸送がスフィンゴ脂質レベルの変動により変化することなどに着想を得て、A-beta の凝集体生成や分解をスフィンゴ脂質変動で制御できるのではないかと、さらには細胞毒性を軽減できるのではないかと考えた。

スフィンゴ脂質は、変性した蛋白質などを細胞内でリソソームへ輸送する小胞輸送 (vesicle trafficking) の構成成分であり、また vesicle trafficking の方向性や移動速度などを調節する因子である可能性がある。そこでスフィンゴ脂質代謝の変動を利用して A-beta の輸送方向を蛋白質分解オルガネラであるリソソームへ切り替え、分解を亢進させて細胞毒性の軽減をすることが可能か否か検討した。

2. 研究の目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は、進行性の記憶障害や認知機能障害などを臨床症状とした神経変性疾患であり、高齢化・老化が進むにつれ発症率が増大する。アミロイド-beta (A-beta) が重合してできたアミロイド線維や変性した神経組織などから成る老人斑が「しみ」のように観察される。また神経細胞内ではリン酸化タウ蛋白質が重合した神経原線維変化が観察される。発症者ではこれらの異常が神経細胞の脱落・細胞死、さらには脳萎縮を引き起こすと推定されている。近年の研究から、神経細胞内に生じる初期の A-beta の異常生成・重合・蓄積が AD 発症の引き金であるとするアミロイドカスケード仮説が提唱されている。神経細胞の細胞死に伴い、脳内で炎症反応に関与するグリア細胞などの活性化も起こり、細胞死・炎症反応活性化・細胞死がサイクル化して起こり、病態の進行につながっていると考えられる。このため A-beta の生成抑制、分解が根本的治療につながると考えられる。本研究では、「細胞内で A-beta の輸送切替を行い、リソソーム (蛋白質の分解を行いアミノ酸などの再利用を可能とする細胞内小器官・オルガネラ) で A-beta の分解を起こさせることで A-beta による細胞死を抑制できるのではないかと」という仮説に基づいて研究を行った。

アミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) は分解酵素 beta-セクレターゼにより切断され A-beta が生成される。A-beta には、A-beta 1-42 など各種断片が存在するが、A-beta の重合・凝集を起こし細胞障害性を示す断片を A-beta と考え、本研究では試験管内で重合・凝集が可能とされる A-beta 25-35 断片を用いた。A-beta の生成は細胞内でも生じるが大半は細胞膜のラフトとよばれる特定の部位で起こっている。ラフトはスフィンゴ脂質やコレステロールを多く含む領域である。ラフトにはアミロイド切断の酵素を含めた各種の酵素が集積し、また神経伝達物質、サイトカインなどの受容体も存在している。通常 A-beta は可溶性のモノマー (単量体) であるが、ラフトに多いスフィンゴ脂質の一つである GM1 ガングリオシドと結合・会合し A-beta のオリゴマー (重合体・凝集体) を形成すると考えられている。従ってスフィンゴ脂質の分子種や含量・存在比などを変化させることで A-beta の凝集体への変化、細胞障害性を変化させることができるのではないかと着想し本研究で検討した。

またラフト領域で形成された A-beta 凝集体は、細胞外への排出と細胞内取り込み（蓄積あるいは分解）がなされる。細胞外では A-beta 凝集体が塊となって可視化できるほど巨大な集積物・老人斑が生成され、またエクソソーム (exosome) と呼ばれる微小 vesicle により排出される。エクソソームはグリア細胞などに貪食されると同時にグリア細胞の活性化を引き起こし、これが脳内の炎症反応につながると考えられる。エクソソームの生成、放出は細胞膜のスフィンゴ脂質やコレステロールレベルにより制御されることから、スフィンゴ脂質の変動により A-beta 含有のエクソソームの生成・放出が制御できるのではないかと考え、本研究で検討した。

