

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461270

研究課題名(和文)アルツハイマー病におけるアストロサイトを介した神経変性メカニズムの解明

研究課題名(英文)The examination of AD pathology from the perspective of the astrocyte-neuron interaction: the participation of IGFBP-3 released by astrocytes.

研究代表者

植村 健吾 (Uemura, Kengo)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00378663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：初代培養細胞を用いて、アストロサイトアミロイドで処置されたアストロサイトでは、カルシウム流入を介してカルシニューリンの活性化が起こり、その結果IGFBPの放出が起こることを示した。IGFBPは成長因子であるIGFと結合し、その活性を阻害することが知られている。さらにIGFは神経細胞におけるタウのリン酸化を抑制し、IGFBPは促進する働きがあることを培養細胞系にて示した。これらの実験結果は、アミロイドの影響が直接神経細胞に働きかけるのみならずグリア細胞を介したメカニズムでも神経変性を引き起こしうることを示したものであり、治療のターゲットとしてアストロサイトも念頭に置く必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We presumed that astrocytes might trigger neuronal reactions, leading to tau phosphorylation. In this study, we examined AD pathology from the perspective of the astrocyte-neuron interaction. A cytokine-array analysis revealed that Aβ stimulates astrocytes to release several chemical mediators that are primarily related to inflammation and cell adhesion. Among those mediators, insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 3 (IGFBP-3) was highly upregulated. In this study, we found that IGF-1 suppressed tau phosphorylation induced by Aβ, although IGFBP-3 inhibited this property of IGF-1. As a result, IGFBP-3 contributed to tau phosphorylation and cell death induced by Aβ. Our study suggested that calcineurin in astrocytes was activated by Aβ, leading to IGFBP-3 release. We further demonstrated that IGFBP-3 produced by astrocytes induced tau phosphorylation in neurons. Our study provides novel insights into the role of astrocytes in the induction of tau phosphorylation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経分子病態学 認知症 脳、神経

1. 研究開始当初の背景

海馬や大脳皮質の神経細胞外に沈着するアミロイド (A) 凝集物 (老人斑) は最も初期に出現するアルツハイマー病 (AD) の病理変化であり、次いで過剰にリン酸化したタウが神経細胞内に凝集する神経原線維変化、最後に神経細胞死が誘導される。病理変化の時系列から、A を AD の引き金とするアミロイド仮説が病態仮説として支持されているが (Hardy and Selkoe, 2002 *Science*)、認知機能障害が出現する 20 年も前から老人斑が出現する事も明らかになってきている (Sperling et al., 2011 *Alzheimers Dement*)。したがって、老人斑陽性の未発症者を対象とした抗 A 療法 (ワクチン、抗体等) による臨床試験が現在実施されている。しかし、今後さらに治療の幅を広げて行く上において、「神経原線維変化を未然に防ぐ事で AD の発症を防げるか」は非常に重要なリサーチクエストである。

申請者らはこれまで基礎研究という観点から老人斑が神経原線維変化を誘導する機序に関する研究を行ってきた (A Ando et al., 2011 *J Biol Chem*)。タウのリン酸化が申請者らを含め多くの研究グループより、ニューロンより分泌された A が再度ニューロンへ働きかけタウの過剰リン酸化を誘導する機序について報告され、つまり A がニューロンへ直接作用する機序がこれまでの主流であった (Takashima et al., 1993 *PNAS*, Busciglio et al., 1995 *Neuron*, Ando et al., 2011 *J Biol Chem*)。

しかしながら、アストロサイトを始めとするグリア細胞のタウリン酸化、神経変性への関与については多くは知られておらず、今後の解明が待たれるところである。

2. 研究の目的

本研究課題では、アルツハイマー病の病態におけるタウリン酸化、神経原線維変化、神経変性へのアストロサイトの関わりを解明することを中心の課題とする。特に、アミロイドがアストロサイトに働きかけた結果放出される分子に着目する。

この目的で、サイトカインアレイを用いて、アミロイド処置後に培地中にアストロサイトから放出される分子を網羅的に解析する。結果、新規のニューロンとアストロサイトとのクロストークを介した神経原線維変化誘導機序を同定し、さらに今までに知られていないアルツハイマー病のリスク因子である ApoE の病態との関連について新たな知見を得る。

3. 研究の方法

(1) アストロサイトの初代培養を用いて、アミロイドペプチドを付加することで放出される分子をサイトカインアレイにて網羅的に解析し、同定する。

(2) 同定された分子の放出メカニズムについて、培養細胞系でさらに詳細に検討する。さらに、神経細胞の初代培養を用いて、放出された分子が神経細胞内のタウリン酸化や (3) 神経細胞死そのものに与える影響について解析する。

(4) 最後に、放出された分子のアルツハイマー病脳内における変動について検討し、in vivo relevance を確認する。

4. 研究成果

サイトカインアレイによる分析から、アミロイドペプチドはアストロサイトを刺激して、炎症や細胞接着に関連した多くの分子を放出することが明らかとなった。これらの中で、IGFBP-3 が高度に上昇していたため、以後はこの分子に着目して解析を行った (下図

