

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590397

研究課題名(和文)アルツハイマー病におけるトリプトファン代謝異常のアミロイド代謝に及ぼす影響

研究課題名(英文)The mechanisms of quinolinic acid-induced infiltration of reactive astrocytes and the amyloid beta peptide production in the activated glial cells

研究代表者

滝川 修 (Takikawa, Osamu)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・治療薬探索研究部・室長

研究者番号：70163342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は加齢に伴い急増する神経変性疾患であり、その予防法・治療法の開発は喫緊の社会的課題となっている。ADは脳内にアミロイドペプチド(A $\beta$ )の蓄積を生じるがその分子メカニズムは不明である。本研究ではAD脳で増加する神経毒キノリン酸(QA)に注目し、QAによる反応性アストロサイト誘導因子の同定及び反応性アストロサイトによるA $\beta$ 産生機構の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is an increasing neurodegenerative disease and prevention and treatment of AD is an urgent social issue. Amyloid  $\beta$  peptide (A $\beta$ ) deposition is a well-known pathological feature in AD brains. A neurotoxin quinolinic acid (QA) has recently been to be involved in the AD pathology. In this study, the putative mediators responsible for QA-induced infiltration of reactive astrocytes in the AD brains have been tried to be identified and the molecular mechanism of the high A $\beta$  production in reactive astrocytes was clarified.

研究分野：医歯薬学

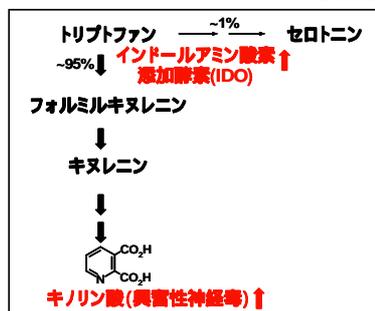
キーワード：アルツハイマー病 トリプトファン代謝 アミロイド ペプチド キノリン酸 神経毒 ID0

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) をめぐる研究は内外で精力的に進められているが、依然として、発症機構の全貌は不明であり、神経細胞死を抑制する薬剤は未だ開発されていない。AD は病理学的には均一な所見を示し、神経毒アミロイド ペプチド (A $\beta$ ) が凝集した老人斑の蓄積 (アミロイド代謝異常) に加え、微小管関連蛋白の一つであるタウ蛋白が異常重合した神経原線維変化の形成 (タウ蛋白代謝異常)、さらに領域特性のある神経細胞の脱落を特徴とする。様々の事実から、アミロイド代謝異常がタウ蛋白代謝異常を促進していると考えられている。一方、中枢性の「炎症」が神経変性・脱落に関与していることが示唆されており、老人斑に集積したグリア細胞が産生する炎症性サイトカインや活性酸素等による神経変性作用が「炎症」の本体ではないかと考えられている。しかし、この「炎症」の全体像は十分に解明されておらず、AD 研究の重要課題の一つとなっている。

我々は、種々の炎症性疾患で強く誘導される Trp 代謝酵素 (IDO) (Biochem Biophys Res Commun. 338:12-19, 2005) とその代謝産物で興奮性神経毒であるキノリン酸 (QA) (図 1) に注目し、ヒト AD 剖検脳を精査した結果、特に海馬の老人斑に集積した活性化ミクログリアで異常な IDO 発現と QA 産生を発見した (Neuropathol Appl Neurobiol. 31:395-404, 2005)。同様の Trp 代謝異常は他の研究者からも報告されている (Redox Rep. 15:161-168, 2010)。その後、AD モデルマウスと培養ミクログリアを使用した解析から、老人斑の主成分である A $\beta$  42 と炎症性サイトカイン IFN- $\gamma$  の両者による相乗的な刺激で誘導される活性化ミクログリアで Trp 代謝異常が惹起されることを示した (J Neurochem, 110:791-800, 2009) さらに本代謝異常で増加する神経毒 QA のアミロイド代謝に与える影響をマウス海馬内投与により調べた結果、神経細胞死に伴い A $\beta$  レベルの著明な増加を発見した。そしてこの A $\beta$  増加を起こす細胞

図1.トリプトファンのキヌレニン代謝経路



はアミロイド前駆体蛋白 (APP) を強発現した反応性アストロサイトによることを免疫組織化学的・生化学的に解明した。実際、マウス脳から調製した静止型アストロサイトを LPS 刺激により反応性アストロサイトに転

