

「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 19 年度採択研究代表者

岩坪 威

東京大学大学院医学系研究科・教授

アルツハイマー病根本治療薬創出のための統合的研究

## 1. 研究実施の概要

アルツハイマー病(AD)の分子病態の理解に基づく、有効な AD 根本治療・予防法の開発を目標とし、AD の病因タンパク質  $\beta$  アミロイドの産生、凝集、クリアランスの分子機構を解明し、各ステップを特異的にブロックないし改善する新機軸の治療薬リードを、低分子化合物を中心に創出することを目標とするのが本研究プロジェクトである。A $\beta$  産生については、 $\gamma$  セクレターゼの構造・機能関連の解析を、ケミカルバイオロジー的手法を駆使して行う。A $\beta$  そのものについては、各種重合体の形成・毒性機構、ならびに  $\beta$  アミロイドに結合しその凝集に影響を与える apoE, CLAC などの結合蛋白質の病的機能について解析する。抗  $\beta$  アミロイド治療法として最も期待されている「A $\beta$  免疫療法」のメカニズムの1つとして脳から血中への A $\beta$  ペプチドの排出(クリアランス; sink 現象)が注目されているが、in vivo レベルでの分子メカニズムは明らかになっていない。血液脳関門特異的条件的ノックアウトマウスやモデル細胞を用い、A $\beta$  クリアランスの全容を解明、A $\beta$  排出促進療法のデザインに示唆を与える。AD の根本治療を実現するには、AD の初期病態を鋭敏に反映するバイオマーカーの同定が重要である。AD 患者において、アミロイドイメージングによる脳内アミロイド蓄積の検出感度の向上をめざし、血液バイオマーカーとの対比につなげる。本年度は  $\gamma$  セクレターゼの代表的阻害薬であるジペプチド型阻害剤の光感応性誘導体を用いて、本阻害薬の標的分子がプレセニン1アミノ末端断片にあることを実証した。またシステインスキャン法を用い、プレセニン1の第9膜貫通部位が酵素活性と基質結合に重要な役割を果たすことを示した。 $\gamma$  セクレターゼを阻害する機能抗体として作動する抗ニカストリン抗体を作出、癌細胞株の発育阻害活性を見出した。apoE が in vitro で A $\beta$  のプロトフィブリルに対して、アイソフォーム特異的な維持作用を有することを示した。A $\beta$  結合タンパク質 CLAC が in vivo でアミロイド斑のコンパクト化に作用することを実証した。血液脳関門培養細胞 TR-BBB を用いて、A $\beta$  の輸送に LRP1 が関与することを示した。また血中の抗 A $\beta$  抗体が脳内 A $\beta$  に作用する機序について検討を加えた。今後  $\gamma$  セクレターゼの構造・機能関連の検討を進め、A $\beta$  42 選択的抑制薬の作動機序を明らかにするとともに、A

