

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：33304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870906

研究課題名(和文) GM1ガングリオシド発現抑制能を有するアミロイド 蛋白重合体形成抑制物質の探索

研究課題名(英文) Investigation of inhibitory materials for Abeta amyloidgenesis including inhibitory function of GM1 ganglioside expression

研究代表者

山本 直樹 (Yamamoto, Naoki)

北陸大学・薬学部・講師

研究者番号：90393157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォル、チオペンタールおよびミダゾラムには、アミロイド 蛋白(A β)重合を抑制する効果と、神経細胞膜のラフト領域のGM1ガングリオシド(GM1)発現を減少させることでA β 重合を抑制する効果があるということ、また、レプチンも同様にGM1発現を減少させることでA β 重合を抑制することを示唆した。ケタミンはNMDA受容体を介したp38の活性化を阻害することにより、また、レプチンおよび脂溶性スタチンはMAPK系のErk1/2経路を活性化することにより、アストロサイトにおけるネプリライシンの発現を抑制することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We suggested that propofol, thiopental and midazolam inhibits amyloid β -protein assembly by decreasing GM1 ganglioside expression in detergent-resistant membrane microdomains of neurons, and that leptin inhibits amyloid β -protein assembly by decreasing GM1 ganglioside expression in neuronal membrane.

We suggested that ketamine suppresses A β degradation of NEP by reducing p38 MAPK-mediated pathway activity, and that leptin decreases A β degradation by NEP through activation of ERK, and that simvastatin and atorvastatin induce the increase of A β degradation of NEP on the extracellular of astrocytes by inducing ERK-mediated pathway activity and that these reagents regulate the differential mechanisms between the secretion of NEP, the induction of cholesterol reduction, and the morphological changes in the cultured astrocytes.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 神経細胞 GM1ガングリオシド アミロイド 蛋白 アストロサイト ネプリライシン

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に突入した我が国において、アルツハイマー病 (AD) は治療薬開発並びに早期診断法の確立が最も急がれている疾患である。AD は発見されてから 100 年の歴史があり、多くの研究者により様々な研究結果が報告されている。特に、AD 発症の物質的基盤であるアミロイド β 蛋白質 (A β) の重合体や線維体が神経細胞死を誘導するというアミロイド説が提唱されている。また、A β 重合を抑制する様々な薬物による評価もなされている。しかし、現在までの日本における AD の薬物療法は、アセチルコリン分解酵素阻害薬の塩酸ドネペジル等の認知改善薬が用いられているだけであり、AD の根本的な治療薬の開発がなされていない。このような状況下で、初期 AD 脳内において同定された GM1 ガングリオシド (GM1) に結合した A β (GAB) が、A β 重合を促進する「種」として働いていることが明らかにされた。この報告を契機として、以後、研究代表者を含めた国内外の研究者により老化や AD 脳内における GM1 の発現様式、ならびに A β 重合体の形成に対する GM1 の関与について様々な報告がなされている。これらの研究により、AD 脳内における A β 重合体形成には、GM1 の集積化が関与していることがより一層明らかとなり、GM1 が発現調節されることによって A β 重合体形成を調節できることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究においては、上記研究成果をさらに発展させ、GAB の基盤となっている GM1 の発現及び分布 (集積化) を調節し、さらに A β 重合体形成を抑制する物質を明らかにする。その中から AD の発症抑制する物質を見出す。最終的には臨床へ応用し AD 発症の予防法確立、ならびに根本的な AD 治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞内の GM1 発現及び分布調節物質のスクリーニング

研究代表者は、加齢や 2 型糖尿病が神経細胞における GM1 の発現及び分布 (ラフト領域) を増加させることを報告した。また、膜内における GM1 集積化が A β 重合を誘導することも報告した。そこで、ラット由来の初代培養神経細胞を用いて GM1 発現及び分布を調節する物質のスクリーニング及び作用機序について検討する。詳細を下記に記す。

初代培養ラット大脳神経細胞に様々な物質を投与し、神経細胞に発現した GM1 をコレラトキシン B サブユニット (GM1 を特異的に認識) で GM1 発現及び分布 (ラフト領域) を調節する物質をスクリーニングする。

