

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく
診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 21年度採択研究代表者

平成 21 年度
実績報告

井原 康夫

同志社大学 生命医科学部 医生命システム学科 教授

分子的理解に基づく抗アミロイド療法および抗タウ療法の開発

§ 1. 研究実施の概要

1. A β 産生阻害剤の開発 (同志社大学、ペプチドリーム)

β CTF アミノ末端結合特殊ペプチドの A β 産生抑制の評価と β CTF 以外の γ セクレターゼ基質の調製:我々は β CTF アミノ末端に特異抗体を結合させると A β 産生が抑制されることを見いだした。このことは基質特異的な A β 産生抑制の可能性を示している。この効果の基質特異性を確認するために、 β CTF 以外の基質の調製をした。

(1)「特殊ペプチド評価」グループ (同志社大学)

β 切断阻害評価のための β セクレターゼ活性測定系の構築: β CTF アミノ末端特異抗体は APP からの β CTF 産生 (β セクレターゼ活性)も基質特異的に抑制できると期待できる。これを検討するため本年度は β セクレターゼ活性測定系を構築した。

(2)「特殊ペプチド創製」グループ (ペプチドリーム)

標的分子として、 γ セクレターゼおよび β セクレターゼの基質認識部位を含むアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の配列 655-687 (C 末側がアミロイド β の 1-16 に相当)を選び、その C 末端にリンカーを介してビオチン標識したペプチドを化学合成した。この標的に結合する阻害ペプチドをスクリーニングするためのライブラリーとしては15残基のランダム化アミノ酸からなる直鎖型ライブラリー、及び4から12残基のランダム化アミノ酸をチオエーテル架橋構造の中に有する環状型ライブラリーを用いた。核酸によって対応付けされ約 10^{13} 乗程度の多様性を持つとされるこれらのペプチドライブラリーを濃度 $1 \mu\text{M}$ 程度の標的分子と混合して核酸を回収する選択操作を6ラウンド繰り返した。ラウンドの進行に伴い標的分子を固定したビーズからの回収量は増加したが、未固定のビーズに対する差は観察されず、新たな APP 結合ペプチドを取得するには至らなかった。この結果を受けて新たな APP の部分配列を化学合成し、さらに N-メチルアミノ酸含有ラ

イブラリーなど他のペプチドライブラリーも調製した。

2. A β オリゴマー(大阪市立大学)

我々が発見した APP E693D 変異を発現するトランスジェニックマウスは、A β オリゴマーを高度に発現することが期待される。このマウス解析から A β オリゴマーの分子病態と病因論学的な意義を解明することができると考えた。同モデルは 24 カ月齢まで老人斑を形成しないことは言うに及ばず、すでに 8 カ月齢頃からニューロン内に A β オリゴマーを蓄積し始めると、シナプス機能低下と記憶障害が現れることが明らかになった。さらに同モデル脳組織で、異常リン酸化タウ、活性化ミクログリアとアストロサイト、神経細胞死を観察することができたことは、老人斑がなくとも A β オリゴマー単独でアルツハイマー病脳病変が誘導されることを強く示唆したことを意味する。今後の案件の 1つが罹患患者脳検索であるが、これ以外では、A β オリゴマー自体の人工合成および生合成を確認し、諸条件の確定をすることであり、その結果、今後の診断・治療法の開発につなげていきたい。

3. 抗タウ治療戦略の検討(同志社大学)

タウオパチーの神経変性がチューブリン消失とそれに伴う非結合型タウの過剰により惹起されるという予備データをもとに進めている。このチューブリン非結合型タウの毒性中和を目的としたチューブリン融合タンパクを構築し、治療戦略を見出す試みとともに、同じく微小管結合タンパクである MAP2 との比較により、タウ分子中の毒性ドメインを決定するつもりである。現在、チューブリン融合タンパクの合成、MAP2、MAP2-tau 融合タンパク発現用のプラスミドの作成を終え、これらを発現する線虫ラインの作成を順次進めている。次年度はこれら完成されたモデル線虫の解析が中心となる。

§ 2. 研究実施体制

(1)-1「A β 産生阻害剤の開発」グループ:特殊ペプチド評価グループ

① 研究分担グループ長:井原 康夫(同志社大学、教授)

