

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591405

研究課題名（和文） アミロイドベータの分解を促進する方法の開発

研究課題名（英文） Development of methods to promote degradation of amyloid beta

研究代表者

田上 真次 (TAGAMI SHINJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40362735

研究成果の概要（和文）：老人斑はアルツハイマー病脳に特異的であり、その主たる構成成分はアミロイドベータ(A β 42)である。従ってA β 42の産生及び分解機構を解明することはADの治療に直接結びつく可能性がある。我々はアミロイドベータ前駆体蛋白(β APP)から、ガンマセクレターゼの基質であるCTF- β を切り出す β セクレターゼ(BACE)がA β 42自体を基質として認識し、より凝集しにくい分子種に分解することを発見した。また、並行してADの病原性分子と考えられているA β 42の産生機構についても研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：Senile plaque is a pathological hallmark of Alzheimer's disease. The major component is amyloid-beta 42(A β 42). Inhibition of A β 42 generation or enhancement of A β 42 degradation is fundamental approach in developing methods to treat AD. We found that BACE, which sheds beta-amyloid protein precursor (β APP) to generate CTF- β , cleaves A β 42 at two sites into species with much less toxicity and hydrophobicity. We also investigated the generation mechanism of A β 42.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：精神医学

科研費の分科・細目：認知症、生化学

キーワード：presenilin, gamma secretase, BACE, betaAPP, amyloid beta, Alzheimer disease

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)脳の主たる構成成分はアミロイドベータ(A β)である。その産生を阻害したり分解やクリアランスを促進することでADの発症を防ぐことが出来る可能性がある。A β は前駆体である β APPがBACEによる細胞外シェディングを受け、引き続いてプレセニリン γ セクレターゼによる膜内蛋白分解を受けて産生される。我々はBACEがA β そのものを基質として認識し、少

なくとも2箇所切断することを明らかにした。切断された短縮型A β はA β 全長に比べて凝集しにくかった。つまりBACEはA β の分解を促進している可能性があることを示した。

2. 研究の目的

我々はBACEがアミロイドベータ自体を基質として認識し、少なくとも2箇所切断することを見出した。BACEが主として細胞内

でアミロイドペータを Y10 と E11 部位の間および L34 と M35 部位の間で分解することを cell-free ガンマセクレターゼ assay 及びリコンビナント BACE を用いた in vitro assay の両者の系で明らかにした。この BACE の性質を利用し、A β の分解促進を図る方法の開発を目指した。また近年 BACE が末梢神経の髄鞘形成に重要な役割を果たす Neuregulin を切断することが明らかになった。BACE 活性を阻害することは AD 治療薬開発の軸のひとつである。従って BACE がどのような生理活性を担っているかどうかを調べることは重要である。本研究ではこの点も併行して進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) BACE に修飾を加え、A β の切断活性は保持するが β APP 切断活性を阻害することができるか？

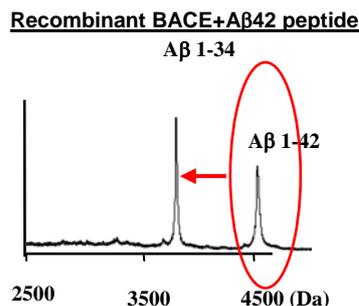
BACE はプロドメインと 2 つの活性中心ならびに膜貫通領域が 1 つあり、細胞内で成熟するに従ってプロドメインが切り離され、いくつかのシステイン残基による S-S 結合を介してフォールディングする。これらの知見を基に BACE の人工変異体を数十種類作製し、各々をスウェーデン型 β APP 発現細胞に恒常的に発現させる。この細胞を一定時間 S35 でラベルする。BACE が β APP を切断する活性は分泌される sAPP β の量で評価する。BACE による A β 切断活性は分泌された A β 各分子種を Bicine Urea ゲルで泳動する。このシステムを用いれば A β 各分子種が同定される。これらプロドメインや膜貫通領域を欠いた変異体の他に、エンドサイトーシスを受けるモチーフなどさまざまなドメインを欠いた変異体を作製する。変異体による A β と β APP の分解効率を評価するには、それらの発現レベルを正確に評価する必要がある。この目的で各種変異体の C 末に Flag-tag を融合させる。されにそれら変異体を恒常的に発現する細胞をそれぞれ準備する。

