

「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21年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告
----------------

井原 康夫

同志社大学生命医科学部・教授

分子的理解に基づく抗アミロイドおよび抗タウ療法の開発

## §1. 研究実施体制

(1) 「特殊ペプチド評価」グループ(同志社大学)

① 研究代表者: 井原 康夫 (同志社大学生命医科学部、教授)

② 研究項目

- ・膜可溶化画分系を利用した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制
- ・生細胞を利用した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制
- ・ $\beta$  セクレターゼ切断機構に着目した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制の検討

(2) 「特殊ペプチド創製」グループ(ペプチドリーム株式会社)

① 主たる共同研究者: 佐々木 亨 (ペプチドリーム株式会社、主任研究員)

② 研究項目

- ・ $\beta$  CTF アミノ末端結合特殊ペプチドの創製
- ・ $\beta$  切断部位結合特殊ペプチドの創製

(3) アミロイド・オリゴマーグループ(大阪市立大学)

① 主たる共同研究者: 森 啓 (大阪市大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

- ・病因アミロイドオリゴマーの設計・製作
- ・モデルマウスの製作・管理・評価
- ・モデルマウス評価のためのデータ収集及び解析

(4) 同志社大学タウ仮説検証グループ

① 研究代表者: 井原康夫(同志社大学生命医科学部、教授)

## ② 研究項目

- ・ 微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明
- ・ 抗タウオパチーペプチドスクリーニング

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### 「特殊ペプチドによる A $\beta$ 産生抑制」

特殊ペプチド創製グループが創製した特殊ペプチドの基質特異的 A $\beta$  産生抑制効果を評価するため、これらのペプチドについて、 $\gamma$  セクレターゼ活性評価系と  $\beta$  セクレターゼ活性評価系、培養細胞における A $\beta$  産生抑制の検討を行った。

スクリーニングによって、得られた10種類のペプチドについて、 $\gamma$  セクレターゼ活性評価系に添加して、 $\beta$  CTF の  $\gamma$  切断と Notch の S3 切断への影響を比較すると、そのうち3種類のペプチドが、基質選択的に  $\beta$  CTF の  $\gamma$  切断を抑制した。この3種類のペプチドを  $\beta$  セクレターゼ活性評価系に添加し、APP 由来断片や St6gal ( $\beta$  セクレターゼ基質) の切断について検討したところ、APP  $\beta$  切断のみ特異的に抑制された。さらに、これらのペプチドを APP、Notch、st6gal I の3つのタンパク質を過剰発現させた CHO 細胞に添加すると、A $\beta$  産生 ( $\gamma$  切断) と sAPP $\beta$  産生 ( $\beta$  切断) は抑制されたが、Notch の S3 切断や st6gal I の切断には全く影響を与えなかった(特願 2012-006687)。一方、上記以外でも非天然アミノ酸を含む2種類のペプチドもスクリーニングによって得られた。これらについても、 $\gamma$  セクレターゼ活性評価系と  $\beta$  セクレターゼ活性評価系において、基質特異的な切断抑制を示し、培養細胞においても基質特異的な A $\beta$  産生抑制を実現させ、年次計画通り結果を確認することができた(特願 2012-006687)。

### 「その他:AD/MCI における $\gamma$ セクレターゼの活性変化」

元来髄液の最適の (AD/MCI 診断の) バイオマーカー策定の為に始められたプロジェクト (NEDO) の中から、髄液の4種の A $\beta$  (A $\beta$  38,40,42,43) の間にこれまで明らかにされていなかった規則性を見出し、AD/MCI 診断の更なる確実性に貢献した。しかしこの規則性の背後に隠れた意義は非常に大きく、AD/MCI における A $\beta$  42 の低下は A $\beta$  42 が老人斑に沈着するからではなく、 $\gamma$  セクレターゼの反応性が変化したためであること、が推定された。これは本研究において重要な点であることから、実際に、ヒト剖検脳のラフトに存在する  $\gamma$  セクレターゼを測定すると AD/MCI において推測された変化 (A $\beta$  40/43 増大; A $\beta$  38/42 の増大) が認められた<sup>1)2)</sup>。この観察によって生じる直接的な推論は、A $\beta$  42 の産生を選択的に抑制しようとする  $\gamma$  モジュレータは AD/MCI には余り効果がないのではないかということである。というのは AD/MCI においてはすでに  $\gamma$  セクレターゼ自身がすでにそのような効果への変化をしているからである

