

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430057

研究課題名(和文) アンギオテンシン受容体による脳内アミロイド蓄積制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of brain amyloid deposition by angiotensin receptor type 1a

研究代表者

鄒 鶴 (ZOU, KUN)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：40450837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)では、脳内アミロイド蛋白(A β)蓄積の機構の解明が重要な課題となっている。中年期の高血圧症はADの危険因子とされており、臨床疫学研究では降圧剤投与が認知障害の発症を抑制という結果が報告されている。しかし、一部の降圧剤は、ADの発症を増悪するとの報告もある。我々は、血圧制御に重要なアンギオテンシン受容体(Agtr1a)に着目し、Agtr1aの欠損が脳内A β 蓄積を顕著に阻害することを明らかにした。さらに、Agtr1a欠損のマウス初代培養線維芽細胞では、A β 産生が著しく減少したことを見いだした。以上の結果から、Agtr1aがAD発症に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is characterized by neuronal loss and cerebral accumulation of amyloid- β protein (A β) and lowering the generation of A β is a pivotal approach in the strategy of Alzheimer's disease treatment. Midlife hypertension is a major risk factor for the future onset of sporadic AD and the use of some antihypertensive drugs may decrease the incidence of AD. However, it is largely unknown how the blood pressure regulation system is associated with the pathogenesis of AD. Here we found that the deficiency of angiotensin type 1a receptor (AT1a), a key receptor for regulating blood pressure, significantly decreased A β generation and amyloid plaque formation in a mouse model of AD. Our results suggest that removal of life style factors or stresses that stimulate AT1a to elevate blood pressure may decrease A β generation and brain amyloid accumulation, thereby preventing the pathogenesis of AD.

研究分野：神経科学、生化学

キーワード：アルツハイマー病 高血圧症 アンギオテンシン受容体

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)では、脳内アミロイド β 蛋白($A\beta$)蓄積の機構の解明が重要な課題となっている。高血圧症、特に中年期の高血圧症は AD の危険因子とされており、臨床疫学研究では降圧剤投与が認知障害の発症を抑制という結果が報告されている。しかし、一部の降圧剤は、AD の発症を増悪するとの報告もある。アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)は、広く降圧剤として使用され、AD の発症を抑制することが最近の疫学調査で報告されている(*Sink KM et al., Arch Intern Med, 169:1195-202, 2009; Davies NM et al., J Alzheimers Dis, 26:699-708, 2011*)。我々は、血圧調節に重要なアンジオテンシン変換酵素(ACE)が、毒性の強い $A\beta_{42}$ を $A\beta_{40}$ に変換する活性($A\beta$ 変換活性)を有することを明らかにした。また、新たにアンジオテンシン受容体タイプ Ia(AgtrIa)の欠損は、脳内 $A\beta$ 蓄積を顕著に阻害することを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究は、血圧調節と AD 発症との関わりを解明するため、AgtrIa 欠損による脳内 $A\beta$ 蓄積減少の制御機構を明らかにする。具体的には、以下の 2 点を明らかにする。

- (1) AgtrIa が $A\beta$ 産生を抑制するか否かおよびその作用機構を明らかにする。
- (2) AgtrIa が $A\beta$ の除去に関与しているか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AgtrIa が $A\beta$ 産生に関与するか否かを明らかにする。

- i. 我々は、14 か月齢の AgtrIa 欠損 AD モデルマウスでは、脳内の $A\beta$ 沈着が顕

著に減少していることを見だしましたが、しかし、 $A\beta$ 産生の減少によるものなのか、あるいは、 $A\beta$ の分解・除去の促進によるものなのかは不明である。継続して *hAPP/AgtrIa^{+/-}* マウスと *AgtrIa^{+/-}* マウスを交配させ、*hAPP/AgtrIa^{+/+}*、*hAPP/AgtrIa^{+/-}* ならびに *hAPP/AgtrIa^{-/-}* マウスを作成する。 $A\beta$ の沈着がない若い 3 か月齢のマウス脳を用いて $A\beta_{43}$ 、 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{40}$ の ELISA 定量を行い、AgtrIa 受容体欠損により $A\beta$ 産生に影響があるか否かを検討する。

- ii. $A\beta$ 産生の減少が認められた場合には、*hAPP/AgtrIa^{+/+}*、*hAPP/AgtrIa^{+/-}* ならびに *hAPP/AgtrIa^{-/-}* マウスの胎児線維芽細胞を初代培養し、 $A\beta$ 産生に関わる α -secretase、 β -secretase および γ -secretase の発現や活性を確認する。AgtrIa による $A\beta$ の産生制御機構を明らかにする。

