

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430070

研究課題名(和文) 脳アミロイド に固有の産生分泌メカニズムと蓄積制御

研究課題名(英文) Neuron-specific mechanism for production and secretion of amyloid-beta and therapeutic regulation of its deposition

研究代表者

西村 正樹 (NISHIMURA, Masaki)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・教授

研究者番号：40322739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の原因となるA $\beta$ ペプチドが脳内の神経細胞から産生分泌される機序は不明である。(1)マウス脳の解析から、基質APPおよびA $\beta$ 産生に関わるセクレターゼはシナプス前膜の活性化ゾーンとそれに結合したシナプス小胞に局在することを解明した。(2)脳A $\beta$ 蓄積を促進するPresenilin-1の翻訳後修飾を検討したが有意な結果は得られなかった。(3)A $\beta$ 産生を抑制するILE1 (ACDP) はシナプス前膜に局在していた。また、本症の脳では発現レベルの低下が認められた。ILE1様活性を示す治療薬開発に向け、ILE1とPresenilin-1との結合を解析し分子設計を目指して評価を継続している。

研究成果の概要(英文)：The exact subcellular site and mechanism of Alzheimer disease-related A $\beta$  secretion from neurons in vivo remain unresolved. (1) Using subcellular fractionation of mouse brain, we revealed that APP and components of the  $\gamma$ -secretase complex are localized to the active zone membrane and the active zone-docked synaptic vesicles of the presynaptic terminals. (2) We could not find any post-translational modification of synaptic Presenilin-1 which enhanced a relative ratio of A $\beta$ 42 production. (3) We found ILE1 as a synaptic A $\beta$  production-suppressing protein and tried molecular design for A $\beta$ -reducing peptides or compounds by conformational prospect of the interaction between ILE1 and Presenilin-1. We also found that this binding was dependent on the DQL sequence of Presenilin-1 C-terminal tail, and the 3 dimension-reference interaction site model (3D-RISM) theory predicted that candidate of Presenilin-1-binding region on ILE1 is around a side chain of the Lys84 residue.

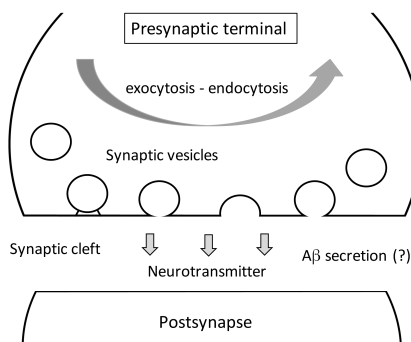
研究分野：分子神経病態学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 アミロイド シナプス Presenilin ILE1 セクレターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は老年期認知症の主要な原因であり、医学的克服が急がれる。その分子病態はアミロイドβ(Aβ)の脳内蓄積によって惹起されることが判明しているものの、Aβ蓄積の一次的原因は多くが未だ不明であり、分子病態の是正による根治治療法の確立には到っていない。病原ペプチドであるAβは、前駆体タンパク質APPがセクレターゼにより切断されたAPP-C99がさらにγセクレターゼによって切断されて産生分泌される。Aβには分子量の異なる分子種が知られ、正常で9割を占めるAβ40と1割以下ながら高い凝集性を示すAβ42が主体をなす。最近の報告により、脳内Aβ蓄積をもたらず要因が総Aβ量ないしはAβ42/Aβ40量比の増加であることが判明してきた。γセクレターゼ切断はAβ産生の最終ステップであり、この切断がAβ分子種の多様性を生じさせることから、γセクレターゼはAD病態において重要な位置付けにある。

一方、脳実質に分泌されるAβレベルはシナプス活動に相関し、神経細胞からのAβ産生や分泌のメカニズムは非神経細胞とは大きく異なるが、その理解は未だ不十分である。Aβの神経毒性の一次ターゲットはシナプスであるとされ、シナプス前部を主なAβの産生分泌部位とする複数の報告がみられる一方で、シナプス小胞にAPPやセクレターゼの局在が検出できていなかった。最近になり、APPや各セクレターゼがシナプス前部に局在することが指摘されてきたものの(下図参照)やはりAPPのソーティング経路やAβ産生から分泌の制御メカニズムなど多くが謎である。また、加齢や疾患に伴うAβ産生制御の破綻メカニズムについても、神経細胞に固有のAβ産生メカニズムを考量に入れた検討はこれまで充分にはなされていない。