GM1 発現を調節する物質の作用機序を、既知の細胞内シグナル伝達系 (PI3

kinase など) の阻害剤を用いて検討する。

(2) GM1 発現調節物質の A β 重合体に与える直接的な影響の検討

研究代表者が確立した様々な A β 構造体の作製時に GM1 発現調節物質を加える。その際に A β 重合体形成、A β 線維体の分解 (破壊)、そして A β 毒性体形成に与える影響を検討する。詳細を下記に記す。

GM1 発現調節物質が A β 線維体形成に与える影響について、反応条件下に GM1 発現調節物質を加え、チオフラビン T (A β 線維を特異的に認識する試薬) による A β 線維体検出法で重合体形成の抑制を検討する。この検討の際に作製した反応液を初代培養神経細胞に投与し、Lactate dehydrogenase (LDH; 細胞死マーカータンパク質) 放出法で毒性評価を行う。研究代表者は、長期培養した初代培養神経細胞に可溶性 A β を投与することによって、シナプス表面から A β が重合することを明らかにした。そこで、GM1 発現調節物質を投与した神経細胞表面からの A β 重合体形成に与える影響を、チオフラビン S (A β 線維を特異的に認識する試薬) 染色法を用いて検討する。

(3) アストロサイト発現 A β 分解酵素に対する発現調節物質の検討

本研究を遂行する過程において A β 分解酵素であるネプリライシン (NEP) の発現をラット初代培養アストロサイトにおいて確認した。アストロサイトにおける NEP の発現調節機構は殆ど解明されていない状況であったことから本研究のスクリーニングに用いた物質を用いて検討を行った。詳細を下記に記す。

初代培養ラットアストロサイトに様々な物質を投与し、アストロサイトに発現した NEP およびインスリン分解酵素 (IDE) の発現をウエスタンブロット法により発現を調節する物質をスクリーニングする。

NEP 発現を調節する物質の作用機序を、既知の細胞内シグナル伝達系 (MAPK, PI3 kinase など) の阻害剤を用いて検討する。NEP 発現を調節する物質をアストロサイトに投与後、A β を培養液中に投与することによる A β の分解能に対する影響も検討する。

4. 研究成果

(1) 神経細胞保護作用を有する麻酔薬である Propofol (Prop) と Thiopental (Thio) が、神経細胞表面上からの GAB を介した A β 重合体形成にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。Prop と Thio は GABAA1 レセプターを介して、PC12N 細胞及び神経細胞膜上の detergent-resistant membrane microdomains (DRMs) の GM1 発現

を減少させた。また、インスリンは可溶性 AB からの線維形成を誘導しなかった。さらに、GM1 リポソームによって誘導される線維形成を抑制し、神経細胞への毒性も減弱させた。神経細胞表面からの AB 線維体形成は、Prop 及び Thio 刺激細胞では観察されなかった。以上の結果は、Prop 及び Thio には、AB 重合を抑制する効果と、神経細胞膜表面の DRMs 領域の GM1 発現を減少させることでの AB 重合を抑制する効果があるということが示唆した。

(2)代謝経路調節において中心的役割を担うホルモンであるレプチンが、神経細胞表面上の GM1 発現並びに GAB 形成にレプチンがどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。レプチンはシグナル伝達系の PI3kinase を介して、初代培養神経細胞膜上の DRMs の GM1 発現を減少させた。また、初代培養神経細胞の培養系における著しい AB 線維体形成能は、レプチン刺激神経細胞では観察されなかった。以上の結果は、レプチンには、神経細胞膜表面の DRMs 領域の GM1 発現を減少させることでの AB 重合を抑制しているということが示唆した。

(3)神経細胞保護作用を有する麻酔薬であるミダゾラムが、神経細胞表面上からの GAB を介した AB 重合体形成にミダゾラムがどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。ミダゾラムは GABAA1 レセプターを介して、神経細胞膜上の DRMs の GM1 発現を減少させた。さらに、GM1 リポソームによって誘導される線維形成をミダゾラムは抑制した。神経細胞表面からの AB40 線維体形成は、ミダゾラム刺激細胞では誘導されなかった。以上の結果は、ミダゾラムには、AB 重合を抑制する効果と、神経細胞膜表面の DRMs 領域の GM1 発現の減少介した AB 重合を抑制する効果があるということが示唆した。

