

「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

井原康夫

同志社大学生命医科学部・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. 膜可溶化画分系を利用した特殊ペプチドによる A β 産生抑制

β CTF に結合する10種類の直鎖状特殊ペプチドについて、 β CTF からの A β 産生を抑制能を評価したところ、ほとんどすべてのペプチドについて A β の産生を抑制することが確認できた。このうち1種については Notch の切断を抑制しないことがわかり、基質特異的に A β 産生抑制できることが確認された。一方、上記10種類のペプチドについて β 切断阻害効果を調べたところ、6種類について阻害効果を確認することができた。この6種類の中には上記の Notch 切断を阻害しないペプチドが含まれていることから、少なくとも现阶段で *in vitro* で γ 切断と β 切断の双方を阻害する直鎖状特殊ペプチドがえられた。一方、 β CTF に結合する3種類の環状特殊ペプチドについても、 β CTF からの A β 産生抑制能を評価したところ、1種類について A β の産生を抑制することが確認できた。

2. A β オリゴマー (大阪市立大学)

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。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

タウ/チューブリンバランス仮説の検証をおこなった。チューブリン減少時に引き起こされるタウ依存性の神経機能障害に対し、RNAi 法によるタウの相対的発現量の低下が十分神経保護効果を示すことを明らかとした。この結果は今後の抗タウオパチーペプチドの効果を予見するものであると同時に、タウの発現抑制効果を有する低分子量化合物の開発の可能性にも繋がる結果である。また、タウの近縁タンパク質である MAP2 (タウと同様 C 末端部分に微小管結合部位 3 repeat を有する)の発現により、タウと同様な神経毒性が再現される事実を見出した。これまでの解析結果を統合し、微小管結合領域の構造が神経毒性配列であることが強く示唆された。

§ 2. 研究実施体制

(1) 特殊ペプチド評価グループ (同志社大学)

① 研究分担グループ長: 井原康夫 (同志社大学生命医科学部、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確立
- ・ β セクレターゼ切断機構に着目した特殊ペプチドによる A β 産生抑制の検討

(2) 特殊ペプチド創製グループ ((株)ペプチドリーム)

① 研究分担グループ長: 佐々木 亨 ((株)ペプチドリーム、主任研究員)

② 研究項目

- ・ 特殊ペプチドのスクリーニング

(3) 「A β オリゴマー」グループ (大阪市立大学)

① 研究分担グループ長: 森 啓 (大阪市立大学医学研究科、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

(4) チューブリンバランス検証グループ (同志社大学)

① 研究分担グループ長: 井原康夫 (同志社大学生命医科学部、教授)

② 研究項目

- ・ 微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明

- ・タウ毒性領域の同定
- ・抗タウオパチーペプチドのスクリーニング

§ 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. 膜可溶化画分系を利用した特殊ペプチドによる A β 産生抑制

「研究目的」アルツハイマー病治療・予防のため基質特異的 A β 産生抑制剤の開発を目指す。特殊ペプチド創製グループ(ペプチドリーム株式会社)が創製する特殊ペプチドの基質特異的 A β 産生抑制効果を評価するため、これまでに確立した γ セクレターゼ膜可溶化画分系を利用する。また、 β CTF 以外の基質も調製・評価することで基質特異性を確認する。また、 β セクレターゼの切断抑制も評価するのでその反応系を確立することも目的としている。

「方法」(1)創製された β CTF アミノ末端結合特殊ペプチドについて、 γ セクレターゼ膜可溶化画分を用いて A β 産生抑制効果を検討するため、 β CTF や他の基質を含む γ セクレターゼ反応液にこれらのペプチドを添加して、A β 産生と他の基質の切断について検討した。(2)これらのペプチドによる β 切断阻害効果を検討するために、 β 切断近傍配列を含む組換え APP 断片を調整し、 β セクレターゼ活性測定系の確立を試みた。(3)上記 β セクレターゼ活性測定系を用いて、特殊ペプチドによる APP の β 切断抑制を検討した。

