

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591249

研究課題名(和文)アルツハイマー病の分子病態とミトコンドリア障害

研究課題名(英文)Pathophysiology of Alzheimer's disease and mitochondrial dysfunction

研究代表者

玉岡 晃(Tamaoka, Akira)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50192183

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)：アミロイド前駆体蛋白(APP)を過剰発現する細胞を用いて、APP、BACE1、 $\gamma$ -secretase複合体の発現量を評価した。Swedish変異型のAPPを過剰発現するヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)細胞を、細胞下分画法によりCrude mitochondria(CM)画分・Microsome(MS)画分に分離した。CM画分内のlysosomeをさらに分離するため、iodixanol密度勾配遠心分離を追加した。

精製ミトコンドリア画分内にはBACE1および $\gamma$ -secretase複合体が少ないことより、ミトコンドリア内でAPPからA $\beta$ が産生されている可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction is implicated in the neurodegeneration in Alzheimer's disease. Accumulation of amyloid protein (A $\beta$ ) in mitochondria is suggested to be responsible for mitochondrial dysfunction. Then, we investigated processing of amyloid precursor protein (APP) in mitochondria in vitro studies.

Microsome and crude mitochondria fractions were obtained from human neuroblastoma SH-SY5Y cells overexpressing Swedish mutant APP by homogenization and centrifugation. By Western blot analysis, components of  $\gamma$ -secretase complex were similarly recovered in microsome and crude mitochondria fractions, and BACE1 was enriched in microsome fraction. After iodixanol gradient fractionation,  $\gamma$ -secretase complex components were recovered mainly in lysosome-enriched fractions. Taking these findings into consideration, it is unlikely that A $\beta$  is generated from APP locally in mitochondria.

研究分野：神経内科学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 蛋白 ミトコンドリア 酸化ストレス BACE1  $\gamma$ -secretase アミロイド前駆体蛋白(APP)

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の病態にミトコンドリアの機能異常が関与していることが示唆されている。また、AD 病患者脳および AD モデルマウスの脳において、アミロイド 蛋白 (A $\beta$ ) がミトコンドリア内に蓄積していることが報告されており、ミトコンドリア内に蓄積した A $\beta$  が、ミトコンドリアの機能不全を引き起こす可能性が考えられている。しかし、ミトコンドリアへの A $\beta$  蓄積のメカニズムについては不明な点が多く、ミトコンドリア内での A $\beta$  産生の関与についても明らかではない。

## 2. 研究の目的

AD の病態にミトコンドリアの機能異常が関与していることが示唆されている。その機序として、A $\beta$  がミトコンドリア内に蓄積し、ミトコンドリア外膜における蛋白輸送の阻害、TCA cycle にかかわる酵素の減少、cytochrome oxidase の減少、呼吸鎖の阻害、ROS 産生などを介して、ミトコンドリア機能不全をきたし、ATP 産生が低下し、シナプス障害を来すと考えられている。しかし、ミトコンドリアへの A $\beta$  蓄積のメカニズムについては不明な点が多く、ミトコンドリア内での A $\beta$  産生の関与についても明らかではない。今回我々は、アミロイド前駆体蛋白 (APP) を過剰発現する細胞を用いて、ミトコンドリアおよびマイクロゾームにおける APP、BACE1、ADAM10、 $\gamma$ -secretase 複合体構成蛋白の発現量を評価し、ミトコンドリア内における APP 代謝について検討した。

## 3. 研究の方法

Swedish 変異型の APP を過剰発現するヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞を材料として用いた。細胞を、遠心分離を用いた細胞下分画法により粗ミトコンドリア画分・マイクロゾーム画分に分離した。さらに粗ミトコン

ドリア画分からライソゾームを分離するため、

Iodixanol 密度勾配遠心を用いた分離法を追加した。得られた画分に対して分離を確認した後、BACE1、 $\gamma$ -secretase 複合体因子、APP、ADAM10 などの発現をウェスタンブロットティングで解析し、比較した。