## 2. 研究の目的

本課題では、神経細胞に固有のAβ産生・分泌部位に関する検証とともに、その知見を踏まえたAβ産生制御による治療法開発に向けた研究を推進する。まず、マウス脳を用いシナプス前部からのAβ産生の占める重要性を評価する(1)。さらに、孤発性ADや加齢に伴うセクレターゼ活性修飾として報告してきたAβ42産生比増加の分子基盤を解明するべく、Aβ産生部位に局在するセク

レーターゼ複合体を精製し、ADや老化脳に特徴的な分子修飾を同定する。加えて、その原因を明らかにすることにより、ADに対する予防的介入に向けた道筋を開き、将来的に予防的治療法の確立を目指す(2)。また、ACDPは神経細胞において発現し分泌されてAβ産生を抑制するが、ACDPの哺乳類脳内発現を解析し、シナプス部におけるACDPとAβの相互作用の詳細を検討するとともに、脳内Aβ産生制御メカニズムを明らかにすることから、ACDP発現誘導ないし活性誘導を介した治療法の開発を目指す(3)。

## 3. 研究の方法

### (1)脳内Aβ産生分泌部位の検討 - シナプス前部仮説の検証

マウス *in vivo* 脳において、神経細胞からAβが産生される部位や分泌のメカニズムを検討する。マウス脳を用い、シナプス構造とくに注目しながら、基質APPや産生酵素セクレターゼ複合体の局在を検討する。

《方法》免疫組織化学、免疫電顕およびシナプトソーム分画法(Gray and Whittaker 1962; Perez-Otano et al. 2006; Phillips 2001)を用いる。ことに産生部位の候補とされるシナプス前膜アクティブゾーンおよびそれにドッキングしたシナプス小胞の単離は特異抗体結合磁気ビーズを用いた方法(Lassek et al. 2013)による。

### (2)シナプス部セクレターゼ複合体の分子修飾の解析

カニクイザル脳に由来するγセクレターゼのAβ42産生活性比は加齢とともに増加し、脳Aβ蓄積と相関することを報告している(*J Neurochem* 123:21-28, 2012)が、その分子基盤は不明である。γセクレターゼの触媒サブユニットはPresenilinであり、Presenilinの多くのミスセンス変異による構造変化はAβ42産生活性比を増加させる。従って、孤発性ADや加齢脳ではPresenilinが非遺伝的要因による修飾から構造変化をきたす可能性が推測される。また、数十種類の基質が知られることから推測できるように、脳内セクレターゼのなかでもAβ産生に関わるプールは限定されている。そこで、シナプスのセクレターゼ複合体に注目して解析を進める。ADや老化に特徴的なセクレターゼ複合体の非遺伝的修飾について、Aβ42産生比を増加させる修飾を同定し、その原因を分子レベルで明らかにする、これに対する介入の方策を検討するなど、発展的に解析を進める。

《材料》4~36歳(60例)のカニクイザル脳(高いAβ42産生活性比を示すことを確認した高齢ザルの脳を含む)ADおよび同年齢対照(各15例)の剖検脳の凍結組織から適したものを選択して用いる。

《方法》分画化シナプトソームからPresenilin-1抗体を用いγセクレターゼ複合体を精製し、ADや老化に特徴的な分子修飾を同定する。なお、翻訳後修飾のなかには、可逆性が評価

の障壁となる場合があるため、サンプル調整には特段の注意を払う。Presenilin-1 の免疫沈降ウェスタン法により、Ser/Thr および Tyr のリン酸化、Lys のユビキチン化、SUMO 化、アセチル化ないし ADP リボシル化、Tyr のニトロ化などを検出する。

