

「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 21 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いて、有効な根本治療・予防法を開発することをめざし、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遮断ないし改善する新機軸の治療薬リードを創出する。A  $\beta$  産生については、 $\gamma$  セクレターゼの構造・機能連関を、阻害薬の作動機序に着目し、ケミカルバイオロジー的手法を駆使して解析する。A  $\beta$  そのものについては、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機能について解析する。A  $\beta$  免疫療法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、アミロイドイメーキ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、プレセニン1の第1膜貫通部位および第6膜貫通部位直下のループ部位が活性中心ポア構造の一部として機能することを実証した。また第2、第6、第9膜貫通部位が基質を取り込むラテラルゲートを形成している可能性が示唆された。 $\gamma$  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プロテオミクスにより、複数の新規  $\gamma$  セクレターゼ活性制御因子の同定に成功した。脂質セカンドメッセンジャーの一つであるセラミド代謝経路の異常が  $\gamma$  セクレターゼ活性を変化させ、凝集性の高い A  $\beta$  42 産生を増加させる事を見出した。光親和性標識法において簡便に溶出可能な新規リンカーの開発に成功した。神経細胞特異的な  $\gamma$  セクレターゼ基質として neuroigin を見出した。スフィンゴシン 1 リン酸化酵素活性が  $\beta$  セクレターゼ活性を直接規定し、スフィンゴシン 1 リン酸化酵素阻害剤の経口投与により脳内 A  $\beta$  量が低下することを見出した。apoE を A  $\beta$  プロトフィブリルと APPトランスジェニックマウス脳内に共投与した場合、apoE3 は凝集抑制作用を有するのに対し、apoE4 はその効果を有さないことを in vivo で実証した。A  $\beta$  に対する抗体免疫療法は、血液への

排出クリアランス過程を促進すると考えられていたが、脳から血液への A $\beta$  の排出輸送を促進する (sink 効果) と信じられてきたモノクローナル抗体 266 が、実は脳実質に進入し、脳内で A $\beta$  凝集を抑制していることを解明した。荒井グループでは <sup>18</sup>F 標識体のアミロイド PET プローブを実用化し、バイオマーカーとの対比に入った。今後  $\gamma$  セクレターゼの構造・機能関連につき、PS1 の全長にわたる解明を進め、特に A $\beta$  に選択的な阻害薬・モジュレータ薬の作動機序を明らかにするとともに、A $\beta$  の凝集と細胞毒性の関連を解明、A $\beta$  クリアランスの *in vivo* の分子機構についても解明し、新規治療方策の開発に繋げる。

## § 2. 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・機能相関の 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・ScFv 断片作出と、 $\gamma$  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 代謝物の  $\beta$  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 vivo* 解析。

A $\beta$  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。

A $\beta$  免疫療法メカニズム解明と、脳 A $\beta$  クリアランスとの関係に関する検討

脳血液関門特異的 LRP-1 ノックアウトマウス確立と、A $\beta$  脳クリアランス原理の検証。

### (2) 東北大学グループ (研究機関別)

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・薬効メカニズム検証

## § 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は (4-1) と対応する)

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を目的として第3年目の研究を行った。A $\beta$ 産生プロテアーゼについては、 $\gamma$ 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。 $\gamma$ 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 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 の解明は、阻害薬開発にも重要である。これまでに substituted cysteine accessibility method (SCAM) を用い、 $\gamma$ 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 6 膜貫通部位からカルボキシ末端までの構造を解析した。引き続き 21 年度は PS1 アミノ末端側の解析を進めた。その結果、PS1 の第 1 膜貫通部位は  $\alpha$  ヘリックスを形成し、その一面が脂質二重膜内に親水性環境に面していること、第 2 膜貫通部位は完全に疎水性環境にあることを見出した。第 6、7、9 膜貫通部位によって形成される活性中心ポア構造と第 1 膜貫通部位の位置関係をクロスリンク実験により検討した。その結果第 1 膜貫通部位の細胞質側は、第 7、9 膜貫通部位の近傍に存在していることが明らかとなった。さらに異なる作動機序を持つ  $\gamma$ セクレターゼ阻害薬の存在下で SCAM を行い、第 1 膜貫通部位が触媒構造そのものを形成している、もしくは非常に近接していることが明らかとなった。すなわち、第 1 膜貫通部位も直接活性中心ポア構造を形成している領域であると考えられた(投稿準備中)。