$\beta$  の凝集と細胞毒性の関連を解明、免疫療法とクリアランスの分子機構についても解析を進める予定である。

## 2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1) に対応する)

アルツハイマー病における病因タンパク質  $A\beta$  の産生、凝集、毒性、排出機構について分子・細胞生化学的手法、ケミカルバイオロジー的手法を結集して解析し、その結果を有効な治療法の開発とその作用メカニズムの実証に繋げることが本研究の目的である。まず  $A\beta$  産生プロテアーゼである  $\gamma$  セクレターゼの構造・活性連関をターゲットに研究を行った。 $\gamma$  セクレターゼはプレセニリンを活性中心とする膜タンパク質複合体であり、 $\gamma$  セクレターゼ阻害薬がどの分子のどのサブドメインを標的とし、いかなる作用機序で阻害作用を発揮するか の解明は、阻害薬開発の上でも重要である。強い  $\gamma$  セクレターゼ阻害活性を発揮する、代表的な阻害薬サブクラスである dipeptidic type inhibitor の DBZ および Compound E に光感応基 (ベンゾフェノン) とビオチンを結合したプローブ分子を合成し、その標的分子を探索したところ、プレセニリン1(PS1)のアミノ末端断片への結合が証明された[1]。この結果は、これらの阻害薬の作用機構ならびに  $\gamma$  セクレターゼに対する特異性決定の上で重要と考えられた。さらに PS1 の single cysteine 変異体を系統的に作出し、システイン結合性標識試薬である MTSEA-biotin を用いたラベリング実験 (substituted Cysteine accessibility method; SCAM) を施行し、これまでにその存在を実証してきた第6, 7膜貫通部位から構成される親水性触媒ポアに、第9膜貫通部位が関与すること、また同部位が切断基質の結合と認識に重要な役割を果たすことを示唆した (J Neuroscience 誌投稿・改訂中)。また SCAM 法を  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬・モジュレータ薬の存在下で施行することにより、 $A\beta$  42 上昇性モジュレータである fenofibrate の存在下で、触媒ポアを構成する PS1 第6膜貫通部位の特定アミノ酸がマスクされ、ポア構造に変化が生じることを示唆する結果[2]をもとに、 $A\beta$  42 低下性モジュレータ薬の作用機序につき、解析を進めた。RNAi スクリーンから見出された、 $\gamma$  セクレターゼによる Notch 切断に特異的に関与する膜タンパク質 surf-4 が Notch の小胞体から細胞表面膜への輸送に関与することを見出した。 $\beta$  セクレターゼ活性を特異的に低下させる糖脂質スフィンゴシンリン酸化酵素阻害薬が  $\beta$  切断を制御することを見出した。 $\gamma$  セクレターゼ複合体の基質認識ユニットとも目されるニカストリンに対するモノクローナル抗体が、機能阻害抗体として作動し、 $\gamma$  セクレターゼ活性を細胞外から阻害できることを確認した。

$A\beta$  結合タンパクであり、その遺伝多型が AD の発症リスクに関与する apoE は  $\epsilon$ 2,3,4 の3種の多型を有する。apoE が  $A\beta$  の凝集中間体であるプロトフィブリルに結合すること、 $\epsilon$ 3 はプロトフィブリルから線維への転換を抑制するが、AD 発症リスクの高い  $\epsilon$ 4 はその作用を有さず、線維形成過程を促進させることが AD 発症の原因の1つとなる可能性を指摘した。 $A\beta$  結合タンパク質 CLAC の前駆体を発現するトランスジェニックマウスと、アミロイド  $\beta$  前駆体 (APP) トランスジェニックマウスを交配

し、CLAC がアミロイド蓄積形態に影響を与え、そのコンパクト化を促進することを見出した。今後 CLAC 前駆体ノックアウトマウスの表現型も解析し、その正常機能とADにおけるアミロイドに対する作用の関連についても調べる予定である。A $\beta$ の凝集・蓄積がAD発症の原因につながることは遺伝学的・病理学的知見より確実であるが、A $\beta$ 毒性の実体と、その標的分子は未だ不明である。尾藤・奥野らは、初代培養ニューロンのカルシウム動態をリアルタイムイメージングで解析可能な実験系を確立し、種々のA $\beta$ 凝集体の投与による毒性効果の系統的解析に道を開いた。さらに、今後A $\beta$ 凝集・蓄積が顕著なADモデルマウス由来の切片標本にて急性のカルシウム測定実験を可能にするため、E15 マウス胚脳室へレンチウイルスベクターを導入法を確立し、実際に大脳皮質 2-3層ニューロンに遺伝子導入可能であることを確立した[3]。

A $\beta$ の脳内からの排出・除去機構は、孤発性ADの発症に重要な役割を果たす可能性があり、またAD治療法として最も期待されているA $\beta$ 免疫療法の標的過程とも目されている。血液脳関門の最外表に位置する脳毛細血管内皮細胞は、A $\beta$ 輸送に決定的な役割を果たす可能性がたかい。脳毛細血管内皮細胞から不死化されたTR-BBB細胞を用いて、A $\beta$ の取り込み実験を行い、本細胞が放射性ラベルA $\beta$ を急速かつ多量に取り込み、排出すること、この取り込みがLRP1阻害タンパク質RAPならびにLRP1中和抗体、LRP1に対するRNAiノックダウンにて抑制されることから、LRP1の関与をはじめて実証した(投稿中)。現在血管内皮特異的LRP1ノックアウトマウスが作出でき、致死でないことを確認し(全身性KOマウスは致死)、A $\beta$ 蓄積に対する影響を交配実験により確認中である。さらに抗A $\beta$ 抗体を全身投与したAPPトランスジェニックマウス脳において、モノマー型A $\beta$ が逆説的に増加するのに対し、全A $\beta$ 量は不変であることを見出し、オリゴマー型もしくは高分子結合型A $\beta$ の減少を介して、抗体療法が奏功する可能性を見出しつつある。本知見は、A $\beta$ 抗体療法の基本メカニズムを考える上で極めて重要と考えられる。