## 「A $\beta$ オリゴマー」

### A $\beta$ オリゴマーの臨床脳画像

A $\beta$ 線維で形成される老人斑の臨床的検出には、髄液を対象としたELISAによる生化学的手法と、アミロイドPETによる脳画像手法がある。これらは、病因論的には課題を残しているが、臨床応用レベルとして広く普及していることもあり、臨床検討の価値がある。我々は、日本国内ではPiB-PETに関して先駆的な経験をしてきている。通常の孤発例アルツハイマー病、正常高齢者、MCI症例だけでなく、正常若年者から、非アルツハイマー病認知症なども解析を進めてきた。さらに、初期変化を確認する手法として家族性アルツハイマー病 (APP 変異症例 1 例、PS1 変異症例 8 例) を孤発症例、正常症例各々 30 例と比較することで線条体での A $\beta$ 線維蓄積を見い出してきた (Villemagne VI et al Arch Neurol, 2009) が、逆にPiB蓄積の有無の有用性について臨床的な検討が必要であった。また、PiBが結合する病変を特定するために、孤発性アルツハイマー病患者だけでなく老人斑モデルマウスと A $\beta$ オリゴマーモデルマウスを対象としてPiB-PETを実施したところ、A $\beta$ 線維老人斑、とりわけA $\beta$ 分子のアミノ末端のピログルタミン酸構造に修飾されたA $\beta$ 老人斑がPiB結合体であることを強く示唆することができた<sup>3)</sup>。

PiBの結合するA $\beta$ 分子種を特定した後、臨床的な検討を進めることとした。これまで生化学的に明らかとなってきたアルツハイマー病マーカーである髄液A $\beta$ 1-42、異常リン酸化タウ、アポリポタンパク質E4アレル分析を実施し、PiB-PETシグナルとの比較を実施した(図1)。その結果、**dementia with Lewy bodies (DLB), frontotemporal dementia (FTD), argyrophilic grain dementia (AGD), neurofibrillary tangle-predominant form of dementia (NFTPD), and hippocampal sclerosis** はPiB陰性となっていることを明らかにし、アルツハイマー病との鑑別診断上有用と結論した<sup>4)</sup>。今後、A $\beta$ 線維老人斑におけるPiBのようなA $\beta$ オリゴマー結合性化合物開発の必要が議論されていくものと考えられる。

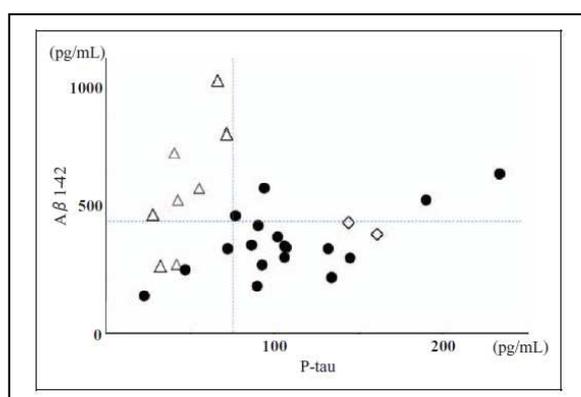


図 1

PiB-PETを実施した認知症症例の患者髄液分析

●アルツハイマー病、△、◇は非アルツハイマー病疾患 (詳細は、本文を参照)

### Aβオリゴマーの臨床

大阪変異 (APP E693Δ) をもつ 2 症例の 8 年にわたる臨床像を詳細に解析した<sup>5)</sup>。図 2 は、症例 1 の経過をしめしたもので、発症後 5 年目で神経所見が急変したことが 1 つの特徴である。時期を同じくして、神経心理テストの結果も急落していることがわかる。PiB-PET は期待通り陰性であったが、脳萎縮は、海馬で顕著に確認されたものの新皮質領域で軽微である点が、特筆に値する。つまり、Aβオリゴマー誘導による本アルツハイマー病症例の脳画像ではMRIによる脳質拡大や脳回萎縮などという通常に観察される所見とは一致しない(図3)。後期には、新皮質の萎縮も見られるが、実際の臨床像は、画像より遙かに重篤で、その時間差も極めて大きい。おそらくは、シナプス機能障害の異常が顕著であり、細胞死を待たずに機能不全となっていると考察した。