換することで、著明な A $\beta$  産生を確認した。しかもその A $\beta$  産生は、反応性アストロサイトの特徴である NO (一酸化窒素) 産生で比較した場合、低濃度の LPS 刺激で惹起されることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、QA で惹起されるアミロイド代謝異常に関して次の2点を明らかにする。

- (1) QA 脳内投与による反応性アストロサイトの誘導機構の解明: 本誘導に関与する炎症性サイトカイン等のメディエーターを同定する。
- (2) 反応性アストロサイトの A $\beta$  産生増加機構の解明: A $\beta$  産生増加をもたらす分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

- (1) QA 海馬内投与による反応性アストロサイトの誘導機構の解明

我々は免疫組織学的解析及び生化学的解析により神経毒 QA のマウス海馬内投与により、神経細胞の傷害が引き金となって、まず活性化ミクログリア (Iba1 陽性細胞) が約 1 週間後に動員され、それに引き続きアミロイド前駆体蛋白 (APP) を発現した反応性アストロサイト (GFAP 陽性細胞) が誘導されることを明らかにしている。活性化ミクログリアは TNF- $\alpha$  や IL-6 等の炎症性サイトカインを含む炎症性メディエーターを産生する。また、ある種の炎症性サイトカインは静止型アストロサイトを刺激し反応性アストロサイトに変換することが知られている。従って、QA 投与で動員される活性化ミクログリアがこれらのメディエーターを産生して反応性アストロサイトを誘導していると予想される。その因子を以下の手順で同定する。

QA の海馬内投与後、継時的に海馬組織を採取し抗体アレイ法 (40 種類の炎症関連サイトカインの測定可能な Inflammation antibody array) により増加する炎症性メディエーターを同定する。

で同定したメディエーターをマウス海馬から調整した静止型アストロサイトに添加し反応性アストロサイトへの転換を in vitro で検証し、さらに海馬内に直接投与し反応性アストロサイトの誘導を in vivo で検証する。

- (2) 反応性アストロサイトの A $\beta$  産生機構の解明

我々は静止型アストロサイトが A $\beta$  産生に関して不活性であるが、反応性アストロサイトに変換することで A $\beta$  を顕著に産生するように変化することを発見した。このアミロイド産生能獲得の分子機構を解明するために、

静止型から反応性への転換に伴う A の産生と分解に關与する酵素群及びアミロイド前駆体蛋白 (APP) の発現レベルの変動を生化学的に解析する。ここでは反応性に変換する刺激剤として汎用される LPS を使用するが、上記の研究により、脳内における反応性アストロサイト誘導因子を同定できた場合、その内因性因子を使用した解析も行う。以下がその解析手順である。

マウス胎児脳から常法に従い高純度のアストロサイトを得る。

細胞分裂をしない静止型アストロサイトにするために低濃度 FCS 培地で一晚培養する。

LPS あるいは反応性アストロサイト誘導因子添加後、継時的に次の項目を測定する。

a) A<sub>40</sub> 及び A<sub>42</sub> 産生量 (ELISA 法による)  
b) アミロイド前駆体蛋白 (APP) 量 (Western blot による)

c) A 生合成に關与する酵素 ( 、 、 及びセクレターゼ活性の測定)

d) A の分解酵素 (インシュリン分解酵素活性及びネプリライシン活性の測定)

の各項目の測定により、A 産生増加がその生合性の亢進に起因するものか、それとも分解酵素活性の低下によって生じているかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) QA 海馬内投与による反応性アストロサイトの誘導機構の解明

QA をマウス海馬内投与後、継時的に海馬組織を採取し抗体アレイ法 (Bio-Plex アッセイ) で増減する炎症性サイトカインの同定を試みたが、検出限界以下で同定に至らなかった。1 回の分析に供する海馬組織量を 1 匹から 10 匹に増加して検討することとし、QA の脳内投与を継続し、サンプルを凍結保存した。平成 27 年度に測定を予定している。

