

in cultured cortical neurons. *Mol Neurodegener*, 6: 47, 2011.

学会発表

1) Michikawa M.

Isoform-dependent functions of apolipoprotein E and Alzheimer disease
Invited speaker, the department seminar at Mayo Clinic

June 8, 2011, Jacksonville, FL, USA

2) Michikawa M.

Isoform-dependent and -independent functions of apolipoprotein E and Alzheimer disease
The International Conference of Korean Society for Gerontology, July 9, 2011, Busan, Korea.

3) Michikawa M., Hosono T, Mouri A, Nishitsuji K., Nakamura T., Jung C.G., Kontani M., Tokuda H, Kawashima H, Kiso Y, Nabeshima T.

Arachidonic acid diet prevents memory impairment and brain Abeta deposition in Tg2576 mice.

Symposium: PUFA and its derivatives-brain, neuroprotective agents for senescence, ISN-ESN, Athens, Greece, Aug 30, 2011.

4) Michikawa M.

ApoE dependent and independent Abeta clearance pathways in the brain.
Mount Sinai University, School of Medicine, January 6, 2012, New York, NY, USA

5) Zou K, Liu J, Watanabe A, Liu S, Tanabe C, Maeda T, Oba R, Michikawa M., Komano H. Two active domains of ACE are essential for Abeta43-converting activity. ISN-ESN, Athens, Greece, Aug 31, 2011.

6) 道川 誠

アルツハイマー病分子病態ならびに認

知機能障害に対する不飽和脂肪酸経口摂取の影響 日本基礎老化学会第 34 回大会 シンポジウム「脳機能と健康食品、漢方」2011 年 6 月 17 日、東京

7) Liu JJ, Liu S, Watanabe A, Tanabe C, Maeda T, Michikawa M, Zou K, Komano H.

Abeta43-converting activity requires two active domains of ACE

日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都

8) 道川 誠

Isoform-dependent functions of apolipoprotein E in cholesterol transport and Alzheimer disease.

日本生化学会大会 シンポジウム "Cholesterol in brain diseases" 2011 年 9 月 23 日、京都

9) 星野瞳、新美しおり、細野知美、道川 誠、神奈木玲児、内村健治
セレクチンリガンド形成に関わる硫酸転移酵素は生後マウス発達脳における 5D4 ケラタン硫酸糖鎖抗原の発現を制御する
日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都

10) 新美しおり、星野瞳、細野知美、道川 誠、内村健治
アルツハイマー病モデルマウス脳に発現するコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカンの構造解析

日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都

11) 道川 誠

アルツハイマー病研究の進歩—特に脂質代謝と関連して

第 19 回東北老年期認知症研究会

平成23年11月26日 仙台

- 12) 新美しおり、星野瞳、細野友美、
道川誠、内村健治

アルツハイマー病モデルマウス脳に発
現する細胞外マトリックスコンドロイ
チン硫酸糖鎖の構造解析

日本認知症学会、平成23年11月1
1日、東京

- 13) 安野史彦、谷向知、佐々木恵、日高真、
池嶋千秋、山下典生、児玉千穂、水上
勝義、道川誠、朝田隆

高齢者認知機能の経時変化に及ぼす血
中脂質濃度、血圧およびApoE遺伝子多
型の影響 日本認知症学会、平成23年

11月11日、東京

- 14) 山内玲奈、ゾウクン、鄭且均、
道川誠 The renin-angiotensin system
modulates APP and ApoE metabolism.