形成された A-beta 凝集体はラフト領域に共存する蛋白質・受容体様分子と会合し、エンドサイトーシス経路で細胞内へ取り込まれる例が報告されている。細胞内に取り込まれた蛋白質は、1) ユビキチン・プロテアソーム系で分解される場合、2) エンドソーム・リソソーム系で分解される場合、3) オートファジー系（オートリソソーム系）で分解される場合などが考えられる。A-beta の分解でもプロテアソーム系が関与しているが、AD 患者さんではプロテアソーム系の機能が低下していることが報告されている (Almeida et al., J Neurosci, 2006)。また AD 患者さんでは飢餓誘導性のオートファジーが亢進しているにも関わらず、A-beta 蓄積を処理できない例も報告されている (Chen, Okazawa et al., Sci Rep, 2015)。また最近の研究では、2) 3) の運動性だけでなく、1) 2) の運動性も示されており、これら分解系は相互に関連していることが示されている。そこで本研究では、細胞膜あるいは細胞内小胞 (early endosomes, late endosomes, trafficking endosomes など) のスフィンゴ脂質の構成比を変えることで、2) のエンドソーム・リソソーム系へ A-beta 凝集体を優先的に移動させ、1) あるいは 3) の分解系と合わせて、A-beta 凝集体の分解を亢進させ細胞障害性を軽減できないかと考えた。

3. 研究の方法

(1) ラフトにおける A-beta のオリゴマー形成と細胞毒性の検討： A-beta 25-35 のペプチドは細胞障害性が確認されており本研究で A-beta として用いた。A-beta 水溶液を作成し、そのまま、あるいは 37°C で 24 hr あるいは 48 hr 保温し無細胞系で凝集を促進させた A-beta サンプルを作製し、細胞障害性を検討した。

(2) 細胞障害性の検討： モデル細胞として株化細胞（ヒト肺由来の線維芽細胞、皮膚由来の線維芽細胞）を用いた。各細胞を、スフィンゴ脂質代謝酵素阻害薬と A-beta を共存させ、24 hr 培養しミトコンドリア脱水素酵素活性を生細胞マーカーとして測定した。

(3) 細胞内スフィンゴ脂質代謝の測定： 蛍光基 (4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole, NBD) を結合させたセラミド (NBD-Ceramide) を細胞とインキュベートし、スフィンゴミエリン (sphingomyelin, SM) やセラミド 1-リン酸 (ceramide 1-phosphate, C1P) などに代謝させ、脂質抽出後、薄層クロマトグラフィーで各スフィンゴ脂質を分離し、その生成量を蛍光強度から測定した。

(4) セラミドキナーゼノックマウス (CerK-null mice) の行動学的観察： 新規物体認識試験、Y 路迷路試験、侵入者認識試験、攻撃性試験などを行った。

4. 研究成果

(1) A-beta 25-35 の細胞障害性： A-beta 25-35 の細胞毒性は 5 micro M から観察され、10 micro M で 50% 程度、20 micro M で 100% の細胞障害性を示した。この細胞障害性は培地中に 10% 血清を存在させた場合であるが、血清を含まない培地中でも同様に観察された。

この結果は、A-beta の細胞障害性が血清によって防御されないことを示しており、他の刺激例えば活性酸素や tumor necrosis factor-alpha 受容体刺激などによる細胞障害性が血清共存で減弱する結果と異なっていた。またあらかじめ無細胞系で A-beta を 37°C で保温し、細胞外で凝集を促進させた A-beta を用いても、細胞に同時添加した場合と同様の用量反応性を示した。この理由としては、処置時間の 24 hr 以内で A-beta の凝集が促進した、細胞処置時に細胞膜で凝集した、凝集を介さずに細胞内に取り込まれ細胞障害性を示した、などの可能性が考えられた。

(2) 細胞の各種スフィンゴ脂質のレベルを変動させる目的で、以下の薬物の共存下で A-beta の細胞障害性を検討した。グルコシルセラミド合成酵素阻害薬である D/L-threo-PPMP は A-beta が存在しない場合でも低濃度 5 micro M から細胞障害性を示したためそれ以上の検討はできなかった。一方、異なった化学構造式を有するグルコシルセラミド合成酵素阻害薬 NB-DNJ (Miglustat, ニーマンピック病 C 型治療薬) は、300 micro M という高濃度でも単独では細胞障害性を示さなかった。また A-beta の細胞障害性を変化させなかった。NVP231 は 1 micro M 以下の濃度で C1P 生成酵素であるセラミドキナーゼ活性を阻害する選択的阻害薬である。NVP231 処置は 5 micro M, 10 micro M を用いても A-beta 作用を変化させなかった。酸性セラミダーゼ (acid ceramidase) の選択的阻害薬 ceranib-2 は 10 micro M を用いても A-beta 作用を変化させなかった。これらの結果から、グルコシルセラミド(とそれ以降のガングリオシドなど)、C1P、スフィンゴシン(とスフィンゴシン 1-リン酸)レベルの変動は A-beta 細胞障害性を変えないと推定された。