(2) ARB が $A\beta$ 産生を減らすか否かを明らかにする。

- i. 臨床で使用されている約十種類の ARB を *hAPP/AgtrIa^{+/+}*、*hAPP/AgtrIa^{+/-}* ならびに *hAPP/AgtrIa^{-/-}* マウス胎児線維芽細胞に添加し、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ および $A\beta_{43}$ の産生が変化するか否かを明らかにする。市販の $A\beta$ ELISA キットで定量する。

- ii. ARB が $A\beta$ 産生に影響与える場合、その分子機構を明らかにする。

(3) AgtrIa が $A\beta$ 分解・変換に関与するか否かを明らかにする。

- i. $A\beta$ 産生後、速やかに $A\beta$ の分解酵素 neprilysin や insulin-degrading enzyme、endothelin-converting enzyme などにより分解され、また、ACE により凝集性の高い $A\beta_{42}$ が $A\beta_{40}$ に変換されるため、正常脳内では $A\beta$ が沈着しにくい。*hAPP/AgtrIa^{+/+}*、*hAPP/AgtrIa^{+/-}* ならびに

hAPP/Agtr1a^{-/-} マウス脳を用いて、Western blot 法でこれらの Aβ の分解・変換酵素の発現変化を決定する。脳内 ACE の活性は、市販の活性キットで活性を測定する。

ii. *hAPP/Agtr1a*^{+/+} ならびに *hAPP/Agtr1a*^{-/-} マウス胎児線維芽細胞に angiotensin II を添加し、細胞内の neprilysin、insulin-degrading enzyme、endothelin-converting enzyme および ACE の発現レベルと活性の変化を検討する。

4. 研究成果

我々は、ARB が Aβ 産生を抑制するのではないかと予想したが、興味深いことに、ARB が種類によって Aβ 産生を促進する作用を持つことが明らかとなった。活性型 ARB である telmisartan と valsartan が、Aβ 産生において異なる作用を持つことを示した。valsartan は Aβ 産生に影響を示さないが、telmisartan は Aβ40 と Aβ42 の産生をそれぞれ約 6 倍、3 倍に増強した。また、非活性型の losartan、candesartan および olmesartan のうち、olmesartan のみが Aβ 産生促進作用を示し、特に Aβ42 の産生を約 3 倍増強した。我々はさらに、AT1 のシグナル伝達系を阻害剤を用いてスクリーニングし、telmisartan の Aβ 産生増強作用が PI3 キナーゼの阻害剤 wortmannin により顕著に阻害されることを見いだした。また、PI3 キナーゼ下流の Akt のリン酸化も telmisartan 処理により増強されることも明らかとなった。これらのシグナル活性化は、アンギオテンシン II とその受容体 AT1 のシグナル伝達に類似している。また、AT1a の欠損細胞では、telmisartan が Aβ 産生の増強作用を示さなかった。これらの結果は、telmisartan や olmesartan が AT1 と結合し、PI3 キナーゼおよび Akt のリン酸化を介して Aβ 産生を促進することを示唆した(Liu J, et al., *Neurosci Lett*,

567:51-6, 2014; Zou K, *Seikagaku*, 88:771-5, 2016)。本研究で使用した ARB と AT1 との結合の強さは、telmisartan > olmesartan > candesartan > valsartan ≥ losartan の順に報告されており、ARB と AT1 との強い結合がアンギテンシン II シグナルを抑制できる一方、AT1 の一部のシグナル伝達を活性化する可能性が示唆される。

我々は、AT1a が Aβ の産生・沈着にどのように影響を与えるのかを検討するため、AT1a 欠損のアルツハイマー病モデルマウスを作製し、Aβ 沈着の変化を検討した。thioflavin-S 染色の結果、AT1a 欠損マウスは脳内における Aβ 沈着が明らかに減少した。Aβ42 の免疫染色の結果、やはり Aβ42 の沈着が AT1a 欠損マウスでは明らかに減少していた。さらに、AT1a 欠損 APP マウスの初代培養線維芽細胞では、Aβ 産生が著しく減少したことを見いだした。このことは、Aβ 産生に関わる β セクレターゼ、あるいは γ セクレターゼ複合体の活性の変化を意味している。プレセリン 1 は、N 末端フラグメント(N-terminal fragment: NTF)と C 末端フラグメント(C-terminal fragment: CTF)に切断されてから γ セクレターゼの活性を持つようになり、γ セクレターゼ複合体の中で中心的な役割を担っている。興味深いことに、AT1a 欠損マウス脳内のプレセニン 1 の全長が増え、切断されたプレセニン CTF が減少していることがわかった。それに伴い、γ セクレターゼ複合体の構成分子のニカストリン(Nicastrin: NCT), Aph-1 および Pen-2 のタンパク質量も減少した。このことは、AT1 欠損が γ セクレターゼ複合体の量を低下させ、Aβ 産生を阻害することを示唆するものである。これらの分子機序を詳しく検討した結果、telmisartan のシグナル伝達と同様

