

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700366

研究課題名(和文)新規シェディング調節因子によるアミロイド産生調節機構の解明

研究課題名(英文) Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing alpha-secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model.

研究代表者

大野 美紀子 (Ohno, Mikiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10583198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の原因として、アミロイド前駆蛋白(APP)の / 位における切断により産生されたA が神経細胞内に凝集・沈着した結果、神経細胞死を引き起こすアミロイド仮説が広く支持されている。 / 位の間に位置する 位での切断はA 産生を抑制するため 位切断の活性化が治療の標的として注目されている。

我々は、HB-EGFの結合蛋白質として同定したメタロプロテアーゼnardilysin (NRDc)が、ADAM10と複合体を形成し、APPの 切断を増強させた結果、アルツハイマー病モデルマウスの脳内におけるA の蓄積を抑制することを明らかにした。成果をNeurobiol. Aging誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：Amyloid beta peptide, the main component of senile plaques in patients with Alzheimer's disease (AD), is derived from proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) by beta- and gamma-secretases. Alpha-cleavage of APP has a potential to preclude the generation of A-beta because it occurs within the A-beta domain. We reported that a metalloendopeptidase, nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDc) enhances alpha-cleavage of APP, which results in the decreased generation of A-beta in vitro. To clarify the in vivo role of NRDc in AD, we intercrossed transgenic mice expressing NRDc in the forebrain with an AD mouse model. Here we demonstrate that the neuron-specific overexpression of NRDc prevents A-beta deposition in the AD mouse model. The activity of alpha-secretase in the mouse brain was enhanced by the overexpression of NRDc, and was reduced by the deletion of NRDc. Our results indicate that NRDc controls A-beta formation through the regulation of alpha-secretase.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド シェディング

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は難治性の認知症であり、わが国でも患者数が増加し社会問題となっている。本邦でも数種類の認知症治療薬が使用可能となったものの、依然疾患の発生機序については未知の部分が多く、さらなる病因究明と治療法開発が切望される。アルツハイマー病の発症機序には諸説あるが、アミロイド前駆蛋白(APP)の 位と 位における切断によって産生されたアミロイド (A)が神経細胞内に凝集・沈着することで、神経細胞死を引き起こすというアミロイド仮説が広く支持されている。また、 位と 位の間に位置する 位での切断は A 産生を抑制するため、治療薬のターゲットとしては、 位切断の抑制、 位切断の活性化が挙げられる。

我々は膜型増殖因子 HB-EGF の結合蛋白質として同定したメタロプロテアーゼ nardilysin (NRDc)が、ADAM プロテアーゼの活性化を介して HB-EGF のシェディングを増強すること、NRDc のシェディング増強効果は HB-EGF に限定されず、APP を含む広範な膜蛋白質に及ぶことを明らかにしてきた (Nishi 他 EMBO.J,2001, Nishi 他 JBC,2006, Hiraoka 他 J.Neurochem,2007, Hiraoka 他 BBRC,2008)。NRDc の生体内における生理的役割を検討するため、NRDc 欠損マウス (NRDc^{-/-})の作製及び解析を行った。NRDc^{-/-}は、異常反射の残存や、協調運動障害、作業記憶障害などの行動異常を呈し、組織上著明な大脳皮質の菲薄化と側脳室の拡大を認めた。さらに詳細な検討の結果、これらの中樞神経系表現型は神経細胞死によるものではなく、軸索、髄鞘の低形成が原因であることが明らかになった。また、前脳の神経細胞特異的な (CAMKII プロモーター)NRDc 過剰発現マウス (NRDc-Tg)を作製し解析したところ、NRDc-Tg では前脳における脳梁の髄鞘過形成を呈したことから、NRDc は発現量依存的に髄鞘形成を制御していることが判明した。