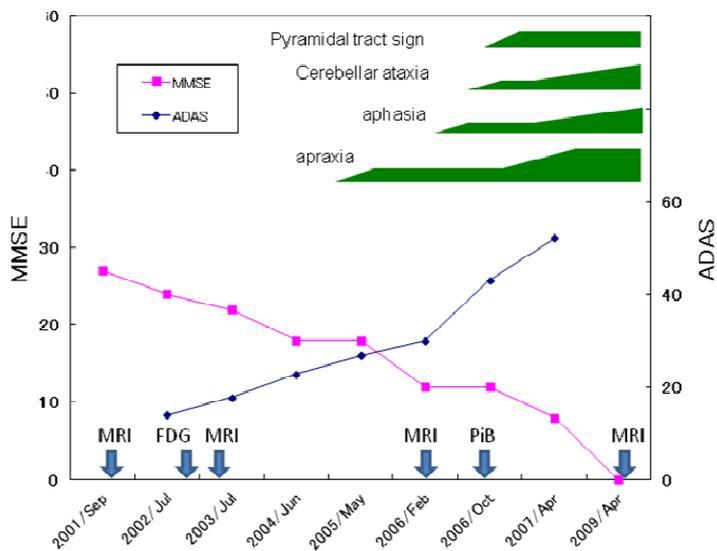


図 2  
大阪変異を持つ家族性アルツハイマー病患者の臨床経過

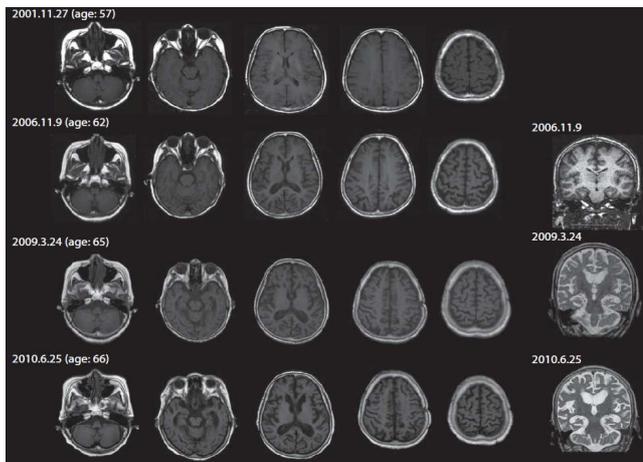


図 3  
大阪変異を持つ家族性アルツハイマー病患者のMRI脳画像

症例1の同胞患者である症例2も、ほぼ同じ経過を辿っていることが観察されている。やはり若年発症で、進行性の経過をしめし、脳画像での脳萎縮は軽微であるにもかかわらず臨床像は重篤である。重要な所見は、同じくPiB-PETで陰性であることが確認されている(図4)。

