

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790073

研究課題名（和文） 種々の分子シャペロンのアルツハイマー病に対する効果

研究課題名（英文） Effect of various molecular chaperones on the Alzheimer's disease.

研究代表者 星野 竜也 (HOSHINO TATUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70457589

研究成果の概要（和文）：HSP70 は変性・凝集したタンパク質を基に戻す機能を持っている。そこで私は、タンパク質の変性・凝集が原因であるアルツハイマー病に HSP70 が有効ではないかと考えた。実際私は、過剰発現マウス、あるいは誘導薬を用いて、アルツハイマー病のモデルマウスにおける HSP70 の産生を高めることにより、アルツハイマー病様症状（記憶学習能力の低下、老人斑の形成）が有意に抑制されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Amyloid- β peptide ($A\beta$) plays an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). HSP70 activity in relation to inhibition of $A\beta$ oligomerization and stimulation of $A\beta$ phagocytosis has also been reported. Transgenic mice expressing APPsw showed less of an apparent cognitive deficit when they were crossed with transgenic mice expressing HSP70. Transgenic mice expressing HSP70 also displayed lower levels of $A\beta$, $A\beta$ plaque deposition and neuronal and synaptic loss than control mice. These results suggest that overexpression of HSP70 in mice suppresses not only the pathological but also the functional phenotypes of AD.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子シャペロン・アルツハイマー・アミロイド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は老人性認知症（痴呆）の主な原因であり、社会の高齢化に伴いその患者数が急増している（我が国だけでも既に100万人を超えている）。アルツハイマー病は患者本人だけでなく、その家族にも大きな介護負担を強いることから社会問題にもなっている。しかしながら現在使われている治療薬は、何れも対症療法的なものであり、根本

的な治療薬は開発されていない。従ってアルツハイマー病の進行を抑制する因子（蛋白質など）を発見し、それを利用してこの疾患の根本的な治療薬を開発することは極めて重要である。

アルツハイマー病の主な原因は、 β アミロイドという蛋白質が過剰に産生・蓄積・凝集することにより、神経細胞の機能が低下することである。アルツハイマー病の病理学的な

特徴の一つである老人斑は β アミロイドが凝集したものである。 β アミロイドは膜タンパク質であるアミロイド前駆体蛋白質 (APP) が β セクレターゼ、及び γ セクレターゼにより分解されることにより産生される。

分子シャペロンは、蛋白質が正しい構造を取るのを助ける一群の蛋白質である。従って分子シャペロンが β アミロイドの凝集を抑制し、アルツハイマー病の発症を抑制することが考えられる。実際最近我々は、精製した HSP25 と HSP70 が試験管内で β アミロイドの凝集を抑制することを見出した (Hoshino *et al.* Submitted)。そこで本研究で我々は、種々の分子シャペロンの β アミロイドの凝集に対する効果を網羅的に解析する。

APP が時間・空間的にダイナミックな制御を受けている膜蛋白質であることが最近分かってきた。APP は小胞体内で糖鎖修飾を受けて、この修飾依存にゴルジ体に移行し、最終的には細胞質膜に配置される。しかし一部の APP は膜小胞 (エンドソーム) に封入され再び細胞質に戻る事が最近分かった。そしてさらにその一部はリサイクリングエンドソームを介して再び細胞質膜に戻り、また一部はリソソームまで運ばれ分解されることも分かってきた。APP のセクレターゼによる分解 (β アミロイドの産生) は、ゴルジ体、及び細胞質膜で行われると考えられてきたが、最近我々はエンドソーム、及びリソソームでも起こることを見出した (Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2007)。また EP₄ 受容体 (プロスタグランジン E₂ 受容体の一種) など一部の受容体はリガンドと結合すると内在化することが知られているが、最近我々はこの内在化に伴い APP も内在化すること、及びこれにより β アミロイドの産生が促進されることを見出した (Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2009)。