β APP の切断効率は低下するが、A β 切断効率は低下しない変異体が見られれば、次の段階として BACE の他の基質切断効率を調べる必要がある。近年、BACE により細胞外シユディングを受ける他の基質に関する知見が蓄積しつつある。BACE の基質には β APP や A β 以外にも APLP1, 2 や糖転移酵素の一種が同定されているが、中でも中枢神経系においてミエリンの形成に重要な役割を果たすニューレギュリンが BACE により切断されることがわかってきた。重要なことに BACE をノックアウトしたマウスではミエリンの形成が抑制されていることがわかった。このことは BACE 阻害剤を開発する上で留意・検討すべき重要事項である。BACE によるニューレギュリンの切断を定量的に評価できるアッセイ系を立ち上げる。この系を用いてスクリーニングで候補として得た変異体がニューレギュリンを切断するかどうかを評価する。

ーレギュリンの切断を定量的に評価できるアッセイ系を立ち上げる。この系を用いてスクリーニングで候補として得た変異体がニューレギュリンを切断するかどうかを評価する。

4. 研究成果

重要なことに我々は BACE が病原性・凝集性が極めて高い A β 42 も切断することを明らかにした。下の図はリコンビナント BACE が in vitro で A β 42 を切断し凝集性がより低い A β 1-34 に分解していることを示す。



しかしながら、BACE は A β 42 の前駆体である β APP を細胞外で切断するため単純にその活性を上昇させると、A β 産生そのものが亢進する。そこで、BACE に修飾を加え、A β の切断活性は保持するが β APP 切断活性を阻害することが可能かどうか、検討を試みた。しかしながら、両者を完全に分離することは不可能であった。従って現時点では BACE による A β 42 分解能を促進することによって、AD の根本治療法を開発することは困難であると判断した。

しかしながら、本研究を遂行することで新たにいくつかの発見をし、技術的進展を得ることが出来た。まず第一に BACE やセクレターゼの活性を変化させることなしに、A β 産生を阻害する化合物を見出し、その作用点を明らかにした (文献 8)。この化合物 (Destruxin E) は in vitro および培養細胞において BACE 活性を全く下げることなしに BACE による β APP の shedding を減じた。Destruxin E が BACE と β APP の細胞内局在を変化させることで、BACE による β APP の shedding を減じている可能性が示唆された。