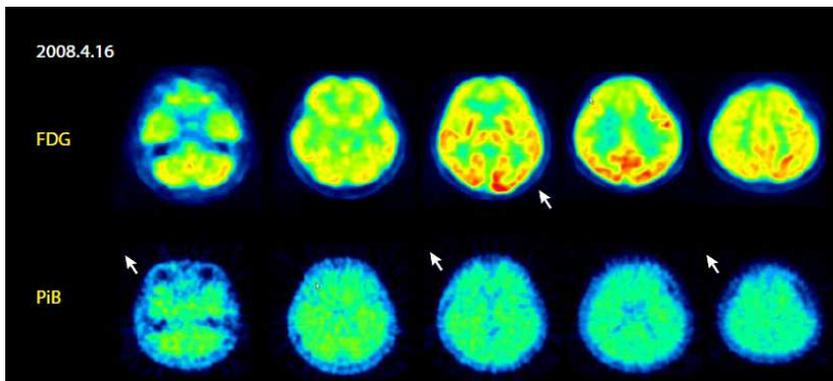


図4  
大阪変異を持つ家族性アルツハイマー病患者のPiB-PET像

#### A $\beta$ オリゴマーの機能

培養細胞系での過剰発現という実験条件ではあるが、チトクローム流出によるアポトーシスの可能性を示唆してきた。この観察を支持するモデルマウスでの検証成果も得られており、リソソーム酵素であるカテプシン、チトクロームCのニューロン内蓄積を検出できた。さらに、活性型カスパーゼも優位に高度に染色されたことで、A $\beta$ オリゴマーによる細胞脱落死がモデルマウスの一部でアポトーシス経路に寄ることが示唆された<sup>6)</sup>。この結果は、A $\beta$ 線維が細胞培養系で神経毒を示すことで細胞脱落を説明したこれまでの研究成果に、新しい視点を追加するものであり、とりわけA $\beta$ オリゴマーがシナプス障害を惹起するだけでなく、細胞内異常蓄積によって細胞死まで誘導する可能性を視野に入れる必要を上舌店で重要であると考えた。細胞外培養液に添加したA $\beta$ オリゴマーは細胞生存率で評価した場合は低い神経毒活性であることを観察した研究成果(Suzuki T et al (2011) *Int J Alz Dis*)からもA $\beta$ 線維と異なる作用機構であることがわかる。病因A $\beta$ オリゴマーの細胞内産生は、細胞内小胞輸送系の異常を示唆してきたが、ミトコンドリア器官におけるA $\beta$ オリゴマー解析だけを残してきた。これは、ミトコンドリアが呼吸機能を担っている点で有力なラジカル発生源器官であると同時に、アルツハイマー病危険因子でもあるコレステロール脂質代謝の場でもあるからであり、さらには、アポトーシスによる神経細胞死の可能性を検討に入れた慎重な分析が必要であったからである。コレステロール排出に関連した視点からもマウスでの検証結果<sup>6)</sup>は、今後生活習慣病と認知症の関連をA $\beta$ オリゴマーから解析する重要な出発点となると考えている。さらなる機能分析は、A $\beta$ オリゴマーの脳組織からの抽出、精製、分析が必要になることは必定であり、これからの中心課題の1つとして展開する計画である。

#### 「抗タウ治療戦略の検討」

チューブリン過剰発現線虫の作成とモデル線虫の **rescue** 実験を進めた結果、チューブリンの異所性発現だけで成長阻害、行動異常が出てしまい、タウによる行動異常の改善効果については判定出来なかった。複数の直接的な微小管安定化薬の効果についても検討したものの、明確な効果は示さなかった。現在安定型チューブリンのマーカであるチューブリンのアセチル化をターゲットとし、さらなる解析を進めている。タウ神経毒性領域の同定については、予定通りに解析を進めた結果、タウオパチーを引き起こす責任配列は微小管結合領域を中心とした C-末端領域にあり、とくにタウの **2nd repeat** に強い **candidate** が有る可能性を見いだした。またタウと近縁の微小管結合タンパク質である **MAP2** もタウと同様な毒性が確認されることを見いだした。現時点での結果をまとめると、少なくとも高度にリン酸化された微小管結合領域を有し、重合傾向が高いものほど神経機能障害を引き起こす毒性が強いようである。さらに患者剖検脳を解析した結果、神経機能毒性を示した **MAP2** の C-末端側のフラグメントも、タウと同様にリン酸化され神経原線維変化に共存していることを見いだした。これより、アルツハイマー病のようにアミロイド等の上流分子によって引き起こされるタウオパチーでは、タウだけでなく **MAP2** も同様な挙動を示し、おそらくタウと同様の毒性分子として振舞っている可能性が示唆された。また、抗タウオパチーペプチドスクリーニングとして、既存のタウ微小管領域に結合しうるモノクローナル抗体を用いて、**in vitro** タウ重合に対する阻害実験を遂行した。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

- 1 Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Naomi Mihira<sup>1</sup>, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC: Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Aβ<sub>43</sub>. *Nat Neurosci* 14(8):1023-1032, 2011 (DOI: 10.1038/nn.2858)
- 2 Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y, J-ADNI: Altered γ-secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* (in press).
- 3 Shimada H, Ataka S, Takeuchi J, Mori H, Wada Y, Watanabe Y, Miki T: Pittsburgh compound B-negative dementia—A possibility of misdiagnosis of patients with non-Alzheimer disease-type dementia as having AD. *J Geriatr Psychiat Neurol* 24(3):123-126, 2011 (DOI:10.1177/0891988711409410)
- 4 Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takeuchi H, Mori H, Miki T: Clinical course of patients with familial early-onset Alzheimer's disease potentially lacking senile plaques bearing the E693G mutation in amyloid precursor protein. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32:45-54, 2011 (DOI:10.1159/000330017)
- 5 Maeda J, Zhang MR, Okauchi T, Ji B, Ono M, Hattori S, Kumata K, Iwata N, Saido TC, Trojanowski JQ, Lee VM, Staufienbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M: In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid-beta and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J Neurosci*. 2011 31(12):4720-30, 2011
- 6 Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H: Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of Aβ oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci* (in press)

#### (3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)