(3)  $\text{A}\beta$  産生抑制タンパク質 ACDP を標的とする AD の予防的治療法の探索

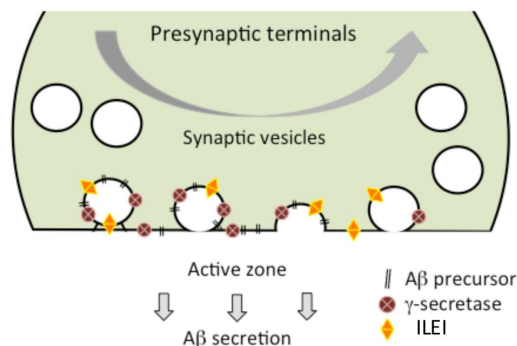
ACDP は APP-C99 の安定性を低下させ  $\text{A}\beta$  産生を抑制する。マウスにおけるトランクジェニック発現により、モデルマウスの脳アミロイド斑と記憶障害は改善された。つまり、その活性誘導ないし発現誘導は AD 治療法としての可能性が期待できる。ACDP の脳内発現レベルの解析をマウス脳、アルツハイマー病症例を含むヒト剖検脳組織を用いて行う。脳内  $\text{A}\beta$  蓄積との関連性についても検討する。また、ACDP のシナプス部への局在を検討し、ACDP 分泌と  $\text{A}\beta$  分泌との相関など機能様式と  $\text{A}\beta$  分泌制御メカニズムの解明や ACDP の発現調節メカニズムの解析から ACDP 様活性による治療法開発の方策を探る。

《方法》マウス脳とヒト剖検脳組織を用い、イムノプロット法にて ILEI の定量を行う。ヒト ACDP 遺伝子発現調節領域のゲノム解析やルシフェラーゼ(Luc)レポーターによるプロモーター解析から転写調節メカニズムの解明を進める。ACDP の  $\text{A}\beta$  産生抑制活性に関わるドメインを同定することから、短縮ペプチド性薬剤の可能性を検討する。さらに、作用機序の詳細を解析し、それをもとにしたタンパク質構造解析から、薬剤設計の可能性を探る。

#### 4. 研究成果

(1) 脳内  $\text{A}\beta$  産生分泌部位の検討-シナプス前部仮説の検証

マウス脳の懸濁液からシナプス構造を分画化し(シナプトソーム)、さらに界面活性剤への溶解度差を用いた分画化やマーカータンパク質抗体への親和性によるシナプス小胞単離などを併用し、各分画に含まれるタンパク質を検出して仮説を評価した。その結果、基質 APP および セクレターゼ複合体はシナプス前膜、なかでも活性化ゾーンとそれに関連したシナプス小胞に濃縮して局在することが明らかとなり、シナプス前部仮説が支持された(*J Neurochem* 133:422-431, 2015)。



(2) シナプス部 セクレターゼ複合体の分子修飾の解析

$\text{A}\beta_{42}$  産生比を増加させる Presenilin-1 の翻訳後修飾の可能性について検討するため、HEK293 細胞およびカニクイザル脳の懸濁液を用い、抗 Presenilin-1 抗体で セクレターゼ複合体を免疫沈降した後、抗リン酸化 Ser/Thr 抗体、抗リン酸化 Tyr 抗体、抗アセチル化 Lys 抗体、ニトロ化 Tyr 抗体を用いたイムノプロット法で検出を試みたが、いずれも有意ではなかった。

(3)  $\text{A}\beta$  産生抑制タンパク質 ILEI (ACDP) を標的とする AD の予防的治療法の探索

ACDP の同定と機能解析の成果について、ILEI という呼称に準じて論文報告した(*Nat Commun* 5:3917, 2014)。以下、ACDP を ILEI として記載する。

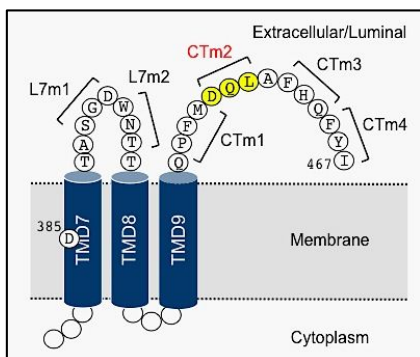
ILEI のマウス脳内発現を発生成熟を追って検索すると、生後 1 週間前後をピークに、その後加齢とともに減少することが判明した。また、凍結剖検脳組織(側頭葉皮質)を用いた検討では、アルツハイマー病では対照例に比して減少が顕著であり、発現レベルに逆相関して脳  $\text{A}\beta$  蓄積レベルは増加することも明らかになった(*Nat Commun* 5:3917, 2014; *Neuroscience* 330:236-246, 2016)。これらは、ILEI 発現レベルの低下が脳内  $\text{A}\beta$  増加、引いてはアルツハイマー病発症の一次的要因となる可能性、さらには早期の ILEI 補充が抗  $\text{A}\beta$  治療として有効である可能性を示唆している。