にアンジオテンシン II が、AT1、PI3K、Akt を介してプレセニリン 1 の切断を促進し、さらに γ セクレターゼ複合体形成を促進することを明らかにした(Liu J, et al., *Sci Rep*, 5:12059, 2015; Zou K, *Seikagaku*, 88:771-5, 2016)。ARB は種類によって A β 産生を増強させるものもあり、さらに種類別に A β 沈着やアルツハイマー病の発症への影響を詳しく調査する必要があると思われる。

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 3 件)

1. 鄒鶴. アンジオテンシン受容体とアミロイド β タンパク質産生. **生化学**, 88:771-5, 2016

2. Junjun Liu, Shuyu Liu, Yukino Matsumoto, Saki Murakami, Yusuke Sugakawa, Ayako Kami, Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda, Makoto Michikawa, Hiroto Komano, Kun Zou. Angiotensin type 1a receptor deficiency decreases amyloid β -protein generation and ameliorates brain amyloid pathology. *Sci Rep*, 5:12059, 2015.

3. Junjun Liu, Shuyu Liu, Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda T, Kun Zou, Hiroto Komano. Differential effects of angiotensin II receptor blockers on A β generation. *Neurosci Lett*, 567:51-6, 2014

[学会発表](計 8 件)

1. 鄒鶴、劉姝余、劉俊俊、松元葵、沈雪峰、横森未来、下方浩史、道川誠、駒野宏人. ACE deficiency increases amyloid plaque burden in APP transgenic mouse brain. 第 35 回日本認知症学会学術集会 2016 年 12 月 (東京)

2. 鄒鶴、駒野宏人. レニン・アンジオテンシン系と A β 除去、第 34 回日本認知

症学会学術集会 シンポジウム 2015 年 10 月 (青森)

3. Junjun Liu, Shuyu Liu, Yukino Matsumoto, Saki Murakami, Yusuke Sugakawa, Ayako Kami, Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda, Makoto Michikawa, Hiroto Komano, Kun Zou. Angiotensin type 1a receptor deficiency ameliorates brain amyloid pathology by regulating γ -secretase complex formation. 第 54 回 日本薬学会東北支部大会 2015 年 9 月 (盛岡)

4. 劉俊俊、劉しゅう余、村上 咲、菅川 悠介、賀美 綾子、田邊 千晶、前田智司、鄒鶴、駒野宏人. Differential effects of angiotensin II receptor blockers on A β generation. 第 58 回日本神経化学会大会 2015 年 9 月 (大宮)

5. Kun Zou, Junjun Liu, Shuyu Liu, Yukino Matsumoto, Saki Murakami, Yusuke Sugakawa, Ayako Kami, Chiaki Tanabe, Tomoji Maeda, Makoto Michikawa, Hiroto Komano. Angiotensin type 1a receptor deficiency decreases amyloid β -protein production and ameliorates brain amyloid pathology. 25th Meeting of The International Society For Neurochemistry, 2015 年 8 月 (Cairns, Australia)

6. 鄒鶴、劉俊俊、劉姝余、松本幸乃、村上咲紀、田邊千晶、前田智司、道川誠、駒野宏人. Angiotensin type 1a receptor deficiency attenuates amyloid beta-protein production and ameliorates brain amyloid pathology. 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 (京都)

7. 劉姝余、鄒鶴、劉俊俊、藤田融、前田智司、寺山靖夫、Anthony J. Turner、駒野宏人. Conversion of A β 43 to A β 40 by the successive action of angiotensin-converting enzyme-2 and angiotensin-converting enzyme. 第 87 回日本生化学会

大会 2014 年 10 月 (京都)

8. 鄒鶴、劉俊俊、劉姝余、松本幸乃、村上咲紀、田邊千晶、前田智司、道川誠、駒野宏人、アンギオテンシン受容体による脳内アミロイド蓄積制御機構の解明、第 57 回日本神経化学会大会 2014 年 9 月 (奈良)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鄒 鶴 (ZOU KUN)

岩手医科大学・薬学部・特任講師

研究者番号 : 40450837

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

駒野 宏人 (KOMANO HIROTO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40170378

(4)研究協力者

()