

「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

平成 20 年度
実績報告

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

本研究プロジェクトは、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 β 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。A β 産生については、 γ セクレターゼの構造・機能連関の解析を、阻害薬の作動機序解明に主眼を置いて、ケミカルバイオロジー的手法を駆使しつつ行う。A β については、重合体の形成・毒性機構、ならびに β 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 β アミロイド治療法として最も進んでいる「A β 免疫療法」のメカニズム、ことに脳から血中への A β ペプチドの排出クリアランスの分子メカニズムにつき、遺伝子改変マウスやモデル細胞を用いて解明する。AD の根本治療実現にむけて、AD の初期病態を鋭敏に反映するバイオマーカーの同定をめざし、ヒト脳において、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と血液バイオマーカーとの対比につなげる。本年度はシステイン化学を用いた SCAM 法により、プレセニリン1の第9膜貫通部位が基質進入サイトとして重要な役割を果たすことを実証し、さらに第2、6膜貫通部位が基質結合部位である可能性を示した。ヘリックスを形成する β ペプチドからなる“フォルダマー”が γ セクレターゼ阻害能を有することを示した。 γ セクレターゼ構成因子であるニカストリンに対するモノクローナル抗体を基にした scFv フラグメントが、 γ セクレターゼ中和活性を有することを見出した。神経細胞において、細胞内スフィンゴシン 1 リン酸濃度が β セクレターゼ活性を直接規定していることを明らかにした。apoE が *in vitro* で A β 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、*in vivo* の検討を開始した。血液脳関門培養細胞 TR-BBB を用いて、A β の取り込み輸送に LRP1 が関与することを示した。また血中に投与した抗 A β 抗体が脳内 A β に作用する機序について検討を加え、脳内抗体結合型 A β を増加させることを示した。今後 γ セクレターゼの構造・機能連関につき、PS1 の全長にわたる解明を進め、阻害薬・モジュレータ薬の作動機序を明らかにするとともに、A β 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 *in vivo* の分子機構についても解明し、治療方策の開発に繋げる。

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 β 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を目的として第2年目の研究を行った。A β 産生プロテアーゼについては、 γ セクレターゼの構造・活性関連につき集中的に研究を行った。 γ 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、 γ セクレターゼ阻害薬が PS1 のどの部位を標的とし、いかなる作用機序で阻害作用を発揮するかをの解明は、阻害薬開発の上でも重要である。substituted cysteine accessibility method(SCAM)を用いて、 γ セクレターゼの活性中心サブユニットである9回膜貫通型タンパク質 PS1 の第8膜貫通部位からカルボキシ末端までの構造を解析した結果、PS1 の第8膜貫通部位は疎水性環境にあること、それに引き続く PAL モチーフ周辺は親水性環境にあることを見出した。また第9膜貫通部位にシステインを置換した変異体のいくつかが親水性を示し、陽性を示す位置が周期性を示したことから、第9膜貫通部位は α ヘリックスを形成し、その一面が親水性環境に面していることが推定された。各膜貫通部位の間の位置関係を調べるため、PS1 の2つの膜貫通部位にそれぞれ1個のシステインを置換した変異体にクロスリンク実験を行ったところ、PAL モチーフならびに第9膜貫通部位のそれぞれが、活性中心アスパラギン酸を含む第6膜貫通部位と近接していることが示された。以上の結果から、PAL モチーフと第9膜貫通部位が活性中心ポアの形成に加わるものと考えられた。異なる作動機序の予想される3種の γ セクレターゼ阻害薬の存在下で SCAM を行い、遷移状態模倣型 γ セクレターゼ阻害薬が PAL モチーフと第9膜貫通部位の一部に結合することを示し、これらが触媒部位を構成することを示唆した。これらの結果を総合し、 γ セクレターゼの基質はまず PS1 の第9膜貫通部位に結合し、その後 PAL モチーフと第9膜貫通部位の一部を含む活性中心ポアに移動し、切断されるというメカニズムを提唱した[1]。さらに第1膜貫通部位をはじめとする PS1 アミノ末端側の解析に着手し、第1膜貫通部位も触媒部位の構成に関与する予備的知見を得た。

γ セクレターゼによる基質認識に関わる「基質結合部位」の同定を目指し、PS1 の各膜貫通領域を置換・改変した各種キメラタンパクを解析した。これまで本手法を用いて第4膜貫通部位が Pen-2 との結合部位であることを見出している。全9膜貫通部位について検討を進めた結果、PS1 の第1、5、8、9膜貫通部位は、 γ セクレターゼの安定性にも関与していることを示した。またケミカルバイオロジー的手法である光親和性標識実験を併用することにより、膜貫通部位が γ セクレターゼの基質結合部位の形成に関わっていることが示された(投稿準備中)。