「結論」(1)創製された β CTF アミノ末端結合特殊ペプチドのうちほとんどが A β 産生を抑制した。基質特異性/選択性について Notch 基質を利用して検討したところ、一種類のペプチドで A β に対して高い選択性を示した。(2) β 切断近傍配列を含む組換え APP 断片を調製し β セクレターゼ基質として利用したところ、 β 切断を確認することができた。(3) γ セクレターゼ膜可溶化画分系において A β 産生を抑制したペプチドは、 β 切断近傍配列を含む組換え APP 断片の β 切断も抑制することができた。

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、われわれ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>

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導入し、数時間培養してから偽妊娠状態の雌マウスの卵管に移植した。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とした。

研究の背景

これまでADは、老人斑を形成するアミロイド線維が病因として重要な役割を果たしてきたという考えであったが、近年、A β オリゴマーが主要病因作用を担うという議論がある(A β オリゴマー仮説)。しかし、A β オリゴマーとADの病理については不明であった。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 (大阪変異)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、有用な知見を付与することが示唆された。変異型APPを発現するモデルマウスを調べることで、A β オリゴマーの病態寄与への詳細な検討をした。

研究成果

1. 細胞内オリゴマーの蓄積と脳内病変

モデルマウス脳内では、A β オリゴマーが8カ月齢頃より大脳皮質や海馬のニューロン内に蓄積し、さらにシナプス障害が生じることも示した(図1)¹⁾。このニューロン内蓄積が、A β ₁₋₄₀あるいはA β ₁₋₄₂に依るものかについては決着しておらず推測の域が出ない。

細胞内蓄積A β は、細胞外へ分泌されるA β と、ある意味で逆比例の関係にある。蓄積が増加するという事は、分泌量低下になることが示唆されるが、大阪変異をもつ遺伝子発現をする細胞では、A β オリゴマーが増加するという特徴の他に、細胞内A β オリゴマーの蓄積と細胞外への分泌低下が観察されている。細胞外への分泌には、細胞内コレステロールが重要である²⁾。これには、A β ₁₋₄₀あるいはA β ₁₋₄₂の化学的な性質が大きく関係することがin vitroの系で示唆された³⁾。

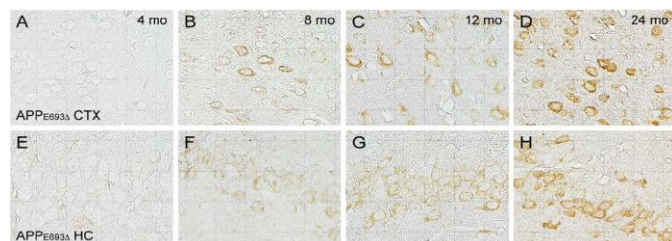


図1. A β オリゴマーモデル(APPE693 Δ)マウスにおける脳病理組織像の経時変化
オリゴマー型ADマウスの4m、8m、12m、24mでのA β オリゴマーをオリゴマー特異抗体
(NU-1)にて免疫染色。CTX、HCは大脳皮質、海馬領域を示す。

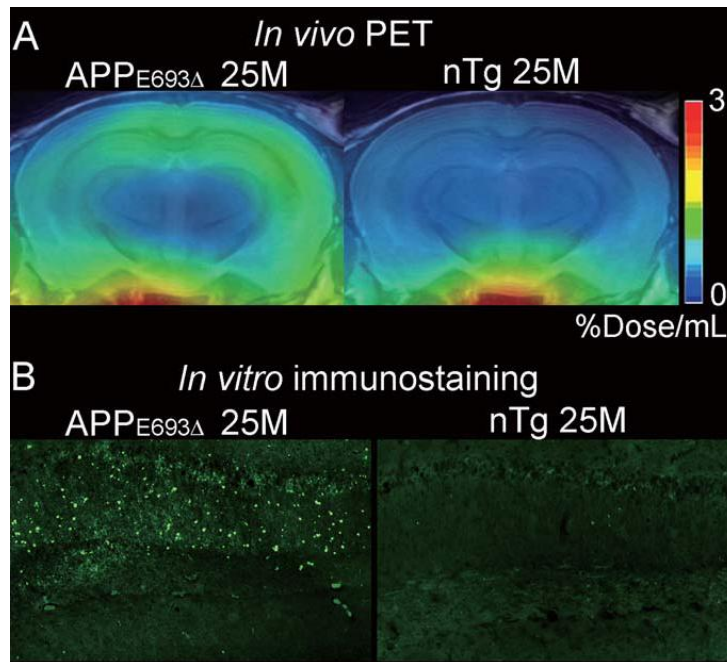


図2. A β オリゴマーモデル (APPE693 Δ) マウスの脳内炎症変化

A: 活性化ミクログリア反応は、18kDaの輸送分子として知られる末梢系ベンゾジアゼピン受容体に結合する放射能標識リガンドを使用して活性化ミクログリアの脳画像PETをしめす。B: リガンド抗体 (NP155) による海馬CA1染色。生体脳画像と脳組織標本が一致することがわかる。