NRDc における髄鞘形成制御機構を考える上で、アルツハイマー病の原因である A 産生に関わる セクレターゼ (BACE1)の欠損マウスが、NRDc^{-/-}と酷似した髄鞘低形成の表現型を呈することに注目し、細胞実験系で NRDc と BACE1 の機能的関連を検討した。その結果 NRDc は BACE1 と複合体を形成し、髄鞘形成の主要制御因子ニューレギュリン 1 (NRG1)のシェディング増強に関与していることが明らかになった。NRG1 は ADAM17 (セクレターゼ)と BACE1 の両方に切断されることが報告されていたが、NRDc は両切断酵素と各々複合体を形成し、NRG1 のシェディング増強に関与していることが明らかとなった。(Ohno 他 Nat. Neurosci.2009)。以上の結果は、NRDc が既に報告した セクレターゼ (Hiraoka 他 J.Neurochem,2007)のみならず、セクレタ

ーゼ活性の制御にも関わっていることを示唆しており、NRDc のアルツハイマー病病態生理への関与が推測された。

2. 研究の目的

本研究では、

1)アルツハイマー病における NRDc の病態生理学的意義の解明、2) NRDc による ADAM・BACE1 活性制御の分子機構解明、3) NRDc の神経疾患バイオマーカーとしての可能性の検討、を目的とした。

1)では、疾患モデルマウスを用いて、NRDc の過剰発現が病態に及ぼす影響を明らかにした。2)では、組み替え蛋白レベルおよび細胞レベルにおける NRDc と ADAM10/17 及び BACE1 の機能的関連を明らかにし、さらに NRDc の BACE1 翻訳後修飾、細胞内分布における役割を検討した。3)では、アルツハイマー病患者血清並びに髄液中の NRDc 濃度を、既に開発した好感度 ELISA システムを用いて測定し、病態との関連を検討する方針であった。

3. 研究の方法

1)アルツハイマー病における NRDc の病態生理学的意義の解明：前脳特異的 NRDc 過剰発現マウス (NRDc-Tg)とアルツハイマー病モデルマウス (APP-Tg)との交配。

APP/NRDc-Tg と APP-Tg マウスの脳切片における、A の沈着量の検討。ELISA による A₄₂ の定量。同マウスの脳切片における抗 A 抗体、抗 NRDc 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 F4/80 抗体を用いた免疫染色法。

位切断を受けた APP(sAPP)や 位切断を受けた APP(sAPP)を特異的に認識する抗体を用いた、ウエスタンブロッティング。

2) NRDc による ADAM・BACE1 活性制御の分子機構解明：APP を発現させた HEK293 細胞に ADAM/BACE1、NRDc を過剰発現させて免疫沈降を行う。同細胞における内因性 NRDc をノックダウンし、培養上清に分泌される sAPP、sAPP に対するウエスタンブロッティングを行う。

3) NRDc の神経疾患バイオマーカーとしての可能性の検討：ヒト NRDc 測定用 ELISA 法の開発と臨床検体を用いた測定系の確立。

4. 研究成果

1)アルツハイマー病における NRDc の病態生理学的意義の解明：

前脳特異的 NRDc 過剰発現マウス (NRDc-Tg)とアルツハイマー病モデルマウス (APP-Tg)との交配を行い、得られた APP/NRDc-Tg と APP-Tg マウスの脳における、A の沈着量について検討した。

抗 A 抗体を用いて一年齢のマウス脳切片に対し免疫染色を行ったところ、APP/NRDc-Tg で A の著明な減少を認めた。

さらに、TBS-insoluble fraction における A₄₂ について ELISA を用いて定量したと

ころ、3ヶ月齢では、両群のA量に有意差を認めなかったが、一年齢のAPP/NRDc-Tg群におけるA₄₂量は有意に減少していた。

A周囲に集簇する炎症細胞について、F4/80やGFAPに対する抗体で検討したが、両群で差を認めなかった。また、位切断を受けたAPP(sAPP)や位切断を受けたAPP(sAPP)を特異的に認識する抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行ったところ、APP/NRDc-Tgの前脳由来脳タンパクではsAPPが増加し、sAPPには変化を認めなかった。さらに、NRDc^{-/-}の前脳由来タンパクでも同様に検討したところ、野生型と比較して、sAPPが減少し、sAPPには変化を認めなかった。よって、NRDcを過剰発現すると位切断が増強すること、NRDcをノックアウトすると位切断が減少すること、両者において位切断に変化を認めなかったことから、APPを基質とした際には、NRDcはセクレターゼよりも、セクレターゼ活性制御を行うことが示唆された。