$\gamma$ セクレターゼ複合体形成過程において、どの過程で活性中心ポア構造が出来ているかを検証するために、SCAM を用いて各構成因子と結合できない変異型 PS1 における、ポア領域に存在するアミノ酸周囲の微小環境について検討した。その結果、ポア構造そのものは PS1 単独であっても形成されていることが示唆された。しかしその親水性は高く、活性型  $\gamma$ セクレターゼに存在する PS1 のポア構造に比べて、「開いた構造(open conformation)」であると考えられた(投稿準備中)。

PS1 の各膜貫通部位を体系的に置換した変異体を作成し解析した。以前この方法により第 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。さらに詳細な解析を行い、第 1、第 5、第 8、第 9 膜貫通部位は  $\gamma$ セクレターゼの安定性に必要であること、第 2、第 6 膜貫通部位が基質結合部位の形成に必要であること、第 3 膜貫通部位は  $\gamma$ セクレターゼの活性化に関わっていることが明らかとなった。またラテラルゲートを形成している第 9 膜貫通部位と第 2 膜貫通部位の距離が近接していることから、第 2、第 6、第 9 膜貫通部位がラテラルゲートを形成している可能性が考えられた(*J Biol Chem* in revision)。基質特異的な阻害活性を示す低分子  $\gamma$ 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、12 ヘリックスを形成する  $\beta$ アミノ酸 *trans*-ACPC からなる  $\beta$ ペプチドが、nM オーダーの IC50 を持つ強力な  $\gamma$ セクレターゼ阻害薬となることを見出した[1]。今年度はこのペプチドの改変により特に 3 位、6 位に水酸基を持つペプチドがさらに強力な阻害活性を示すことが明らかとなった。その一方でプロリンを基本アミノ酸とするポリプロリンヘリックスは全く  $\gamma$ セクレターゼ阻害活性を示さなかったことから、特異的な基質認識機構の存在が示唆された。

$\gamma$ 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。Sf9・バキュロウイルス系を用いた発芽ウイルスによる膜タンパクディスプレイ法を利用し、ニカストリン細胞外領域に対するモノクローナル抗

体 A5201A、A5226A を樹立し解析したところ、前者は活性型酵素に含まれていない未成熟型ニカストリンを特異的に認識し、後者は生化学的には成熟型・未成熟型をともに認識する抗体であった [3]。そこでこれらの抗体を用いターゲットドショットガンプロテオミクスを行い、結合分子群の差分をとることで活性型  $\gamma$  セクレターゼ複合体と相互作用する分子を特異的かつ網羅的に同定することを試みた。その結果、30 個の分子を活性型  $\gamma$  セクレターゼ複合体結合分子として同定した。得られた各分子について RNAi を行い、Stx12、Vamp8、Bcap31、Tm9sf4、Bst2、Ilvbl、Rdh11、Atp6v0d1、Tspan31、Myof が  $\gamma$  セクレターゼ活性調節因子として機能していることを見出し、さらにその一部は  $\gamma$  セクレターゼの Notch 切断作用には関与せず、A  $\beta$  産生特異的な  $\gamma$  セクレターゼ活性調節因子として機能していることを見出した (特許申請済)。これらの分子を標的とした創薬戦略により、副作用の少ない  $\gamma$  セクレターゼ活性抑制法の開発につながることを期待される。

A5201A の可変領域をコードする遺伝子をハイブリドーマよりクローニングし、単鎖抗体として培養細胞に発現させたところ、小胞体内でニカストリンと結合し、その成熟化を妨げることにより  $\gamma$  セクレターゼ複合体全体が不安定化すること、その結果  $\gamma$  セクレターゼ活性が低下することを見出した [3]。またこの A5201A 単鎖抗体を大腸菌において発現させ、大量生産させることに成功した。一方、A5226A についても同様にクローニングし、単鎖抗体として大腸菌に発現、精製した。この単鎖抗体もニカストリンと結合することが示された。今後 A5226A 単鎖抗体の  $\gamma$  セクレターゼ活性抑制能を検討する。