このように APP が時間・空間的にダイナミックな制御を受け、その課程で β アミロイドが産生されることから、APP の細胞内輸送に影響を与える蛋白質は β アミロイドの産生、即ちアルツハイマー病の進行に重要な役割を果たしている可能性がある。実際我々は後述するように、小胞体シャペロンが APP の細胞内輸送を抑制し、 β アミロイドの産生を阻害することを見出した (Hoshino *et al.* *Biochem J* 2007)。また最近、HSP25 がリサイクリングエンドソームを介する APP の細胞膜移行を抑制することにより、 β アミロイドの産生を阻害することを見出した。そこで本研究で我々は、種々の分子シャペロンの APP の細胞内輸送に対する効果を網羅的に解析する。

アスピリンなどの非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) はプロスタグランジン E₂ (PGE₂) を減少させ、抗炎症作用を発揮する (PGE₂ は炎症増悪因子である)。一方、NSAIDs の副作用である胃潰瘍が臨床現場で大きな問題

になっている。さらに疫学調査から、NSAIDs の長期使用によりアルツハイマー病の発症リスクが大きく低下したりアルツハイマー病の進行が抑制されたりすることが知られている。我々は NSAIDs のこれら様々な薬理作用 (副作用) に与る分子機構を抗炎症作用依存的なもの、非依存的なものに分けて検討してきた。 (Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2003; Tanaka, Hshino *et al.* *J Biol Chem* 2005; Ushijima, Hoshino *et al.* *Mol Pharmacol* 2005; Aburaya, Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2006; Namba, Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2009)。NSAIDs の抗アルツハイマー病作用に関しては、NSAIDs の抗炎症作用がアルツハイマー病の進行を抑制すること (炎症がアルツハイマー病の進行を促進すること) を明らかにした (Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2007、アルツハイマー病治療薬の新しいターゲットが発見されたと、新聞やテレビで広く報道された)。一方、抗炎症作用非依存的な経路に関して我々は、DNA チップを用いて NSAIDs が誘導する遺伝子を網羅的に同定した。その結果、NSAIDs が小胞体シャペロン (GRP78 など) を誘導することを見出した (Tsutsumi, Hoshino *et al.* *Cell Death Differ* 2004; Tsutsumi, Hoshino *et al.* *Oncogene* 2006; Namba Hoshino *et al.* *Mol Pharmacol* 2007; Namba, Hoshino *et al.* *J Biol Chem* 2009 など)。次に我々は APP を過剰発現している神経由来培養細胞において、GRP78 や ORP150 などの小胞体シャペロンを発現すると、 β アミロイドの産生が抑制されることを見出した。またこの原因として、小胞体シャペロンが APP と結合し小胞体からゴルジ体への APP の輸送を阻害していることを見出した (Hoshino *et al.* *Biochem J* 2007)。以上の結果は、NSAIDs は抗炎症作用に依存する機構と、依存しない機構 (小胞体シャペロンの誘導) を介して、抗アルツハイマー病作用を発揮していることを示唆している。最近我々は HSP70 が抗炎症作用を持ち、これにより炎症性疾患に対して保護的に働いていることを見出した。そこで本研究で我々は、種々の分子シャペロンの抗炎症作用を網羅的に解析する。

2. 研究の目的

分子シャペロンはアルツハイマー病の進行に重要な複数のステップ (β アミロイドの凝集、APP の細胞内輸送、炎症反応) を抑制するので、アルツハイマー病の進行を抑制する可能性が考えられる。最近我々は、APP 過剰発現マウス (APP を過剰発現しているマウスで、 β アミロイドの過剰産生、老人斑の形成、認知機能低下などアルツハイマー病とよく似た症状を示す) と HSP70 過剰発現マウスを掛け合わせ、野生型マウスに比べ、HSP70 過剰発現マウスではアルツハイマー

