

News Release



日本マイクロバイオファーマ

2022 年 2 月 28 日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

理化学研究所

日本マイクロバイオファーマ株式会社

アルツハイマー病病因分子の産生量に影響を与える

土壌微生物叢由来代謝物の同定

～土壌微生物叢 vs アミロイドβ から新世代の微生物創薬へ～

ポイント

- iPS 細胞を使ったスクリーニング系を用いることで、神経細胞のアミロイドβ 産生動態を変化させる土壌微生物叢^{注1)}由来の代謝物^{注2)}を同定し、土壌微生物とアルツハイマー病の関係を明らかにしました。
- この手法を用いて、微生物叢が神経細胞の病態に与える影響を直接的に調べることで、微生物叢の疾患への影響評価や、新たな微生物創薬研究につながると考えられます。
- 微生物とアミロイドβ の関係を明らかにすることは、人類の防御システムと病因分子としてのアミロイドβ の役割のトレードオフの結果としてのアルツハイマー病、という理解につながる可能性があります。

1. 要旨

近藤孝之特定拠点講師(京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)増殖分化機構研究部門特定拠点講師、理化学研究所(理研)バイオリソース研究センター(BRC)iPS 創薬基盤開発チーム客員研究員、理研革新知能統合研究センター(AIP)iPS 細胞連携医学的リスク回避チーム客員研究員)、井上治久教授(CiRA 同部門教授、理研 BRC 同チームチームリーダー、理研 AIP 同チーム客員主管研究員)、日本マイクロバイオファーマ株式会社らの研究チームは、日本の土壌に由来する微生物叢から抽出・精製した代謝物ライブラリと、アルツハイマー病(AD)患者さん由来の iPS 細胞から調製した大脳皮質神経細胞を用いて、土壌微生物叢の代謝物が AD の中心的な病因分子の一つであるアミロイドβ (Aβ)^{注3)}の産生動態に与える影響を評価し、Aβ 産生動態を変化させる代謝物として、ミロテキウム属^{注4)}の真菌が産生するペルカリン A と、ストレプトマイセス属^{注5)}の細菌が産生する Mer-A2026A を同定しました。このように、微生物由来の代謝物ライブラリと iPS 細胞技術を組み合わせることで、従来直接的に評価することが困難だった微生物叢と脳神経系の関連性を検証し、将来的な AD のリスク因子探索や新たな微生物創薬につなげることができます。

本研究成果は 2022 年 3 月 2 日午後 7 時(日本時間)に英国科学雑誌『Scientific Reports』でオンライン公開されます。

2. 研究の背景

1928 年、アレクサンダー Fleming 博士は、ペニシリウムという菌の培養から世界初の抗生物質であるペニシリンを発見しました。その後、糸状菌や放線菌などの微生物から、多くの抗生物質、高コレステロール血症薬、免疫抑制剤、抗腫瘍剤などが分離されました。このように微生物由来の代謝物を含む天然物には、生理学的活性を有するものがあることが知られています。本研究チームは、微生物資源、特に土壌微生物に由来する二次代謝物の化合物ライブラリの収集と整備を続けてきました。

2000 年代に入り、ヒトを取り巻く微生物叢と多様な疾患との関係が脚光を浴びるようになりました。そして、患者さんの腸や口腔などの微生物叢が、AD を含む脳神経系疾患の発症や進行に影響を与えることも疫学研究から明らかになりつつあります。中でも、アルツハイマー病病因分子 $A\beta$ が体内で微生物の感染に対する自然免疫としての役割を果たす可能性も報告されてきました。しかし、どのような微生物叢が、どのようにして脳神経疾患の発症に関わるのかを解明することは困難でした。特に土壌由来の微生物の多くは単離および維持培養が難しく、解析が困難でした。

3. 研究結果

本研究では、土壌微生物叢の代謝物と AD の関係を直接的に調べるため、放線菌類を中心とする細菌 65 種と、多様な真菌 33 種から抽出した 98 の二次代謝物からなるライブラリを使用しました(図 1)。これらの代謝物を、家族歴のない孤発性 AD 患者さんから樹立した iPS 細胞を用いて調整した大脳皮質神経細胞に添加し、 $A\beta$ の産生動態を定量的に評価しました。



