

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09664

研究課題名（和文）アルツハイマー病における病因関連分子の分子種依存的なミトコンドリア障害の解析

研究課題名（英文）Analyses of mitochondrial dysfunction depending on the species of pathogenic molecules in Alzheimer's disease

研究代表者

玉岡 晃（Tamaoka, Akira）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50192183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト神経芽腫細胞由来のSH-SY5Y細胞やスウェーデン型のAPP変異を発現したSH-SY5Y細胞において、成熟型A $\beta$ 前駆体（APP）、BACE1、セクレターゼ複合体の構成成分（特にpresenilin1とPEN-2）は、リソゾーム画分に比べてミトコンドリア画分にはほとんど検出できなかった。TFEBのみ過剰発現させた神経細胞では、A $\beta$ 分泌量は対照よりも減少し、これはADAM10レベルの増加によるためと考えられた。APPまたは $\gamma$ -CTFを過剰発現させた神経細胞では、TFEB過剰発現によりA $\beta$ 分泌量は有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADではA $\beta$ のフリーラジカル化した毒性構造体が増加している事やA $\beta$ オリゴマーがミトコンドリア障害性に作用する事が示されて来た。本研究では、AD発症における病因関連分子であるA $\beta$ がAD発症を促進する機序に関して、特にミトコンドリアとの関係を中心に解析した。SH-SY5Y細胞を用いた実験により、APPよりのA $\beta$ の産生は、ミトコンドリアにおいては生じていないものと考えられた。また、APPの細胞内代謝を解析では、TFEBによるALP促進がA $\beta$ 分泌量に与える影響は、主に $\gamma$ -CTFレベルの変化によるものと考えられた。今後は、酸化ストレスやミトコンドリア障害とALPやTFEBとの関係を解析する必要がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether Amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) is generated locally from amyloid precursor protein (APP) within mitochondria by analyzing the expression patterns of APP and related molecules in mitochondria separated from human neuroblastoma SH-SY5Y cells and those expressing Swedish mutant APP. In view of the particularly low expression levels of BACE1,  $\gamma$ -secretase complex proteins, and  $\gamma$ -CTF in mitochondria, we propose that it is unlikely that A $\beta$  generation from APP occurs locally within this organelle. On the other hand, abnormalities of the autophagy-lysosomal pathway (ALP) have been implicated in the pathology of AD. Activation of TFEB (transcription factor EB), a master regulator of the ALP, leads to ALP facilitation. The present study sought to clarify whether TFEB-mediated ALP facilitation influences the process of A $\beta$  generation in neurons, indicating that TFEB-mediated ALP enhancement appears to have dual, but opposite, effects on A $\beta$  production in neurons.

研究分野：神経内科学

キーワード：Alzheimer's disease mitochondria amyloid protein amyloid precursor oxidative stress autophagy lysosome transcription factor EB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) の病因関連分子は脳血管や老人斑に沈着するアミロイド  $\beta$  蛋白 (amyloid  $\beta$  protein; A $\beta$ ) であるが、A $\beta$  がシナプス障害や神経細胞死をきたす機序に関しては未だ解明されていない。また、AD では A $\beta$  のフリーラジカル化した毒性構造体 (毒性 A $\beta$ ) が増加している事や A $\beta$  オリゴマーがミトコンドリア障害性に作用する事が示されて来た。更にまた、AD 最大の遺伝的危険因子はアポリポ蛋白 E (apolipoprotein E: APOE) の  $\epsilon 4$  であり、APOE は AD の疾患感受性遺伝子と考えられている。APOE- $\epsilon 4$  が AD を促進する機序としては、A $\beta$  の凝集促進やクリアランス抑制作用の他に、抗酸化作用の減弱が示唆されている。本研究では、A $\beta$  オリゴマーや毒性 A $\beta$ 、APOE- $\epsilon 4$  の AD 発症における病因関連分子が AD 発症を促進する機序に関して、特にミトコンドリアとの関係を中心に解析することを目的とする。AD 脳ミトコンドリアにおける A $\beta$  や APOE の分子種依存的な分子病態 (A $\beta$  モノマー対 A $\beta$  オリゴマー、通常 A $\beta$  対毒性 A $\beta$ 、APOE-E3 対 APOE-E4) を明らかにすることは、AD の予防や治療法の開発にも結び付く可能性があり、臨床的意義は極めて大きい。