(4) アストロサイトに発現している NEP 及び IDE の麻酔薬ケタミンによる発現調節が、AB の分解にどのような影響を与えているのかを解明することを目的とした。ケタミンと MK801 は、NMDA 受容体シグナルを抑制することでアストロサイトの NEP の発現を減少させた。しかしながら、IDE 発現には影響はなかった。またこの NEP の発現変化は、細胞内の MAPkinase (p38 経路) の抑制に起因するものであった。さらに、ケタミンによる NEP の減少は、アストロサイトの細胞内での AB の分解を抑制した。以上の結果より、ケタミンは NMDA 受容体のシグナル伝達系の p38 の活性化を阻害することにより、アストロサイトにおける NEP 発現を抑制することで AB 分解能を減少させることが示唆した。

(5)アストロサイトに発現している NEP 及び IDE の代謝経路調節において中心的役割を担

うホルモンであるレプチンによる発現変化が、AB 分解に与える影響を検討することを目的とした。レプチンは、Erk1/2 経路を活性化によるアストロサイトの NEP の減少は、アストロサイト培養下での AB の分解を抑制した。以上の結果より、レプチンは Erk1/2 経路を活性化することにより、アストロサイトにおける NEP 発現を抑制することで AB 分解能を減少させることが示唆した。

(6) アストロサイトに発現している NEP 及び IDE の脂質異常症治療薬であるスタチン系薬剤による発現変化が、AB 分解に与える影響を検討することを目的とした。シンバスタチン (Sim) は、Erk1/2 経路を活性化することでアストロサイトの NEP の発現を減少させた。この NEP の発現変化は、細胞外への NEP 放出に起因するものであった。さらに、Sim による NEP の影響は、アストロサイトの細胞外領域における AB 分解を促進した。以上の結果より、Sim は Erk1/2 経路を活性化することにより、アストロサイトの NEP 放出を促進することで細胞外領域の AB 分解能を誘導させることが示唆した。

以上の結果を学術専門誌に投稿し、受理されることによって国内外における本研究の位置づけとインパクトを獲ることができた。また、関連学会での発表等により広く普及することができた。

今後は本研究成果をもとに神経細胞表面からの AB の重合体形成抑制物質ならびにアストロサイト由来の NEP 発現調節物質を詳細に検討することによって、アルツハイマー病の治療および予防に発展させていく。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

山本 直樹、藤井 有子、笠原 梨加(8人、1番目)、 Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid-protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways, *Glia*, 査読あり, Vol. 64, 2016, pp. 952-962, DOI: 10.1002/glia.22974

谷田 守、山本 直樹、芝本 利重(8人、3番目)、 Hypothalamic Nesfatin-1 Stimulates Sympathetic Nerve Activity via Hypothalamic ERK Signaling, *Diabetes*, 査読あり, Vol. 64, 2015, pp. 3725-3736, DOI: 10.2337/db15-0282

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉(7人、1番目)、 Midazolam inhibits the formation of amyloid fibrils and GM1

ganglioside-rich microdomains in presynaptic membranes through the gamma-aminobutyric acid A receptor、Biochem Biophys Res Commun、査読あり、Vol.457、2015、pp. 547-553、DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.022

谷田 守、山本 直樹、芝本 利重 (6人、2番目) Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. J Neurosci、査読あり、Vol.35、2015、pp. 474-484、DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1828-14.2015

山本 直樹、谷田 守、鈴木 健二 (5人、1番目) Leptin inhibits amyloid β -protein fibrillogenesis by decreasing GM1 gangliosides on the neuronal cell surface through PI3K/Akt/mTOR pathway、J Neurochem、査読あり、Vol. 131、2014、pp. 323-332、DOI: 10.1111/jnc.12828

谷田 守、山本 直樹、芝本 利重 (8人、5番目) Soy isoflavone affects the autonomic nervous system in a tissue-specific manner in anesthetized rats、Exp Biol Med (Maywood)、査読あり、Vol. 239、2014、pp. 477-483、DOI: 10.1177/1535370213519197

山本 直樹、谷田 守、祖父江 和哉 (8人、1番目) Leptin inhibits amyloid β -protein degradation through decrease of neprilysin expression in primary cultured astrocytes、Biochem Biophys Res Commun、査読あり、Vol. 445、2014、pp. 214-217、DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.168

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉 (9人、1番目) Ketamine reduces amyloid β -protein degradation by suppressing neprilysin expression in primary cultured astrocytes、Neurosci Lett、査読あり、Vol. 545、2013、pp. 54-58、DOI: 10.1016/j.neulet.2013.04.016.