病の進行が顕著に抑制される (β アミロイド蓄積、老人斑の形成、認知機能低下のいずれもが抑えられる) ことを見出した (Hoshino *et al.* submitted)。そこで本研究で我々は、APPトランスジェニックマウスと種々の分子シャペロンの過剰発現マウスを掛け合わせ、アルツハイマー病様症状が改善するかを調べる。これによりアルツハイマー病の進行を抑制する分子シャペロンを同定したいと考えている。

一方本研究で我々は独自に入手した神経変性疾患に効くとされる漢方薬から種々の分子シャペロン誘導剤を検索し、そのアルツハイマー病に対する効果を細胞レベル、動物レベルで検討する。このように本研究は、分子シャペロンによる APP や β アミロイドの機能・動態の制御を明らかにするだけでなく、新しいタイプのアルツハイマー病治療薬の開発に繋がる研究である。

3. 研究の方法

(1) 種々の分子シャペロンの β アミロイド凝集に対する効果

最近我々は精製した HSP25 や HSP70 が、試験管内で β アミロイドの凝集を抑制することを見出した。一方、HSP32, HSP47, HSP60にはこのような活性がないことも見出した

(Hoshino *et al.* submitted)。この研究には、チオフラビンという蛍光物質と β アミロイドを反応させると、 β アミロイドの凝集依存に蛍光が高まる現象を利用した。そこでこの方法を用いて、他の HSP (HSP90, HSP104)、及び小胞体シャペロン (calreticulin, calnexin, GRP78, GRP94, ORP150) に関しても、 β アミロイドの凝集を抑制するかを検討する。各分子シャペロンの精製は、バキュロウイルスを用いてこれらを過剰発現させた昆虫細胞から行う。また GRP78 に対する Erdj4 など、シャペロン活性を促進する補助因子 (コシャペロン) も精製しその効果を検討する。

一方、細胞内での β アミロイド凝集に対する種々の分子シャペロンの効果も検討する。具体的には、細胞内で β アミロイドを過剰発現させ、凝集した β アミロイドを遠心法で検出する系において、種々の分子シャペロン (上述) の過剰発現の効果を検討する。この場合も、コシャペロンの存在が知られているものに対しては、その効果を検討する。

以上二つのアッセイで有効な分子シャペロンに関しては、変異導入などを用いてこの活性が確かにシャペロン活性に依存していることを確認する。

(2) 種々の分子シャペロンの抗炎症作用

最近我々は、炎症性細胞において HSP70 を過剰発現させると、炎症性サイトカインの発現・産生が抑制されること、及びこの機構

として HSP70 が炎症誘導性転写因子である NF- κ B の活性を直接抑制することを見出した。そこで本研究では他の分子シャペロン (HSP25, HSP32, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90, HSP104, calreticulin, calnexin, GRP78, GRP94, ORP150) を炎症性細胞で過剰発現させ、炎症性サイトカインの発現・産生を抑制するかを調べる。抑制が見られた場合、そのメカニズムを NF- κ B などの炎症関連転写因子に注目して検討する。

(3) 種々の分子シャペロンの APP の細胞内輸送に対する効果

我々は、GRP78 が小胞体からゴルジ体への APP 輸送を阻害することにより、 γ セクレターゼによる APP 切断 (β アミロイドの産生) を抑制することを見出した (Hoshino *et al. Biochem J* 2007)。また最近、HSP25 がリサイクリングエンドソームを介する APP の細胞膜移行を抑制することにより、 β アミロイドの産生を阻害することを見出した。そこで本研究で我々は APP の輸送に対する種々の分子シャペロンの効果を網羅的に調べる。具体的には、小胞体からゴルジ体への輸送、ゴルジ体から細胞質膜への輸送、細胞質膜からエンドソームへの輸送 (細胞質膜の陥入による、膜蛋白質の細胞内再輸送)、エンドソームからリソソームへの輸送、エンドソームから細胞質膜への逆輸送 (リサイクリングエンドソーム依存)、それぞれの輸送に対する個々の分子シャペロンの効果を調べると共に、その分子シャペロンがその部位 (エンドソームなど) において APP と結合しているかを調べる。さらにそれぞれの輸送を阻害した時 (siRNA や各種阻害剤を用いる)、 β アミロイドの産生がどのように変化するかを調べる。