脳 ILEI はニューロン細胞体のトランスゴルジネットワークに加え、セクレターゼ複合体と同様にシナプス前分画とくにアクティブゾーンないしそれに融合したシナプス小胞への局在が確認された(*Neuroscience* 330:236-246, 2016)。

ヒト遺伝子プロモーター解析の結果、HEK293 細胞では転写開始点上流 -8.0 ~ -7.3 kb および -4.1 ~ -2.0 kb に強い活性領域が、-1.0 ~ -0.8 kb に弱い活性領域が認められた。しかし、神経系とされる SH-SY5Y 細胞では上流の強い活性領域が検出されず、神経系細胞特異的な転写抑制機構の存在が推測された。本症における転写活性低下のメカニズムについては、さらなる検討を要する。

HEK293 細胞への発現では、ILEI はいずれの構造ドメインを欠失させても分子としての安定性を失うことが明らかになった。このため、 $\text{A}\beta$  産生抑制に必要な部分を限局化することは困難であった。

一方、ILEI の作用メカニズムとしては、セクレターゼ複合体への結合を介して、基質 APP-C99 の安定性を低下させ  $\text{A}\beta$  産生を抑制することを解明した。この結合は Presenilin-1 の C 末端領域で細胞外ループ構造にある DQL 配列に依存することを見出した(下図参照)。



この結合を統計力学 3D-RISM 理論によって構造生物学的に解析し、分子設計による A $\beta$  産生阻害薬の開発を目指した。ILEI の予測構造上に DQL 配列の側鎖の分布をマッピングした結果、ILEI 上の Lys84 側鎖近傍に結合部位の候補が特定された。数種の Lys84 置換変異体を発現するプラスミドを作製し、ILEI ノックアウト HEK293 細胞に発現させて機能評価を継続している。

#### 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 12 件)

西村正樹 . 新規内性  $\gamma$  セクレターゼ結合因子 ILEI/FAM3C によるアミロイド  $\beta$  産生制御 . 『**認知症研究の新時代**』印刷中(査読無)

西村正樹 . アミロイド  $\beta$  産生を抑制する分泌型タンパク質 ILEI/FAM3C によるアルツハイマー病の次世代診断・治療 . **分子精神医学** 17(2): 14-20, 2017 (査読無)

Liu L, Watanabe N, Akatsu H, Nishimura M. Neuronal expression of ILEI/FAM3C and its reduction in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 330:236-246, 2016 (査読有) doi:10.1016/j.neuroscience.2016.05.050.

Seita Y, Tsukiyama T, Iwatani C, Tsuchiya H, Matsushita J, Azami T, Okahara J, Nakamura S, Hayashi Y, Hitoshi S, Itoh Y, Imamura T, Nishimura M, Tooyama I, Miyoshi H, Saitou M, Ogasawara K, Sasaki E, Ema M. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep* 6:24868, 2016 (査読有) doi: 10.1038/srep24868.

Ochiishi T, Itakura A, Liu L, Akatsu H, Kohno H, Nishimura M, Yoshimune K. Immunohistochemical detection of the delayed formation of non-fibrillar large amyloid- $\beta$  aggregates. *Genes Cells* 21:200-211, 2016 (査読有) doi: 10.1111/gtc.12332.

Abdelalim EM, Bellier JP, Tooyama I.

Localization of brain natriuretic peptide immunoreactivity in rat spinal cord. *Front Neuroanat* 10:116, 2016. eCollection 2016 (査読有)

Wang X, Yang H, Yanagisawa D, Bellier JP, Morino K, Zhao S, Liu P, Vigers P, Tooyama I. Mitochondrial ferritin affects mitochondria by stabilizing HIF-1 $\alpha$  in retinal pigment epithelium: implications for the pathophysiology of age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging* 47:168-179, 2016 (査読有) doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.025.

Yang M, Yang H, Guan H, Bellier JP, Zhao S, Tooyama I. Mapping of mitochondrial ferritin in the brainstem of *Macaca fascicularis*. *Neuroscience* 328:92-106, 2016 (査読有) doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.04.035.

西村正樹 . 抗認知症薬開発の現状と展望 . **総合リハビリテーション** 44(1): 29-34, 2016 (査読無)

Liu L, Fujino K, Nishimura M. Presynaptic localization of the  $\gamma$ -secretase-inhibiting protein p24 $\alpha_2$  in the mammalian brain. *J Neurochem* 133:422-431, 2015 (査読有) doi:10.1111/jnc.13000.