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉 (7人、1番目) Propofol and thiopental suppress amyloid fibril formation and GM1 ganglioside expression through the γ -aminobutyric acid A receptor、Anesthesiology、査読あり、Vol. 118、2013、pp. 1408-1416、DOI: 10.1097/ALN.0b013e31828afc16.

谷田 守、山本 直樹、芝本 利重 (8人、4番目) Central PACAP mediates the sympathetic effects of leptin in a tissue-specific manner、Neuroscience、査読あり、Vol. 238、2013、pp. 297-304、DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.016.

[学会発表](計13件)

山本 直樹、谷田 守、有馬 一、鈴木 健二、祖父江 和哉、脂溶性スタチンはアストロサイト細胞膜表面のネプリライシン発現を低下させる、日本薬学会第136回年会、2016年3月26-29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

柴田 麻里、山本 直樹、石黒 凌、谷田 守、有馬 一、祖父江 和哉、没食子酸エピガロカテキンはアストロサイトのネプリライシン発現を低下させる、日本薬学会第136回年会、2016年3月26-29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

石黒 凌、山本 直樹、柴田 麻里、谷田 守、有馬 一、祖父江 和哉、インスリンはアストロサイトのネプリライシンとインスリン分解酵素の発現を調節する、日本薬学会第136回年会、2016年3月26-29日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

山本 直樹、谷田 守、有馬 一、鈴木 健二、祖父江 和哉、スタチンとアストロサイトのネプリライシン発現調節の検討、第34回日本認知症学会学術集会、2015年10月2-4日、リンクステーション青森(青森県・青森市)

山本 直樹、谷田 守、大野 陽子、笠原 梨加、鈴木 健二、祖父江 和哉、レプチンはアストロサイトのネプリライシン発現を抑制する、第58回日本神経化学学会、2015年9月11-13日、大宮ソニックスティ(埼玉県・大宮市)

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉、ミダゾラムによるA重合体形成の抑制検討、日本薬学会第135回年会、2015年3月25-28日、神戸ポートアイランドエリア・三宮エリア(兵庫県・神戸市)

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉、ミダゾラムはAB重合体形成を抑制する、第33回日本認知症学会学術集、2014年11月29日-12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

山本 直樹、谷田 守、大野 陽子、笠

原 梨加、鈴木 健二、祖父江 和哉、
レプチンはアストロサイトのネプリライ
シン発現を抑制することで AB 分解を抑制する、第 37 回日本分子生物学会年会、
2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉、
Midazolam inhibit the formation of AB
assemblies from neuronal membrane、第
57 回日本神経化学会大会、2014 年 9 月
29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館(奈良
県・奈良市)

山本 直樹、谷田 守、祖父江 和哉、
鈴木 健二、レプチンは神経細胞表面の
GM1 ガングリオシド発現減少によって AB
重合体形成を抑制する、日本薬学会第 134
回年会、2014 年 3 月 27-30 日、ホテル
日航熊本(熊本県・熊本市)

山本 直樹、有馬 一、祖父江 和哉、
ミダゾラムは神経細胞膜からの AB 重合
を抑制する、第 36 回日本分子生物学会年
会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートア
일랜드(兵庫県・神戸市)

山本 直樹、谷田 守、祖父江 和哉、
谷浦 秀夫、鈴木 健二、レプチンは神
経細胞膜表面からの AB 重合体形成を抑制する、第 32 回日本認知症学会学術集会、
2013 年 11 月 8-10 日、キッセイ文化ホール(長野県・松本市)

山本 直樹、谷田 守、祖父江 和哉、
谷浦 秀夫、鈴木 健二、レプチンは神
経細胞膜の GM1 ガングリオシド発現減少
を介して AB 重合体形成を抑制する、第
56 回日本神経化学、2013 年 6 月 20-23
日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 直樹 (Yamamoto Naoki)
北陸大学・薬学部
講師

研究者番号： 90393157

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：