図1: 研究概要図

土壌微生物叢由来の代謝物を AD 患者さん由来の iPS 細胞から分化した大脳皮質神経細胞に添加し、どの代謝物が AD 病態に影響を与えるのか調べた。

それぞれの代謝物を $1\mu\text{M}$ の濃度で添加し、培地中の $A\beta 40$ と $A\beta 42$ の濃度および $A\beta 42/40$ 比を測定しました。そして、ネガティブコントロールとして化合物の溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)のみを添加した条件に対する $A\beta$ 産生の比率を計算し、代謝物の影響を調べました(図 2 左上、右上、左下)。また、添加された代謝物による細胞損傷は培養皿の中の神経細胞数を減らしてしまい $A\beta$ の定量結果に影響するため、神経細胞損傷の程度も同時に評価しました(図 2 右下)。スクリーニング内のアッセイの安定性指標としてネガティブコントロールの変動係数(CV%)を計算すると、 $A\beta 40$ と $A\beta 42$ の濃度、 $A\beta 42/40$ 比、および細胞損傷アッセイの平均 CV%は、それぞれ 2.1%、3.7%、1.7%、および 3.4%であり、安定したスクリーニング系が構築されていることを示しました。そして、 $A\beta$ の高毒性型である $A\beta 42$ の産生量に影響する代謝物として、 $A\beta 42$ 濃度が減少した、あるいは $A\beta 42/40$ 比が増加または減少した 9 つの代謝物を特定しました(図 2 右上、左下の黄色の点)。

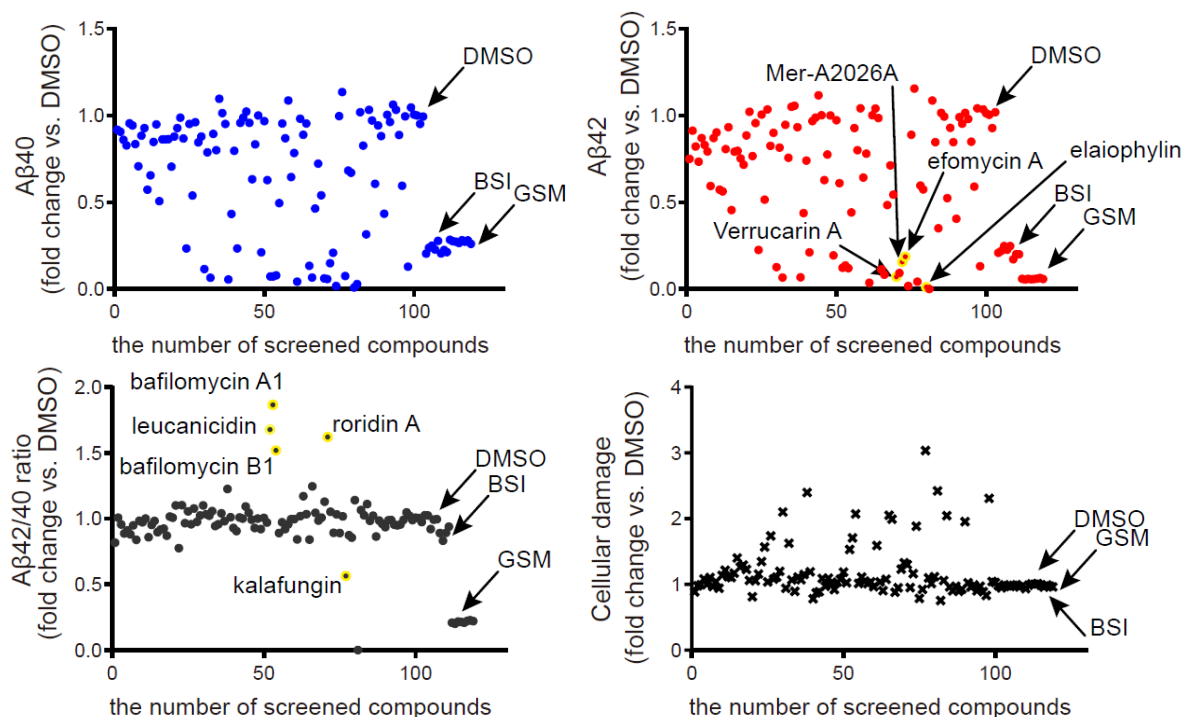


図 2: 孤発性 AD 患者さんの iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞を用いた一次スクリーニング

