

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06653

研究課題名(和文) 酸素化アミロイドのクリアランス機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of clearance mechanism of oxygenated Abeta

研究代表者

堀 由起子 (Hori, Yukiko)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：80610683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の発症原因として、脳内にアミロイドペプチド(A β)やタウがアミロイドを形成して蓄積することが挙げられる。我々はこれまで、光照射によって活性化される光酸素化触媒を開発し、アミロイドに対する選択的な酸素原子付加(酸素化)による凝集阻害と除去の可能性を見出し、本研究ではそのメカニズム解明を目的として研究を遂行し、光酸素化によってアミロイドの構造・性質が変容する可能性を見出した。また光酸素化された凝集A β の分解・除去機構に、脳内免疫担当細胞であるミクログリアが関与することも明らかにし、光酸素化によってミクログリア内リソソーム分解酵素による分解が亢進する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者認知症の多くを占めるADは、大きな社会問題となっている。脳内でのアミロイドの蓄積がAD発症の原因であることから、アミロイド形成を抑制し、既に蓄積したアミロイドを効率よく除去することがAD根本治療戦略として考えられているが、未だ根本治療法確立には至っていない。本研究結果は、凝集A β やタウに対する光酸素化法の新規AD根本治療戦略としての可能性を示した点で意義がある。また光酸素化触媒はアミロイドに共通の立体構造に対して反応し活性化することから、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症などの、AD以外のアミロイド形成・蓄積を原因とする多くの神経変性疾患に対しても有用である可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer disease is caused by the accumulation of amyloid, called as amyloid peptide (A β) and tau, in the brain. We previously developed an artificial photo-oxygenation system using a low molecular weight catalytic compound, photocatalyst. And we also have revealed the possibility that this amyloid selective photo-oxygenation inhibited the aggregation and facilitated the clearance of already formed amyloid. However, the mechanism of facilitated clearance by photo-oxygenation was unclear.

In this study, we found that the structural and biochemical properties of amyloid were changed by photo-oxygenation. We also revealed that microglia were responsible cells in brain for facilitated degradation of photo-oxygenated A β , and that lysosomal degrading enzymes within these cells were involved in degradation. These results suggest that photo-oxygenation have possibility as a novel therapeutic strategy against Alzheimer disease.

研究分野：医療薬学

キーワード：神経変性疾患 神経科学

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、老人斑と神経原線維変化という、タンパク質が異常に凝集してアミロイドを形成し細胞内外に蓄積した2つの病理学的所見を特徴とする。老人斑はアミロイドβペプチド (Aβ)、神経原線維変化はタウが主要構成成分である。このタンパク質の異常凝集・蓄積が神経変性の原因であることから、Aβおよびタウの凝集抑制あるいはクリアランス促進がADの根本的治療に繋がることが示唆されるが、未だその方法は確立されていない。

我々は、これまでアミロイドに対する人工的な酸素付加 (酸素化) を可能とする光酸素化触媒の開発を行ってきた。光酸素化触媒は、光エネルギーを利用して体内環境の分子酸素を酸素原子源として凝集したアミロイドを選択的に酸素化する (図1)。これまで、光酸素化の効果に関する検討において、酸素化Aβが低凝集性、低毒性であることを明

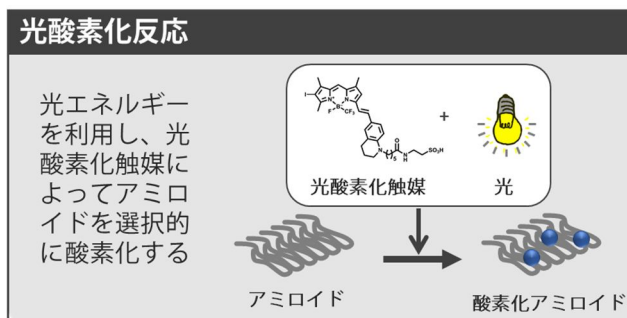


図1 光酸素化触媒を用いた、アミロイド選択的光酸素化法

らかにした (Taniguchi *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl* 2014; Taniguchi *et al.*, *Nat Chem* 2016; Ni *et al.*, *Chem*, 2018)。加えて、月齢依存的に脳内にAβが蓄積するADモデルマウスに対して脳内Aβを光酸素化したところ、短期間の反応にも関わらず凝集Aβ総量が減少することも明らかにした。このことは、酸素化アミロイドは単なる凝集阻害能をもつだけでなく、脳内においてはクリアランスされやすい可能性を示しており、本光酸素化法がAD根本治療法となりうる可能性を示唆していると考えた。しかし、その背景にある分子メカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、これまでの研究結果から生じた新たな仮説、すなわち酸素化アミロイドのクリアランス亢進の可能性を検証し、その分子メカニズムを解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