アストログリア、ミクログリアの経時的増加も観察されたことから、脳内炎症を示唆する免疫反応に関与する生体変化が細胞内A β オリゴマー蓄積と同期していることが観察された。これは、マウスの生体レベルでのPETを使用した脳画像でも確認することが出来ている⁴⁾。この結果より、脳神経炎症のトリガーは、アミロイド老人斑だけでなく、非線維性A β オリゴマーも脳炎症の原因と成ることが示された。更なる検討のために、ヒト型タウ遺伝子を発現するモデルマウスとの交配を計画している。

2. 細胞死分子機構

小胞体でのA β オリゴマー蓄積は、小胞体ストレスを介して細胞死を誘導する事が知られているが、細胞死におけるミトコンドリアの関与は老化における酸化ストレスの議論を考慮した場合重要なファクターとなる。そこで、A β オリゴマーによるミトコンドリア機能への影響について検討した。

ミトコンドリア内膜成分として電子伝達系作用を担っている機能性チトクロームC (赤色) が APPE693 Δ 発現をした細胞ではミトコンドリア集積が少なく、機能低下が示唆されている。実際、ミトコンドリア画分から細胞質画分への漏出があることを確認している (図3. B, C)。これらの培養細胞を用いた結果はA β オリゴマーモデル (APPE693 Δ) マウス脳内においても検証された。以上を総合して、A β オリゴマーの細胞内発現と蓄積によって、ミトコンドリアの形態はチューブ状からドット状もしくは凝集体へと変化するだけでなく、ミトコンドリア内膜のチトクロームC分子の細胞質への漏出が生じることが明らかとなった⁵⁾。

