

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893042

研究課題名(和文) 神経-グリア細胞間Eph/ephrinシグナルによるA $\beta$ 量制御機構の解析研究課題名(英文) The functional role of Eph/ephrin signal as neuron-glia communication in the regulation of brain A $\beta$  level

研究代表者

堀 由起子 (Hori, Yukiko)

東京大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80610683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の原因分子であるアミロイドペプチド(A $\beta$ )の脳内量制御機構の解明は重要である。本研究では、主に神経-グリア細胞間コミュニケーションという観点からEphA4/ephrinシグナルに着目し、新規A $\beta$ 量制御機構を明らかにすることを目的に研究を行った。本研究をとおし、EphA4/ephrinシグナルによって、A $\beta$ 産生酵素の一つBACEの蛋白量変動を介したA $\beta$ 産生量調節機構があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) is linked to the pathogenesis of Alzheimer disease (AD). Therefore, it is important to reveal the mechanistic insights underlying regulation of brain A $\beta$  level. In this research, we examined the functional role of EphA4/ephrin signal as neuron-glia communication in the regulation of brain A $\beta$  level. We found that EphA4/ephrin signal modulates the A $\beta$  level by altering the protein level of BACE, which is a limiting enzyme for A $\beta$  production.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳神経疾患 神経科学 アルツハイマー病

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む現代社会においてアルツハイマー病 (AD) は大きな社会問題となりつつあり、AD 発症機構の解明とその機構に基づいた根本治療法の確立が急務となっている。

AD の発症メカニズムとして広く支持されている「アミロイド仮説」は、神経細胞から産生されるアミロイドβペプチド (Aβ) が異常に線維化・蓄積することによって、神経細胞に対し障害性を発揮するというものである。そのため、AD 発症の原因分子である Aβ の脳内における量を制御する分子機構の詳細な解明は、AD 発症メカニズムの解明に繋がると共に、根本治療法確立にむけた標的分子機構となると考えられる。

これまでこのアミロイド仮説に基づいて、Aβ 産生に関する多くの研究が神経細胞を用いて行われてきたが、Aβ 産生機構をグリア細胞の側から明らかにした研究はほとんどない。しかし近年、「神経 - グリア細胞間コミュニケーション」という神経細胞とグリア細胞の間に機能的相互関係があるという概念が提唱され、実際にグリア細胞も神経活動の制御に積極的に関与することが報告され始めている。このことは、グリア細胞も神経細胞機能に影響を及ぼすことで Aβ 産生機構に関与する可能性を示唆している。そのため、神経細胞のみに注目した研究だけでなく、神経 - グリア細胞間コミュニケーションの異常が病態形成・疾患発症に関与するかどうか、またその分子メカニズムについての研究が注目されている。

### 2. 研究の目的

過去の研究室内外の実験結果から、EphA4/ephrin シグナルによる神経 - グリア細胞間コミュニケーションが存在すること (Filosa et al., Nat. Neurosci., 2009) またそのシグナルの異常がシナプス機能、ひいては AD に関与する可能性があること (Shen L, et al., Neuroimage, 2010, Simón et al., J. Alzheimer's Dis., 2009, Shiohara et al., 未発表データ) が示唆されている。そこで我々は、特に EphA4/ephrin シグナルに着目して研究を行うこととした。EphA4/ephrin シグナルによる神経 - グリア細胞間コミュニケーションが脳内 Aβ 量の制御に関与する可能性を検証すること、またその分子メカニズムを解明することを目的に解析を行った。

### 3. 研究の方法

EphA4 シグナルが Aβ 量に及ぼす影響を検討するために、初代培養細胞や成体マウス、あるいはマウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞を用いて、薬剤投与によるシグナル阻害や過剰発現・ノックダウンの手法によって EphA4 シグナルを変化させ Aβ 量の変化を評価した。また

同時に、分子メカニズムの検討のために、特に Aβ 産生に関与する分子に着目してウェスタンブロット解析を行い、蛋白量を評価した。

さらに、EphA4 自体の代謝と AD の関連について、特に細胞外領域のプロテアーゼによるシェディングに着目して検討した。初代培養細胞を用い、Aβ 刺激時の EphA4 のシェディングの変化について、conditioned medium に放出された sEphA4 断片量をウェスタンブロットにより評価した。

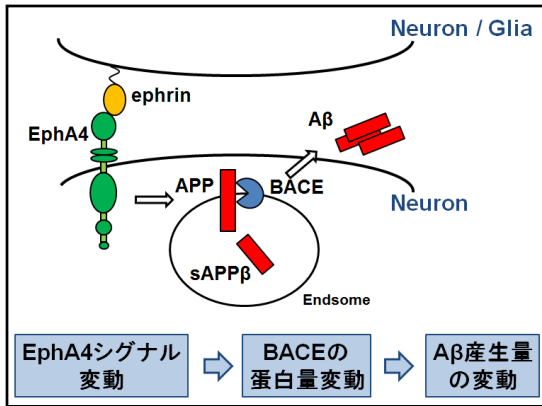
### 4. 研究成果

まず、EphA4 シグナルが Aβ 量の制御に関与しているかを検討するために、初代培養細胞に対し EphA4 阻害剤である KYL ペプチドを投与し、Aβ 量を評価した。その結果、KYL ペプチド投与量依存的に Aβ 量が上昇することを見出した。この Aβ 量の変化は、初代培養神経細胞単独時には観察された一方で、初代培養グリア細胞単独時には観察されなかった。このことから、KYL ペプチドによる Aβ 量上昇にはグリア細胞ではなく神経細胞内のシグナルが関与していることも明らかになった。また、この現象が *in vivo* においても再現されるかどうかを、成体マウスの脳内に KYL ペプチドをインジェクションして検討した。その結果、KYL ペプチド投与側の海馬において内因性脳内 Aβ 量の増加が観察され、*in vivo* においても KYL ペプチドによる Aβ 量制御機構が存在することが示唆された。