日本認知症学会、平成23年11月1
1日、東京

- 15) 吉池裕二、及川尚人、道川誠、滝川修、
高島明彦、柳澤勝彦

タウ関連病態に影響をおよぼす因子の
解析 日本認知症学会、平成23年11
月11日、東京

H. 特許申請
なし

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

(分担)研究報告書

A β 産生分子機構の解明と特異的制御法による治療法の開発

研究分担者: 富田泰輔 東京大学大学院薬学系研究科

研究要旨

A β は前駆体タンパク APP より、 β および γ セクレターゼによる切断を受け産生・分泌される。この A β 産生システムはいずれも膜タンパクであり、細胞膜脂質環境と小胞輸送系に大きく影響を受けることが知られている。申請者はこれまでに、 β セクレターゼがスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 代謝系、 γ セクレターゼがセラミド代謝系の影響をうけることを明らかにした。一方、孤発性アルツハイマー病の成因については未だ明らかにされていないが、近年の GWAS 解析により、BIN1、PICALM、CD2AP など小胞輸送関連分子遺伝子の SNP がアルツハイマー病発症リスクと相関することが示され、発症メカニズムと細胞内小胞輸送経路の変容が示唆された。すなわち、神経細胞膜脂質および小胞輸送の変容が A β 産生に影響を与え、ひいてはアルツハイマー病発症に関わるという分子機構が想定された。そこで本研究においては、セクレターゼ活性を制御するこれら膜脂質代謝経路および小胞輸送系に関わる分子群を解析し、その活性を制御する低分子化合物を開発することで、新規アルツハイマー病治療薬の開発を目指す。

A. 研究目的:

本研究計画においては、神経細胞膜脂質組成及び小胞輸送系に着目し A β 産生を選択的に阻害する創薬標的分子の同定と低分子化合物のスクリーニングを行う。本年度は具体的に、1) S1P 代謝経路による A β 制御機構の分子機構解明と *in vivo* における治療効果の解析、2) GWAS より同定された孤発性 AD の遺伝学的危険因子の機能解明、の 2 点について解明を進めた。

B. 研究方法

①S1P 代謝経路に関連する低分子化合物群の作用点を検討すると同時に A β 産生に影響を与える新規 GPCR の同定を目指し、RNAi によるスクリーニングを行った。

②GWAS 解析より AD の遺伝学的危険因子と同定された遺伝子のうち、BIN1 (Bridging integrator 1) および PICALM

(Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) の発現変動が A β 産生および各セクレターゼ代謝・局在化に与える影響について精査した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については当施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果

① β セクレターゼ活性を変化させる化合物 SKI II、ABC294640、THI の前臨床試験に向けてトランスジェニックマウス A7 の個体数を増やした。またこれまでに Notch 切断を保ちながら $A\beta$ 産生を低下させる各種 γ セクレターゼモジュレーターとして、S1P 受容体アゴニスト/機能的アンタゴニストである FTY720 を同定していたが、同様の化学構造をもつ KRP-203 も同様の $A\beta$ 産生抑制効果を示した。一般的に FTY720 の標的分子として S1P1 受容体が考えられているが、S1P1 のノックダウンは $A\beta$ 産生に大きな影響を与えなかった。そこで文献的に S1P をリガンドとすることが報告されている各種 GPCR の RNAi ライブラリーを用いて $A\beta$ 産生に対する影響と FTY720 に対する感受性への変化を検討した。その結果、GPR6、GPR12、EDG3 のノックダウンにより FTY720 による $A\beta$ 産生効果が失われた。

② GWAS 解析より孤発性 AD 患者において BIN1 および PICALM 遺伝子近傍に存在する SNP が遺伝学的危険因子として同定された。ともにタンパク質をコードする領域ではなかったことからこれらの SNP は発現量に影響を与えている可能性が指摘された。そこで BIN1、PICALM のノックダウン及び過剰発現により $A\beta$ 産生に影響を与えるか否かについて検討したところ、BIN1 のノックダウンは C99 産生及び $A\beta$ 産生を有意に上昇させたことから、 β セクレターゼ活性を亢進させることが明らかとなった。その時に BACE の発現量が上昇していることも明らかとなった。一方、PICALM のノックダウンは $A\beta$ 42 産生比率を有意に抑制する

こと、逆に過剰発現によって $A\beta$ 42 産生比率が上昇することが明らかとなった。イメージング解析から、PICALM の発現量は γ セクレターゼの細胞内在化の速度を決定していることが明らかとなった。

D. 考察

① FTY720、KRP-203 がともに GSM として機能したことから、S1P 受容体を介したシグナル経路が $A\beta$ 産生を制御していることが示唆された。その作用点として、GPR6、GPR12、EDG3 のいずれかが考えられた。いずれもオーファン受容体であり、その特異的リガンドや低分子化合物の開発はアルツハイマー病治療薬開発につながる可能性がある。