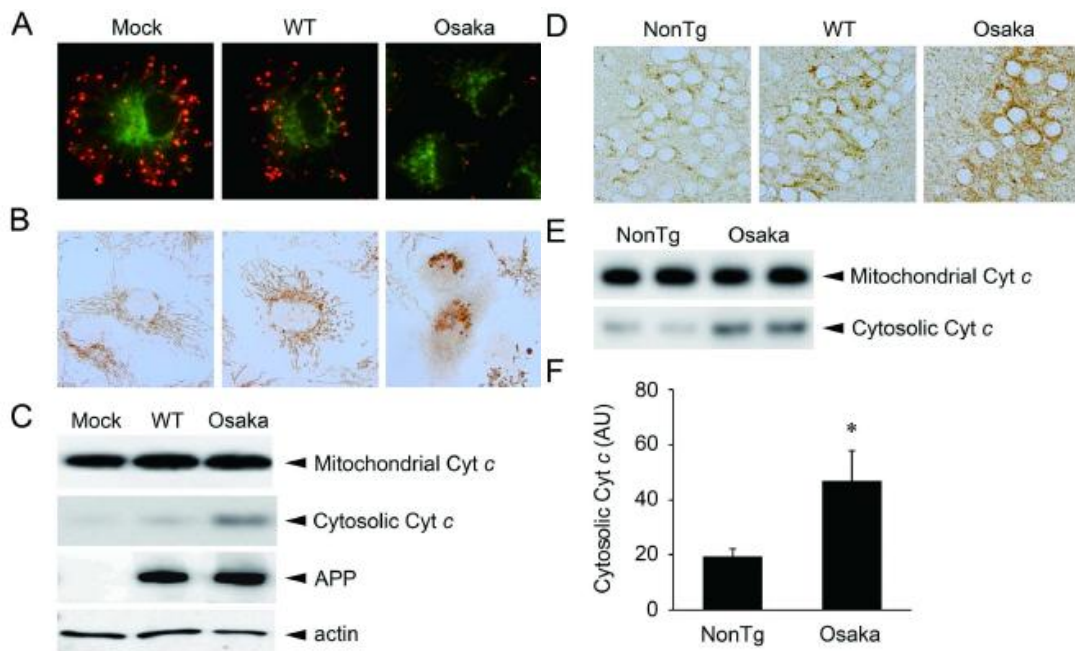


図3. Aβオリゴマーによるミトコンドリア機能への影響

A:ミトコンドリアのCOS細胞内分布。ミトコンドリアレポーター分子(JC-1)染色したもの。B:同細胞のDAB染色像。C:チトクロームC染色が細胞質にあることを、細胞分画した後にウェスタンブロットにより検出した。D-F:Aβオリゴマーモデル(APPE693Δ)マウス脳におけるミトコンドリア観察。D:脳組織の免疫染色像、E:ミトコンドリアを脳組織から細胞分画したウェスタンブロット像、F:Eを定量したもの。

3. タウ/チューブリンバランス説の検証

これまでのタウオパチーモデル線虫を用いた解析から、チューブリンに対するタウの相対的な発現比が高くなることでタウオパチーが惹起される可能性を見出している。これに対し、チューブリン発現によるタウオパチー rescue の可能性、微小管安定化薬によるタウオパチー rescue の可能性、RNAi 法によるタウ発現抑制によるタウオパチー発症のコントロールの3つの方法を検討した。その結果、チューブリン過剰発現ではそれ自体で神経機能毒性が現れたことから、将来の治療戦略として適正でないと判断した。また、微小管安定化薬については汎用されている taxane 誘導体から、より細胞内移行性の高い macrolide 系化合物 (Epothilone B) に変更し、その効果について確認した。現在までに有効性は確認できておらず、in vivo における微小管安定化効果自体について検証中である。一方、RNAi 法によるタウの発現抑制については成功し、tubulin 減少時に認められるタウ依存性の神経機能障害を有意に軽減した。これはタウ/チューブリンバランス仮説を裏付けるとともに、タウ発現量コントロールによるタウオパチー治療の可能性を示唆している。

タウの神経毒性領域の同定では、タウの近縁タンパク質である MAP2 の発現線虫の確立に成功した。平成21年度に手がけていた抗 unc-119 抗体の作成にも成功し、それを用いた発現量と神経機能障害の検討をおこなった。その結果、MAP2 にはタウと同等以上の神経毒性を有する結果を得た。現在、これらモデル線虫の生化学的、形態学的解析を進めている。平行してタウ、

MAP2 およびそれらフラグメント、融合タンパク質の精製を終え、チューブリン、微小管との会合における in vivo, in vitro 系を組み合わせた解析の準備を進めている。これらタウと MAP2 の比較解析をさらに進め、タウの神経毒性機構について解明したい

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Mori H, Tomiyama T, Ishibashi K, Ohnishi K, Teraoka R, Fukushima A, Takuma H, Shimada H, Ataka S, Umeda T, Kitajima E, Fujita Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Miki T, Matsuyama S, Iso H, Nagata T, Nishizaki T, Wada Y, Yoshioka E, Watanabe Y: Oligomeric A β is the sole culprit molecule to cause Alzheimer's disease? *Hiroasaki Med J* 60(Suppl.): S105–S110, 2010 DOI:なし
2. Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T: Regulation of cholesterol efflux by amyloid β secretion. *J Neurosci Res* 88: 1985-1994, 2010 DOI: DOI: 10.1002/jnr.22360
3. Suzuki T, Murakami K, Izuo N, Kume T, Akaike A, Nagata T, Nishizaki T, Tomiyama T, Takuma T, Mori H, Irie K: E22delta Mutation in amyloid β -protein promotes β -sheet transformation, radical production, and synaptotoxicity, but not neurotoxicity. *Int J Alzheimers Dis* 2011:431320-7, 2011 DOI:10.4061/2011/431320
4. Maeda J, M-R Zhang, Okauchi T, Bin Ji, Ono M, Hattori H, Kumata K, Iwata N, Saido T, Trojanowski J, Lee V, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M: In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid- β and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J Neurosci* in press
5. Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, Mori H: Intraneuronal amyloid β oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* in press
6. Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, Takashima A: Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. *FEBS Lett* 584: 3227-3232, 2010 DOI:10.1016/j.febslet.2010.06.014

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0件)