酸素化アミロイドのクリアランス機構として、以下のような仮説を想定した。アミロイドは分子内および分子間の疎水性相互作用によって形成されることから、直接的な酸素化修飾によりアミロイド中の疎水性相互作用が弱まることで、アミロイドタンパク質が解離する。解離した酸素化タンパク質は、酸素化修飾によって分解酵素などとの親和性が向上し、クリアランスが促進されるというものである。

そこで本研究では、光酸素化によるアミロイドクリアランス亢進効果を検証した上で、酸素化アミロイドの性状解析、酸素化アミロイドのクリアランス機構の解析の2点から解析を行うことでその分子メカニズムに迫ることとした。アミロイドとしては、Aβおよびタウをモデルタンパク質として用いた。特にAβは、すでにクリアランス亢進効果の可能性を見出していることから、この解析では主にAβを用いて解析を行った。

4. 研究成果

酸素化アミロイドの性状解析

Aβと異なり、タウについては光酸素化されるかどうか不明であったため、リコンビナントタ

ウタンパク質を作製し光酸素化を試みた。その結果タウに対しても、単量体ではなく、アミロイド選択的に光酸素化できることが明らかになった (Suzuki *et al.*, **Chem. Commun.**, 2019)。

次に、酸素化アミロイドの解析として、本法によって光酸素化されるアミノ酸の同定を試みた。A β ペプチドやリコンビナントタウを光酸素化し、トリプシン消化したのち MS 解析して酸素化部位を同定したところ、いずれもメチオニン残基とヒスチジン残基が酸素化されていることが明らかになった。特にヒスチジン残基の酸素化は顕著であった (Suzuki *et al.*, **Chem. Commun.**, 2019)。また、酸素化 A β および酸素化タウをウェスタンブロットで評価したところ、その一部が反応特異的な架橋体を形成していることを見出し、光酸素化によって構造的あるいは性質的に変化が生じている可能性が示唆された (Ozawa *et al.*, **Brain**, 2021)。さらに、AD 患者脳由来サンプルの A β に対しても光酸素化が可能かどうかを検証した。AD 患者脳サンプルをホモジナイズし、そのライゼートに対して光酸素化反応を行ったところ、先述の光酸素化反応特異的に検出される A β 架橋体バンドが観察された (Ozawa *et al.*, **Brain**, 2021)。このことから患者脳由来 A β に対しても本法による酸素化が可能であることが明らかになり、本法のヒトへ対する適応の可能性、すなわち AD 根本治療法としての可能性を示すものと考えられた。

光酸素化反応特異的な架橋体の形成を見出したことから、酸素化アミロイドの構造が変化している可能性が示唆された。そこでその構造変化をとらえるために、酸素化 A β の線維構造を電子顕微鏡によって観察したが、光酸素化の有無による線維構造の違いは見いだせなかった。この結果は見た目のマクロな線維構造に変化がないことを示しているが、Cryo-EM などによって同定されるようなミクロの分子構造に変化が生じている可能性はまだ残っている。またアミロイドのミクロな性質に変化が生じている可能性もある。今後、そのような変化を明らかにしていきたい。

酸素化アミロイドのクリアランス機構の解析

これまでに、月齢依存的に A β が脳内に蓄積する AD モデルマウス (NLGF マウス) に対して、光酸素化触媒の脳内インジェクションと、光ファイバーによる光照射によって、生きたマウス脳内での凝集 A β の光酸素化が可能であること、光酸素化によって脳内 A β 総量が減少することを見出している。この現象が光酸素化によって A β の脳内クリアランスが亢進したことに起因するかどうかを検証するために、あらかじめ *in vitro* で光酸素化した酸素化 A β を野生型マウス脳内に注入し、その代謝速度をウェスタンブロットによって検証した。その結果、酸素化 A β は非酸素化 A β と比べて素早く脳内から除去され、光酸素化によって脳内クリアランスが亢進することが明らかになった。

脳内における A β クリアランス機構の一つとして、脳内免疫担当細胞であるミクログリア細胞による貪食が知られている。そこで、光酸素化によるクリアランス亢進にミクログリアが関与するかを確認するために、脳内ミクログリアの除去を目的として CSF-1 receptor 阻害剤である PLX3397 を野生型マウスに投与した。3 週間の投与によって、脳常在ミクログリアが著しく減少することを確認した。このミクログリアを除去したマウスに対して、先程と同様に、あらかじめ *in vitro* で光酸素化した酸素化 A β を脳内に注入してその後の A β クリアランスを評価したところ、酸素化 A β のクリアランス亢進はミクログリア除去によって完全にキャンセルされた。このことから、酸素化 A β のクリアランス亢進において、ミクログリアが責任細胞であることが明らかになった。