基質特異的な阻害活性を示す低分子 γ セクレターゼ阻害薬の作動機序解明と化合物のラショナルデザインを目指し、ヘリックスを形成する β ペプチドからなる“フォルダマー”を利用することで、ヘリックス面をデザイン可能な新規 γ セクレターゼ阻害薬の開発に着手し、シクロペンタンを含む β アミノ酸 *trans*-ACPC によって形成される12ヘリックス β ペプチドが、nM オーダーの IC₅₀ を持つ強力な γ セクレターゼ阻害薬となることを見出した。さらに光親和性標識実験を併用することで、このフォルダマーが γ セクレターゼの基質結合部位を標的とすることを見出した(投稿中)。

γ セクレターゼ複合体の基質認識ユニット・ニカストリンの細胞外領域は、複合体形成過程において糖鎖付加を受けると同時に大きな構造変化を生じる。ニカストリン細胞外領域に対するモノクローナル抗体を樹立し、ハイブリドーマより scFv フラグメントを樹立した。その1つ 5226F を培養細

胞に直接「intrabody」として発現させたところ、小胞体においてニカストリンと結合、糖鎖付加および構造変化を阻害し、 γ セクレターゼ複合体の不安定化を介して活性を抑制することを見出した。この過程でニカストリンは小胞体内で γ セクレターゼ複合体としてアセンブリーされた後に、様々な糖タンパクのフォールディングに関わるカルネキシンに結合すること、scFvとの結合はカルネキシンサイクルから γ セクレターゼを遊離させ、不安定化することを示した。この結果は、ニカストリン細胞外領域の新規 γ セクレターゼ阻害標的としての有用性を示唆するものである(投稿中)。また γ セクレターゼに含まれるニカストリンのパルミトイル化を示した[11]。

スフィンゴシン1リン酸(S1P)はリゾリン脂質メディエーターとして様々な生体反応に関与する。昨年度S1Pの産生に関わるスフィンゴシンリン酸化酵素SPHKの阻害剤がA β 産生を抑制することを見出したので、その作用点を検討した。細胞内S1P量に応じてA β 産生量が低下すること、その低下は β セクレターゼ活性の特異的な低下によること、この現象は神経細胞特異的に生じることを見出した。SPHK阻害を行った細胞破碎液中でも β セクレターゼ活性が減弱することから、S1Pは受容体を介さない経路で β セクレターゼ活性を制御することが示唆された(投稿準備中)。

遺伝多型がADの発症リスクに関与するapoEがA β の凝集中間体であるプロトフィブリルに結合すること、 ϵ 2,3,4の3種の遺伝多型アイソフォームのうち、 ϵ 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 ϵ 4はその作用を有さず、線維形成過程を促進させることを実証した。APPトランスジェニックマウスA7の脳内にA β 線維あるいはプロトフィブリルを注入すると、アミロイド蓄積のseedとして作用し、蓄積が促進されることを見出した(投稿準備中)。A β 毒性の実体と、その標的分子の同定に向けて、尾藤・奥野らは、A β プロトフィブリルが神経細胞・シナプス伝達に及ぼす長期的影響を、初代培養神経細胞系を用いてモニターするための条件検討と、初代培養神経細胞系を用いたアッセイ系の構築を行った。シナプスCa流入に前後する可塑的シグナルの障害が予想されたため、A β プロトフィブリルの長時間にわたる暴露中のCa測定を可能にするFRET測定系を開発した。さらに神経細胞発現により長時間の神経活動に伴うCRE活性、c-Fosプロモーター活性、Arcプロモーター活性など神経活動依存的転写を測定するレポーター系を構築した[7]。A β プロトフィブリルがCRE活性を抑制することを示唆するデータを得た。またinositol 3 phosphate受容体制御へのプレセニリンの関与を示した[4]。

A β の脳内からの排出・除去に、血液脳関門を構成する血管内皮細胞が重要な役割を果たす可能性を考え、脳毛細血管内皮から不死化されたTR-BBB細胞を用いて、A β の取り込み実験を行い、本細胞が放射性ラベルA β を急速に取り込み、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の関与を示した[6]。血管内皮特異的LRP1ノックアウトマウスを作出、放射標識A β の脳内注入により、A β 排出には影響が生じないことを見出し、in vivoではLRP1以外のレスキュー系が作動する可能性を示唆した(投稿準備中)。抗A β モノクローナル抗体266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、脳内における抗体結合モノマー型A β の逆説的増加を見出し、抗体非結合型A β の減少を介して、抗体療法が作動する可能性を見出した(投稿準備中)。

抗A β 療法が臨床的に奏功するためには、ニューロンに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理想的である。東北大学グループ・荒井らは、現在臨床的に最も感度の高い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」

