

「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

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・予防法の開発をめざし、特にADの病因タンパク質 β アミロイド(A β)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しようとするものである。

A β 産生については、 γ セクレターゼにシステイン化学等の解析法を用い、プレセニリン1の活性中心ポア構造の全貌ならびに作動機構を解明した。 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が阻害薬として働くことを示し、本抗体を用いたプロテオミクスにより、複数の新規 γ セクレターゼ活性制御因子の同定に成功した。A β 42 選択的 γ モジュレータ、Notch 保存性 γ 阻害薬それぞれの結合部位を明らかにした。またスフィンゴシン 1 リン酸化酵素活性が β セクレターゼを活性化すること、スフィンゴシン1リン酸化酵素阻害剤の投与により脳内A β 量が低下することを見出した。A β そのものについては、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機能について解析し、apoEをA β 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、apoE4はapoE3の有する凝集抑制作用を欠くことを *in vivo* で実証した。また主要なA β 結合タンパク CLACが運動ニューロンの発生期における生存維持に不可欠の役割を果たすことを発見した。臨床面からは、ADの初期病態を鋭敏に反映するバイオマーカーの同定をめざし、ヒト脳において、PET イメージングによる脳内アミロイド蓄積の検出と生化学バイオマーカーとの対比を行い、ADへの進展予測におけるアミロイド PETの優位性を実証した。

今後、 γ セクレターゼの構造・機能連関につき、PS1構造の完全解明を進め、特にA β 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 β の凝集と細胞毒性の関連を

解明、A β 除去機構についても解明し、新規治療方策の開発に繋げ、AD の超早期治療・予防の実現に向かって研究を推進する。

§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 (東京大学大学院医学系研究科・教授)

② 研究項目

- ・ γ セクレターゼ複合体の構造解析と、阻害剤・モジュレータ薬の作動機構解明
- ・ A β 42、APP を選択的に抑制する γ セクレターゼ阻害薬・モジュレータ薬の創出
- ・ γ セクレターゼ複合体構成因子ニカストリンを標的とする抗体治療
- ・ γ セクレターゼ活性調節因子の RNAi スクリーニングによる同定
- ・ β セクレターゼ活性調節による A β 抑制療法:セラミド代謝系酵素への介入
- ・ A β 結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究
- ・ 脳からの A β 排出機構に関する研究
- ・ 脳からの A β 排出を標的とする治療法とそのメカニズムに関する研究

(2)「東北大学」グループ

① 研究分担グループ長:荒井 啓行 (東北大学加齢医学研究所・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

1) γセクレターゼ複合体の構造解析と、阻害剤・モジュレータ薬の作動機構解明

PS1 の single cysteine(Cys)変異体を系統的に作出し、Cys 結合性標識試薬である MTSEA-biotin を用いたラベリング実験 (substituted Cys accessibility method; SCAM) を施行し、PS1N 末端側の第 1 膜貫通部位は αヘリックスを形成し、その一面が第 7、9 膜貫通部位の近傍に存在し、膜内で親水性環境に面していること、第 1 膜貫通部位も活性中心ポア構造に関与し、切断プロセスの中でピストン様運動を営むことを示した (文献 1)。さらに第 2 膜貫通領域が脂質二重膜に埋没している一方、第 4 膜貫通領域は親水性環境に面することも示した。第 1、2 膜貫通部位をつなぐ第 1 親水性ループ領域は PS1 の構造の中で最も大きな細胞外領域を占める。ケミカルバイオロジー的手法により、第 1 親水性ループ領域が γセクレターゼによる基質認識に必要であることを明らかにした。また分子細胞生物学的な解析とケミカルバイオロジー的手法を組み合わせ、第 2 及び 6 膜貫通領域が基質認識部位形成に必要であることを示した (文献 3)。Notch シグナル温存型 g-secretase inhibitor HF14057 を作出、プローブ化を行って標的分子を探索、PS1 アミノ末端断片内第 6 膜貫通領域の細胞質側領域を標的と同定した (投稿準備中)。高活性を持つ A842 降下性モジュレータ GSM-1 の光親和性標識プローブ化に成功し、PS1 アミノ末端断片第 1 膜貫通部位への直接結合を証明、同部の γセクレターゼ活性修飾への関与を示した (投稿準備中)。

2) A842、APP を選択的に抑制する γセクレターゼ阻害薬・モジュレータ薬の創出

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、PPAR_γ アゴニスト誘導体ライブラリーを探索し、Notch シグナルを保持したまま Aβ 産生を抑制する新規 NS-GSI の開発に成功 (文献 5)、マウス脳内投与実験を実施し、Aβ 量が低下することを見出した。APP に各種変異を導入し Aβ 産生に対する影響を観察、内腔側に存在する、Aβ 配列として第 20 位に存在するフェニルアラニン残基が Aβ 産生に必須であることを発見した。一方、細胞質内領域 AICD の放出には影響を与えなかった。そこでこのアミノ酸を含む 17-21 位のペプチドを合成し検討したところ、Aβ 産生抑制能を持つことが明らかとなり、APP 特異的な阻害剤の標的領域となる可能性を示した (投稿準備中)。

3) γセクレターゼ複合体構成因子ニカストリンを標的とする抗体治療

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。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、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 (論文投稿中)。