ショウジョウバエ S2 細胞を用いたゲノムワイドな RNAi スクリーニングにより、セラミドに作用しグルコシルセラミド (GlcCer) を作るグルコシルトランスフェラーゼ (GlcT-1/GCS/UGCG, EC 2.4.1.80) の発現抑制が  $\gamma$  セクレターゼ活性に影響を与え、凝集性の高い A  $\beta$  42 産生上昇を惹起することを見出した。そこでセラミドを含めたスフィンゴ糖脂質代謝経路にかかわる遺伝子群について注目したフォーカスト RNAi ライブラリーを作製し解析したところ、やはり複数のグルコシルセラミド産生酵素の発現抑制が A  $\beta$  42 産生上昇を引き起こした。また哺乳類細胞においても、GlcT-1 阻害薬である PDMP 処理やセラミド分解を抑制する MAPP 処理によっても A  $\beta$  42 産生が亢進したことなどから、細胞内セラミド濃度の上昇が  $\gamma$  セクレターゼ活性に影響を与えるものと考えられた (投稿準備中)。遺伝学的解析から AD 脳においてセラミド産生酵素の発現上昇、代謝酵素の発現低下が指摘されており、脳内セラミド濃度の異常は A  $\beta$  42 量の上昇、ひいては AD 発症につながる可能性がある。

化合物の標的分子同定にあたり、光親和性標識法は有用な手法であるが、一方で紫外線照射により非特異的なタンパク質凝集などを引き起こす。そのため標識実験に引き続くタンパク質精製の簡便かつ穏和な手法開発が求められている。そこで光官能基とタンパク質精製に用いるビオチン基をつなぐリンカー間にニトロベンゼンスルホンアミド基を導入し、還元条件下で簡便にこれら二つの官能基を切り離すことが出来る手法を開発した [6]。

スフィンゴシン1リン酸 (S1P) はスフィンゴ脂質メディエーターとして様々な生体反応に関与する。昨年度までに神経細胞において S1P 産生を抑制すると  $\beta$  セクレターゼ活性が低下し、A  $\beta$  産生を抑制することを見出した。そこで S1P 分解酵素の発現抑制を行ったところ、 $\beta$  セクレターゼ活性の上昇、A  $\beta$  産生の亢進が観察され、神経細胞での S1P 量が A  $\beta$  産生量を規定していることが示唆

された。また APPトランスジェニックマウス A7 に対して、経口投与によるスフィンゴシン 1 リン酸化酵素阻害剤の準慢性投与実験を行い、脳内 A $\beta$  量が低下することを見出した(投稿準備中)。

Neuroigin は神経細胞におけるシナプス可塑性を支える分子の一つとして知られ、強いシナプス誘導能をもつ。生化学的な解析から、Neuroigin が細胞外でプロセッシングを受け、残った膜結合型の C 末端断片がガンマセクレターゼによって切断を受けることを見出した。ラット脳スライス培養系に対する遺伝子導入実験を用いた解析から、このプロセッシングは Neuroigin のシナプス誘導能に対してネガティブに作用することを明らかにした。さらに Neuroigin のプロセッシングは興奮性シナプスの活性化に応じて引き起こされたことから、神経活動依存性に Neuroigin が代謝を受け、シナプス可塑性を制御している可能性が示唆された。

遺伝多型が AD の発症リスクに関与する apoE2,3,4 の 3 種の遺伝多型アイソフォームのうち、E3 をプロトフィブリルとともに APPトランスジェニックマウス A7 の脳内に注入すると、アミロイド蓄積の seed 能力を抑制するが、E4 はこの作用を持たず、蓄積が促進されることを見出した(投稿準備中)。