このクリアランス亢進メカニズムをさらに詳しく検討するために、マウスミクログリア由来培養細胞である MG6 細胞を用いた *in vitro* 検討を行うことにした。酸素化 A β を MG6 細胞に投

与後、その細胞内局在を免疫染色によって検証したところ、リソソームマーカーである CD68 と共局在することがわかり、MG6 細胞は酸化 A β を取り込んでリソソームにおいて分解している可能性が示唆された。そこで、酸化 A β のクリアランス亢進がミクログリアによる取り込み亢進、あるいは細胞内代謝亢進によって引き起こされている可能性を考え、それぞれを個別に検証することにした。まず取り込みに対する影響を検証するために、酸化 A β あるいは非酸化 A β を MG6 細胞に投与し、インキュベート時間ごとの細胞内に取り込まれた A β 量を評価したところ、両者に差はなかった。しかし一方で、両 A β をそれぞれ投与した後に washout して、細胞内に取り込まれた A β の細胞内代謝を比較したところ、非酸化 A β に比べて、酸化 A β の細胞内代謝は亢進していることがわかった。また、この MG6 細胞における酸化 A β の細胞内代謝亢進という現象は、リソソーム分解酵素の阻害剤であるロイペプチンの処理によって阻害された。さらに、アストロサイト由来の培養細胞である H4 細胞を用いて同様に細胞内代謝を検討したが、酸化 A β の代謝亢進は確認されなかった。以上の結果から、酸化 A β のクリアランス亢進にはミクログリア細胞が関わっており、またその細胞内の lysosome 分解酵素による分解が亢進している可能性が示唆された。

本研究のまとめ

本研究において、A β やタウのアミロイドは光酸化されることによって構造的・性質的に変容する可能性があること、脳内にて酸化 A β はクリアランスが亢進しており、その責任細胞としてミクログリアが関与していることを明らかにした(図2)。また、酸化 A β の分解はミクログリア内のリソソーム分解酵素によって亢進される可能性も示唆された(図2)。これらの研究は、科学論文2報として発表した(Suzuki *et al.*, *Chem. Commun.*, 2019; Ozawa *et al.*, *Brain*, 2021)。今後は責任酵素の同定を進め、さらに詳細な分子メカニズムを解明したい。また本光酸化法を AD 根本治療法とするべく、更なる改良・開発を継続したいと考えている。

