

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0410

研究課題名（和文）脳血管指向型の複合型脳アミロイドアンギオパチー掃討治療の開発

研究課題名（英文）Cerebrovascular-oriented combined cerebral amyloid angiopathy eradication therapy

研究代表者

井上 泰輝（Inoue, Yasuteru）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：00806408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,900,000円

渡航期間： 24ヶ月

研究成果の概要（和文）：-エノラーゼ（EN01）をCAA/ADトランスジェニックマウスの脳内持続投与モデルを作成し、生化学的解析と行動解析を行った。EN01投与群では脳血管と脳実質へのA<sub>β</sub>沈着が減少し、不溶性A<sub>β</sub>40、42が減少した。Y迷路試験では空間作業記憶が改善した。EN01はA<sub>β</sub>モノマーの減少を通じてA<sub>β</sub>重合の開始を阻害し、線維化を防ぐと考えられた。同時に、脳内でEN01がニトロシル化されることでその酵素活性が低下することも確認した。熱処理で失活したEN01の脳内投与では、A<sub>β</sub>沈着や空間作業記憶は改善しなかった。EN01のニトロシル化による酵素活性低下がCAA/ADの進行に寄与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、-エノラーゼ（EN01）を使い、脳内にアミロイドベータ（A<sub>β</sub>）が蓄積するアルツハイマー病モデルマウスで研究を行いました。EN01を脳に持続投与すると、A<sub>β</sub>の蓄積が減少し、記憶機能が改善されました。これにより、EN01がA<sub>β</sub>の分解を助け、アルツハイマー病の進行を遅らせる可能性が示されました。社会的には、アルツハイマー病の新しい治療法開発に貢献する重要な研究成果です。

研究成果の概要（英文）：The applicant developed a model to continuously administer -enolase (EN01) into the brain of CAA/AD transgenic mice using an infusion pump. They conducted biochemical and behavioral analyses, finding that EN01 reduced amyloid-beta (A<sub>β</sub>) deposition in the brain vasculature and parenchyma, with significant decreases in insoluble A<sub>β</sub>40 and A<sub>β</sub>42. Spatial working memory improved in the EN01-treated group. EN01 likely inhibits A<sub>β</sub> polymerization, as evidenced by reduced A<sub>β</sub> monomers. There were no differences in amyloid precursor protein (APP) or its metabolites between treated and untreated groups. EN01 was nitrosylated in CAA/AD mice, reducing its enzymatic activity in vitro. Heat-inactivated EN01 did not reduce A<sub>β</sub> or improve memory, suggesting that nitrosylation decreases EN01 activity, contributing to CAA/AD progression.

研究分野：脳神経科学

キーワード：脳アミロイド血管症 アミロイド アミロイドーシス

## 1. 研究開始当初の背景

脳アミロイドアンギオパチー (CAA) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の 90% に随伴し、A $\beta$  が脳血管に沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が社会問題となる中、CAA 患者が増加する一方で、CAA の予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。CAA や AD は病原タンパク質である A $\beta$  が脳に沈着するアミロイドーシスという疾患概念に含まれる。アミロイドーシスは、難溶性のタンパク質であるアミロイド線維が全身諸臓器の細胞外に沈着し、様々な機能障害を起こす疾患群の総称であり AD と CAA を総じて脳アミロイドーシスと呼ぶ。近年、アミロイドーシスの研究領域では、病原タンパク質と共存するタンパク質が分子基盤の解明と治療薬開発の鍵として認識されるようになった。しかし、CAA の共存タンパク質の研究は、これまで日本、および諸外国を含め報告がなかった。申請者はこの問題を解明すべく、世界に先駆けて CAA における共存タンパク質を同定した。この中から申請者は  $\alpha$ -エノラーゼ (ENO1) に着目した。ENO1 は、申請者の先行研究においても同定されており、解糖系酵素として広く研究されているが、近年、熱ショックタンパク質や低酸素ストレスタンパク質としての多面的機能が指摘されつつある。ENO1 が解糖系酵素以外の機能を有している可能性を想定し、その機能解明を目指した研究を行った。申請者は既に、ENO1 が ① A $\beta$  の線維形成を抑制 ② A $\beta$  線維を分解するという新しい機序を見出し、治療応用への可能性を示した。