② BIN1 は β セクレターゼの発現量を、PICALM は γ セクレターゼの局在化を変化させることによって $A\beta$ 産生レベルを調節していることが示唆された。特に BIN1 は Phosphoinositide との結合が、また PICALM は PI(4,5)P との結合がその機能との関連について知られている。今後これらの脂質代謝を含めて、BIN1 や PICALM の分子機構に関連する分子は新規創薬標的となる可能性が考えられた。

E. 結論

① FTY720、KRP-203 は新規アルツハイマー病治療薬となる可能性がある。また GPR6、GPR12、EDG3 関連分子は治療薬開発における新規創薬標的分子である。

②GWAS 解析より見出された BIN1、PICALM はそれぞれ β 、 γ セクレターゼの発現や局在を変化させることによって A β 産生レベルを調節、ひいてはアルツハイマー病発症に関与している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Tomita T*, Iwatsubo T: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate in neurons. *J Neurosci* 31:6850-6857, 2011
- 2) Miyashita H, Maruyama Y, Isshiki H, Osawa S, Ogura T, Mio K, Sato C, Tomita T*, Iwatsubo T: Three dimensional structure of signal peptide peptidase. *J Biol Chem* 286:26188-26197, 2011
- 3) Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Funamoto S, Ihara Y, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T*, Iwatsubo T: Phenylpiperidine-type γ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J* 30(23):4815-24, 2011

- 4) Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S: Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 γ -secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem* 52:44569-44575
 - 5) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T*, Iwatsubo T: Neutralization of the γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* doi: 10.1038/onc.2011.265 in press.
- ### 2. 学会発表
- <海外>
- 1) Tomoki Sasaki, Nobumasa Takasugi, Satoko Osawa, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Functional analysis of a novel domain modulating γ -secretase-mediated cleavage within amyloid precursor protein. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
 - 2) Shizuka Takagi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: The monoclonal antibody targeting the

- juxtamembrane region of TMD1 of Presenilin 1 decreases the γ -secretase activity. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
- 3) Taisuke Tomita, Shizuka Takagi, Takeshi Iwatsubo: The α -helical structure of the hydrophilic loop1 of presenilin 1 contributes to the formation of the substrate binding site. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
 - 4) Taisuke Tomita, Nobumasa Takasugi, Tomoki Sasaki, Satoko Osawa, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Virginia Lee, John Trojanowski, Takeshi Iwatsubo: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. The Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2011, July 16-21, 2011, Paris, France
 - 5) Taisuke Tomita: Notch-Notch ligand interactions modulate the levels of synaptic vesicle proteins in neurons. The Notch Meeting. October 2-6, 2011, Athens, Greece
 - 6) Kunimichi Suzuki, Yukari Hayashi, Soichiro Nakahara, Ryuta Koyama, Norio Matsuki, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Proteolytic processing of neuroligin 1 modulates its spinogenic function. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
 - 7) Aya Tominaga, Shizuka Takagi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Structural analysis of transmembrane domain 4 of Presenilin 1, a catalytic subunit of γ -secretase. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
 - 8) Yuichi Morohashi, Kunihiro Kanatsu, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: PICALM impacts the production and secretion of A β 42 in cultured cells. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
- <国内>
- 1) Sho Takatori, Ikuo Hayashi, Takeshi Kawamura, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, Takeshi Iwatsubo, Taisuke Tomita: γ -Secretase interacting tetraspanin protein CD81 is involved in the internalization of the γ -secretase and its substrates to the endocytic compartment. 2011 年 6 月 28 日～7 月 1 日 第 30 回内藤カンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学[II]脂質ドメイン、