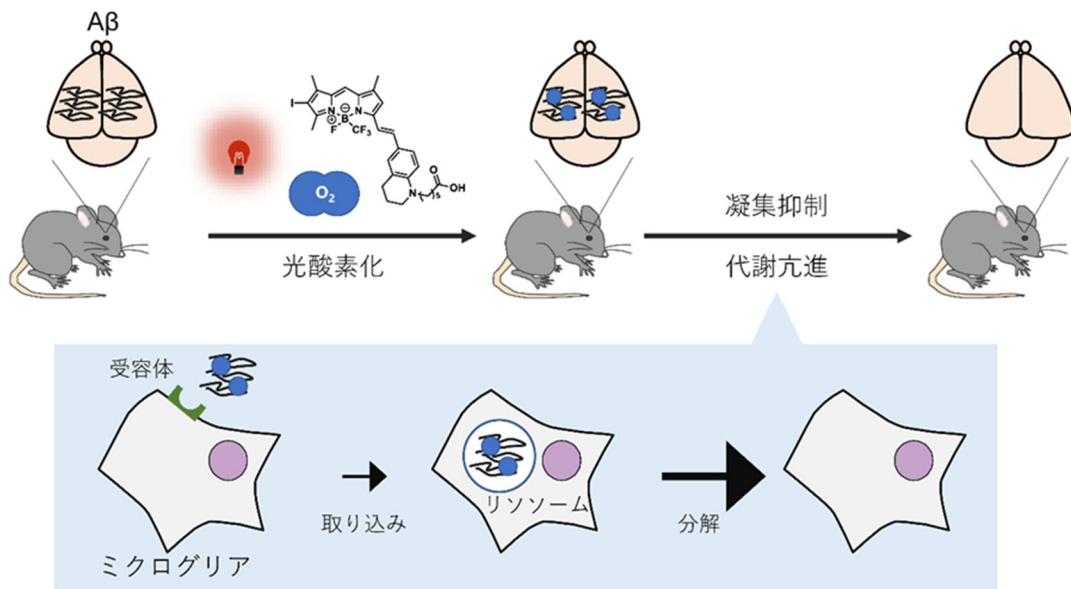


図2 A β に対する光酸化法による AD 病態改善

本研究から、光照射と光酸化触媒を用いた凝集 A β 選択的な光酸化法は、生体内において、A β のさらなる凝集抑制と凝集 A β の効率的な除去の作用を有していることがわかった(上段)。また凝集 A β の除去亢進メカニズムとして、脳内のミクログリア細胞による効率的な分解が認められた(下段)。すなわち光酸化法は AD 病態を改善する可能性が示唆され、新規 AD 根本治療法となりうることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tamura K, Chiu YW, Shiohara A, Hori Y, Tomita T	4. 巻 34(12)
2. 論文標題 EphA4 regulates A production via BACE1 expression in neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16383-16396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001510R	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 Ozawa S, Hori Y, Shimizu Y, Taniguchi A, Suzuki T, Wang W, Chiu YW, Koike R, Yokoshima S, Fukuyama T, Takatori S, Sohma Y, Kanai M, Tomita T	4. 巻 -
2. 論文標題 Photo-oxygenation by a biocompatible catalyst reduces amyloid- levels in the brains of Alzheimer 's disease model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awab058	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 Nagashima N, Ozawa S, Furuta M, Oi M, Hori Y, Tomita T, Sohma Y and Kanai M	4. 巻 7(13)
2. 論文標題 Catalytic photooxygenation degrades brain A in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abc9750	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 Ikeda T, Hori Y, Sohma Y, Kanai M, and Tomita T	4. 巻 -
2. 論文標題 Photo-oxygenation: an innovative new therapeutic approach against amyloidoses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Suzuki T*, Hori Y*, Sawazaki T, Shimizu Y, Nemoto Y, Taniguchi A, Ozawa S, Sohma Y, Kanai M, Tomita T	4. 巻 55(44)
2. 論文標題 Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 6165-6168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc01728c	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 Furusawa K, Takasugi T, Chiu YW, Hori Y, Tomita T, Fukuda M, Hisanaga SI	4. 巻 294(28)
2. 論文標題 CD2-associated protein (CD2AP) overexpression accelerates amyloid precursor protein (APP) transfer from early endosomes to the lysosomal degradation pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 10886-10899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005385	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 Kanatsu K, Hori Y, Ebinuma I, Chiu YW, Tomita T	4. 巻 147(1)
2. 論文標題 Retrograde transport of γ -secretase from endosomes to the trans-Golgi network regulates A β production.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 110-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14477	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 堀由起子、永島臨、小澤柊太、相馬洋平、金井求、富田泰輔
2. 発表標題 新規光酸化触媒による非侵襲的光酸化反応の確立
3. 学会等名 第39回日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤柊太、谷口敦彦、清水裕介、王文博、小池礼子、横島聡、福山透、高鳥翔、相馬洋平、金井求、堀由起子、富田泰輔
2. 発表標題 マイクログリアによる光酸化A 代謝促進機構の解明
3. 学会等名 第39回日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤玄謙、堀由起子、春日健作、池内健、富田泰輔
2. 発表標題 APP依存的な新規タウ分泌現象の発見
3. 学会等名 第39回日本認知症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀由起子
2. 発表標題 光酸化触媒を用いた新規AD治療戦略の開発
3. 学会等名 第24回 Neurology SPECT定量検討会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Hori
2. 発表標題 Development of photooxygenation technology towards therapeutic strategy against Alzheimer disease
3. 学会等名 UTokyo-Cambridge Voices Workshop on the future of therapeutic development against neurodegenerative diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hori Y, Suzuki T, Sawazaki T, Shimizu Y, Nemoto Y, Taniguchi A, Ozawa S, Sohma Y, Kanai M, Tomita T
2. 発表標題 Photooxygenation inhibits tau amyloid formation
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nemoto Y, Hori Y, Tomita T
2. 発表標題 The effect of synaptic adhesion molecules on in vitro tau propagation model
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀由起子、小澤柊太、清水裕介、谷口敦彦、相馬洋平、金井求、富田泰輔
2. 発表標題 光酸化反応による酸化A β の代謝機構の解析
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木崇允、堀由起子、澤崎鷹、清水裕介、根本侑、谷口敦彦、小澤柊太、相馬洋平、金井求、富田泰輔
2. 発表標題 アルツハイマー病治療を目指した光酸化触媒によるタウアミロイド動態制御
3. 学会等名 日本認知症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Hori
2. 発表標題 Photooxygenation reduces the Ab level in the brains of Alzheimer disease model mice
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (9th FAOPS2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuta Ozawa, Yukiko Hori, Takanobu Suzuki, Youhei Sohma, Motomu Kanai, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Photooxygenation by biocompatible catalyst reduces the Aβ level in the brains of Alzheimer disease model mice.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木崇允、堀由起子、澤崎鷹、根本侑、小澤柊太、相馬洋平、金井求、富田泰輔
2. 発表標題 光酸化触媒によるタウの酸化は凝集を抑制する
3. 学会等名 2018年度生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院薬学系研究科 機能病態学教室
<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsych/tomita/index.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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------