## 2. 研究の目的

本研究においては、ENO1 が CAA、AD をはじめとする脳アミロイドーシスの病態形成に与える影響、治療応用への発展について *in vitro*, *in vivo* の両面から検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. 各種プロテアーゼを用いた ENO1 のアミロイド線維形成阻害機序の解明

申請者は ENO1 がプロテアーゼ作用を介し、A $\beta$  タンパクを切断するとの仮説を立て、複数のプロテアーゼ阻害剤を用いて詳細に検討した。セリンプロテアーゼ阻害剤として Pefabloc、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害剤として PepstatinA、システインプロテアーゼ阻害剤として E64、金属プロテアーゼとして Phosphoramidon と EDTA を用いた。

### 2. CAA/AD マウスへの ENO1 持続投与による治療実験

20 ヶ月齢 CAA/AD マウス (APP23) の、海馬に ENO1 を 7 日間持続投与した。本マウスモデルは 6 ヶ月齢から CAA が出現する。脳定位固定装置を用い、麻酔下でマウスの海馬に 30 ゲージの薬物注入用カニューレを挿入し、持続注入システムを使用して ENO1 の組換えタンパク質を 7 日間持続投与した。

## 4. 研究成果

セリンプロテアーゼ阻害剤である Pefabloc SC を用いた検討で、ENO1 の線維形成抑制効果が阻害されることを示した (図 1)。同様の現象は、透過型電子顕微鏡を用いた形態学的解析においても確認された。セリンプロテアーゼ以外の阻害剤ではこのような抑制効果はなかった。次に、申請者は ENO1 を CAA/AD トランスジェニックマウスの脳実質内へ注入ポンプを用いて持続投与するモデルを作成し、生化学的解析、行動解析を行った (図 2)。ENO1 投与群において脳血管、脳実質への A $\beta$  の沈着が減少し、不溶性分画の A $\beta$ 40 と 42 が有意差をもって減少した。Y 迷路試験では ENO1 投与群において、空間作業記憶が改善した。ENO1 の作用機序として、投与群における A $\beta$  モノマーが減少したことから、A $\beta$  の重合開始を阻害することで、引き続き線維化を阻害することを想定した。アミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質である APP やその代謝過程における産物には ENO1 投与群と非投与群では差がなく、ENO1 が A $\beta$  の産生経路に影響を与える可能性は低いと考えた。同時に CAA/AD トランスジェニックマウスの脳実質では、ENO1 がニトロシル化されていることを確認し、ENO1 の酵素活性はニトロシル化により減弱することも *in vitro* で確認した。そこで、ENO1 の酵素活性が A $\beta$  の分解に関与するとの仮説を立て、次に熱処理により酵素を失活させた ENO1 を注入ポンプで脳内に投与したところ、A $\beta$  の沈着は減少せず、空間作業記憶も改善しなかった。本結果は、ENO1 が CAA/AD の進行過程においてニトロシル化され、酵素活性が減少した結果、ENO1 の A $\beta$  分解作用が減弱し、CAA/AD の進行に寄与する可能性を示した。