(倫理面への配慮) 特に問題なし。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

ミトコンドリア画分の分離は TOMM20, TOMM40, Cytochrome C を用いて確認した。マイクロゾーム画分は 1 Adaptin、Calnexin、Cathepsin D などで評価したが、Cathepsin D はミトコンドリア画分内にもマイクロゾーム画分と同程度に存在しており、ライソゾームが一部ミトコンドリア画分に含まれている可能性が示唆された。

粗ミトコンドリア・マイクロゾーム画分の検討では APP はミトコンドリア・マイクロゾーム画分に同程度分布していた。BACE1 はマイクロゾーム画分優位、Presenilin1、Nicastrin、APH-1aL は粗ミトコンドリア画分優位に分布していた。

粗ミトコンドリア画分にライソゾームが混入している可能性が示唆されたため、ライソゾームを除去するためさらに Iodixanol density gradient を用いた分離法を追加した。得られた画分について Cathepsin D, Tomm40 で分離を確認し、ミトコンドリアを多く含む画分とライソゾームを多く含む画分について検討を行った。

その結果、 $\gamma$ -secretase 複合体構成蛋白は精製ミトコンドリアよりもライソゾームを多く含む画分に多く回収された。精製ミトコンドリアには ADAM10 と未熟型 APP はあるが、成熟型 APP、BACE1、 $\gamma$ -secretase 複合体は乏しかった。

## (2) 考察

精製ミトコンドリア画分について検討したところ、ミトコンドリア内には未熟型 APP、ADAM10 は存在するものの、成熟型 APP、 $\gamma$ -secretase 複合体構成蛋白、BACE1 は乏しかった。以上の結果から、ミトコンドリア内において APP の代謝、A $\beta$  産生が行われている可能性は低いと考えられた。

## (3) 結論

精製ミトコンドリア画分内には BACE1 および  $\gamma$ -secretase 複合体は少なく、ミトコンドリア内での A $\beta$  産生はあったとしても他の細胞内小器官と比較し非常に少ないと考えられる。

## 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 12 件)

Hatsuta H, Takao M, Ishii K, Ishiwata K, Saito Y, Kanemaru K, Arai T, Suhara T, Shimada H, Shinotoh H, Tamaoka A, Murayama S. Amyloid  $\beta$  Accumulation Assessed with <sup>11</sup>C-Pittsburgh Compound B PET and Postmortem Neuropathology. *Curr Alzheimer Res*. 2015 Mar 2. [Epub ahead of print] 査読有

Shioya A, Saito Y, Arima K, Kakuta Y, Yuzuriha T, Tanaka N, Murayama S, Tamaoka A. Neurodegenerative changes in patients with clinical history of bipolar disorders. *Neuropathology*. 2015 Mar 30. doi: 10.1111/neup.12191. [Epub ahead of print] 査読有

Araki W, Tamaoka A. Amyloid beta-protein and lipid rafts: focused on biogenesis and catabolism. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:314-24. 査読有

Satoh J, Motohashi N, Kino Y, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 May 1;9:68. doi: 10.1186/1750-1172-9-68. 査読有

Araki W, Minegishi S, Motoki K, Kume H, Hohjoh H, Araki YM, Tamaoka A. Disease-Associated Mutations of TDP-43 Promote Turnover of the Protein Through the Proteasomal Pathway. *Mol Neurobiol*. 2014 Jan 30. [Epub ahead of print] 査読有

Hoshino S, Sakamoto K, Vassilopoulos S, Camus SM, Griffin CA, Esk C, Torres JA, Ohkoshi N, Ishii A, Tamaoka A, Funke BH, Kucherlapati R, Margeta M, Rando TA, Brodsky FM: The CHC22 clathrin-GLUT4 transport pathway contributes to skeletal muscle regeneration. *PLoS One*. 2013 Oct 30;8(10):e77787. doi:10.1371/journal.pone.0077787. eCollection 2013. 査読有

Iwata A, Nagata K, Hatsuta H, Takuma H, Bundo M, Iwamoto K, Tamaoka A, Murayama S, Saido T, Tsuji S. Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet*. 2013 Oct 6. [Epub ahead of print] 2014 Feb 1;23(3):648-56. doi:10.1093/hmg/ddt451. Epub 2013 Sep 18.