さらに、さらに新たなアルツハイマー病治療薬ターゲット開発のため、アミロイドペータの分解および中枢から末梢へのクリアランスを促進する因子の探索を行った。具体的には Macrophage colony stimulating factor (MCSF) ノックアウトマウスの解析を行い、MCSF ノックアウトマウスでは末梢血中の A β 40 の濃度がコントロールマウスに比べて低いことを明らかにした。(文献 11)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Mori K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Yanagida K, Kodama TS, Tatsumi S, Fujii K, Tanimukai H, Hashimoto R, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Funamoto S, Ihara Y, Takeda M. The production ratios of AICD ϵ 51 and A β 42 by intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. *Psychogeriatrics* 査読有 10, 2010, p117-123
2. Mitsuishi Y, Hasegawa H, Matsuo A, Araki W, Suzuki T, Tagami S, Okochi M, Takeda M, Roepman R, Nishimura M. Human CRB2 inhibits gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein by binding to the presenilin complex. *J Biol Chem* 査読有 285, 2010, p14290-14931
3. Takeda M, Hashimoto R, Kudo T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Sadick G, Tanaka T. Laughter and humor as complementary and alternative medicines for dementia patients. *BMC Complement Altern Med*. 査読有 10, 2010, p1-7
4. Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M. *Dement Geriatr Cogn Disord* 査読有 30, 2010, p302-308
5. Takeda M, Martínez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R, Cacabelos R. Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin Neurosci* 査読有 64, 2010, p592-607
6. Okochi, M., Tagami, S., Takeda, M. Analysis of APL1beta28, a surrogate marker for Alzheimer Abeta42, indicates altered precision of gamma-cleavage in the brains of Alzheimer disease patients, *Neurodegenerative Dis*, 査読有 7, 2009, p42-45
7. Yanagida K, Okochi, M., Tagami S, Nakayama T, Kodama TS, Nishitomi K, Jiang J, Mori K, Tatsumi S, Arai T, Ikeuchi T, Kasuga K, Tokuda T, Kondo M, Ikeda M, Deguchi K, Kazui H, Tanaka T, Morihara T, Hashimoto R, Kudo T, Steiner H, Haass C, Tsuchiya K, Akiyama H, Kuwano R, Takeda M. The 28-amino acid form of an APLP1-derived Ab-like peptide is a surrogate marker for Ab42 production in the central nervous system. *EMBO Molecular Medicine*, 査読有 1, 2009, p223-235
8. Itoh N, Okochi, M., Tagami S, Nishitomi K, Nakayama T, Yanagida K, Fukumori A, Jiang J, Mori K, Hosono M, Kikuchi J, Nakano Y, Takinami Y, Dohi K, Nishigaki A, Takemoto H, Minagawa K, Katoh T, Willem M, Haass C, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Hasegawa H, Nishimura M, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M. Destruxin E Decreases Beta-Amyloid Generation by Reducing Colocalization of Beta-Amyloid-Cleaving Enzyme 1 and Beta-Amyloid Protein Precursor. *Neurodegenerative Dis* 査読有 6, 2009, p230-239
9. Tagami S., Okochi M., Fukumori A., and Takeda M, Amyloid-beta 42 generating process may have a biological role in regulation of Notch signaling intensity, *Jpn. J. Neuropsychopharmacology*, 査読有 28, 2008, p177-183
10. Tagami S., Susuki K., Takeda M., and Koga M, Fulminant case of Guillain-Barré syndrome with poor recovery and depression after Haemophilus influenzae infection, *Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 査読有 62, 2008, p487
11. Jiang J., Okochi M., Tagami S., Nishitomi K., Yanagida K., Nakayama T., Tatsumi K., Mori K., and Takeda M, Macrophage colony stimulating factor is associated with excretion of amyloid-peptides from cerebrospinal fluid to peripheral blood, *Psychogeriatrics*, 査読有, 8, 2008, p188-195
12. Takahashi H, Iwase M, Ishii R, Ohi K, Fukumoto M, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Canuet L, Nakahachi T, Iike N, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kazui H, Yoshida T, Tanimukai H, Yasuda Y, Kudo T, Hashimoto R, Takeda M, Impaired prepulse inhibition and habituation of acoustic startle response in Japanese patients with schizophrenia, *Neurosci Res* 査

読有
62, 2008, p187-194

[学会発表] (計 12 件)