抗A $\beta$ 療法が臨床的に有効性を発揮するためには、神経細胞死、シナプスの不可逆的障害が生じ、認知症が発症する以前にアミロイド蓄積を検出し、治療を開始することが必要となる。現在臨床的に最も有効な非侵襲的アミロイド検出法である「アミロイドイメージング」の臨床的に有効なプローブとして、荒井ら・工藤らにより本邦独自に開発されたチオフラビン誘導体低分子化合物BF-227の<sup>11</sup>C誘導体を用いたヒトAD患者における撮像に成功した[4]。さらに、<sup>18</sup>F誘導体BF-227を合成し、<sup>11</sup>C誘導体と同等にアミロイド結合性を有することを確認した。今後脳アミロイドイメージング陽性と連動して動く血液バイオマーカーを検証し、トランスジェニックマウスを用いた動物実験にてその動作原理を追究し、発症前診断バイオマーカーとして確立したい。

このように $\beta$ アミロイドを標的とする治療原理の解明に初年度から大きな進展があった。次年度はさらにこれらの研究を深めるとともに、A $\beta$ 42特異的 $\gamma$ セクレターゼモジュレータの作動原理解明、低分子化合物スクリーニングの遂行、A $\beta$ 毒性の解析、脳内A $\beta$ 動態の解明と抗体療法の作動原理解明に力点をおきつつ、プロジェクトを展開したい。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 東京大学グループ

① 研究分担グループ長: 岩坪 威 (東京大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・ $\gamma$  セクレターゼ複合体の膜内構造、とくに活性に重要な C 末端部分の構造・機能関連の substituted Cys accessibility method (SCAM)法による解析。
- ・ $\gamma$  セクレターゼ複合体の構成因子ニカストリンの細胞外部分に対する機能抗体作出と、 $\gamma$  セクレターゼ阻害抗体療法の検討。
- ・ショウジョウバエ S2 細胞における  $\gamma$  セクレターゼ活性を阻害・増強する遺伝子の探索。
- ・sphingosine kinase (SK) 阻害剤処理による  $\beta$  セクレターゼ活性の阻害効果の解析。
- ・apoE のアイソフォームごとの中間凝集体の形成に対する効果の in vitro の凝集実験による解析。
- ・A $\beta$  凝集体がシナプスに及ぼす影響の、初代培養神経細胞カルシウムイメージングによる検証方法の検討。
- ・AD 脳老人斑アミロイド結合成分 CLAC の A $\beta$  蓄積に対する効果に関する、二重トランスジェニックマウスを用いた組織学的検討。
- ・脳毛細血管内皮細胞を不死化した TR-BBB 細胞を用いた、A $\beta$  輸送モデルの確立。
- ・脳血液関門特異的 LRP-1 ノックアウトマウス確立と、A $\beta$  輸送の in vivo 検証。

#### (2) 東北大学グループ

① 研究分担グループ長: 荒井 啓行 (東北大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・ヒト脳アミロイドの画像診断による検出、バイオマーカーの創出、抗アミロイド薬の同定

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

- [1] Fuwa H, Takahashi Y, Konno Y, Watanabe N, Miyashita H, Sasaki M, Natsugari H, Kan T, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Divergent synthesis of multifunctional molecular probes to elucidate the enzyme specificity of dipeptidic  $\gamma$ -secretase inhibitors. ACS Chemical Biology 2:408-418, 2007
- [2] Isoo N, Sato C, Miyashita H, Shinohara M, Takasugi N, Morohashi Y, Tsuji S, Tomita T, Iwatsubo T: A $\beta$ 42 overproduction associated with structural changes in

the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase: common effects of Pen-2 amino-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem* 282:12388-12396, 2007

- [3] 奥野浩行、藤井哉、尾藤晴彦: 情報素子としてのシナプス・構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義-. p220-233, in ナノメディシン 宇理須恒雄 編、オーム社、東京 (2008)
- [4] Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H 2-(2-Dimethylaminothiazol-5-yl) Ethynyl-6-(2-Fluoroethoxy) Benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J. Nucl. Med.* 48:553-561, 2007