AD の根本的治療薬候補として有望視される、ヒト化抗 A $\beta$  抗体受動免疫療法において、脳外から投与された抗体が脳内の A $\beta$  蓄積を抑制するメカニズムは不明であった。特に、現在治験の進められている抗体のいくつかは、血液中で作用し、脳からの A $\beta$  排出を促進する(「シンク効果」と信じられてきたが、それを実証する知見は存在しなかった。シンク効果の提唱されたモノクローナル抗体 266 を腹腔内に投与しておく、シンク効果で予測される動きとは逆に、マウス脳内に注入された <sup>125</sup>I 放射標識 A $\beta$  の排出過程が顕著に遅延すること、このとき抗体に結合した A $\beta$  が脳内で増加していることを示した。脳内に A $\beta$  が産生・蓄積される APP トランスジェニックマウスの腹腔内に 266 抗体を投与すると、脳内の総 A $\beta$  量は変化しないが、可溶・単量体型の A $\beta$  に抗体が結合した複合体が選択的に増加した。これらの結果から、266 抗体は従来の通説とは異なり、末梢血液中で作用するのではなく、脳内に進入して可溶・単量体型の A $\beta$  に結合、これをオリゴマーやアミロイド等の多量体の形成過程から隔離し、阻害するという新規の作用メカニズムにより治療効果を発揮するものと考えられた[2]。

荒井らは、自身の開発したアミロイドイメージングプローブ <sup>11</sup>C-BF-227 をヒトに応用し、MCI の約半数に陽性を見出した[9,11]。<sup>18</sup>F 誘導体 BF-227 が <sup>11</sup>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、臨床研究に入った。脳内アミロイド蓄積と髄液 A $\beta$  42 変化の対応を AD 13 名、MCI 9 例、正常者 1 名の計 23 名において検証すると、髄液 A $\beta$  42 は BF227 の陽性値と有意な負の相関 ( $r=-0.59$ ,  $P=0.002$ ) を示し、その低下は A $\beta$  42 の老人斑への蓄積を反映することが確認された。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

- 1)Imamura Y, Watanabe N, Umezawa N, Iwatsubo T, Kato N, Tomita T, Higuchi T: Inhibition of  $\gamma$ -secretase activity by helical  $\beta$ -peptide foldamers. *J Am Chem Soc* 131:7353-7359, 2009

DOI: 10.1021/ja9001458

- 2) Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T: A $\beta$  immunotherapy: intracerebral sequestration of A $\beta$  by an anti-A $\beta$  monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A $\beta$ . *J Neurosci* 29: 11393-11398, 2009  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2021-09.2009
- 3) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Isoo N, Osawa S, Fukuda MA, Kodama T, Hamakubo T, Li T, Wong PC, Tomita T, Iwatsubo T: Single chain variable fragment against Nicastrin inhibits the  $\gamma$ -secretase activity. *J Biol Chem* 284:27838-27847, 2009  
DOI: 10.1074/jbc.M109.055061
- 4) Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S, Hubans C, Maurage CA, Huot L, Bensemain F, Laumet G, Ayrat AM, Fievet N, Hauw JJ, DeKosky ST, Lemoine Y, Iwatsubo T, Wavrant-Devrièze 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* 14:1004-1016, 2009  
DOI: 10.1038/mp.2009.10
- 5) Kamikawaji S, Ito G, Iwatsubo T: Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2 linked to familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 48:10963-10975, 2009  
DOI: 10.1021/bi9011379
- 6) Yokoshima S, Abe Y, Watanabe N, Kita Y, Kan T, Iwatsubo T, Tomita T, Fukuyama T: Development of photoaffinity probes for  $\gamma$ -secretase equipped with a nitrobenzenesulfonamide-type cleavable linker. *Bioorg Med Chem Lett* 19:6869-6871, 2009  
DOI: doi:10.1016/j.bmcl.2009.10.086
- 7) Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S: Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model. *Cancer Sci* 100:2444-2450, 2009 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01328.x
- 8) Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H: Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 29:13720-13729, 2009 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3018-09.2009
- 9) Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 285:100-108, 2009  
DOI: 0.1016/j.jns.2009.06.005
- 10) Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins in vitro and in vivo. *J Neurochem* 109:1648-1657, 2009  
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06069.x
- 11) Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. *J Neurol* 257: 721-727, 2010 DOI: 10.1007/s00415-009-5396-8

12)Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-Ura K. In vivo detection of prion amyloid plaques using [(11)C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37: 934-941, 2010  
DOI: 10.1007/s00259-009-1314-7

13)Cheung KH, Mei L, Mak DO, Hayashi I, Iwatsubo T, Kang DE, Foskett JK: Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Science Signaling* 3:ra22.  
DOI: 10.1126/scisignal.2000818

(4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)

②CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)