(2) 反応性アストロサイトの A 産生機構の解明

マウス胎児脳から純化したアストロサイトに起炎剤である LPS を添加して活性化し反応性アストロサイトへの変換に伴う、アミロイド前駆体蛋白 (APP)、A 切り出し酵素 ( 、 、 及びセクレターゼ)、A 分解酵素 (インシュリン分解酵素及びネプリライシン) の変動解析を行った。その結果、反応性アストロサイトによる A 産生増加は、APP 及びセクレターゼの発現増加とネプリライシンの減少によって生じることを解明した。

#### 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) Tanizaki Y, Kobayashi A, Toujima S, Shiro M, Mizoguchi M, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Takikawa O, Ino K. Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer via inducing immunosuppressive environment. *Cancer Sci.* 105:966-973, 2014. doi: 10.1111/cas.12445. 査読有
- 2) Tajima Y, Ishikawa M, Maekawa K, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Ikeda K, Arita M, Taguchi R, Okuno A, Mikawa R, Niida S, Takikawa O, Saito Y. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis.* 12:68-81, 2013. doi: 10.1186/1476-511X-12-68. 査読有
- 3) Sato N, Saga Y, Mizukami H, Wang D, Takahashi S, Nonaka H, Fujiwara H, Takei Y, Machida S, Takikawa O, Ozawa K, Suzuki M. Downregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase in cervical cancer cells suppresses tumor growth by promoting natural killer cell accumulation. *Oncol Rep.* 28:1574-1578, 2012. Doi: 10.3892/or.2012.1984. 査読有
- 4) Tanaka M, Li X, Hikawa H, Suzuki T, Tsutsumi K, Sato M, Takikawa O, Suzuki H, Yokoyama Y. Synthesis and biological evaluation of novel tryptoline derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 21:1159-1165, 2013. doi: 10.1016/j.bmc.2012.12.028. 査読有
- 5) Fukuhara K, Ohno A, Ota Y, Senoo Y, Maekawa K, Okuda H, Kurihara M, Okuno A, Niida S, Saito Y, Takikawa O. NMR-based Metabolomics of Urine in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: Identification of Oxidative Stress Biomarkers. *J Clin Biochem Nutr.* 52:133-138, 2013. doi: 10.3164/jcfn.12-118. 査読有
- 6) Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T. Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol.* 48:660-670. 2013. doi:10.1007/s00535-012-0667-z. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- 1) Kayano M, Hirayama A, Washimi Y, Bundo M, Sakurai T, Tokuda H, Soga T, Niida S,