さらに、KYL ペプチドによるこれらの結果が EphA4 シグナルの変化を介しているかどうかを検討するために、EphA4 の過剰発現実験を行った。マウス神経芽細胞腫である Neuro2a 細胞を用いて、EphA4 恒常発現細胞を取得し Aβ 量を定量したところ、EphA4 の過剰発現により Aβ 量が減少した。これらの結果は、EphA4 シグナルの阻害により Aβ 量が上昇し、活性化により Aβ 量が減少するという、神経細胞の EphA4 シグナルによる Aβ 量制御機構が存在することを示唆している。

さらにその詳細な分子メカニズムについて検討するために、KYL ペプチド投与時における Aβ 産生過程に関与する蛋白質の量をウェスタンブロットにより解析した。その結果、KYL ペプチド投与により、Aβ 前駆体蛋白質 APP の切断酵素である BACE の蛋白量が増加していることが明らかになった。同実験条件において qRT-PCR により BACE mRNA 量の定量を行ったが、BACE mRNA 量に変化はなかったことから、この蛋白量の変化は分解抑制によるものではないかと推測される。

以上から、図に示すように、我々は EphA4 シグナルにより BACE の分解制御を介した Aβ 産生量の調節機構が存在することを新規に明らかにした。



一方で、EphA4 の研究を進める過程で、我々は EphA4 が細胞外領域でプロテアーゼによりシェディングを受け、N 末端側が sEphA4 として細胞外に放出されることを見出した。EphA4 は細胞外領域を介してリガンドである ephrin と結合することでシグナルをながすことから、EphA4 細胞外領域のシェディングは ephrin との相互作用を失い、EphA4/ephrin シグナルの減少に繋がると考えられる。そこで、このシェディングがどのようなメカニズムで引き起こされるのか、AD との関連はあるのかについて検討した。

まず EphA4 のシェディングと AD との関連を検討するために、月齢依存的に脳内に Aβ アミロイド蓄積を生じる AD モデルマウスにおいて、脳内 sEphA4 量の変化を月齢ごとに検討した。Aβ アミロイド蓄積が生じ始める月齢において、野生型マウスと比較し AD モデルマウスで sEphA4 量が増加し、シェディングが亢進していることを見出した。さらに、EphA4 は神経細胞・グリア細胞共に発現していることから、どちらの細胞において EphA4 シェディングが亢進しているかを検討するために、初代培養細胞を用いて Aβ 刺激実験を行った。初代培養神経細胞とグリア細胞を個別に培養し、AD において毒性分子種と考えられている Aβオリゴマーをそれぞれ投与すると、神経細胞ではなくグリア細胞特異的に、Aβオリゴマーによって EphA4 のシェディングが亢進していることが明らかになった。

EphA4 シェディングの責任酵素を明らかにするために、メタロプロテアーゼである ADAM ファミリーに着目した。各種 ADAM をノックアウトしたマウス由来不死化線維芽細胞に EphA4 を発現させ、その切断効率を評価したところ、Adam10 ノックアウト細胞において EphA4 切断効率が減少することがわかった。この結果は、EphA4 の切断には ADAM10 が関与していることを示唆している。

AD モデルマウスや AD 患者脳内において、グリア細胞は Aβ アミロイド斑の周囲に集積して活性化していることが知られている。我々の実験結果は、このような Aβ アミロイド斑周囲において、グリア細胞に発現する EphA4 の ADAM10 を介したシェディング効率が

変化し、EphA4 シグナルが変化している可能性を示している。

本研究において、従来の研究とは異なりグリア細胞の観点から研究を進めたことにより、新たな Aβ 産生調節機構と EphA4 の代謝機構を明らかにすることができた。今後は、両機構が相互に関連しているかどうかを中心に解析を進め、グリア細胞を介した Aβ 産生調節機構のさらなる詳細な分子メカニズムを検討したい。

## 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2件)

1. Hori Y, Hashimoto T, Nomoto H, Hyman BT, Iwatsubo T: Role of Apolipoprotein E in  $\beta$  Amyloidogenesis: Isoform-specific effects on protofibril to fibril conversion of A $\beta$  in vitro and brain A $\beta$  deposition in vivo. *J Biol Chem.*, 査読有り, 290(24): 15163-15174, 2015, doi: 10.1074 / jbc.M114.622209.
2. Hori Y, Takeda S, Cho H, Wegmann S, Shoup TM, Takahashi K, Irimia D, Elmaleh DR, Hyman BT, Hudry E: A FDA-approved asthma therapeutic agent impacts amyloid  $\beta$  in the brain in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.*, 査読有り, 290(4): 1966-1978, 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.586602.

[学会発表](計2件)

1. 田村 謙典、堀 由起子、富田 泰輔: EphA4 を介したアルツハイマー病原因物質 Aβ 産生量制御機構の解明, 第 14 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015, 2015 年 9 月 12 日, 千葉大学亥鼻キャンパス 医薬系総合研究棟, 千葉
2. Hori Y, Takeda S, Cho H, Wegmann S, Shoup TM, Takahashi K, Irimia D, Elmaleh DR, Hyman BT, Hudry E: A FDA-approved asthma therapeutic agent impacts amyloid  $\beta$  in the brain in a transgenic model of Alzheimer disease. The 12<sup>th</sup> international conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases (AAIC), March 18-22, 2015, Nice, France

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neuropsch/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 由起子 (Yukiko Hori)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：80610683