脂肪滴、疾患 札幌

- 2) Kunihiko Kanatsu, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo:
The role of phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (PICALM) in the metabolism of amyloid precursor protein. 2011 年 6 月 28 日～7 月 1 日 第 30 回内藤カンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学 [III]脂質ドメイン、脂肪滴、疾患 札幌
- 3) 大木優、肥後拓也、島田尚明、大沢智子、福山透、横島聡、富田泰輔、岩坪威: γ セクレターゼモジュレーター-GSM-1 のアミロイドペプチド切断調節機構の解析 2011 年 11 月 11 日-13 日 第 30 回 日本認知症学会学術集会 東京
- 4) 山下雄大、一色隼人、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: Notch の γ セクレターゼ切断を制御する XPR1 の機能解析 2011 年 11 月 11 日-13 日 第 30 回 日本認知症学会学術集会 東京
- 5) 一色隼人、山下雄大、石渡智之、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: Identification and functional analysis of a genetic regulator for γ -secretase substrate trafficking. 2011 年 11 月 11 日-13 日 第 30 回 日本認知症学会学術集会 東京
- 6) 竹尾浩史、谷村瞬、ザハリエブイヴァンクラスイミロブ、横島聡、福山透、富田泰輔、岩坪威: 光親和性標識を用いたフェニルイミダゾール型 γ セクレターゼモジュレー

ターの作用標的分子の同定 2011 年 11 月 11 日-13 日 第 30 回 日本認知症学会学術集会 東京

- 7) 石渡智之、一色隼人、桑原知樹、諸橋雄一、三谷昌平、富田泰輔、岩坪威:
Functional analysis of *sft-4* in the *C. elegans* Notch pathway. 2011 年 11 月 11 日-13 日 第 30 回 日本認知症学会学術集会 東京
- 8) Hayato Isshiki, Yuta Yamashita, Tomoyuki Ishiwata, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo:
Identification and functional analysis of a genetic regulator for the trafficking of γ -secretase substrate. 2011 年 11 月 14-15 日 第 6 回日本 Notch 研究会 野田
- 9) Kunihiko Kanatsu, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo:
PICALM regulates the endocytosis of γ -secretase. 2011 年 11 月 14-15 日 第 6 回日本 Notch 研究会 野田
- 10) Koji Takeo, Shun Tanimura, Ivan Krasimirov Zahariev, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo:
Molecular target of phenylimidazole-type γ -secretase modulators. 2011 年 11 月 14-15 日 第 6 回日本 Notch 研究会 野田

11) Tomoyuki Ishiwata, Hayato Isshiki,
Tomoki Kuwahara, Yuichi Morohashi,
Shohei Mitani, Taisuke Tomita,
Takeshi Iwatsubo: Functional analysis
of *sft-4* in the *C. elegans* Notch
pathway. 2011 年 11 月 14-15 日 第 6
回日本 Notch 研究会 野田

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

(分担)研究報告書

A β 分解調節

西道 隆臣

理化学研究所脳科学総合研究センター

研究要旨

これまで、A β 分解酵素ネプリライシンが脳内のA β 定常量を規定すること、また、加齢に伴うネプリライシンの発現低下が孤発性アルツハイマーの原因に寄与する可能性を示してきた。ネプリライシンは、II型の膜結合タンパク質であり、細胞質領域に幾つかの潜在的リン酸化サイトがある。ネプリライシンの細胞表面局在に対するリン酸化の影響を調べたところ、6番目のセリンのMEKによるリン酸化がこれを抑制すること、また、protein phosphatase-1a (PP1a)による脱リン酸化によって局在が回復することを見いだした。ネプリライシンのリン酸化を抑制すること、あるいは、脱リン酸化を促進することは、ネプリライシンの細胞表面局在を増加させることによって、A β レベルを低下させることが期待される。神経ペプチドソマトスタチンはネプリライシンの細胞表面局在を増加させることによって脳内のA β レベルを低下させる。ソマトスタチンが、PP1aの活性を制御する可能性があるので、今後、この点を検討し、そのメカニズムを明らかにする。これによってソマトスタチンの作用機所が明らかになることが期待される。

A. 研究目的：

本研究では、ADの発症に深く関与するA β の脳内における代謝を制御する神経ペプチド-受容体-シグナル伝達システムを同定し、その機構を明らかにする。さらに、新しい次世代型ADモデルマウスを作製する。これにより、脳内A β レベルを制御することによって、アルツハイマー病の予防と治療に応用することを目的とする。

B. 研究方法

ソマトスタチンとは逆の作用を有する神経成長因子(BDNF, NT-3, NT-4)の作用機所について、ネプリライシンの細胞質領域のリン酸化に注目し、検討する。ネプリライ