- Takikawa O.  
Blood biomarkers for Alzheimer ' s disease revealed by capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS)-based metabolomics.  
Tenth Annual International Conference of the Metabolomics Society, June 25, 2014, Tsuruoka, Japan.
- 2) Mikawa R, Okuno A, Takayanagi A, Okada K, Yoshimi T, Takikawa O.  
Characterization of Amyloid- Degrading Activity in Human Serum.  
日本基礎老化学会第 37 回大会、平成 26 年 6 月 26 日、東浦
- 3) Antonio Coluccia, Giuseppe La Regina, Okuno A, Takikawa O, Romano Silvestri.  
New modulator of the tumoural immuno escape via Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO) inhibition.  
XXV CONGRESSO NAZIONALE DELLA SCI " SCI2014 " , September 7, Rend CS, Italy.
- 4) 滝川修、吉見立也(フォーラムオーガナイザー): イメージング質量分析の最前線: 創薬と生命科学への応用. 第 87 回生化学会大会フォーラム 4F04、2014 年 10 月 18 日、京都
- 5) 三河隆太、奥野海良人、高柳亜紀子、吉見立也、滝川修、ヒト血清中のアミロイド 分解活性の同定、第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 18 日、京都
- 6) Okuno A, Yoshimi T, Okumura K, Sawada K, Takikawa O. Development of High-speed and Super Sensitive Device for Detection of Amyloid- Peptide Using an Ion Image Sensor. IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science(MHS) 2014, November 10-12, 2014, Nagoya.
- 7) 滝川修 トリプトファン代謝酵素 IDO・TDO と免疫抑制 第 34 回癌免疫外科研究会、平成 25 年 5 月 15 日、岡山
- 8) 滝川修 トリプトファン代謝異常と疾患: アルツハイマー病とがん免疫抑制作用 第 52 回日本栄養・食糧学会近畿支部大会、2013 年 10 月 26 日、彦根
- 9) 滝川修 トリプトファン代謝異常の病態生理学的意義: アルツハイマー病とがんを中心に 第 17 回「アミノ酸セミナー: 基礎と臨床を結ぶ会」、2013 年 12 月 13 日、東京
- 10) 三河隆太、吉見立也、奥野海良人、岡田健、高柳亜紀子、滝川修 血管内皮細胞における A 産生機構と脳アミロイド血管症 第 36 回日本基礎老化学会、2013 年 6 月 4 日、大阪
- 11) 滝川修 反応性アストロサイトによる A 産生: アルツハイマー病のアミロイド代謝異常に関する新知見 Neuro2013、2013 年 6 月 22 日、京都
- 12) 三河隆太、奥野海良人、岡田健、高柳亜紀子、吉見立也、滝川修 脳血管細胞による A 産生と脳アミロイド血管症 第 35 回神経組織培養研究会、2013 年 6 月 30 日、大阪
- 13) Tajima Y, Maekawa Keiko, Ishikawa M, Murayama M, Senoo Y, Nishimaki-Mogami T, Nakanishi H, Kazutaka I, Arita M, Taguchi R, Okuno A, Mikawa R, Niida S, Takikawa O, Saito Y. Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer ' s disease. The 9th Annual Conference of the Metabolomics Society, July 4, 2013, Glasgow.
- 14) Takikawa O, Mikawa R, Okuno A, Yoshimi T, Okada K, Takayanagi A. Implications of brain microvessel endothelial cell-derived amyloid peptide in cerebral amyloid angiopathy associated with Alzheimer ' s disease. Alzheimer ' s disease Association International Conference (AAIC) 2013, July 14, 2013, Boston.
- 15) 三河隆太、吉見立也、奥野海良人、岡田健、高柳亜紀子、滝川修 血管内皮細胞による A 産生調節機構: 脳アミロイド血管症におけるその病態生理学的意義 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜
- 16) 岡田健、三河隆太、奥野海良人、高柳亜紀子、山岸まゆみ、吉見立也、滝川修 Kinetic and protein-ligand interaction studies of human tryptophan 2,3-dioxygenase, identified the modulation of enzymatic reactions by tryptophan. 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、横浜
- 17) 岡田健、三河隆太、奥野海良人、吉見立也、滝川修 ヒト Tryptophan 2,3-dioxygenase のアロステリック効果による酵素反応調節機構 第 35 回日本トリプトファン研究会、2013 年 9 月 29 日、京都
- 18) 大森啓充、滝川修、眞山義民、奥野海良人、山崎雅美、福場浩正、村田芳夫、松本信夫、品川友江、宮地隆史、住元了、鈴木修一、宮野前健、児玉浩子 経管栄養施行中の重症心身障害児(者)の栄養障害と免疫機能 - インドールアミン酸素添加酵素(IDO)との関連について- 第 35 回日本臨床栄養学会、2013 年 10 月 4-6 日、京都
- 19) 滝川修、新飯田俊平、平山明由、曾我朋義 メタボロミクスによるアルツハイマー病早期診断マーカーの探索 第 8 回メタボロームシンポジウム、2013 年 10 月 4 日、福岡
- 20) 福田美和、脇稔、浅井章良、滝川修、宮地弘幸、松野研司 Benzimidazole 構造を有する新規 indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)阻害剤の合成と活性評価 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2013 年 11 月 20 日、広島

- 21) 三河隆太、吉見立也、奥野海良人、岡田健、高柳亜紀子、滝川修 Characterization of Amyloid- Degrading Activity in Human Serum. 第6回NAGOYAグローバルリトリート、平成26年2月14日、東浦
- 22) 福田美和、脇稔、浅井章良、滝川修、宮地弘、松野研司 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 阻害活性を有する benzimidazole 系化合物の創製 日本薬学会第134年会、平成26年3月28日、熊本

〔図書〕(計1件)

1) 滝川修

トリプトファン代謝異常の病態生理学的意義：がんとアルツハイマー病を中心として、アミノ酸研究、8(1),25-34,2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 修 (TAKIKAWA, Osamu)

独立行政法人国立長寿医療研究センター  
長寿医療研究センター・治療薬探索研究部・室長

研究者番号：70163342

(2) 研究分担者

奥野 海良人 (OKUNO, Alato)

独立行政法人国立長寿医療研究センター  
長寿医療研究センター・ラジオアイソトープ管理室 特任研究員

研究者番号：50623980