② 研究項目

- ・ β CTF アミノ末端結合特殊ペプチドの A β 産生抑制の評価と β CTF 以外の γ セクレターゼ基質の調製
- ・ β 切断阻害評価のための β セクレターゼ活性測定系の構築

(1)-2「A β 産生阻害剤開発」グループ:特殊ペプチド創製グループ

① 研究分担グループ長:佐々木 享(ペプチドリーム、主任研究員)

② 研究項目

β 切断部位結合ペプチドの生成

(2)「A β オリゴマー」グループ

① 研究分担グループ長: 森 啓 (大阪市立大学、教授)

② 研究項目

- ・ 病因アミロイドオリゴマーの設計・製作
- ・ モデルマウスの製作・管理・評価
- ・ モデルマウス評価のためのデータ収集及び解析

(3)「抗タウ治療戦略の検討」グループ

① 研究分担グループ長: 井原 康夫 (同志社大学、教授)

② 研究項目

目的とする症状を発現する線虫の作製とその解析。

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) A β 産生阻害剤開発

我々は β CTF アミノ末端に特異抗体を結合させると A β 産生が抑制されることを見いだした。このことは、 β CTF アミノ末端に特異的に結合する化合物によって基質特異的な A β 産生抑制の可能性を示している。今年度はこの効果の基質特異性を確認する準備段階として β CTF 以外の基質の調製を試みた。従来の基質はアミノ末端に α -galactosidase のシグナルペプチドを付加して調製していたが、 α CTF や Notch など他の基質ではシミュレーション通りにこのシグナルペプチドが切断・除去されず、本来のアミノ末端を保持しないタンパク質のみが調製されていた。本研究ではシグナルペプチドと基質の間に subtilisin 認識配列を挿入した。上記融合タンパク質を発現させた細胞抽出液を subtilisin 親和性カラムにより精製した。精製した組換え基質のアミノ末端配列を決定したところ、本来のアミノ酸配列を保持していた。この組換えタンパク質調製方法は今後多くの基質調製に有用と考えられる。

一方、 β CTF アミノ末端に結合する特異抗体は APP からの β CTF 産生(β 切断)も抑制できる可能性がでてきた。特異抗体の β 切断抑制の有無を検討するために、 β 切断部位近傍配列を含む組換えタンパク質を調製した、 β セクレターゼ活性測定系を構築した。この系に γ 切断を阻害する特異抗体を添加すると、 β 切断を抑制できた。一つの特異抗体で APP の β 切断と γ 切断の双方を抑制できることがわかった。このような性質を保持する特殊ペプチドの調製に期待したい。

(2) A β オリゴマー

本研究の目的は、アルツハイマー病(AD)の発症・進行過程におけるA β オリゴマーの病理学的役割を、我々が家族性認知症患者から同定したアミロイド前駆体蛋白質(APP)の新しい変異 E693 Δ を発現するトランスジェニックマウス(Tg マウス)を用いて調べることである。

まず、このマウスでの老人斑形成やA β オリゴマーの蓄積、シナプス機能や学習記憶機能の変化を生化学、組織化学、電気生理学、行動試験などの手法を用いて調べ、A β オリゴマーモデルマウスとしての妥当性を検証する。次に、A β オリゴマーの蓄積によって、老人斑の形成なしに、シナプスの消失やタウの異常リン酸化、グリア細胞の活性化、ニューロンの消失などのADの病理変化が起こるかどうかを免疫組織化学的に調べる。

研究の方法

<トランスジェニックマウスの作成>

大阪市立大学医学部附属病院の外来受診した家族性認知症患者に同定したAPPの新しい変異 E693 Δ は、老人斑の形成なしに、A β のオリゴマー化を促進することで病気を発症させていると考えられ、この変異型遺伝子を発現するモデルマウスは、可溶性A β オリゴマーによるシナプス機能障害で始まると考えられ、現在もっとも議論の集中している可溶性A β オリゴマー解析に有用と考えられたために、トランスジェニック(Tg)マウスを作成することにした。プリオンプロモーター下流に新変異(E693 Δ)を組み込んだヒトAPPcDNA遺伝子コンストラクトのベクター部分を排除した後、顕微鏡下で受精卵前核へDNAをマイクロインジェクションした。数時間培養後、DNAを注入した受精卵は偽妊娠状態にした雌マウスの卵管に移植し自然分娩で出産した仔マウスをC57BL/6にて少なくとも、10代以上戻し交配したものを確立した。