(3) これら上記の阻害薬はいずれもセラミドからの代謝を阻害する薬物である。次にセラミド自体の細胞障害性を検討した。脂肪酸の長さが異なった C2-ceramide, C6-ceramide は単独で 5 micro M から細胞障害性を示し、A-beta 処置と併用すると相加的に細胞障害性を示した。現在、A-beta を細胞に処置した場合のセラミド代謝を研究方法に示した NBD-ceramide を用いた方法で検討中であり、セラミド代謝を亢進する予備的データが得られている。この結果は A-beta 毒性がセラミド含量の増加と連動している可能性を示している。

(4) 興味深いことに、スフィンゴミエリン合成酵素 (SM synthase) の阻害薬である D609 を共存させたところ 1 micro M という低濃度で A-beta の細胞障害性を減弱させた。この保護作用は肺組織由来、皮膚由来の両方の線維芽細胞で観察された。有機溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) は 1% 以下では細胞毒性が低いとされ、水溶性の低い薬物の溶媒として細胞を用いた研究などに使用される。一方で最近、神経細胞では 1% 以下でミトコンドリア障害を介し、カスパーゼ-3 に依存しない細胞死を亢進することが報告されている (Galvao et al., FASEBJ, 2014)。私たちの実験系でも、DMSO の処置は 1% では細胞障害性を示さなかったが 2% DMSO は細胞の生存を半減させた。興味深いことに D609 処置は 2% DMSO による細胞障害性も減弱させた。スフィンゴミエリンは細胞膜だけでなくリソソーム、ミトコンドリアを含めた各オルガネラの構成成分であり、コレステロールとの親和性が高く、ラフト構造など膜構造の特異性を担っている。現在 D609 処置によるリソソームの構造変化を Lyso-Tracker などの色素を用いて検討している。

(5) A-beta 含有エキソソームの放出、細胞内での A-beta のエンドサイトーシスプロセスの可視化、A-beta とスフィンゴ脂質の結合性の評価などの目的で、A-beta 25-35 に蛍光発色団を結合させたペプチド作製を連携研究者が試みている。まだ十分な蛍光強度を有する物質の作成に至っていない。この研究プロセスで、二重の蛍光発色団を有した新規のセラミドプローブの開発に成功した(公表論文 3、Wang et al., 2018, Bioorg. Med. Chem. Lett. 28, 3222-3226)。本

プローブを使用すると細胞を生かしたままリアルタイムで複数のセラミド代謝を同時にイメージングできる。

(6) APP トランスジェニックマウスを購入使用し、スフィンゴ脂質と病態の関連性を検討する予定であったが、供給時期と飼育スペース確保の不一致からできなかった。代替として、学習・記憶や情動性などの変化をセラミドキナーゼノックアウトマウス (CerK-null mice) を用いて観察した。これらの変化は AD においても顕著にみられる症状である。CerK-null mice は短期記憶を反映している新規物体認識試験や Y 路迷路試験において低スコアを示し、また侵入者試験において新規マウスに対する慣れ行動が低下していた。この結果はスフィンゴ脂質変動と学習・記憶などの脳の高次機能変化の関連性を示唆している。CerK-null mice がヒトの AD で観察される症状と類似した行動変化を示したことは今後の研究に重要な手掛かりを与えると考えており、他の学習・記憶などの試験、情動性などの試験を行って更なる解析を進める。一方で、細胞レベルの検討では A-beta の細胞障害性がセラミドキナーゼ阻害薬 NVP231 で変化しなかった結果が得られており、今後さらなる検討が必要である。現在、大脳や海馬のスライス標本の神経細胞染色、アストロサイト染色などを CerK-null mice, 野生型 wild mice とで比較している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Takahashi H, Ashikawa H, Nakamura H, Murayama T: Phosphorylation and inhibition of ceramide kinase by protein kinase C- β : their changes by serine residue mutations. (2019) Cell. Signal. 54, 59-68.

Doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.008. (査読有り)

2) Nishino S, Yamashita H, Tamori M, Mashimo M, Yamagata K, Nakamura H, Murayama T: Translocation and activation of sphingosine kinase 1 by ceramide-1-phosphate. (2019) 120, 5396-5408. J. Cell. Biochem.

Doi.org/10.1002/jcb.27818. (査読有り)

3) Wang Y, Kasahara J, Yamagata K, Nakamura H, Murayama T, Suzuki N, Nishida A.: Development of a new doubly-labeled fluorescent ceramide probe for monitoring the metabolism of sphingolipids in living cells. (2018) Bioorg. Med. Chem. Lett. 28, 3222-3226. Doi. 10.1016/j.bmcl.2018.08.013. (査読有り)

4) Suzuki S, Tanaka A, Nakamura H, Murayama T: Knockout of ceramide kinase aggravates pathological and lethal responses in mice with experimental colitis. (2018) Biol. Pharm. Bull. 41, 797-805. Doi: 10.1248/bpb.b18-00051.

(査読有り)

5) Nakamura H, Moriyama Y, Watanabe K, Tomizawa S, Yamazaki R, Takahashi H, Murayama T:

Lactosylceramide-induced phosphorylation signaling to group IVA phospholipase A2 via reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α -treated cell. (2017) J. Cell. Biochem. 118, 4370-4382. Doi: 10.1002/jcb.26091. (査読有り)

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 中村浩之、芦川仁美、高橋宏昌、村山俊彦 . リン酸化シグナルによるセラミドキナーゼ活性制御機構の解明 . 日本薬学会第 139 年会 (千葉, 2019 : 平成 31 年 3 月 21 ~ 23 日)

2) 穴田幸平、中村浩之、村山俊彦 . セラミドキナーゼノックアウトマウスを用いた行動学的解析 . 日本薬学会第 139 年会 (千葉, 2019 : 平成 31 年 3 月 21 ~ 23 日)

3) 中村浩之、富澤智史、村山俊彦 . セラミドキナーゼによるアクチン細胞骨格と細胞遊走制御機構の解明 . 第 92 回日本薬理学会年会 (大阪, 2019 : 平成 31 年 3 月 14 - 16 日)

4) Nakamura H, Tomizawa S, Murayama T : Role of ceramide kinase on lamellipodia formation and cell migration. International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL 2018, Helsinki, Finland, September 4-7, 2018)

5) Hori M, Gokita M, Nakamura H, Murayama T . The involvement of ceramide kinase/ceramide-1-phosphate in NGF-induced differentiation and neurotransmission in PC12 cells. 18-th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018, Kyoto, Japan, July 1 - July 6, 2018)

6) Tanaka A, Nakamura H, Murayama T. The role of ceramide kinase in the pathophysiology of multiple sclerosis. 18-th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018, Kyoto, Japan, July 1 – July 6, 2018)

7) 鈴木智美、中村浩之、村山俊彦. 潰瘍性大腸炎におけるセラミドキナーゼの役割 - ノックアウトマウスを用いた解析. 日本薬学会第138年会(金沢, 2018:平成30年3月25~28日)

8) 五木田緑、堀真悠子、中村浩之、村山俊彦. セラミドキナーゼによる神経機能制御機構の解明. 第138回日本薬理学会関東部会(東京, 2018:平成30年3月10日)

9) 田森瑞貴、成岡詩織、中村浩之、西野将平、山下尚大、村山俊彦. セラミド-1-リン酸による EphA2 動態制御機構の解明. 第136回日本薬理学会関東部会(東京, 2017:平成29年7月8日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究分担者:なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:中村 浩之

ローマ字氏名:NAKAMURA hiroyuki

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究協力者氏名:西田 篤司

ローマ字氏名:NISHIDA atsushi

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

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。