以上の研究は、分子シャペロンによる APP や β アミロイドの機能・動態の制御を明らかにするためだけでなく、アルツハイマー病治療薬としての分子シャペロン誘導剤の評価のためにも行う。例えばある分子シャペロンが APP 輸送に影響し、 γ セクレターゼによる APP 切断を阻害した場合は、同じく γ セクレターゼの基質である Notch 1 の切断を検討する。これは、アルツハイマー病治療薬として開発された γ -セクレターゼ阻害剤が、Notch 1 の切断も阻害するため、免疫異常副作用を起こすことが報告されているためである (Notch 1 は免疫細胞の分化に関与している)。

(4) 種々の分子シャペロンのアルツハイマー病の進行に対する効果

最近我々は APPトランスジェニックマウス (APPを過剰発現しているマウスで、 β アミロイドの過剰産生、老人斑の形成、認知機能低下などアルツハイマー病とよく似た症状を示す) と HSP70 の過剰発現マウスを掛け合わ

せ、野生型マウスに比べHSP70の過剰発現マウスでは、アルツハイマー病の進行が抑制されることを見出した (Hoshino *et al.* submitted)。そこで同様の方法で種々の分子シャペロン (特に (1) から (3) の研究で可能性が示唆されたもの) のアルツハイマー病の進行に対する効果を調べる。具体的には、APPトランスジェニックマウスと種々の分子シャペロンの過剰発現マウスを掛け合わせ、アルツハイマー病様症状 (β アミロイドの産生、老人斑の形成、認知機能低下など) が改善するかを調べる。

(5) 毒性のない分子シャペロン誘導剤の検索

我々はこれまで毒性のない HSP 誘導剤を用いて、その有用性を示してきた。そこで (1) ~ (4) の研究でアルツハイマー病に有効であることが示唆された分子シャペロンに関して、その毒性のない誘導剤の検索を行う。スクリーニングは、我々が独自に入手した神経変性疾患に効くとされる約 600 種の漢方薬から行う。個々の分子シャペロン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、それを保持した細胞を用いた系で一次スクリーニングを行い、イムノブロット法で二次スクリーニングを行う。毒性のない分子シャペロン誘導剤を得たいので、三次スクリーニングではその漢方薬の細胞毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度で分子シャペロンを誘導する漢方薬を選択する。四次スクリーニングではその漢方薬をマウス脳内に注入し、分子シャペロンを誘導するかを検討する。

次にそれぞれの漢方薬を APP トランスジェニックマウスに脳質内投与し、 β アミロイドの産生、老人斑の形成、認知機能低下を抑制するかを検討する。抑制が見られた場合には、他の臓器の状態を精査し、副作用が表れていないかを調べる。結果を総合的に判断し、アルツハイマー病治療薬としての有望な分子シャペロン誘導剤を決定する。

4. 研究成果

我々は精製した HSP25 や HSP70 が、試験管内で β アミロイドの凝集を抑制することを見出した。一方、HSP32, HSP47, HSP60 にはこのような活性がないことも見出した。そこでこの方法を用いて、他の HSP (HSP90, HSP104)、及び小胞体シャペロン (calreticulin, calnexin, GRP78, GRP94, ORP150) に関しても、 β アミロイドの凝集を抑制するかを検討した。各分子シャペロンの精製は、バキュロウイルスを用いてこれらを過剰発現させた昆虫細胞から行った。その結果、HSP90、及び GRP78 が試験管内で β アミロイドの凝集を抑制することを見出した。しかしながらその