1. 田上 真次 柳田 寛太 児玉 高志 佐野 聖三 朝長 毅 武田 雅俊 大河内 正康, アルツハイマー病の発症予期診断バイオマーカー開発を目的とした脳脊髄液中のペプチド解析 amyloid beta42 のサロゲートマーカー、APL1beta 28 について日本ヒトプロテオーム機構第 8 回大会 2010. 7. 26-27 東京ベイホテル 東急
2. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Kodama T, Takeda M, Analysis of CSF of patients suffering from PS1-mutated familial AD indicates that the level of Abeta42 generation does not increase in brain of these patients, 第 53 回日本神経化学会 (神戸) 大会 Neuro2010, 2010. 9. 2-4, 神戸コンベンションセンター
3. 田上 真次 大河内 正康 児玉 高志 柳田 寛太 佐野 聖三 朝長 毅 武田 雅俊, 末梢血中の amyloid beta42 のサロゲートマーカー開発について, 第 29 回日本認知症学会学術集会, 2010. 11. 5-7, 名古屋市ウインク愛知
4. Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takeda M, The Ratio of Csf Apla1beta28, a Surrogate Marker for Abeta42, Increases Before Onset of Sporadic Alzheimer's Disease, Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease 2010, 2010. 7. 10-15, Honolulu Hawaii U.S.A
5. Tagami S, Okochi M, Takeda M, Analysis of an A β -like peptide in human CSF to address how the cleavage precision of presenilin/ γ -secretase is altered in PS1 familial AD patients, International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), 2009. 7. 11-16, Messe Wien Exhibition and Congress Center Vienna, Austria
6. 田上 真次 大河内 正康, 病的に低下した Notch シグナルを是正する新たな方法の開発について, 第 4 回 Notch 研究会, 2009. 7. 30, 国立遺伝学研究所講堂
7. 田上 真次 大河内 正康 柳田 寛太 中山 泰亮 児玉 高志 辰巳 真一 森 康治 武田 雅俊, 家族性アルツハイマー病の発症機序において、脳内アミロイド β 42 の産生増大は本当に起こっているか?, 第 16 回末病システム学会総会, 2009. 10. 31, 千里ライフサイエンスセンター
8. 田上 真次 大河内 正康 武田 雅俊, Overproduction of A β 42 may not occur even in brain of PS1 familial AD patients in which tremendous amounts of A β 42 accumulate in cotton wool plaques., 第 28 回日本認知症学会, 2009. 11. 20, 仙台, 東北大学百周年記念会館
9. Tagami, S., Okochi, M., and Takeda, M., Notch signaling can be up-regulated through modification of presenilin/ γ -secretase-mediated S3 cleavage, The 31th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2008. 7. 30, 東京国際会議場
10. Tagami, S., Okochi, M., and Takeda, M., Changes in the cleavage precision of presenilin/ γ -secretase regulate Notch signaling intensity, The 11th International Conference on Alzheimer's disease and Related Disorders, 2008. 7. 30, McCormick Place, Chicago, USA
11. 田上真次 大河内正康 武田雅俊, アルツハイマー病の病原性物質である A β 42 を産生する仕組みには「細胞の分化に必須の Notch シグナル強度」を調節する生理作用がある, 第 51 回日本神経化学大会シンポジウム 8 アルツハイマー病の神経化学, 2008. 9. 12, 富山国際会議場
12. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Nakayama T, Kodama T, Tatsumi S, Jiang J, Mori KSakaguchi G, Kato A, Hasegawa H, Nishimura M, and Takeda M, Relation between presenilin/ γ -secretase modulators and Notch signaling intensity, 第 27 回日本認知症学会, 2008. 10. 10, 群馬県前橋テルサ

[図書] (計 5 件)

1. 田上真次 武田雅俊, 法研, 老年期うつ病 家庭医学大全科, 2010, p522-523
2. 田上真次 武田雅俊, 南江堂, 興奮・暴力 疾患と治療 III, 2010, p217
3. 田上 真次 大河内 正康 武田 雅俊, 科学評論者, 神経内科 第 7 2 巻特別増刊号 認知症診断マニュアル 総論的事項—アルツハイマー病の病理過程の理解と治療薬開発 (A β カスケード、神経栄養因子、神経伝達物質) 2010, p243-247
4. 田上 真次 大河内 正康 武田 雅俊, 東京大学出版会, 新老年学 第 3 版 アルツハイマー型認知症, 2010 p1205-1213
5. 田上真次 大河内正康 福森亮雄 武田雅俊, 分子精神医学 先端医学社, プレセニリン γ セクレターゼによる切断の多様性とその変化について, 2008, p80-83

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：プレセニリンγセクレターゼによるアルツハイマー病アミロイドの分解ア

ッセイ法

発明者：大河内正康、田上真次、武田雅俊、西富晃平

権利者：大河内正康、田上真次、武田雅俊、西富晃平

種類：特許願

番号：J110137126

出願年月日：平成 22 年 10 月 18 日

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

http://www.osaka-u.ac.jp/en/research/annual-report/volume-9/100_select_paper/biology02.html

http://www.osaka-u.ac.jp/en/research/annual-report/volume-11/100_select_paper/copy6_of_science02.html

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/psy/www/jp/lab/kagaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 真次 (TAGAMI SHINJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40362735

(2) 研究分担者

大河内 正康 (OKOCHI MASAYASU)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90335357

(3) 研究分担者

武田 雅俊 (TAKEDA MASATOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00179649