シンには、潜在的リン酸化サイトが5カ所ある。それぞれについて、リン酸化ペプチド特異的抗体を作製し、リン酸化部位を決定する。また、潜在的リン酸化部位(セリン残基・スレオニン残基)をアラニンに置換した変異体を作製することによって、リン酸化・脱リン酸化の作用を明らかにする。次世代型動物モデルについては、APPを過剰発現せずにA β 42を過剰産生する動物を樹立し、ソマトスタチン受容体サブタイプ欠損マウスと交配する。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。特に動物実験については当

研究施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果

神経成長因子 (BDNF, NT-3, NT-4) が、受容体活性化を介して、細胞表現に局在するネプリライシンの量を減少させた。ネプリライシンの細胞質領域には5つの潜在的リン酸化部位が存在するが、この際に、N末端から6残基目のセリンがリン酸化された。このリン酸化は、MEK 阻害剤 U0126 によって抑制された。ネプリライシンのリン酸化に伴って、細胞外の A β レベルが上昇し、これも U0126 によって抑制された。さらに細胞質領域に存在する5つの潜在的リン酸化部位をアラニンに置換したところ、6残基目のセリンを置換した場合にのみ、細胞表面のネプリライシンが増加した。また、25残基目のスレオニンを置換するとネプリライシンの存在自体が消失した。次に、脱リン酸化酵素について阻害剤を用いて検討したところ *tautomycin* が6位のセリンの脱リン酸化を顕著に抑制した。さらに、脱リン酸化酵素 PP1a とその活性化体を細胞に発現すると、リン酸化レベルが減少し、ネプリライシンの細胞表面局在を増加させ、培地中の A β を減少させた。動物モデルについては、次世代型 AD モデルマウスは作成済みで、ソマトスタチン受容体欠損マウスも導入は完了しており、現在、これらの交配を行っているところである。

D. 考察

A β 分解酵素ネプリライシンの細胞質ドメインにおいて、6残基目のセリンが MEK に

よってリン酸化され、PP1a によって脱リン酸化されると考えられる。リン酸化によって、細胞表面のネプリライシンが減少し、その結果、培地中の A β が上昇したと考えられた。逆に、脱リン酸化を促進すると、細胞表面のネプリライシンが増加し、その結果、培地中の A β が減少したと考えられる。ソマトスタチン受容体と PP1a がカップリングしているという報告があることから、ソマトスタチンの作用は PP1a を介する可能性が考えられる。

E. 結論

A β 分解酵素ネプリライシンは、その細胞質領域における第6残基目のセリンのリン酸化と脱リン酸化によって細胞表面局在が制御される。これらのシグナル伝達系を制御することにより、脳内の A β レベルをコントロールすることが出来る可能性がある。また、ソマトスタチン受容体活性化がホスファターゼ PP1a 活性とカップルしているという報告があるので、ソマトスタチン受容体サブタイプ特異的なアゴニストも有力な薬剤の候補となると期待される。この点については、AD モデルマウスとソマトスタチン受容体欠損マウスを交配させたものの表現型によって、明らかになるであろう。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito, T., Suemoto, T., Brouwers, N., Sleegers, K., Funamoto, S., Mihira, M., Matsuba, Y., Yamada, K., Nilsson, P., Takano, J., Nishimura, M., Iwata, N., Van Broeckhoven, C., Ihara, Y., Saido, T.C.

(2011) Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat. Neurosci.*, 14, 1023-1032.

2. Takano, J., Mihira, N., Fujioka, R., Hosoki, E., Chishti, A.H., Saido, T.C. (2011) Vital role of the calpain-calpastatin system for placental integrity-dependent embryonic survival. *Mol. Cell Biol.*, 31, 4097-4106.
3. Asai, M., Yagishita, S., Iwata, N., Saido, T.C., Ishiura, S., Maruyama, K. (2011) An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J.*, 25, 3720-3730.
4. Yahata, N., Asai, M., Kitaoka, S., Takahashi, K., Asaka, I., Hioki, H., Kaneko, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H. (2011) Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One.*, 6, e25788.
5. Ryu, M., Yasuda, M., Shi, D., Shanab, A.Y., Watanabe, R., Himori, N., Omodaka, K., Yokoyama, Y., Takano, J., Saido, T., Nakazawa T. (2011) Critical role of calpain in axonal damage-induced retinal ganglion cell death. *J. Neurosci. Res.*, in press.
6. Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Takano, J., Suemoto, T., Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., Saido, T.C. (2011) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.*, in press.