孤発性 AD の iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞に、土壌微生物叢由来の代謝物 98 種類 $1 \mu\text{M}$ を添加した際の、 $A\beta 40$ 濃度(左上)、 $A\beta 42$ 濃度(右上)、 $A\beta 42/40$ 比(左下)、細胞損傷(右下)のネガティブコントロールに対する比率。ヒットした化合物は、化合物名の付いた黄色で強調表示。DMSO: ジメチルスルホキシド(ネガティブコントロール)、BSI: β -セクレターゼ阻害剤($A\beta 40$ 濃度のポジティブコントロール)、GSM: γ -セクレターゼモジュレーター($A\beta 42$ 濃度および $A\beta 42/40$ 比のポジティブコントロール)。

さらに、濃度依存性的に $A\beta$ 産生動態が変化する代謝物として、ベルカリン A と Mer-A2026A を見いだしました(図 3、4)。ベルカリン A は、土壌のミロテキウム属が生産することが報告されている化合物です。高濃度のベルカリン A ($0.2\text{--}5 \mu\text{M}$) は弱い神経細胞損傷を示したものの、低濃度 ($0.32\text{--}8\text{nM}$) では神経細胞に損傷を与えることなく、 $A\beta 40$ および $A\beta 42$ の産生量を大きく減少させました(図 3)。以上のことから、ベルカリン A は $A\beta$ 産生量を減少させる治療薬の元になる可能性があります。

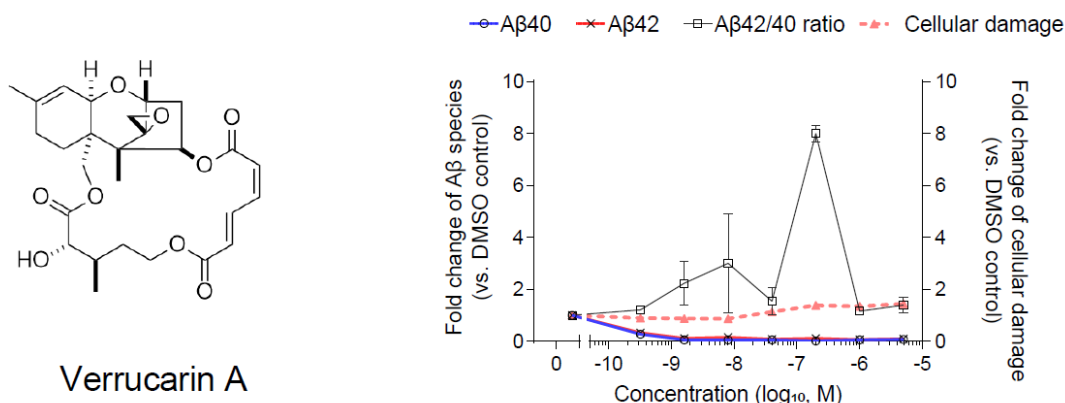


図 3: ベルカリン A の構造式と $A\beta$ 産生量に対する影響

左のグラフは、ベルカリン A を添加した際の神経細胞の A β 40 と A β 42 の産生量および神経細胞毒性をネガティブコントロールに対する比率で示す。

Mer-A2026A は、添加した濃度にかかわらず神経細胞への損傷が小さく、低濃度 (1.6–200nM) では保護的 A β である A β 40 産生量の減少と A β 42/40 比の増加を示しました (図 4)。一方、高濃度の Mer-A2026A (0.04–5 μ M) は、A β 40 と A β 42 両方の産生量をネガティブコントロールの半分程度まで減少させました。

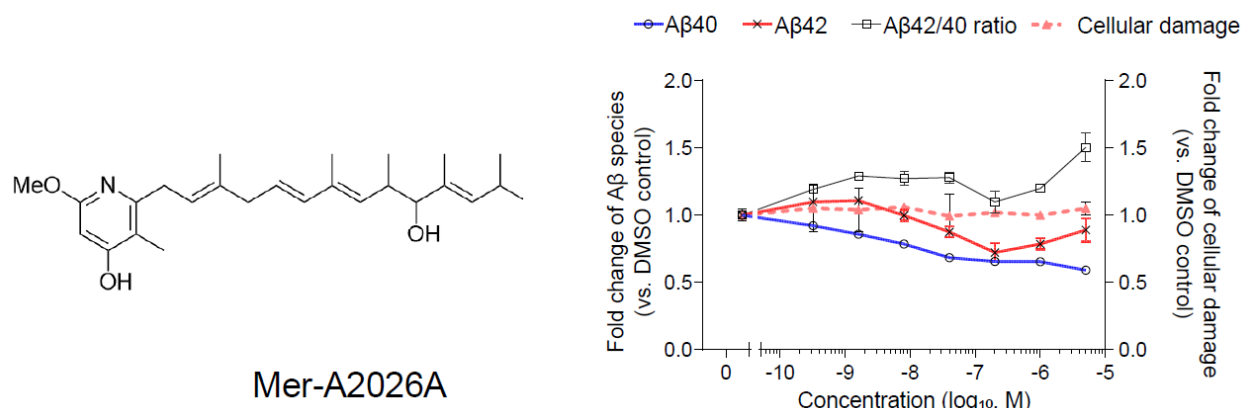


図 4: Mer-A2026A の構造式と A β 産生量に対する影響

左のグラフは、Mer-A2026A を添加した際の神経細胞の A β 40 と A β 42 の産生量および神経細胞毒性をネガティブコントロールに対する比率で示す。