<生化学的解析>

A β の単量体および多量体形成はウェスタンブロットにより、 β 001抗体、4G8抗体、6E10抗体により検出を試みた。

<免疫組織化学的解析>

マウス脳組織におけるA β は β 001抗体、4G8抗体、6E10抗体、GFAP抗体、Iba1抗体、リン酸化タウ抗体(PHF1)、NeuN抗体により検出を試みた。

<電気生理学的解析>

シナプス機能を検討するためにLTP測定を実施した。

<行動科学的解析>

変異型APPを発現するTgマウスの表現型を調べることで、A β オリゴマーの病理学的役割を探ることにした。

研究の背景

ADは、可溶性A β オリゴマーによるシナプス機能障害で始まると信じられている(A β オリゴマー仮説)。しかし、A β オリゴマーが実際にヒトにおいてADを発症させているという証拠はなく、また、A β オリゴマーがADの病理にどの程度関与しているのかについては不明であった。すなわち、シナプス機能障害から神経細胞死までのすべての過程がA β オリゴマーの存在だけで起こり得るのか、それともADの病理変化の出現にはやはりA β フィブリルや老人斑の存在が必要なのかはわかっていない。

我々が最近、家族性AD患者から同定したAPPの新しい変異 E693 Δ は、老人斑の形成なしに、A β のオリゴマー化を促進することで病気を発症させていると考えられ、上記の問題点を解明するための有用なツールとなることが示唆された。すなわち、この変異を持つマウスは、脳内にA β オリゴマーのみを蓄積し、フィブリルや老人斑を形成しない、ユニークなA β オリゴマーの

モデルマウスになるのではないかと期待された。そこで我々は、この変異型 APP を発現する Tg マウスを作製し、その表現型を調べることで、A β オリゴマーの病理学的役割を探ることにした。

研究成果

マウスプリオンプロモーター下で E693 Δ 変異 APP を発現する Tg マウスを作製した。対照として、同じプロモーター下で野生型 APP を発現する Tg マウスおよび non-Tg 兄弟マウスを用いた。変異型 APP の発現量は、野生型 APP の約 1/2 であった。

様々な月齢でマウスの脳切片を作製し、A β や A β オリゴマーに対する抗体 (β 001 および NU-1 抗体) で免疫染色を行ったところ、この変異型 APP-Tg マウスは、8 カ月齢頃より大脳皮質や海馬のニューロン内に A β オリゴマーが蓄積し始めることがわかった (図1)¹⁾。