2. 学会発表

<海外>

1. Saido, T.C. Effect of Neprilysin deficiency on deposition of pyroglutamy amyloid β peptide and apolipoprotein E in ATT-Tg mice. 10th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease (AD/PD 2011), Barcelona, Spain 2011, 3.
2. Saido, T.C. Metabolism of amyloid β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. The 5th Annual Meeting of Korean Society for Neurodegenerative Diseases-A New Perspective on Neurodegenerative Disease. Seoul, Korea, 2011, 10.

<国内>

1. 西道隆臣. アミロイド代謝ダイナミクスとアルツハイマー病. 認知症研究を知る若手研究者の集まり, 大府, 日本, 2011, 7.
2. Saido, T.C. Catabolism and anabolism in amyloid β peptide. AACL-Nagasaki Symposium: Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration: Molecular Perspective and Regional Bridging, Nagasaki, Japan, 2011, 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

タウの異常病理を再現する新しい細胞モデルの構築

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：野中隆¹⁾、宮田悠^{1, 2)}、久永真市²⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室

²⁾ 首都大学東京 大学院理工学研究科生命科学コース

研究要旨

アルツハイマー病(AD)をはじめとするタウが蓄積する変性疾患の患者脳不溶性画分を調製し、遺伝子導入試薬を用いて SH-SY5Y 細胞内に導入する実験をおこなった。プラスミドを導入して培養細胞にヒトタウを発現しただけでは、異常タウの凝集、蓄積は観察されなかったのに対し、タウ発現細胞に患者脳不溶性画分を導入した結果、AT8, AT100 陽性のタウの凝集が観察され、界面活性剤不溶性画分にリン酸化タウのバンドの増加が認められた。患者脳不溶性画分の処理だけではバンドが検出されないことから、添加した患者脳不溶性画分に含まれる異常タウがシードとなって細胞内の正常タウが構造変化して蓄積したものと考えられる。

A.研究目的

タウの高リン酸化を再現する培養細胞モデルは多数報告されているが、リン酸化の質、量、ユビキチン化、さらには蓄積の状態や不溶性タウの構造は、実際の AD 患者脳に蓄積するタウのものとは本質的に異なっている。我々は、試験管内で線維化したタウをヒトタウ過剰発現細胞内に導入するという全く新しい方法により、神経系培養細胞内においてもタウのリン酸化、蓄積が起こることを報告した。今年度はこの方法をさらに発展させ、AD を含む変性疾患患者脳に実際に蓄積する異常タウを細胞内に導入する実験を行った。その結果、患者脳由来の分子が、導入された培養細胞内において細胞に発現するヒトタウに構造変化をおこし、異常リン酸化、不溶化する現象が観察された。

B.研究方法

AD 患者剖検脳（側頭葉あるいは頭頂葉）を 1 %

Sarkosyl, 0.8M NaCl を含む緩衝液で可溶化し、1 % Sarkosyl に不溶性を示す画分を調製した。得られた Sarkosyl 不溶性画分をリン酸緩衝液にて洗浄後、少量のリン酸緩衝液にけん濁し、超音波処理により、線維を断片化させ、均一に分散させた。この AD タウシードを、精製したリコンビナントタウと共にインキュベートし、試験管内でのタウの凝集、性質の変化を調べた。また AD シードを SH-SY5Y 細胞、あるいはヒト 4 リピータウを過剰発現する培養細胞に遺伝子導入試薬を用いて導入し、細胞内でのタウの蓄積を調べた。シード添加後 2 日間培養を行った後、細胞を回収し、50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1% Sarkosyl を含む緩衝液で順次可溶化し、得られたそれぞれの画分を電気泳動した。PVDF 膜に転写後、抗タウ抗体 (T46, HT7)、抗リン酸化タウ抗体(pS396)を用いてイムノブロット解析を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。また、剖検脳からの試料調製については当研究所の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 研究結果