4) γセクレターゼ活性調節因子の RNAi スクリーニングによる同定

ショウジョウバエ S2 細胞を用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、γ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。Surf-4 の機能解析から、ER-Golgi 間のベジクル輸送が基質特異的な切断に影響を及ぼすことが示唆された(投稿準備中)。

5) β セクレターゼ活性調節による A β 抑制療法:セラミド代謝系酵素への介入

スフィンゴシン1リン酸(S1P)を産生するリン酸化酵素 SphK の阻害剤が A β 産生を抑制することを見出し、神経細胞において、細胞内 S1P 量に応じて β セクレターゼ活性が直接制御を受けることを発見した。APP トランスジェニックマウスにスフィンゴシン 1 リン酸化酵素阻害剤の経口投与を行い、脳内 A β 量が低下することを見出した。AD 脳において SphK 活性の亢進を確認し、SphK は新規 AD 治療薬創薬標的となることを示した(文献 14)。BACE1 の膜貫通部位にアロステリックに作用する BACE 阻害薬 TAK-070 を同定、S1P の作用との共通性を指摘した(文献 4)。

6) A β 結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究

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、E ϵ 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)。CLAC-P ノックアウトマウスを確立、胎生期に運動ニューロンのアポトーシス性細胞死が亢進し、出生時致死であることを確認、CLAC-P がアミロイド結合作用以外に、運動ニューロン発生の必須因子としての生理機能を有することを見出した。

7) 脳からの A β 排出を標的とする治療法とそのメカニズムに関する研究

脳における A β 分解過程を治療標的と考え、アストロサイトから分泌される A β を分解するプロテアーゼ活性の存在、その活性がセリンおよびメタロプロテアーゼ阻害剤により失活することを見出した。東大分生研橋本研作成の各種 LXR 作動薬を検討し、一部の LXR アゴニストが分解活性を亢進させることを見出した。

8) β アミロイド PET イメージングを用いた AD の超早期診断に関する研究

東北大学老年科を受診した 15 名の AD、15 名の MCI、12 名の NA を対象にアミロイドイメージング、糖代謝イメージング、MRI を用いた volumetry による脳体積の定量解析を施行した。AD での BF-227 アミロイドプローブの取り込みは大脳皮質全体、線条体において NA 群に比し亢進していた。MCI での BF-227 の取り込みは NA 群に比し前頭葉、側頭葉、後頭葉等で亢進していたが、その亢進は AD より小さかった。FDG-PET では、AD で AN に比し側頭葉、頭頂葉、後部帯状回、側頭葉内側、において糖代謝の低下を認めた。MCI では後部帯状回、側頭葉内側において AN に比し糖代謝が低下していた。BF-227 と FDG の取り込みの間には有意な負の相関を認めた。MRI-volumetry においては AD 群と後に AD にコンバートした MCI 群において AN 群と AD にコンバートしなかった MCI 群に比し有意に大脳灰白質の萎縮が進行していた。また MRI-volumetry と BF-227-PET を比較すると、BF-227-PET の方が MCI から AD にコンバートを予測する感度、特異度が高かったが、AD の進行度(MMSE スコア)とより相関が強かったのは MRI-volumetry であった。脳脊髄液中の A β 42、total タウ、リン酸化タウと放射線学的画像検査(BF-227-PET、FDG-PET、MRI-volumetry)の結果を比較検討すると、MCI から AD への

コンバージョンを予測する点においては BF-227-PET が感度、特異度とも最も優れていた(文献 10,11)。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15950, 2010 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3318-10.2010
2. Cheung KH, Mei L, Mak DOD, Hayashi I, Iwatsubo T, Kang DE, Foskett JK: Gain of function Alzheimer's disease presenilin regulation of InsP3 receptor modal gating in patient cells and AD mouse neurons. *Science Signaling* 3:ra22, 2010 doi: 10.1126/scisignal.2000818.
3. Watanabe N, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: participation of transmembrane domains 2 and 6 in the formation of initial substrate binding site of γ -secretase. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010 doi: 10.1074/jbc.M110.101287
4. Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M: A non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates Ab pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 33:11157-11166, 2010 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2884-10.2010
5. Kurosumi M, Nishio Y, Osawa S, Kobayashi H, Iwatsubo T, Tomita T, Miyachi H: Novel Notch-sparing γ -secretase inhibitors derived from a peroxisome proliferator-activated receptor agonist library. *Bioorg Med Chem Lett* 20:5282-5285, 2010 doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.131
6. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M: Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285:34885-34898, 2010 doi: 10.1074/jbc.M110.148460
7. Asai M, Iwata N, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K: Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 88:3588-3597, 2010 doi: 10.1002/jnr.22503
8. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* 465:182-187, 2010 doi: 10.1038/nature09033.
9. Inoue M, Yagishita-Kyo N, Nonaka M, Kawashima T, Okuno H, Bito H: Synaptic activity-responsive element (SARE): A unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun Integr Biol.* 3:443-446, 2010 doi: 10.4161/cib.3.5.12287
10. Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matsuda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K. Voxel-Based Analysis of Amyloid

Positron Emission Tomography Probe [C]BF-227 Uptake in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 30:101-111, 2010 DOI: 10.1159/000318754

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. Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y: In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl) ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 133:1772-1778,2010 doi: 10.1093/brain/awq091
14. Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* in press

(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 1 件)