Fig.1 参照)

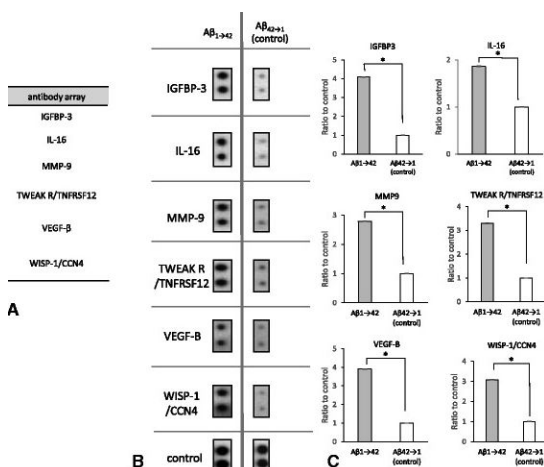


Fig.1 アストロサイトへのアミロイド付加にて有意に上昇したタンパク質 (IGFBP-3, IL-16, MMP-9, TWEAK R, VEGF-B, WISP-1 などの上昇が認められた。)

IGFBP-3 は、成長因子である IGF と結合することでその、活性を抑制することが知られている分子であるが、独自の生理活性も持っていることが予想されている。

本研究では、まずアルツハイマー病の患者の脳においては、IGFBP-3 の発現が増加していることがウエスタンブロットにて示された。さらに、蛍光顕微鏡による解析にて、IGFBP-3 のアストロサイト内での増加が示された。特に、老人斑の周囲に存在する活性化アストロサイトにおいて、この傾向が顕著であった(下図 Fig.2 参照)。

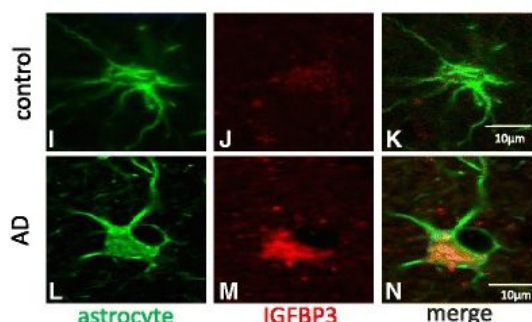


Fig.2 アルツハイマー病患者アストロサイトにおける IGFBP-3 の発現上昇 (赤)

続いて、ヒトアストロサイトから得られた培養細胞を用いた解析にて、アミロイド付加後のアストロサイト内でのカルシウム濃度の増加が示された。カルシニューリンの阻害剤によって IGFBP-3 の上昇は mRNA のレベルでも、蛋白レベルでも同様に抑制されることから、IGFBP-3 の上昇は、細胞内へのカルシウム流入を介したカルシニューリンの活性化が仲介していることを示した。

同様に、アルツハイマー病の脳内においてもカルシニューリンの活性化が示され、また、老人斑の周囲に存在するアストロサイト内において特にカルシニューリン発現が増加していることも示された(下図 Fig.3 参照)。

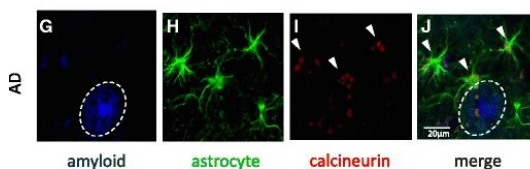


Fig.3 老人斑の近傍にあるアストロサイト内でカルシニューリンが発現増加している (老人斑：青 カルシニューリン：赤)

今までの研究において、アミロイドは、タウリン酸化酵素である GSK3beta の 9 番目のセリンの抑制性リン酸化を解除することによって、タウリン酸化酵素活性を向上させることが知られている(Ando et al., 2011 *J Biol Chem*)。一方、IGF はこのアミロイドの活性に拮抗し、GSK3beta の 9 番目のセリンの抑制性リン酸化を維持することによって、タウのリン酸化を抑制する効果がある。

本研究ではさらに、初代培養神経細胞を用いた実験により、今回の研究で見出された IGFBP-3 が IGF の抑制により、タウリン酸化を促進する効果があり、結果神経細胞死を誘発する可能性が示唆された。

以上の研究成果をまとめると、アミロイドはアストロサイト内へのカルシウム流入を誘発することによって、カルシニューリンの

活性化を引き起こす。活性化カルシニューリンは、IGFBP-3を始めとする多くの分子の産生を促進し、アストロサイトからの放出を促す。放出されたIGFBP-3はIGFの抑制を介して、タウリン酸化酵素であるGSK3betaを活性化させる。結果、タウのリン酸化、神経原繊維変化、神経細胞死の促進に關与する。このように、アルツハイマー病における重要な病理学的変化である神経原繊維変化や神経細胞死に關与しているアストロサイトを介した新規のルートが存在する可能性が示され、カルシニューリンの抑制は重要なちゆ量のターゲットとなりうる可能性が本研究の結果示された(下図 Fig.4 参照)。