また、AD の病態においては、オートファジー・リソソーム経路 (ALP) の異常が示唆されている一方、転写因子 EB (TFEB) は ALP の主要な調節機能を有しており、その活性化により ALP の機能が亢進することが報告されている。TFEB によって誘導される ALP の促進が神経細胞の A $\beta$  産生過程に及ぼす影響を明らかにすることも、A $\beta$  の分子病態を明らかにする上で重要である。

## 2. 研究の目的

AD の病態にはミトコンドリア機能障害が関与している可能性があり、AD の病因関連物質である A $\beta$  とミトコンドリアとの関係を解析することを目的とした。また、オートファジー・リソソーム経路の活性化による A $\beta$  産生への影響も検討した。

## 3. 研究の方法

まず、ヒト神経芽腫細胞由来の SH-SY5Y 細胞やスウェーデン型の APP 変異を発現した SH-SY5Y 細胞を用いて、ウェスタンブロットにより発現パターンを調べた。

次に、APP の細胞内代謝を解析するために、オートファジー・リソソーム経路 (ALP) の活性化による A $\beta$  産生への影響を検討した。AD の病態においては、ALP の異常が示唆されており、転写因子 EB (TFEB) はその活性化により ALP の機能が亢進する。ラットの大脳皮質初代培養神経細胞を 14 日間培養し、15 日目に対照細胞と野生型 A $\beta$  前駆体蛋白 (APP) を強制発現させた細胞に TFEB を強制発現させた。18 日目に培養細胞をウェスタンブロットにて解析し、培養上清中の A $\beta$  を測定した。

## 4. 研究成果

ヒト神経芽腫細胞由来の SH-SY5Y 細胞やスウェーデン型の APP 変異を発現した SH-SY5Y 細胞において、成熟型 A $\beta$  前駆体 (APP)、BACE1、 $\gamma$  セクレターゼ複合体の構成成分 (特に presenilin1 と PEN-2) は、リソソーム画分に比べてミトコンドリア画分にはほとんど検出できなかった。従って、APP よりの A $\beta$  の産生は、ミトコンドリアにおいては生じていないものと考えられた。

APP の細胞内代謝を解析では、TFEB のみ過剰発現させた場合には、A $\beta$  分泌量は対照よりも減少し、これは ADAM10 レベルの増加によるためと考えられた。APP または  $\beta$ -CTF を過剰発現させた神経細胞では、TFEB 過剰発現により A $\beta$  分泌量は有意に増加していた。

A $\beta$  産生において、この  $\beta$ -CTF 増加の影響が ADAM10 増加の影響を上回るため、A $\beta$  の分泌量は増加するものと推測される。本実験系においては、TFEB による ALP 促進が A $\beta$  分泌量に与える影響は、主に  $\beta$ -CTF レベルの変化によるものと考えられた。今後は、酸化ストレスやミトコンドリア障害と ALP や TFEB との関係を解析する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 73 件)

Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada N, Tamaoka A, Kametani F, Lakshmana MK, Araki W. TFEB-mediated Enhancement of the Autophagy-lysosomal Pathway Dually Modulates the Process of Amyloid  $\beta$ -Protein Generation in Neurons. *Neuroscience*. 2019 Mar 15;402:11-22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.01.010. Epub 2019 Jan 21. 査読有

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Highly Efficient Ultracentrifugation-free

Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018 Nov 1;11:180-190. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015. eCollection 2018 Dec 14. 査読有

Hosaka T, Yamashita T, Teramoto S, Hirose N, Tamaoka A, Kwak S. ADAR2-dependent A-to-I RNA editing in the extracellular linear and circular RNAs. *Neurosci Res*. 2018 Nov 16. pii: S0168-0102(18)30587-X. doi: 10.1016/j.neures.2018.11.005. [Epub ahead of print] 査読有

Terada M, Suzuki G, Nonaka T, Kametani F, Tamaoka A, Hasegawa M. The effect of truncation on prion-like properties of  $\alpha$ -synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* jbc.RA118.001862, 2018 査読有

Mano T, Nagata K, Nonaka T, Tarutani A, Imamura T, Hashimoto T, Bannai T, Koshi-Mano K, Tsuchida T, Ohtomo R, Takahashi-Fujigasaki J, Yamashita S, Ohyagi Y, Yamasaki R, Tsuji S, Tamaoka A, Ikeuchi T, Saido TC, Iwatsubo T, Ushijima T, Murayama S, Hasegawa M, Iwata A. Neuron-specific methylome analysis reveals epigenetic regulation and tau-related dysfunction of BRCA1 in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(45):E9645-E9654, 2017 査読有

Ogawa T, Ishitsuka Y, Koguchi-Yoshioka H, Tanaka R, Fujisawa Y, Ishii A, Tamaoka A, Fujimoto M. Polymyositis induced by PD-1 blockade in a patient in hepatitis B remission. *J Neurol Sci*. 381:22-24, 2017 査読有

Boonruamkaew P, Chonpathompikunlert P, Vong LB, Sakaue S, Tomidokoro Y, Ishii K, Tamaoka A, Nagasaki Y. Chronic treatment with a smart antioxidative nanoparticle for inhibition of amyloid plaque propagation in Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Boonruamkaew P, Chonpathompikunlert P, Vong LB, Sakaue S, Tomidokoro Y, Ishii K. *Sci Rep*. 7(1):3785, 2017 査読有

Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien JP, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, Ayaki T, Ito H, Kaji R, Takahashi R, Yamanaka S, Inoue H. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 9(391), 2017 査読有

Mamada N, Tanokashira D, Ishii K, Tamaoka A, Araki W. Mitochondria are devoid of amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ )-producing secretases: Evidence for unlikely occurrence within mitochondria of  $A\beta$  generation from amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 486(2):321-328, 2017 査読有

Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK, Araki W. The neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Mol Brain*. 10(1):4, 2017 査読有

Mamada N, Tanokashira D, Ishii K, [Tamaoka A](#), Araki W. Mitochondria are devoid of amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ )-producing secretases: Evidence for unlikely occurrence within mitochondria of A $\beta$  generation from amyloid precursor protein. *Biochemical and biophysical research communications* 486: 321-328, 2017 査読有

Terada M, Nakamagoe K, Obara N, Ogawa S, Sakamoto N, Sato T, Nohara S, Chiba S, [Tamaoka A](#). Chronic Graft-versus-host Disease Presenting with Multiple Punctate Intracranial Lesions on Contrast-enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Internal Medicine* 56(3):363-368, 2017 査読有

Yanagiha K, Ishii K, [Tamaoka A](#). Acetylcholinesterase inhibitor treatment alleviated cognitive impairment caused by delayed encephalopathy due to carbon monoxide poisoning: Two case reports and a review of the literature. *Medicine* 96(8):e6125, 2017 査読有

Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, [Tamaoka A](#), Lakshmana MK, Araki W. The neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Molecular Brain*. 10(1):4, 2017 査読有

Masuda T, Ishii K, Seto Y, Hosoya T, Tanaka R, Nakayama T, Iwasaki N, Shibata Y, [Tamaoka A](#). Long-term accumulation of diphenylarsinic acid in the central nervous system of cynomolgus monkeys. *Arch Toxicol* 91(8):2799-2812, 2017 査読有

Mamada N, Nakamagoe K, Shioya A, Furuta J, Sakai N, Ishii A, [Tamaoka A](#). Adult-onset Krabbe disease presenting as acute hemiparesis and progressive demyelination detected by diffusion-weighted imaging. *Journal of the Neurological Sciences* 367:326-328, 2016 査読有

Oikawa T, Nonaka T, Terada M, [Tamaoka A](#), Hisanaga S, Hasegawa M.  $\alpha$ -Synuclein Fibrils Exhibit Gain of Toxic Function, Promoting Tau Aggregation and Inhibiting Microtubule Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 291(29):15046-15056, 2016 査読有

Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, [Tamaoka A](#), Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1). *Mol Ther Methods Clin Dev*. 3:15058. 2016 査読有

〔学会発表〕(計 30 件)

Kenji Sakai, Mitsuharu Ueda, Wakaba Fukushima, [Akira Tamaoka](#), Mikio Shoji, Yukio Ando, Masahito Yamada: CAA-related intracerebral hemorrhage in younger patients: a nationwide study in Japan. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (Osaka) 2019.5.22

Wataru Araki, Kaori Taniguchi, Takuya Araki, Fumiko Yamamoto, [Akira Tamaoka](#), Fuyuki Kametani: Amyloid beta-protein oligomers bind to both NMDA receptor and metabotropic

glutamate receptor 1. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (Osaka) 2019.5.22

Yasushi Tomidokoro, Kazuhiro Ishii, Kazuhiro Irie, Akira Tamaoka: Toxic Abeta conformer and tau in CSF obtained from the cases of AD and controls, a preliminary study. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (Osaka) 2019.5.22

Tomomi Kanazawa, Wakiro Sato, Ben Raveney, Daiki Takewaki, Yuma Yoko, Yuji Takahashi, Akira Tamaoka, Shinji Oki, Takahashi Yamamura: The role of Eomesodermin-expressing T-helper cells in neurodegenerative diseases. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (Osaka) 2019.5.24

Kenji Sakai, Mitsuharu Ueda, Akira Tamaoka, Mikio Shoji, Yukio Ando, Masahito Yamada: Nationwide survey on cerebral amyloid angiopathy in Japan, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 24

Yasushi Tomidokoro, Kazuhiro Ishii, Kazuhiro Irie, Akira Tamaoka: Toxic Abeta conformer and tau in CSF obtained from the cases of AD dementia, a preliminary study, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 25

Takashi Hosaka, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Naoki Hiroes, Akira Tamaoka, Shin Kwak: ADAR2-mediated A-to-I sites in extracellular RNAs as a biomarker of amyotrophic lateral sclerosis, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 26

Naoki Takegami, Hiroyuki Ishiura, Nobue K. Iwata, Hiroyuki Murai, Kyoko Yasaka, Hiroshi Takuma, Akira Tamaoka, Kishin Koh, Yoshihisa Takiyama, Shoji Tsuji, Tatsushi Toda, Jun Goto: Clinical and genetic analysis of three Japanese SPG3A families, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 23

Nobuko Shiraiwa, Go Saito, Sachiko Hoshino, Akira Tamaoka, Norio Ohkoshi: Clinical features of hemichorea-hemiballism, considered as strokerelated movement disorders, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 24

Kazuhiro Ishii, Jyunko Itoh, Tomoyuki Masuda, Yasushi Tomidokoro, Naruhiko Sahara, Takeshi Ikeuchi, Akira Tamaoka: Altered expression of the Tau protein by organic arsenic compounds, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 24

Fumiko Yamamoto, Kaori Taniguchi, Naomi Mamada, Akira Tamaoka, Fuyuki Kametani, Madepalli K. Lakshmana, Wataru Araki: Enhancement of the autophagy-lysosomal pathway modulates the process of beta-amyloid generation, 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(Sapporo), 2018 May 26

K. Nakamagoe, R. Kawakami, T. Koganezawa, S. Yamada, M. Takiguchi, A. Tamaoka. **ABNORMAL SACCADIC INTRUSIONS WITHOUT VISUAL FIXATION IN ALZHEIMER'S DISEASE**, WCN2017, 19 Sep 2017

M. Terada, G. Suzuki, T. Nonaka, F. Kametani, A. Tamaoka, M. Hasegawa. **EFFECT OF TRUNCATION ON ALPHA-SYNUCLEIN PRION-LIKE PROPAGATION**. WCN2017, 20 Sep 2017

Y. Tomidokoro, K. Ishii, K. Irie, A. Tamaoka. **MEASUREMENT OF TOXIC AB CONFORMER IN CEREBROSPINAL FLUID OBTAINED FROM THE CASES OF AD DEMENTIA**, WCN2017, 20 Sep 2017

A. Ishii; M. Yoshida; H. Ueno; K. Kokubo; N. Ohkoshi; A. Tamaoka. **Antioxidants improve**

muscle degeneration process. 21<sup>st</sup> international Congress of World Muscule Society, October 7, 2016.

Ayako Shioya, Madoka Mori-yoshimura, Yasushi Oya, Miho Murata, Masato Hasegawa, Akira Tamaoka, Shigeo Murayama, Yuko Saito : Abnormal splicing of tau transcripts influences neuropathology of myotonic dystrophy. 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 21, 2016, Kobe, Japan

Yasushi Tomidokoro, Takuya Koide, Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka : Analysis of toxic Abeta conformer in human CSF. 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 19, 2016, Kobe, Japan

Kazuhiro Ishii, Shinya Ishihara, Takuya Koide, Tohru Matsuura, Kaori Adachi, Eiji Nanba, Yasushi Tomidokoro, Akira Tamaoka : FMRP and FMR1 mRNA expression in FXTAS and other neurodegenerative disease brain. 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, May 20, 2016, Kobe, Japan

〔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

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：富所康志

ローマ字氏名：Tomidokoro Yasushi

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：講師

研究者番号(8桁): 80447250

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。