査読有

Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Keino-Masu K, Ishii K, Kwak S, Masu M, Tamaoka A. A unique mouse model for investigating the properties of amyotrophic lateral sclerosis-associated protein TDP-43, by in utero electroporation. *Neurosci Res*. 2013; 77(4): 234-241. 2013 Sep 27. doi:pil: S0168-0102(13)00206-X.

10.1016/j.neures.2013.09.009.[Epub ahead of print] 査読有

Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci*. 2014; 124(5): 344-349. 査読有

Hosaka A, Araki W, Oda A, Tomidokoro Y, Tamaoka A: Statins reduce amyloid  $\beta$ -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochem Res*, 38: 589-600, 2013. doi:10.1007/s11064-012-0956-1. 査読有

Araki W, Oda A, Motoki K, Hattori K, Itoh M, Yuasa S, Konishi Y, Shin RW, Tamaoka A, Ogino K. Reduction of  $\beta$ -amyloid accumulation by reticulon 3 in transgenic mice. *Curr Alzheimer Res*. 2013 Feb;10(2):135-42. 査読有

Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain*. 2012 Nov;135(Pt 11):3380-91. doi: 10.1093/brain/aws230. Epub 2012 Oct 3 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

中馬越 清隆、角野 虎太郎、小金澤 禎史、藤宮 克、藤塚 捺、清水 彩音、森山 哲也、玉岡 晃：アルツハイマー病の経過における前庭機能異常、第 56 回日本神経学会

学術大会(新潟)、5月23日、2015。

Yasushi Tomidokoro、Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka: Toxic abeta conformer in brains and CSF obtained from non-demented individuals, 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 20, 2015, Niigata, Japan

Araki Wataru, Naomi Mamada, Ai Hosaka, Daisuke Tanokashira, Fuyuki Kametani, Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka: The molecular mechanism by which Abeta oligomers induce BACE1 upregulation. 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 21, 2015, Niigata, Japan

Naomi Mamada, Wataru Araki, Daisuke Tanokashira, Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka: Analysis of amyloid precursor protein processing in mitochondria. 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 21, 2015, Niigata, Japan

Ayako Shioya, Madoka Mori-yoshimura, Yasushi Oya, Miho Murata, Masato Hasegawa, Akira Tamaoka, Yuko Saito: Tau pathology in the brains in cases of myotonic dystrophy. 56th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 21, 2015, Niigata, Japan

中馬越 清隆、藤宮 克、小金澤 禎史、藤塚 捺、清水 彩音、上野 友之、門前達哉、玉岡 晃；アルツハイマー病におけるバランス機能の検討について。第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5月21日、2014。

山口 哲人、保坂 愛、柴垣 泰郎、玉岡 晃；認知症高齢者における六君子湯の食欲改善効果の検討。第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5月22日、2014。

相澤 哲史、寺田 真、保坂 孝史、儘田 直美、山口 哲人、山本 詞子、石井 亜紀子、石井 一弘、詫間 浩、富所 康志、中馬越 清

隆、渡邊 雅彦、玉岡 晃；筋萎縮性側索硬化症における Frontal Assesment Battery のスコアと関連する因子の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 21 日、2014.

儘田 直美、荒木 亘、大木 香織、石井 一弘、玉岡 晃；培養細胞を用いたミトコンドリア内 A 産生系に関する検討. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 23 日、2014 .

富所 康志、石井 一弘、玉岡 晃； 毒性 A コンフォーマーのヒト脳ならびに脳脊髄液における生化学的同定の試み. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 23 日、2014 .

詫間 浩、赤松 恵、山下 雄也、Oehring Hartmut、岡田 拓也、榎 和子、石井 一弘、Jirikowski Gustav、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃；子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 23 日、2014 .