Hasegawa H, Liu L, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid- $\beta$  precursor. *Nat Commun* 5:3917, 2014 (査読有) doi:10.1038/ncomms4917.

Han J, Jung S, Jang J, Kam TI, Choi H, Kim BJ, Nah J, Jo DG, Nakagawa T, Nishimura M, Jung YK. OCIAD2 activates  $\gamma$ -secretase to enhance amyloid  $\beta$  production by interacting with nicastrin. *Cell Mol Life Sci* 71(13): 2561-2576, 2014 (査読有) doi:10.1007/s00018-013-1515-x.

[学会発表](計 15 件)

Nishimura M . ILEI in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *International Symposium "Alzheimer's disease: Narrowing the gap between basic science and clinical application"* Niigata University, March 10-11, 2017

Nishimura M, Liu L, Watanabe N, Akatsu H. Neuronal expression of ILEI/FAM3C and its reduction in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Association International Conference 2016*, Toronto, July 2016

西村正樹 . 孤発性アルツハイマー病における  $\gamma$  セクレターゼ . 『第 17 回和歌山認知症研究会』, 2016 年 6 月 11 日、和歌山、

西村正樹 .  $\gamma$  セクレターゼ複合体の結合タンパク質解析 . 「第21回病態プロテアーゼ学会」, 2016年8月6日、大阪

Watanabe N, Liu L, Nishimura M. Brain distribution and subcellular localization of ILEI/FAM3C and its reduction with aging. 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20~22日, 横浜

渡邊直希, 劉磊, 赤津裕康, 西村正樹. Amyloid 蓄積を抑制する ILEI/FAM3C のニューロンにおける発現とアルツハイマー病脳における発現低下 . 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月1日、横浜

渡邊直希, 劉磊, 赤津裕康, 西村正樹 . A $\beta$  産生抑制タンパク質 ILEI/FAM3C の脳内発現様式と加齢に伴う発現減少 . 第35回日本認知症学会学術集会, 2016年12月2日、東京

Nishimura M, Liu L, Tooyama I. Neuronal ILEI reduces amyloid- $\beta$  production by destabilizing amyloid precursor protein. The 12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, March 18-22, 2015, Nice

Liu L, Nishimura M. A $\beta$  generation is regulated by p24 $\alpha$ 2 at the presynaptic terminals. BMB2015, December 1-4, 2015, Kobe

Liu L, Nishimura M. Pre-synaptic localization of p24 $\alpha$ 2 in the mammalian brain. 第56回日本神経科学学会, 2015年6月28-31日、神戸

劉磊, 村山繁雄, 西村正樹 . A $\beta$  産生を抑制するタンパク質 ILEI の哺乳類脳内発現 . 第34回日本認知症学会, 2015年10月3日、青森

Nishimura M, Liu L, Fujino K. p24 $\alpha$ 2 interacts with  $\gamma$ -secretase complex at presynaptic terminals. Alzheimer's Association International Conference 2014, July 12-17, 2014, Copenhagen

Nishimura M, Liu L. Expression of p24 $\alpha$ 2 in mammalian brain. Experimental Biology 2014, April 26-30, 2014, San Diego

劉磊, 長谷川浩史, 遠山育夫, 村山繁雄, 西村正樹. ILEI はアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド沈着と記憶障害を軽減させる, 第33回日本認知症学会, 2014年11月30日、横浜

Liu L, Hiroshi Hasegawa H, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. ILEI reduces amyloid- $\beta$  generation by destabilizing

APP-C99. 第37回日本神経科学学会, 2014年9月11-13日、横浜

〔図書〕(計 2件)

西村正樹 . 認知症 . 京都大学出版「**Q & A 生活習慣病の科学Neo**」, 2016, p211-232

西村正樹 . タンパク質発現解析—免疫組織化学法に法補的な手法—. 日本組織細胞化学学会「**組織細胞化学2014**」, 2014, p65-74

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 正樹 (NISHIMURA, Masaki)  
滋賀医科大学・神経難病研究センター・  
教授

研究者番号: 40322739

### (2) 研究分担者

J・P Bellier  
滋賀医科大学・神経難病研究センター・  
助教

研究者番号: 80346022

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )