

研究課題別評価

1. 研究課題名 :アルツハイマー病から脳の老化制御機構を探る :
新たな Amylospheroid 仮説提唱と検証

2. 研究者氏名 :星 美奈子

3. 研究の狙い :

アルツハイマー病は老人性痴呆の主たる要因であり、高齢化社会に急速に移行する日本において重要な課題である。従来、発症機序は「脳内 β -アミロイド($A\beta$)量が増え老人斑(線維)を作ること」とされてきた。しかし、脳内の $A\beta$ 量や線維量は必ずしも臨床症状と対応せず、 $A\beta$ に由来する病的な構造体が他にあるのではないかと考えられたが、その実体に関しては1)複数の $A\beta$ 分子種($A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$)がともに神経毒性を発揮すること、2)in vitro で報告されている構造体(2/3量体、線維、球など)は様々な会合状態からなる混合物であることから、どれが神経毒性の担い手であるかを初め、多くが不明である。そのために、生理的 $A\beta$ が毒性会合体に変わる機構や神経細胞死機構等の基本的命題が解明されないまま、臨床応用が加速している状況であった。私は、複数ある $A\beta$ 会合体の中から神経細胞死を実際に引き起こす $A\beta$ 構造体の探求と、それによる発症機構の解明を目的として研究を開始した。そのために、我々が発見した $A\beta_{1-40}$ に由来する新たな球状会合体「amylospheroid」を手がかりに、(1)amylospheroid 形成機構の解明、(2)生体におけるamylospheroid の存在の検証、(3)amylospheroid による神経細胞死機構の解明を研究の3つの柱とした。

4. 研究結果 :

(1) amylospheroid 形成機構の解明

amylospheroid の発見 $A\beta_{1-42}$ に比べ毒性が低いと考えられていた $A\beta_{1-40}$ だが、我々が開発した回転法を用いることで再現的に神経毒性を発揮するようになる。その中には複数の会合体が含まれるが、遠心による粗精製から球状の構造体が毒性を発揮する成分と考えられ、これをamylospheroid と名付けた。今回、これをグリセロール密度勾配遠心により精製を行ったところ、中でも直径 10-15 nm のものに毒性があり、従来注目されてきた線維の約 400 倍の神経毒性を持つことを明らかにした (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。

$A\beta_{1-42}$ 由来 amylospheroid 我々は、今回、より発症と相関するとされていた $A\beta_{1-42}$ も $A\beta_{1-40}$ と同様の 10-15 nm の amylospheroid を形成することを見いだした。しかし $A\beta_{1-42}$ 由来 amylospheroid は、 $A\beta_{1-40}$ 由来 amylospheroid の 100 倍以上強い比活性を持ち、ごく微量でかつ短時間に形成されるということを発見した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。この結果は、 $A\beta_{1-42}$ が発症と相関する理由が毒性会合体の形成能力の差に起因する可能性を示唆し、今後、この神経毒性の差を物理化学的に解明する端緒を開いた。

線維と amylospheroid の形成経路は分岐する :パーキンソン病を初めとする各種変性疾患でタンパク質の異常凝集、特に線維形成の「中間体」が注目されている。しかし、各々の凝集過程は必ずしも解明されてはいない。我々の実験条件下では重合開始時の $A\beta_{1-40}$ 濃度が低いほど amylospheroid 形成が優位となり、相対的に線維形成が抑制される。また、シート形成を阻害する 5 残基のペプチドは、線維形成は抑制するが、amylospheroid には影響がなかった。以上から

amylospheroid は線維形成とは異なる分子変化である可能性を示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。

amylospheroid 形成は分子内変化を伴う? :神経毒性を持つ amylospheroid の形成は、SDS-PAGE 上の 2-4 量体バンドと関連し、何らかの分子変化が起きていることが推測された。今回、我々は今まで注目されていない、A β の内部配列上の特定のアミノ酸が amylospheroid 形成に必要であることを見だし、現在さらなる解析を進めている。(Sato, K. et al. 投稿中、Noguchi, A., Hoshi, M. et al. 投稿準備中)

新たな手法の開発—液中原子間力顕微鏡によるナノ領域の観察 :電子顕微鏡下ではサンプルを乾燥させるが、それを排除するため、困難とされる溶液下の原子間力顕微鏡観察に取り組み、プローブとマイカの表面処理方法を開発し、溶液下で amylospheroid が真球であることを示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。近年、原子間力顕微鏡は DNA やタンパク質の観察に用いられるが、nm の定量的観察は未だ困難であり、今回確立した手法を汎用化した (Shibata-Seki, T, et al. Nanoscale seminar 2004&投稿準備中)

(2) 生体における amylospheroid の存在の検証

精製した amylospheroid を抗原にポリクローナル抗体を作製しつつ、amylospheroid 特異的抗体の 1 次スクリーニング法についても検討中である。さらに、生体試料の検証、細胞内での局在など、の解析を進めるべく生命倫理の手続きを取り進めている。

(3) amylospheroid による神経細胞死機構の解明 amylospheroid による神経細胞死の初期に、我々が長年研究してきたタウリン酸化酵素 TPPI/GSK-3 β が関与する可能性を示した (Hoshi, M. et al. PNAS2003)。また、Fyn の関与を示唆する結果も得た (Hoshi, M. et al. 投稿準備中)。さらに、東京薬科大学との共同研究により amylospheroid によりカルシウム流入が起こり、カルパインが活性化することを示した。カルパイン阻害剤は amylospheroid 毒性を非常に効果的に遮断するため、カルシウム-カルパインは重要な神経細胞死経路であると考えられた。(Kobayashi, N. R. et al. 投稿中)。

5. 自己評価 :

研究場所こそ移動しなかったが、ラボのセットアップ (人的並びに環境) から運営まで小規模ながらフルコースを体験出来た。お陰で現在進めている次のグループ構築では、3 年前とは異なりラボの絵がすんなりと頭に描けるようになっている。この貴重な体験を与えられたことを心から感謝したい。研究成果では生命研が実質は非営利組織であり科研費申請も可能になったにも関わらず、株式会社であることが足かせとなり、ブレインバンクの利用に関しての手続きに予想外に手間取り、ヒト脳での検証を着手する寸前に終わったことが大変残念である。マウスモデルの結果からも良い感触があり、倫理面での手続きが完了し次第、着手したい。

今回、「生理的 A β が何に変わることで病因となるのか」を解明するための貴重な手がかりを得ることが出来た。ヒトでの検証を踏まえ、次には生理的 A β が「どのような分子機構で毒性を持つ会合体に変わるのか」、それを「制御する機構は何か」と言う問題を解きたい。amylospheroid を初めとする複数の異なる A β 会合体が、試験管内で他のタンパク質等の助けを借りることによって形成されること、そしてその内の少なくとも 1 つである線維は実際にヒト脳で形成されることから、A β は複数の会合体を形成する自己組織化能力を持つと推測される。どの可能性が選ばれるかを左右するのは A β を取り巻く水とイオン環境、そしてシャペロンが考えられるが、アルツハイマー病の最大の発症因子である老化とこれらの関係はまた今後の課題である。amylospheroid の場合、回転がど

のような物理化学的变化を A β に引き起こすかを明らかにすることが、制御機構の解明への最初の一步となるだろう。公表前なので委細は省くが、そのための手がかりを本研究で得ることが出来た。生理的 A β と各種 A β 会合体は全て A β からなり、コンフォメーションと連鎖様式のみが異なる。会合体が機能を喪失するだけではなく、新たな機能を発現することから、タンパク質はこの構造代謝とでも言うべき動的構造変化により、生体の各段階に応じた機能を発揮しているのかもしれない。我々の研究はまだ一步を踏み出したところだが、アミロスフェロイドを手がかりに、現在存在する技術的問題を打破し、病態と老化という生命現象を物理化学的に解き明かしていきたいと思っている。この3年間を見守ってくださった永井総括、領域アドバイザーの先生方、領域事務並びに JST の方々に心から感謝したい。

6. 研究総括の見解：

高齢化の進展に伴い社会的に益々問題化しつつあるアルツハイマー病とその治療法の開発に対して、従来の見解を一新する成果をあげることになり、国際的にも一躍注目をあびるに至った。即ちアミロスフェロイド神経毒仮説の提唱である。現在、研究の進展は加速されつつあり、予防と新治療法の開発を目指しての今後の展開が注目される。

7. 主な論文等：

論文

1. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato, K. (2003) Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β ? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6370-6375 (May 27)
2. Sato, K., Takashima, A., Maeda, T., Ohtake, A., and Hoshi, M. (2004) Asn27 is Essential for the Neurotoxicity of Amyloid β (1-42) Peptide submission
3. Kobayashi, N.R., Hirasawa, T., Yoshida, N., Hoshi, M. and Kudo Y. (2004) β -amyloid1-40 disrupts calcium homeostasis of selective hippocampal neurons in organotypic slice culture submission

総解説

1. 星美奈子 (2002) 脳の老化-いかにタンパク質の自己重合を制御するか?、細胞工学 21、728-732 特集 老化・寿命決定のメカニズム 監修 鍋島陽一
2. 星美奈子 (2003) :アミロスフェロイドの発見-アルツハイマー病における神経細胞死の原因を探して 医学のあゆみ 206、986-987
3. 星美奈子 (2004) :新規毒性物質「アミロスフェロイド」の形成と神経細胞死 生化学 総説 (印刷中)
4. 星美奈子 (2004) 新規球状毒性会合体「アミロスフェロイド」の同定-アルツハイマー病発症に置ける神経細胞死機構の解明に向けて Dementia Japan (印刷中)
5. 星美奈子 (2004) : アミロイド自己組織化による神経毒性の発現-新規毒性物質「アミロスフェロイド」とアルツハイマー病 化学と工業 (印刷中)

著書

1. 星美奈子(2004) 『かたち』が制御する神経の死 :アミロスフェロイドから病態 老化の暗号を解く (印刷中) : 細胞における蛋白質の一生』共立出版 編集 小椋光他

監修

1. 星美奈子 (2004) Bioindustry 神経変性疾患研究の最前線 特集号監修 (印刷中)

国際学会

1. Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A. and Sato, K.: Spherical β -amyloid aggregate (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase i/gsk-3 β : 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience: Nov. 2003: New Orleans, LA, USA
2. Shibata-Seki, T., Karino, Y., Hoshi, M., Sato, M. and Matsumoto, S.: Three dimensional morphological analysis of β -amyloid aggregates in a buffer solution by atomic force microscopy: Seminar Nanoscale 2004, 6 th Seminar of Quantitative Microscopy and 2nd Seminar on Nanoscale Calibration Standards in Micro- and Nanometre Range: March 2004: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Germany

招待講演

1. 星美奈子 (2003 年 5 月) 新規毒性物質『Amylospheroid』の発見-アルツハイマー病発症における神経細胞死機構の解明に向けて 東京工業大学
2. 星美奈子 (2003 年 6 月) 新規毒性物質『Amylospheroid』の発見-アルツハイマー病発症における神経細胞死機構の解明に向けて 東京大学医学部
3. 星美奈子 (2003 年 9 月) : 『かたち』が制御する神経の死 :アミロスフェロイド形成とアルツハイマー病 科学技術振興事業団第 9 回基礎研究報告会 生命? その誕生から死まで』東京
4. 星美奈子 (2003 年 10 月) : 『かたち』が制御する神経細胞死 :アミロスフェロイドとアルツハイマー病 第 22 回日本痴呆学会シンポジウム 変性疾患における神経細胞死』東京
5. 星美奈子 (2003 年 10 月) :アミロスフェロイドの発見 : 『かたち』が制御する神経細胞死 京都大学医学部
6. 星美奈子 (2003 年 12 月) Morphology and Toxicity of Newly Identified Spherical β -amyloid aggregates (Amylospheroid) :Spring8

受賞

1. 第 35 回 内藤記念科学奨励金(研究助成) 受賞

その他

PNAS の論文『アミロスフェロイド』発見に関して、文部科学省においてプレスリリースを行った。
(2003 年 5 月)日経 朝日 読売 毎日 東京新聞 (2003.05.13) 日経産業新聞・日刊工業新聞 化学工業日報・日本工業新聞・日刊ゲンダイ (2003.5.14) 科学新聞 薬事日報 (2003.5.16) 日経バイオテク、全国地方紙

一般講演発表 3 件