Mer-A2026A は、土壌由来のストレプトマイセス属細菌ストレプトマイセス・パクトムの培養液から分離され、血管拡張作用がある化合物として報告されていました。本研究の結果からは、Mer-A2026A には、A β 42/40 比を上げ AD の危険因子となる場合、あるいは A β 産生を抑制して AD に対して保護的にはたらく場合という二面的な性質があることが示されました。神経細胞が土壌微生物叢の産生する物質を感知し、感染に対する免疫として A β を産生する可能性や、土壌微生物叢が A β 産生を抑制するための物質を産生する可能性などを考えると、本研究結果は、今後、微生物叢と AD 発症の関係を解明する糸口になるかもしれません。さらに、ヒトが感染症に対抗するために備わっている A β が、寿命延長により AD の原因になったとも考えられ、AD は人類の防御システムと病因分子としての A β の役割の進化上のトレードオフの結果と考えられるかもしれません。

4. まとめ

今回、本研究チームは、土壌微生物叢由来の代謝物ライブラリと iPS 細胞技術を組み合わせることで、土壌微生物叢の代謝物が AD の病態に与える影響を直接的に評価することに成功しました。今後、この解析技術を用いることで、微生物叢と AD の関連性の理解が進み、微生物叢を標的とした発症予防やリスク管理、新たな微生物創薬への道筋が開かれることが期待できます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Metabolites of soil microorganisms modulate amyloid β production in Alzheimer’s neuron”

○ ジャーナル名

Scientific Reports

○ 著者

Takayuki Kondo^{1,2,3}, Tsuyoshi Yamamoto⁴, Kaoru Okayama⁴, Hideki Narumi⁴, Haruhisa Inoue^{1,2,3,5*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所
 2. 理化学研究所バイオリソース研究センター(BRC) iPS 創薬基盤開発チーム
 3. 理化学研究所革新知能統合研究センター(AIP) iPS 細胞連携医学的リスク回避チーム
 4. 日本マイクロバイオファーマ株式会社(MBJ)
 5. 京都大学医学部附属病院 先端医療研究開発機構(iACT)
- * 責任著者

6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より支援を受けて実施されました。

- 日本医療研究開発機構(AMED)再生医療実現拠点ネットワークプログラム(iPS 細胞研究中核拠点)
- 日本学術振興会科学研究費補助金(17K16121, 20K16599)
- 日本マイクロバイオファーマ株式会社(MBJ)

7. 用語説明

注1) 微生物叢

特定の環境に生息する微生物の集まり。腸管内や口腔内などの場所ごとに特徴的なグループを形成し、この微生物叢の特性や変化が疾患に影響することが知られている。

注2) 代謝物

生物の生育の過程で生産される化合物。微生物は種類や環境により様々な代謝物を生産することが知られている。代謝物の多くは生理活性を示し、代謝物の変化が宿主の病態に影響を与えることも示唆されている。今回の検討では、98 種類の代謝物から構成される代謝物ライブラリを用いた。

注3) アミロイドβ (Aβ)

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である APP がコードするアミロイド β 前駆体を、β-セクレターゼや γ-セクレターゼなどの酵素が切断することで産生される。細胞外に分泌される Aβ には Aβ 40 と Aβ 42 があり、Aβ 40 と比べて Aβ 42 は凝集性が高いことから、より毒性の高い種類の Aβ として知られている。

注4) ミロテキウム属 (*Myrothecium*)

主に土壌中に棲息する真菌の一種。植物などに寄生する事が多い。

注5) ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)

主に土壌中に生息し、代謝物が抗生物質など様々な医薬品として応用されている。

本件担当: 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA) 国際広報室
大内田 美沙紀
TEL: 075-366-7005
FAX: 075-366-7185
Email: media@cira.kyoto-u.ac.jp

理化学研究所 報道担当
E-mail: ex-press@riken.jp