1. AD タウシードによる試験管内のタウ凝集

精製リコンビナントタウに約 50 分の 1 量の AD タウシードを添加し、37 度に静置して、タウの凝集を観察した。その結果、AD タウシードを添加したものにおいて、2~3 日後から、高分子領域にタウのバンドやスメア状の反応が認められ、その一部は Sarkosyl 不溶性を示した。一方、シードを添加しないものでは、このような反応は観察されなかった。AD シードによるタウの凝集は、シードを 100℃で 3 分熱処理した場合にもみとめられたことから、タウの凝集促進作用のある分子種は熱安定性であることが示唆された。

2. 培養細胞内への AD シードの導入

SH-SY5Y 細胞にプラスミドを導入し、ヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを発現しても、明らかなタウの凝集体形成、蓄積は観察されない。これに対し、細胞に線維化タウシードを遺伝子導入試薬を用いて細胞内導入すると、Triton 不溶性タウが増加し、一部 Sarkosyl 不溶性タウが検出される。AD 患者から調製したタウシードを培養細胞内に導入したところ、タウを発現していない細胞では、添加した AD タウシードと思われるものが少量検出されただけであったが、ヒトタウを発現する細胞内に導入した結果、Triton, Sarkosyl 不溶性タウの増加が観察された。また不溶性タウは pS396 のリン酸化抗体にも陽性を示した。

E. 考察

今回、線維化タウ、患者脳由来の異常タウを培養細胞内に導入する細胞モデルの構築の可能性が示された。細胞内に発現するタウが重合核（シード）依存的に構造変化を起こすという点でこれまでのタウ凝集モデルとは大きく異なり、全く新規のモデルといえる。本モデル構築できれば、AD をはじめとする変性疾患のタウの異常の多くを再現するだけでなく、その蓄積メカニズムの考え方を根本的に変えるものとなる。ただ、患者脳由来の異常タウを細胞内に導入するモデルについては、3R タウと 4R タウの両方を発現する細胞で検討するなど、さらに多くの検討を行う必要がある。また、これまで試験管内におけるタウの凝集を阻害する効果を示されている低分子化合物を、シードを導入する新規細胞モデルに応用し、シード依存性タウの凝集に対する効果と、細胞膜の透過性についての効果を検討する必要がある、モデルが構築できた際には、認可治療薬を中心とする 1500 種類の化合物ライブラリーをスクリーニングし、新規のタウ蓄積抑制化合物を探索する。

F. 結論

試験管モデル、細胞モデルにおいて、正常 4R タウに、AD 脳から抽出した Sarkosyl 不溶性画分を添加することにより、4R タウの凝集の促進が観察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417:

116-121.

2. Foulds PG, et al (2011) Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. FASEB J 25: 4127-37.

3. Foulds PG, et al (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. Neurobiol Dis 45:188-95.

4. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. J Mol Neurosci 45:480-485

5. Nonaka T and *Hasegawa M (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. Commun & Integ Biol 4, 501-502.

6. Meyerowitz J, et al (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. Mol Neurodegener 6:57.

7. Habuchi C, et al (2011) Clinicopathological study of diffuse neurofibrillary tangles with calcification. With special reference to TDP-43 proteinopathy and alpha-synucleinopathy. J Neurol Sci 301, 77-85.

2. 学会発表

1. Hasegawa M : Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, Melbourne [2011. 8. 2]

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

III.研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	雑誌名	発行元	巻号・ページ	出版年
Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, <u>Michikawa M.</u>	Lipoprotein lipase is a novel A β -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes.	J. Biol. Chem		286: 6393-6401	2011
Nishitsuji K, Hosono T, Nakamura T, Bu G, <u>Michikawa M.</u>	Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain-barrier model.	J. Biol. Chem		286(20): 17536-17542	2011
Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Hidaka S, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, <u>Michikawa M.</u> Asada T.	Association between cognitive function and plasma lipids of the elderly after controlling for apolipoprotein E genotype.	Am. J. Geriat. Psychiat (in press)			
Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara	The dissociation of A β from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease	J. Neurosci. Res		6: 815-821,	2011