2) NRDcによるADAM・BACE1活性制御の分子機構解明：APPを基質蛋白とした場合、NRDcはADAM(セクレターゼ)とBACE1(セクレターゼ)のどちらとより複合体を形成するのか、細胞実験系を用いて検討した。NRDcがADAM17とBACE1と各々複合体を形成することは免疫沈降にて確認済みであるが、APP切断に特に重要であると報告されているセクレターゼ(ADAM10)においても同様の系を用いてNRDcとの複合体形成の有無を確認した。APPを過剰発現させたHEK293細胞にADAM10、NRDcを過剰発現させ免疫沈降を行ったところ、両者は複合体を形成した。さらに、同細胞について内因性NRDcをノックダウンし、培養上清に分泌されるsAPP、sAPPについてウエスタンブロッティングにて検討したところ、NRDcをノックダウンした際には、培養上清中のsAPPは変化を認めず、sAPPが減少することが明らかとなった。さらにtotal cell lysate中の切断型APPについても同様の検討を行い、NRDcをノックダウンするとAPPの位切断が減少することが明らかとなった。

以上の結果から、NRDcはADAM10と複合体を形成し、APPの切断を増強させ、その結果A₄₂が減少することが示唆された。

3) NRDcの神経疾患バイオマーカーとしての可能性の検討：我々は、ヒトNRDcに対する複数のマウスモノクローナル抗体を作製し、ヒト血清NRDcを高感度で検出できるELISAの開発に成功している。健常人ボランティアにおける血清NRDc値の測定結果から、正常値を800pg/mlと設定し、当院循環器内科患者における血清NRDc値を測定したところ、急性冠症候群やたこつぼ型心筋症で、正常値と比較して有意な上昇を認めた。さらに、本研究課題であるアルツハイマー病患者においても、血清並びに髄液中のNRDc

濃度を測定し、病状・予後との相関を検討することにより、バイオマーカーとしての可能性を検討する予定であったが、研究機関中に解析に必要な検体数が集まらなかったため、十分な検討には至らず、今後の課題としたい。なお、以上の1)~2)の結果は、Neurobiol Aging 35(1):213-22, 2014.に投稿し受理・掲載された。

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3件)

1. Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. Nat Commun 5:3224, 2014.

2. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler S.F, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing β -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. Neurobiol Aging 35(1):213-22, 2014.

3. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, *Seno H, Nishi E and Chiba T. Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF- α . EMBO Mol Med 4(5):396-411, 2012.

【学会発表】(計6件)

1. Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Kita T, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome.

第18回日本循環器学会近畿地方会(2013年6月15日、京都)

*English session 最優秀賞受賞

2. 大野美紀子、平岡義範、松浦博、西清人、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、北徹、木村剛、西英一郎

「ナルディライジンによる心拍数制御機構」第18回日本病態プロテアーゼ学会(2013年8月16日、大阪)

*第18回学術集会奨励賞受賞

3. 大野美紀子

「ナルディライジンによる交感神経系分布及び循環動態制御機構」
第一回京都循環動態研究会 (2013年10月18日、京都)

4. 大野美紀子、平岡義範、松岡龍彦、西清人、西城さやか、坂本二郎、陳博敏、北徹、木村剛、西英一郎
「エネルギー代謝におけるナルディライジンの役割」
動脈硬化若手研究会 (2013年10月19日、東京)

5. Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing alpha-secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model
第36回日本分子生物学会年会 (2013年12月4日、神戸)

6. Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Kimura T, Nishi E.
Nardilysin regulates cardiovascular functions through modulating cardiac sympathetic innervation

【その他】

ホ - ム ペ - ジ :
<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/sentan-bunshi/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 美紀子 (Ohno Mikiko)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：10583198

(3)連携研究者

西 英一郎 (Nishi Eiichiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30362528