活性は、HSP70 よりも弱かった。

一方、細胞内での β アミロイド凝集に対する種々の分子シャペロンの効果も検討した。具体的には、細胞内で β アミロイドを過剰発現させ、凝集した β アミロイドを遠心法で検出する系において、種々の分子シャペロンの過剰発現の効果を検討した。その結果、HSP70 において最も強い β アミロイド凝集阻害活性が見られた。

(1) 種々の分子シャペロンの抗炎症作用

最近我々は、炎症性細胞において HSP70 を過剰発現させると、炎症性サイトカインの発現・産生が抑制されること、及びこの機構として HSP70 が炎症誘導性転写因子である NF- κ B の活性を直接抑制することを見出した。そこで今年度我々は、他の分子シャペロン (HSP25, HSP32, HSP47, HSP60, HSP70, HSP90, HSP104, calreticulin, calnexin, GRP78, GRP94, ORP150) を炎症性細胞で過剰発現させ、炎症性サイトカインの発現・産生を抑制するかを調べた。その結果、HSP32, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78 において抗炎症作用が見られた。

(2) 種々の分子シャペロンのアルツハイマー病の進行に対する効果

我々は APP トランスジェニックマウス (APP を過剰発現しているマウスで、 β アミロイドの過剰産生、老人斑の形成、認知機能低下などアルツハイマー病とよく似た症状を示す) と HSP70 の過剰発現マウスを掛け合わせ、野生型マウスに比べ HSP70 の過剰発現マウスでは、アルツハイマー病の進行が抑制されることを見出した。そこで同様の方法で種々の分子シャペロンのアルツハイマー病の進行に対する効果を調べた。具体的には、APP トランスジェニックマウスと種々の分子シャペロンの過剰発現マウスを掛け合わせ、アルツハイマー病様症状 (β アミロイドの産生、老人斑の形成、認知機能低下など) が改善するかを調べた。その結果、複数の分子シャペロンがアルツハイマー病の進行を抑制することを示唆した。

一方我々はこれまで毒性のない HSP 誘導剤を用いて、その有用性を示してきた。他の分子シャペロンに関して、その毒性のない誘導剤の検索を行った。スクリーニングは、我々が独自に入手した神経変性疾患に効くとされる約 600 種の漢方薬から行った。個々の分子シャペロン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、それを保持した細胞を用いた系で一次スクリーニングを行い、イムノブロット法で二次スクリーニングを行った。毒性のない分子シャペロン誘導剤を得るために、三次スクリーニングではその漢方薬の細胞

毒性を調べ、細胞毒性を示さない濃度で分子シャペロンを誘導する漢方薬を選択した。四次スクリーニングではその漢方薬をマウス脳内に注入し、分子シャペロンを誘導するかを検討した。以上のスクリーニングの結果、3種の生薬を選択した。そしてこの3種に対して、他の臓器の状態を精査し、副作用が表れていないかを調べた。現在、結果を総合的に判断し、アルツハイマー病治療薬としての有望な分子シャペロン誘導剤を決定している。

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 6 件)

- ① Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP₄ receptor. *J. Neurochem.* in press. 査読有
- ② Takehara, M., Hoshino, T., Namba, T., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Acetaminophen-induced differentiation of human breast cancer stem cells and inhibition of tumor xenograft growth in mice *Biochem. Pharmacol.* 81, 1124-1135. (2011) 査読有
- ③ Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J. Neurosci.* 31, 5225-5234. (2011) 査読有
- ④ Namba, T., Hoshino, T., Suemasu, S., Takarada-Iemata, M., Hori, O., Nakagata, N., Yanaka, A. and Mizushima, T. Suppression of expression of endoplasmic reticulum chaperones by *Helicobacter pylori* and its role in exacerbation of NSAID-induced gastric lesions. *J. Biol. Chem.* 285, 37302-37313. (2010) 査読有
- ⑤ Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Mineda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Suppression of melanin production by expression of HSP70. *J. Biol. Chem.* 285, 13254-13263. (2010) 査読有
- ⑥ Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y.,

Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848-5858. (2010) 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 竜也 (HOSHINO TATUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：70457589