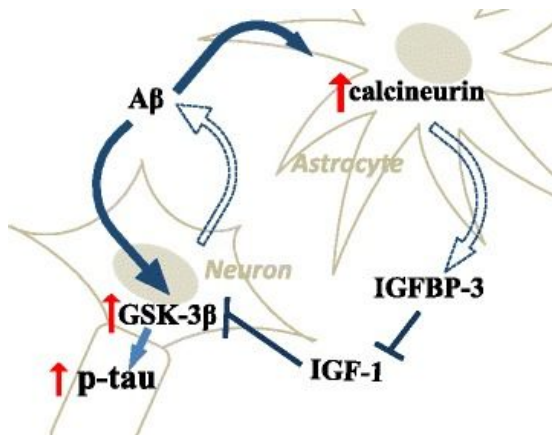


Fig. 4 まとめ。アミロイドはアストロサイト内のカルシニューリンの活性化を介してIGFBP-3の放出を促し、最終的にGSK3betaを活性化、タウのリン酸化を引き起こす。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S, Takahashi R, Kinoshita A.

The participation of insulin-like growth factor-binding protein 3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease.

Mol Brain. (査読有) 2015 Dec 4;8(1):82.
doi:10.1186/s13041-015-0174-2.

〔学会発表〕(計13件)

陣上直人、植村健吾、浅田めぐみ、山田茂樹、川原隆、岩崎琢也、厚地正道、石川正恒、高橋良輔、木下彩栄。

タップテストでの脳脊髄液バイオマーカーの動的モニタリング

第18回日本正常圧水頭症学会、2017/2/28、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

Masakazu Miyamoto, Akira Kuzuya, Yasuha Noda, Kengo Uemura, Megumi Asada-Utsugi, Shinji Ito, Yoshiyasu Fukusumi, Hiroshi Kawachi, Ryosuke Takahashi, Ayae..

Kinoshita

A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.

SfN 2016、2016/11/13、(サンディエゴ、アメリカ)

宮本将和、葛谷聡、野田泰葉、浅田めぐみ、植村健吾、伊藤慎二、高橋良輔、木下彩栄。

A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.

第39回神経科学大会、2016/7/21、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

陣上直人、葛谷聡、植村健吾、浅田めぐみ、高橋良輔、木下彩栄。

Split luciferase assayを用いたタウ伝播の実験系

第39回神経科学大会、2016/7/20、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

宮本将和、葛谷聡、野田泰葉、浅田めぐみ、植村健吾、伊藤慎二、高橋良輔、木下彩栄。

A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.

第57回日本神経学会学術大会、2016/5/19、神戸国際会議場他(兵庫県神戸市)

陣上直人、葛谷聡、植村健吾、浅田めぐみ、高橋良輔、木下彩栄

Tau protein propagation detection by Luciferase-based protein complementation assay.

第 57 回日本神経学会学術大会、2016/5/19、神戸国際会議場他（兵庫県神戸市）

宮本将和、野田泰葉、葛谷聡、植村健吾、浅田一宇津木めぐみ、伊藤慎二、高橋良輔、木下彩栄

A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity

第 38 回日本神経科学大会、2015/7/30、神戸国際会議場・神戸国際展示場（兵庫県神戸市）

宮本将和、野田泰葉、葛谷聡、植村健吾、浅田一宇津木めぐみ、高橋良輔、木下彩栄

A search for novel interacting proteins to modulate synaptic BACE1 activity.

第 56 回日本神経学会学術大会、2015/5/21、新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）

上村麻衣子、植村健吾、木下彩栄、高橋良輔

ApoE Isoforms Differentially Affect Amyloid beta-Induced Synaptic Toxicity

第 56 回日本神経学会学術大会、2015/5/21、新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）

陣上直人、浅田めぐみ、植村健吾、能登理央、高橋牧郎、尾崎彰彦、木原武士、景山卓、高橋良輔、下濱俊、木下彩栄

特発性正常圧水頭症はアルツハイマー病と異なるバイオマーカープロファイルを持つ疾患である

第 16 回日本正常圧水頭症学会、2015/2/28、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）

浅田めぐみ、久保田正和、野田泰葉、上田奈津実、諏訪あゆみ、田代喜崇、上村麻衣子、山門穂高、下濱俊、高橋良輔、植村健吾、

木下専、木下彩栄

Increased synaptic density and improved spatial memory in N-cadherin shedding deficient knock-in mice.

第 37 回日本神経科学大会、2014/9/11、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

宮本将和、小形美果、浅田めぐみ、高橋良輔、植村健吾、木下彩栄

アルツハイマー病への酸化ストレスの影響に対する神経保護物質の抵抗性の in vitro での検証

第 55 回日本神経学会学術大会、2014/5/23、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

宮本将和、小形美果、浅田めぐみ、高橋良輔、植村健吾、木下彩栄

Analysis of effect of neuroprotective agents on oxidative stress in association with Alzheimer's disease in vitro.

第 37 回日本神経科学大会、2014/9/11、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件) 取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植村 健吾 (UEMURA, Kengo)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：00378663

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

木下 彩栄 (KINOSHITA, Ayae)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80321610

(4) 研究協力者