

「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

H23 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. 研究実施体制

### (1)「東京大学」グループ

① 研究代表者:岩坪 威 (東京大学大学院医学系研究科、教授)

#### ② 研究項目

- ・  $\gamma$  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
- ・  $A\beta$  42、APP を選択的に抑制する  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬・モジュレータ薬の創出
- ・  $\gamma$  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
- ・  $\gamma$  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
- ・  $\beta$  セクレターゼ活性調節による  $A\beta$  抑制療法:セラミド代謝系酵素への介入
- ・  $A\beta$  結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究
- ・ 脳からの  $A\beta$  排出機構に関する研究

### (2)「東北大学」グループ

① 主たる共同研究者: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

## § 2. 研究実施内容

$\gamma$  セクレターゼの解析と標的治療グループ(東京大学)

① 研究のねらい:AD の病因タンパク質  $\beta$  アミロイドの産生にかかわる  $\beta$  および  $\gamma$  セクレターゼの活性制御による AD 治療薬の創出を目的とし、これらセクレターゼの作動原理の理解とその分子メカニズムに基づく活性制御法の開発を目指す。

② これまでの研究成果:PS1 に MTSEA-biotin を用いたラベリング実験 (substituted Cysteine

accessibility method; SCAM)を施行し、PS1 の第 1、6、7、9 膜貫通領域によって活性中心ポア構造ができていないこと、第 2、6 膜貫通領域が基質認識部位として重要であることを見出した。さらに第 1 膜貫通部位も直接活性中心ポア構造を形成し、切断プロセスの中でピストン様運動をしていることが明らかとなった。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、*trans*-ACPC からなる  $\beta$  ペプチドが強力な  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬となることを見出した。また PPAR $\gamma$  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 A $\beta$  産生を抑制する新規阻害剤の開発に成功した。

### ③研究進捗状況と得られた成果

#### 1) $\gamma$ 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

SCAM 法により、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していることを示した。第 1、2 膜貫通部位をつなぐ第 1 親水性ループ領域の一部が membrane-associated helix として脂質二重膜に相互作用し、基質認識に必要であることを見出した。光親和性標識実験により、Notch シグナルを保ちつつ A $\beta$  産生を抑制することが期待されている Notch-sparing  $\gamma$ -secretase inhibitor (NS-GSI) が第 6 膜貫通領域の細胞質側領域を標的とすることを示した。高活性を持つ A $\beta$ 42 降下性モジュレータ GSM-1 が活性中心ポア構造を作る第 1 膜貫通部位に結合することを見出した(4)。異なるファーマコフォアを持つモジュレータ薬の開発と光親和性標識プローブ化に成功し、PS1 および APH-1 を標的分子とすることが明らかとなった。プレセニンと相同の活性中心残基を持つ Signal Peptide Peptidase の単粒子解析により、ホモ 4 量体構造を明らかにした(3)。

#### 2) A $\beta$ 42、APP を選択的に抑制する $\gamma$ セクレターゼ阻害剤・モジュレータ薬の創出

$\beta$  アミノ酸 *trans*-ACPC からなる  $\beta$  ペプチドの改変を行い、3 位、6 位に水酸基を持つペプチドに強い阻害活性を見出した。A $\beta$ 17-21 位ペプチドが A $\beta$  産生抑制能を持つことを示し、PS1 の C 末端領域に結合することが明らかとなった。第 1 親水性ループ領域に対するモノクローナル抗体 9D11 が第 1 膜貫通部位の構造ダイナミクスに影響を与えて  $\gamma$  セクレターゼ阻害活性を示すことを明らかにした。

#### 3) $\gamma$ 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

$\gamma$  セクレターゼの基質認識分子ニカストリンの細胞外領域に対するモノクローナル抗体 A5226A が  $\gamma$  セクレターゼ活性を中和し、*in vivo* で抗がん活性を有することを示した(6)。本抗体を用いたショットガンプロテオミクスにより、 $\gamma$  セクレターゼによる APP 切断制御分子として CD9、CD81 を見出した。

#### 4) $\gamma$ 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

RNAi スクリーニングにより、小胞体から細胞表面膜への輸送に関与する Surf-4 の機能解析から、ER-Golgi 間のベジクル輸送が Notch 特異的な切断に影響を及ぼすことを明らかとした。また各種 RNAi による検討により、孤発性アルツハイマー病患者のゲノムワイド関連解析により同定された PICALM、BIN1 がそれぞれ  $\gamma$ 、 $\beta$  セクレターゼのエンドサイトーシス経路の制御を通じて A $\beta$  産生に影響を与えることを示した。

## 5) スフィンゴ脂質・セラミド代謝経路によるセクレターゼ活性調節

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。神経細胞において、細胞内S1Pが $\beta$ セクレターゼの膜貫通領域に作用し、 $A\beta$ 産生を制御すること、APPトランスジェニックマウスに於いてもS1P合成阻害剤が脳内 $A\beta$ 量を低下させることを見出した。またAD脳においてSphK活性の亢進が見られ、SphKはAD治療標的と目された(1)。

## 6) 神経細胞における $\gamma$ セクレターゼ基質の同定と機能

新規 $\gamma$ セクレターゼ基質として、シナプス形成に関わるNeurologinを見出した。 $\gamma$ セクレターゼの切断はNeurologinによるシナプス形成能に対して抑制的に作用することを明らかにした。

### ④今後の研究の進め方、および研究成果の見通し

AD治療における $\gamma$ セクレターゼ活性制御において、Notchシグナルの抑制を回避する低分子化合物を用いる方が最適と考えられる。本グループでは $\gamma$ セクレターゼの構造活性相関の理解を進め、新規NS-GSIやGSMの開発にも成功しているほか、基質/切断特異性に関わる酵素及び基質の分子標的領域を同定し、低分子化合物のみならず、ペプチドを基にしたフォルダマーによるラショナルデザイン、機能抗体によるアプローチなど、多様な活性制御法を開発しつつある。 $\beta$ セクレターゼについても膜貫通領域に相互作用する脂質が活性制御分子となることを示した。今後、これらの成果をin vivoの実験動物で検証し、ヒトにおけるADの予防、治療へと繋ぐ。

## $A\beta$ 結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究グループ(東京大学)

①研究のねらい:  $A\beta$ の凝集・毒性発揮に関与するタンパク質として、老人斑構成分子CLACのAD病態における意義と正常機能を解明する。引き続き $A\beta$ のクリアランス機構を解析する。

②これまでの研究成果: CLAC-Pノックアウトマウスを確立、運動ニューロンのアポトーシスの亢進により呼吸不全を生じることを示した。 $A\beta$ シンク仮説を否定、抗体が脳内で作用することを示した。

### ③研究進捗状況と得られた成果

1) CLAC-Pノックアウトマウスの解析: CLAC-Pノックアウトマウスでは、E12.5以降に認められる生理的な運動ニューロンのアポトーシスが過剰に起こり、出生時までには大部分の運動ニューロンが消失した。また運動ニューロン軸索束は横隔膜に投射するがE13.5では退縮し、以降完全に消失した。これらの結果から、CLAC-Pは軸索が標的骨格筋上で分枝し、生存を維持する、もしくは神経筋接合部を形成する過程に必須の因子であることが分かった。

### 2) CLAC-Pトランスジェニックマウスを用いた、CLACのアミロイド斑形成に対する役割の検討

APPとCLAC-Pを発現する二重TGマウスを作出し、CLACのアミロイド蓄積に対する効果をin vivoで検討した。生化学的にはアミロイド蓄積初期の9ヶ月齢においては、A7に比して二重TGマウスで不溶性 $A\beta$ 量が増加した。18ヶ月齢では、オリゴマー $A\beta$ を含む可溶性 $A\beta$ 量が二重TGマウスで顕著に減少した。免疫組織化学的には、CLACの結合によりアミロイド斑がより成熟した形態を示した。CLACは $A\beta$ の不溶化、成熟した形態の斑の形成を促進し、また沈着したアミロイドから可溶性 $A\beta$ の放出を抑制することにより、脳に保護的に働く可能性が考えられた。

3)  $A\beta$ クリアランスに関する検討: 血液-脳脊髄液関門においてLRP1の関与を明らかにした(2)。

臨床・バイオマーカー研究グループ(東北大学)

研究のねらい:アミロイド PET イメージング、体液バイオマーカーを駆使した先進的臨床研究を通じて、AD の超早期診断マーカーを同定し、創薬及び実験的研究に還元することを目的とする。

研究の経過:H23年度は東日本大震災により東北大学のPETが破損したため、PET撮像は中断した。血液・脳脊髄液中 adiponectin の診断的意義(7)を解析し、BF-227 アミロイド PET の 3D-SSP を用いた新規解析法を樹立した(8)。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

- 1) 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* 31: 6850-6857, 2011 DOI:10.1523/JNEUROSCI.6467-10.2011
- 2) Fujiyoshi M, Tachikawa M, Ohtsuki S, Ito S, Uchida Y, Akanuma S-i, Kamiie J, Hashimoto T, Hosoya K-i, Iwatsubo T, Terasaki T: Amyloid- $\beta$  peptide(1-40) elimination from cerebrospinal fluid involves low-density lipoprotein receptor-related protein 1 at the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neurochem* 118:407-415, 2011 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07311.x
- 3) Miyashita H, Maruyama Y, Isshiki H, Ogura T, Mio K, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. *J Biol Chem* 286: 26188-26197, 2011 doi: 10.1074/jbc.M111.260273
- 4) Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J* 30:4815-4824, 2011 doi: 10.1038/emboj.2011.372.
- 5) Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Suo S, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S: Comparison of preselinin1 and presenilin 2  $\gamma$ -secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem* 286:44569-44575, 2011 doi: 10.1074/jbc.M111.270108
- 6) Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Osawa S, Morohashi Y, Li T, Wong PC, Chiba S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of the  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. *Oncogene* 31(6):787-798, 2012 doi: 10.1038/onc.2011.265
- 7) Une K, Takei YA, Tomita N, Asamura T, Ohru T, Furukawa K, Arai H: Adiponectin in plasma and cerebrospinal fluid in MCI and Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 18:1006-1009, 2011 doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03194.x.
- 8) Kaneta T, Okamura N, Minoshima S, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Fukuda H, Takahashi S, Yanai K, Kudo Y, Arai H: A modified method of 3D-SSP analysis for amyloid PET imaging using [11C]BF-227. *Ann Nucl Med* 25:732-739, 2011 DOI:10.1007/s12149-011-0518-7

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)