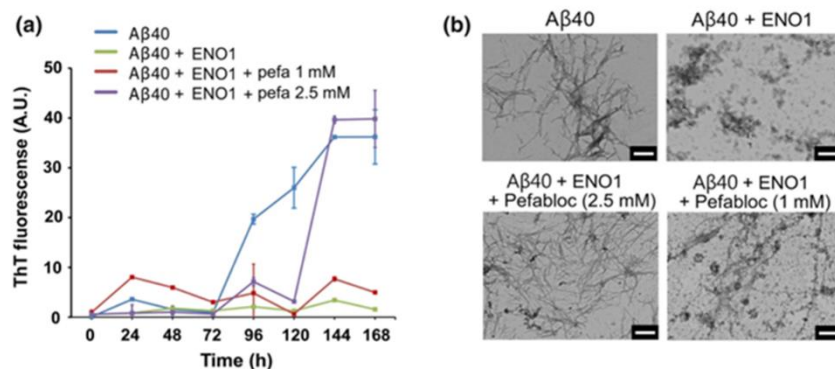
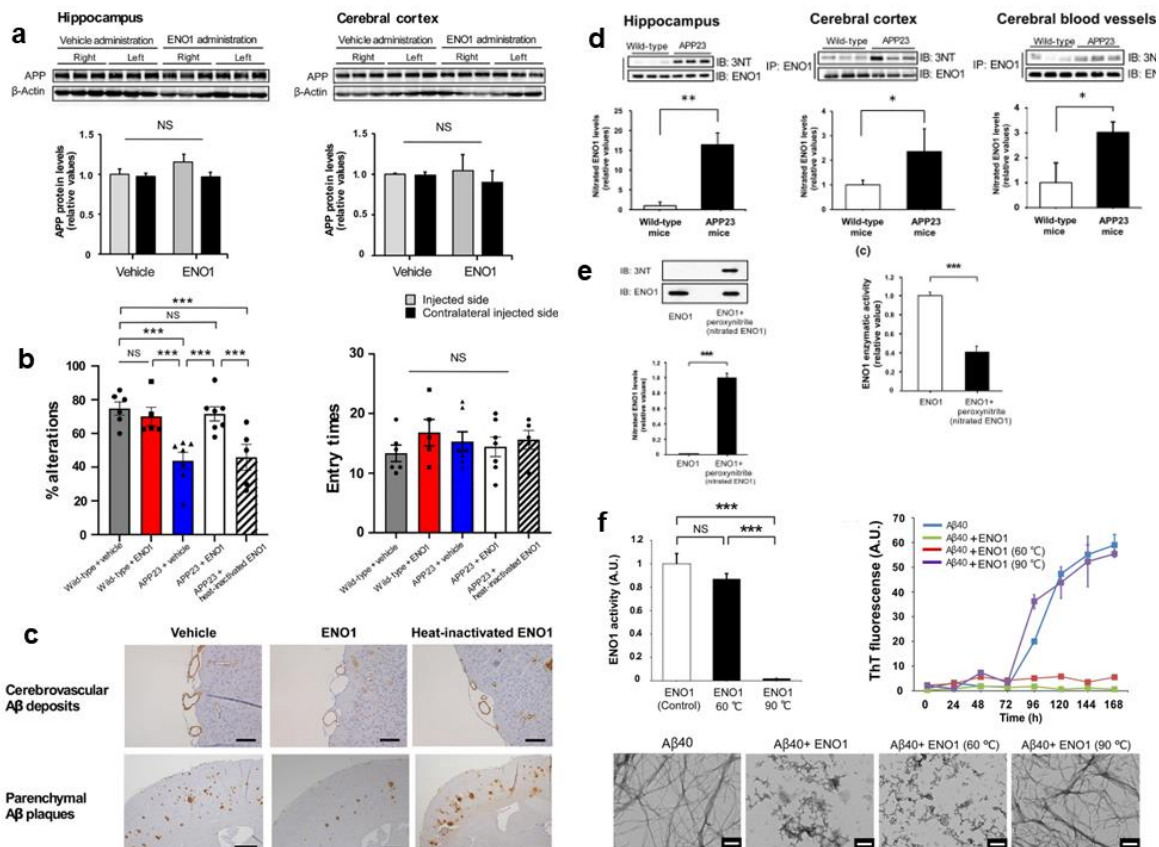


図 1

Pefabloc SC は 2.5 mM の濃度において ENO1 の A $\beta$  対す線維形成抑制を阻害した。ENO1 により ThT 吸光度の上昇が抑制されているが (青)、2.5 mM (紫) の Pefabloc SC では上昇し、TEM でも線維形成が確認された。