を、自身の開発した国産プローブ BF-227 の ^{11}C 誘導体を用いてヒト臨床応用し、MCI の約半数に陽性を見出した。 ^{18}F 誘導体 BF-227 のヒトにおける検討も開始し、 ^{11}C 誘導体と同等のアミロイド結合性を有することを確認した。神経疾患の治療に用いられてきた漢方方剤の構成生薬に含まれている生理活性物質で化学構造の解明されている化合物75種について、A β 凝集抑制作用および凝集脱重合作用について検討し、Baicalein や Wogonin (ともにオウゴンに含有) など9種の化合物に、用量依存的な凝集抑制作用および凝集脱重合作用を認めた[9]。

第2年度には、このように β アミロイドを標的とする治療原理の解明と治療薬候補の同定・解析が大きく進んだ。次年度は、次節で触れる A β 42 特異的 γ セクレターゼモジュレータの作動原理解明、A β 毒性の分子機構解析、脳内 A β 動態の解明と抗体療法のメカニズム解明を主な目標として、さらにプロジェクトを充実・進捗できる見込みである。

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

γ セクレターゼ複合体の膜内構造・機能相関の substituted Cys accessibility method (SCAM)法による解析。

γ 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・ScFv 断片作出と、 γ 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 γ セクレターゼ活性を阻害・増強する遺伝子の探索。

sphingosine 代謝物の β セクレターゼ活性に対する効果の解析。

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/in vivo 解析。

A β 凝集体がシナプスに及ぼす影響の、カルシウムイメージングによる検証。

AD 脳老人斑アミロイド結合成分 CLAC の機能に関する、遺伝子改変マウスを用いた検討。

脳毛細血管内皮細胞不死化細胞を用いた、A β 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 β 免疫療法作動原理の 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、天然物をシードとする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. Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the γ

- secretase. *J Neurosci* 28: 6264-6271, 2008
2. Akanuma SI, Ohtsuki S, Doi Y, Tachikawa M, Ito S, Hori S, Asashima T, Hashimoto T, Yamada K, Ueda K, Iwatsubo T, Terasaki T: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid- β peptide (1-40) at the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 52:956-961, 2008
 3. Yoshihara T, Takiguchi S, Kyuno A, Tanaka K, Kuba S, Hashiguchi S, Ito Y, Hashimoto T, Iwatsubo T, Tsuyama S, Nakashima T, Sugimura K: Immunoreactivity of phage library-derived human single-chain antibodies to amyloid β conformers in vitro. *J Biochem* 143:475-486, 2008
 4. Cheung K-H, Shineman D, Muller M, Cardenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM-Y, Foskett K: Mechanism of Ca^{2+} disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* 58:871-883, 2008
 5. Laras Y, Pietrancosta N, Tomita T, Iwatsubo T, Kraus JL: Synthesis and biological activity of N-substituted spiro[benzoxazepine-piperidine] A β -peptide production inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 7:1, 2008
 6. Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, Liu Q, Bu G, Basak JM, Holtzman DM, Ohtsuki S, Terasaki T, Iwatsubo T: The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid β peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem* 283: 34554-34562, 2008
 7. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:316-321, 2009
 8. Matsushita S, Miyakawa T, Maesato H, Matsui T, Yokoyama A, Arai H, Higuchi S, Kashima H. Elevated cerebrospinal fluid tau protein levels in Wernicke's encephalopathy. *Alcoholism: Clin Exp Res.* 32:1091-1095, 2008
 9. Hashimoto M, Shahdat HM, Yamashita S, Katakura M, Tanabe Y, Fujiwara H, Gamoh S, Miyazawa T, Arai H, Shimada T, Shido O. DHA disrupts in vitro amyloid β 1-40 fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex tissue of Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem* 107:1634-1646, 2008
 10. Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R. GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur. J. Hum. Genetics*, Epub 2008
 11. Cheng H, Vetrivel KS, Drisdell RC, Meckler X, Gong P, Leem JY, Li T, Carter M, Chen Y, Nguyen P, Iwatsubo T, Tomita T, Wong PC, Green WN, Kounnas MZ, Thinakaran G: s-Palmitoylation of γ -secretase subunits nicastrin and Aph-1. *J Biol Chem* 284:1373-1384, 2009
 12. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, Maurage CA, Huot L, Bensemain F, Laumet G, Ayral AM, Fievet N, Hauw JJ, DeKosky ST, Lemoine Y, Iwatsubo

T, Wavrant-Devrière F, Dartigues JF, Tzourio C, Buée L, Pasquier F, Berr C, Mann D, Lendon C, Alperovitch A, Kamboh MI, Amouyel P, Lambert JC: Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatr* Epub ahead of print 2009

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)