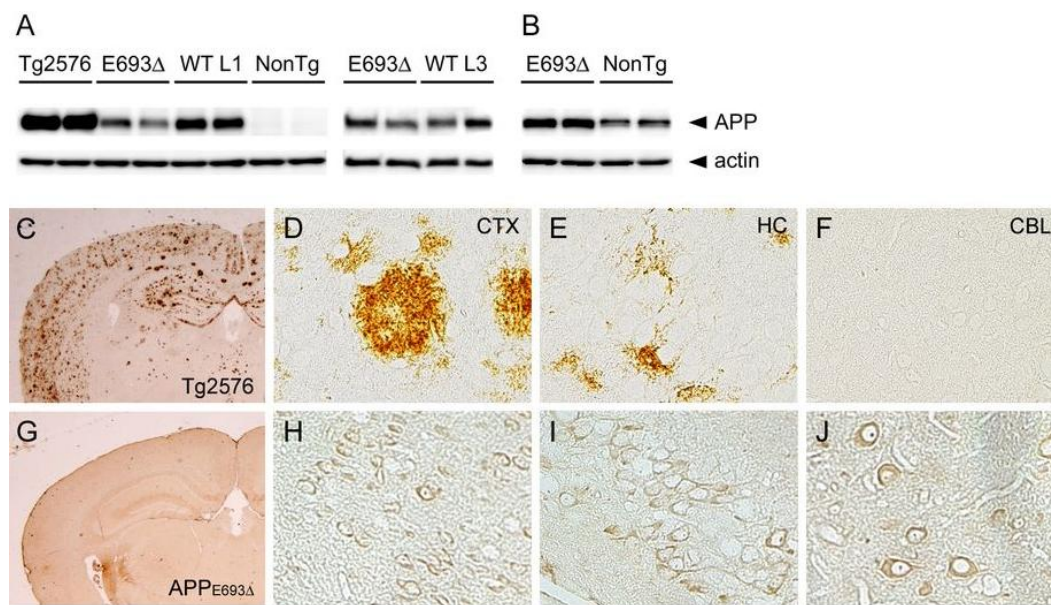
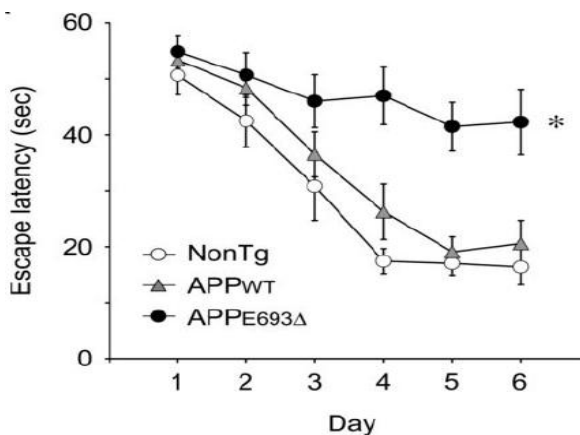


図1. 新しいA β オリゴマーモデル (APPE693 Δ) マウスの脳病理組織像

(A,B) 既存老人斑 (Tg2576) モデルマウス、野生型 APP モデルマウス、新しい A β オリゴマー (APPE693 Δ) モデルマウス、非 Tg マウスのウェスタンブロット分析。(C-F) Tg2576 マウス (G-J) APPE693 Δ マウス。CTX、HC、CBL は各々脳皮質、海馬、小脳をしめす。

しかし、細胞外の老人斑は、24 カ月齢においても検出されなかった¹⁾。前シナプスのマーカーであるシナプトフィジンに対する抗体で染色したところ、この変異型 APP-Tg マウスは、8 カ月齢頃より海馬のシナプスが消失し始めることが確認された。そこで、8 カ月齢でこのマウスのシナプス機能および学習記憶機能を電気生理学および行動試験により調べた¹⁾。その結果、海馬シナプスの長期増強の抑制およびモリス水迷路での空間参照



記憶の低下が認められた(図2)¹⁾。さらにアルツハイマー病患者で検討された PiB-PET によるアミロイドイメージング²⁾をモデルマウスに応用したところ脳病理組織検索と一致して陽性シグナルを検出しなかった(Mori 未発表、Higuchi 未発表)。

以上の結果より、このマウスがA β オリゴマーのモデルマウスとして妥当であることが示された。

次に、病理学的タウに対する抗体(PHF-1 および MC1 抗体)、アストロサイトのマーカーGFAP に対する抗体、ミクログリアのマーカーIba-1 に対する抗体、成熟ニューロンのマーカーNeuN に対する抗体などを用いて、このマウスの脳に AD の病理変化が起こっているかどうかを免疫組織化学により調べた。その結果、このマウスは、8 カ月齢でタウの異常リン酸化、12 カ月齢でミクログリアの活性化、18カ月齢でアストロサイトの活性化、そして24カ月齢で海馬ニューロンの消失を示した。

以上の結果より、A β オリゴマーだけでADに認められる主な病理変化が引き起こされること、すなわち、A β オリゴマーだけでADが発症・進行し得ることが示唆された。

A β オリゴマーのみを蓄積し、フィブリルや老人斑を形成しない AD のモデルマウスはこれが初めてであり、現時点でオリゴマー仮説の問題点を解明することのできる唯一の動物モデルであると考えられる。このマウスは、A β オリゴマーをターゲットとするADの新しい診断・治療薬の開発のための有用なツールとなると期待される。