## 図 2

(a) アミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質である APP の発現は、ENO1 の投与により影響を受けなかった。(b) CAA/AD モデルマウスを用いた実験では、Y 迷路試験では ENO1 投与群において、空間作業記憶が改善した。(c) ENO1 投与群において脳血管、脳実質への  $A\beta$  の沈着が減少し、不溶性分画の  $A\beta_{40}$  と  $42$  が有意差をもって減少した。CAA/AD トランスジェニックマウスの脳実質では、ENO1 がニトロシル化されていることを確認し (d)、ENO1 の酵素活性がニトロシル化により減弱した (e)。90°C の熱処理によって ENO1 の  $A\beta$  に対す線維形成の抑制が阻害された。ENO1 投与により ThT 吸光度は上昇しないが (青)、90°C で熱処理した ENO1 (紫) では上昇し、TEM でも線維形成が確認された。この 90°C で熱処理した ENO1 を注入ポンプで CAA/AD モデルマウスの脳内に投与したところ、 $A\beta$  の沈着は減少せず、空間作業記憶も改善しなかった (b, c)。



## 発表論文

1. Inoue Y, Ando Y, Misumi Y, Ueda M. Current Management and Therapeutic Strategies for Cerebral Amyloid Angiopathy. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 3869. doi: 10.3390/ijms22083869.
2. Inoue Y, Masuda T, Misumi Y, Ando Y, Ueda M. Metformin attenuates vascular pathology by increasing expression of insulin-degrading enzyme in a mixed model of cerebral amyloid angiopathy and type 2 diabetes mellitus. *Neurosci Lett.* 2021; 762: 136. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136136.
3. Inoue Y, Tasaki M, Masuda T, Misumi Y, Nomura T, Ando Y, Ueda M.  $\alpha$ -Enolase reduces cerebrovascular  $A\beta$  deposits by protecting  $A\beta$  amyloid formation. *Cell Mol Life Sci.* 2022; 79: 462. doi: 10.1007/s00018-022-04493-x.
4. Inoue Y, Nakajima M, Inatomi Y, Masuda T, Misumi Y, Nomura T, Uetani H, Hirai T, Ueda M. Reversible Periventricular Hyperintensity Lesions in Cerebral Amyloid Angiopathy: A Case Mimicking Cerebral Amyloid Angiopathy-related Inflammation. *Intern Med.* 2022; 61: 3581-3584. doi: 10.2169/internalmedicine.8630-21.

## 講演

1. Cutting-Edge Therapeutic Approaches to Cerebral Amyloid Angiopathy. 8th International Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) Conference (招待講演) (国際学会) 2022 年
2. プロテオミクスを用いた脳アミロイドアンギオパシーの進行抑制分子の探索 第 64 回日本神経病理学会総会学術研究会/第 66 回日本神経化学学会大会合同大会 (シンポジウム講演) (国際学会) 2023 年

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inoue Yasuteru, Tasaki Masayoshi, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Nomura Toshiya, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 79
2. 論文標題 -Enolase reduces cerebrovascular A deposits by protecting A amyloid formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 462-462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04493-x	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 Inoue Yasuteru, Nakajima Makoto, Inatomi Yuichiro, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Nomura Toshiya, Uetani Hiroyuki, Hirai Toshinori, Ueda Mitsuharu	4. 巻 61
2. 論文標題 Reversible Periventricular Hyperintensity Lesions in Cerebral Amyloid Angiopathy: A Case Mimicking Cerebral Amyloid Angiopathy-related Inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3581 ~ 3584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.8630-21	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 Inoue Yasuteru, Masuda Teruaki, Misumi Yohei, Ando Yukio, Ueda Mitsuharu	4. 巻 762
2. 論文標題 Metformin attenuates vascular pathology by increasing expression of insulin-degrading enzyme in a mixed model of cerebral amyloid angiopathy and type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136136 ~ 136136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136136	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 -
1. 著者名 Yasuteru Inoue, Yukio Ando, Yohei Misumi, Mitsuharu Ueda	4. 巻 22
2. 論文標題 Current Management and Therapeutic Strategies for Cerebral Amyloid Angiopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22083869	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuteru Inoue
2. 発表標題 Cutting-Edge Therapeutic Approaches to Cerebral Amyloid Angiopathy
3. 学会等名 8th International Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA) Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuteru Inoue
2. 発表標題 2. プロテオミクスを用いた脳アミロイドアンギオパチーの進行抑制分子の探索
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 / 第66回日本神経化学会大会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
米国	Mayo Clinic, FL, USA		
米国	Mayo Clinic, FL, USA		