荒木 亘、本木 和美、田之頭 大輔、儘田 直美、玉岡 晃、Medpalli Lakshmana ; B A C E 1 の発現と脂質ラフト局在に関する L R P 1 の影響. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 24 日、2014 .

塩谷 彩子、齋藤 祐子、大槻 泰介、佐々木 征行、佐藤 典子、柿田 明美、玉岡 晃； 内側側頭葉てんかんにおける臨床病理学的研究. 第 55 回日本神経学会学術大会(福岡)、5 月 24 日、2014 .

M. Akamatsu, H. Takuma, T. Yamashita, T Okada, K. Ishii, K. KEINO-MASU, S. Kwak, M. Masu, A. Tamaoka. TDP-43 aggregation produced by In utero electroporation and its properties in the mouse motor neurons. M. Society for Neuroscience 43th Annual Meeting (Nov 11, 2013; 435.03 poster; San Diego Convention Center)

Nakamagoe K, Fujimiya M, Koganemaru T, Shimizu K, Fujizuka N, Tamaoka A:

Study of vestibular dysfunction in frontotemporal lobar degeneration. J Neurol Sci 333(2013):e292-e357. WCN 2013 (Wien).

赤松 恵、詫間 浩、山下 雄也、岡田 拓也、石井 一弘、榎 和子、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃.筋萎縮性側索硬化症関連タンパク質：TDP-43 封入体の形成—マウス胎仔電気穿孔法による大脳皮質運動野への疾患関連遺伝子の導入.第 36 回日本神経科学大会（京都）、6 月 20 日、2013 .

塩谷彩子、有馬邦正、杠 岳文、村山繁雄、玉岡 晃、齊藤祐子：双極性感情障害が神経変性疾患に先行する一群の存在について . 第 54 回日本神経学会学術大会（東京）、5 月 29 日、2013 .

詫間 浩、赤松 恵、山下雄也、岡田拓也、石井一弘、榎 和子、郭 伸、榎 正幸、玉岡 晃：マウス胎仔電気穿孔法による in vivo TDP-43 遺伝子導入と封入体形成の検討 . 第 54 回日本神経学会学術大会（東京）、5 月 30 日、2013 .

富所康志、石井一弘、玉岡 晃：Alzheimer 病患者脳における毒性 コンフォーマーの同定 第 54 回日本神経学会学術大会(東京)、5 月 31 日、2013 .

保坂 愛、嶺岸正治、玉岡 晃、荒木 亘：アミロイド 蛋白による BACE1 の発現亢進 . 第 54 回日本神経学会学術大会（東京）、5 月 31 日、2013 .

〔図書〕(計 5 件)

玉岡 晃：Alzheimer 病 . イヤーノート TOPICS 2014-2015 内科・外科疾患 第 4 版、岡庭 豊、荒瀬康司、三角和雄編集、MEDIC MEDIA (東京) 2014、pp312-315 .

玉岡 晃：認知症治療薬 . Pocket Drugs 2015 . 福井次夫監修、小川康宏、渡邊裕司、編集、医学書院 (東京) 2015、pp 9 9-1 0 1 .

玉岡 晃：前頭側頭型認知症、神経内科研究ノート、永井良三総監修、診断と治療社（東京）2014、pp268-272

玉岡 晃：新しいアルツハイマー病の診断基準．Annual Review2013 神経、鈴木則宏、祖父江 元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆編、中外医学社（東京）、2013、pp81-91.

玉岡 晃：アルツハイマー病．神経・精神疾患診療マニュアル（日本医師会雑誌 142（特別号（2）））、北川泰久、寺本明、三村将監修、飯森眞喜雄、内山真一郎、片山容一、岸本今年史、水澤英洋 編集、日本医師会（東京）2013、pp192-194．

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

玉岡 晃（Tamaoka Akira）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50192183

### (2)研究分担者

詫間 浩（Takuma Hiroshi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：00326258

富所康志（Tomidokoro Yasushi）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：80447250

### (3)連携研究者

（ ）

研究者番号：