本研究により、ADの発症・進行過程におけるA β オリゴマーの病理学的役割を明らかにすることができた。また同時に、本研究により、老人斑はADの進行に必ずしも必要ではない可能性が強く示唆された。このことは、老人斑の病理学的意義やADの定義を考える上で重要な情報となるであろう。

(3) 抗タウ治療戦略の検討

チューブリン発現によるタウオパチー rescue の可能性

タウオパチー変性神経ではタウの蓄積と共に微小管(チューブリン)の消失が知られている。これまでの予備的解析から、通常 tubulin (hetero)dimer と結合しているタウが、tubulin の消失と共に非結合型となり、これが神経毒性をもたらすのではないかと考えている。これは、tubulin に代わるタウ結合タンパクを補填し、非結合型タウを中和することで、タウオパチーを抑えられる可能性を意味している。本年度は、このチューブリン融合タンパクの構築をおこなった。全長 tubulin では保存された発現抑制機構がはたらき、過剰発現ができないことが確認されている。これに対し、タウ結合領域と考えられている tubulin の C-末フラグメントと蛍光タンパク mCherry を融合させることにより、培養細胞系においても十分な発現量を確保でき、かつ in vitro においてタウと結合できるコンストラクトの構築に成功した。今後、このベクターをタウ線虫に発現させ、神経障害の改善について検討する予定である。

微小管安定化薬の薬理効果

一方、低分子量化合物による微小管自体の安定化もタウオパチー抑制につながると考えられる。タウオパチー線虫モデルは薬物スクリーニングの系としても優れており、他の課題におい

ですすでに有効な化合物を同定している。定法に従い、代表的な微小管安定化薬である taxol を線虫飼育培地上に塗布し、そのタウ線虫への効果を確認した。その結果、現在までに taxol によるタウオパチー線虫の神経症状に対する改善効果については確認できなかった。Taxol の bioavailability の低さが問題と考えられたため、新たに薬物浸透性の高い変異株 acs-20 との交配を進めたが、acs-20 とタウの transgene が同一の chromosome あった為、解析可能な株の完成に至らなかった。今後は溶媒、投与方法の改善を目指し、その効果について決定したい。

タウフラグメント発現線虫の解析

すでにタウの N-末端半分、C-末端半分で発現する線虫株を樹立しており、C-末端側の発現により、タウ全長よりも強い神経症状が現れることを確認している。N-末端については発現が得られなかったためその毒性については不明であった。mRNA の発現は十分であった為、タウ N-末フラグメントの急速な分解が予想された。これに対し、RNAi 法を用いた proteasome 阻害を試みたが、フラグメントの発現は見られなかった。今後は MAP2c あるいは蛍光タンパク質との融合により安定的な発現を維持させ、神経毒性の判定に進めたい。

タウ/MAP2 キメラタンパク質発現線虫の作成

神経細胞には、タウと同様な微小管結合タンパク MAP2 がある。両者の微小管結合領域は 68.8% の homology、92.5% という極めて高い similarity を有しているにもかかわらず、MAP2 にはタウのような関連疾患の報告は無い。タウが主に軸索、MAP2 が主に神経細胞体と樹状突起に局在すること以外機能上の差異は不明であり、動物モデルを用いて両者の神経毒性を比較した例はない。本課題では、これまで作成してきた全長タウ、タウ N-末端および C-末端フラグメントに加え、全長 MAP2c、タウと MAP2 のキメラタンパクを発現する線虫の作成を試みた。これまでに必要とされるプラスミドの構築を終えており、次年度より線虫モデルの作成を進める予定である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Lambert M, Klein W, and Mori H: A mouse model of amyloid beta oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo" *J Neurosci* 30(14): 4845-4856,2010; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5825-09.2010
2. Villemagne VL, Ataka S, Mizuno T, Brooks WS, Wada Y, Kondo M, Jones G, Watanabe Y,

Mulligan R, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, O'Keefe GJ, Masters CL, Mori H, Rowe CC:
High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease
mutation types. *Arch Neurol* 66(12):1537-1544, 2009