Y, Abe K, Shoji M, <u>Michikawa M</u> , Matsubara E.	accelerates A β 42 assembly.				
Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, <u>Michikawa M</u> .	Higher activity of peripheral blood angiotensin-conv erting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease.	J. Neurol. Sci		300: 67-73.	2011;
Marutani T, Maeda T, Tanabe C, Zou K, Araki W, Kokame K, <u>Michikawa M</u> , Komano H.	ER-stress-inducib le Herp, facilitates the degradation f immature nicastrin.	Biochim. Biophys. Acta		1810: 790-8	2011
Hosono-Fukao T, Ohtake-Niimi S, Nishitsuji K, Hossain M, van Kuppevelt TH, <u>Michikawa M</u> , Uchimura K.	RB4CD12 epitope expression and heparan sulfate disaccharide composition in brain vasculature.	J. Neurosci. Res		89: 1840-8	2011
Jung C-G, Uhm K-O, Miura Y, Hosono T, Horike H, Khanna K K, <u>Michikawa M</u> .	Beta-amyloid increases the expression level of ATBF1 responsible for death in cultured cortical neurons.	Mol Neurodeg ener		6: 47	2011
Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y,	BACE1 activity is modulated by cell-associated	<i>J Neurosci</i>	31	6850-685 7	2011

Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Tomita T*, Iwatsubo T	sphingosine-1-phosphate in neurons.				
Miyashita H, Maruyama Y, Isshiki H, Osawa S, Ogura T, Mio K, Sato C, Tomita T*, Iwatsubo	Three dimensional structure of signal peptide peptidase.	<i>J Biol Chem</i>	286	26188-26197	2011
Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Funamoto S, Ihara Y, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T*, Iwatsubo T	Phenylpiperidine-type α -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1.	<i>EMBO J</i>	30	4815-4824	2011
Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S	Comparison of presenilin 1 and presenilin 2 α -secretase activities using a yeast reconstitution system.	<i>J Biol Chem</i>	52	44569-44575	2011
Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Miyake Y, Takagi J, Sakata-Yanagimoto M, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T*, Iwatsubo T	Neutralization of the α -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin.	<i>Oncogene</i>		In press	2011
Saito, T., Suemoto, T., Brouwers, N., Sleegers, K., Funamoto, S.,	Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43.	<i>Nat. Neurosci.</i>	14	1023-1032	2011

Mihira, M., Matsuba, Y., Yamada, K., Nilsson, P., Takano, J., Nishimura, M., Iwata, N., Van Broeckhoven, C., Ihara, Y., <u>Saido, T.C.</u>					
Takano, J., Mihira, N., Fujioka, R., Hosoki, E., Chishti, A.H., <u>Saido, T.C.</u>	Vital role of the calpain-calpastati n system for placental integrity-depende nt embryonic survival.	<i>Mol. Cell Biol.</i>	31	4097-410 6	2011
Asai, M., Yagishita, S., Iwata, N., <u>Saido, T.C.</u> , Ishiura, S., Maruyama, K.	An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model	<i>FASEB J.</i>	25	3720-373 0	2011
Yahata, N., Asai, M., Kitaoka, S., Takahashi, K., Asaka, I., Hioki, H., Kaneko, T., Maruyama, K., <u>Saido, T.C.</u> , Nakahata T, Asada T, Yamanaka S, Iwata N, Inoue H.	Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease	<i>PLoS One</i>	6	e25788	2011
Sato, K., Minegishi, S., Takano, J., Plattner, F., Saito, T., Asada, A., Kawahara, H., Iwata, N., <u>Saido, T.C.</u> , Hisanaga, S-I.	Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25	<i>J. Neurochem.</i>	117	505-515	2011

Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Takano, J., Suemoto, T., Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., <u>Saido, T.C</u>	Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology.	<i>FASEB J</i>	in press		2011
Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A and Hasegawa M	Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration.	Biochem Biophys Res Commun	417	116–121.	2012
Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa JI, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G	Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies.	Neurobiol Dis.		In press.	2012
Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann DM, and Allsop D	Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease.	FASEB J	25	4127-37	2011
Foulds PG, Yokota O, Thurston A,	Post mortem cerebrospinal	Neurobiol Dis	45	188-95	2011