

「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

H24 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療法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

- ・脂質二重層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
- ・モデルマウスを利用した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制

(2) ヒト脳組織評価グループ(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

- ・脳内アミロイド  $\beta$  タンパク質蓄積量別の  $\gamma$ -secretase 活性測定
- ・ $\epsilon 4$  と  $\gamma$ -secretase 活性変化相関についての検討

(3) アミロイド・オリゴマーグループ(大阪市立大学)

① 主たる研究代表者: 森 啓 (大阪市大医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・非線維性 A $\beta$  オリゴマーの同定、形成と分析
- ・分子診断・治療戦略としての A $\beta$
- ・A $\beta$  オリゴマーの作用解析

(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(同志社大学大学、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
- ・タウ神経毒性領域の同定
- ・抗タウオパチーペプチドスクリーニング
- ・タウオパチー脳を用いた神経細胞骨格変性過程の検証

## § 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」

前年度に特殊ペプチド創製グループ(ペプチドリーム株式会社)が創製した特殊ペプチドは、細胞レベルの実験(APP、Notch、st6gal Iの3つのタンパク質を過剰発現させたCHO細胞)において、基質特異的にA $\beta$ 産生( $\gamma$ 切断)とsAPP $\beta$ 産生( $\beta$ 切断)は抑制したが、NotchのS3切断やst6gal Iの切断には全く影響を与えなかった。このペプチドをマウス腹腔内投与したところ、脳内のA $\beta$ 量を減少させた。FITC標識したペプチドを同様にマウス腹腔内投与すると、脳内でFITC由来の蛍光が観察された。特願2012-006687、特願2012-208277、PCT/JP2013/50663。

### 「ヒト脳組織評価」

孤発性アルツハイマー病患者剖検脳から脂質ラフト $\gamma$ セクレターゼを分離し、 $\gamma$ セクレターゼ modulatorの効果を検討したところ、健常者由来の脂質ラフト $\gamma$ セクレターゼの場合と比較して、 $\gamma$ セクレターゼ modulatorの効果が限定的であることがわかった。この結果は、 $\gamma$ セクレターゼ modulatorが治療薬として効果が小さい可能性を暗示している。また、この脳内の $\gamma$ セクレターゼ活性の変化は、A $\beta$ 蓄積初期(AD発症以前)から起きていることがわかった(原著論文1)。

### 「A $\beta$ オリゴマー」

#### a) 非線維性A $\beta$ オリゴマーの同定、形成と分析

孤発性アルツハイマー病凍結脳組織より抽出後、超遠心上清を得ることで、カラム精製の出発材料とした。ゲル濾過、イオン交換によりほぼ単一に精製した抗A $\beta$ タンパク質抗体反応性バンドを分析したところ、精製標品はA $\beta$ タンパク質アミノ酸配列とは一致しなかった。

#### b) 分子診断・治療戦略としてのA $\beta$

合成A $\beta$ タンパク質標品を抗原とするモノクローナル抗体を作製したところ、多数の抗体を得たが、いずれも電子顕微鏡アッセイでA $\beta$ 線維を認識する事が確認された(図1)非線維性A $\beta$ オリゴマーだけではなく、線維成分への反応性があることで、ワクチン投与をした場合副作用

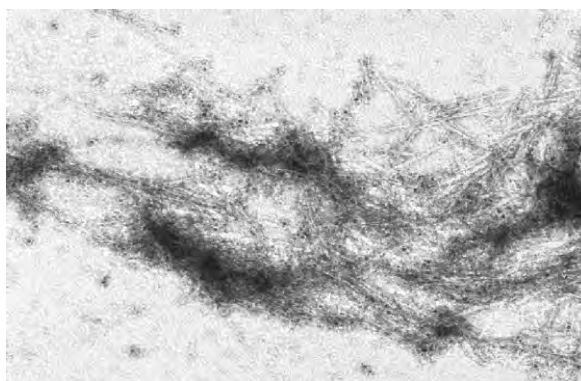
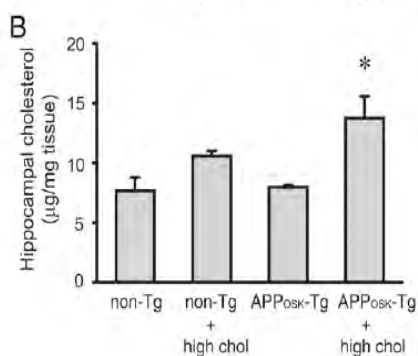
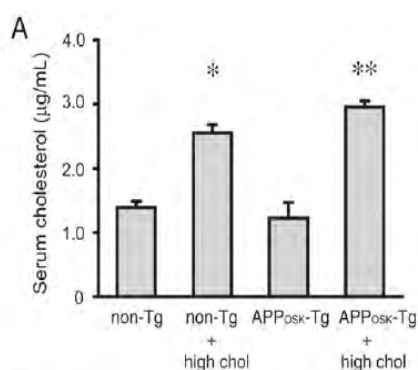


図 1. 精製された抗 A $\beta$  タンパク質抗体反応性バンドの分子解析

の危険性があると考察された。



### c) Aβオリゴマーの作用解析

現在、糖尿病、狡猾圧、脂質異常症の生活習慣病がアルツハイマー病危険因子として作用することが疫学的調査によって示唆されている。本研究では、従来のアルツハイマー病モデルマウスではなく、老人斑を形成しないAβオリゴマーを有する大阪変異型モデルマウスによって、これらの検討を実施した。特に補年度は、高脂血症がAβオリゴマーに与える作用について検討した。

図 2. 高コレステロール食餌によるコレステロール値の変動。アルツハイマー病モデルマウスと正常マウスには関係なく、高コレステロール食餌により脂質異常症になることが観察された。実験は、5ヶ月齢マウスに、1ヶ月間高コレステロール食餌を与えてから、(A) 血漿および (B) 脳組織中コレステロールを測定した。

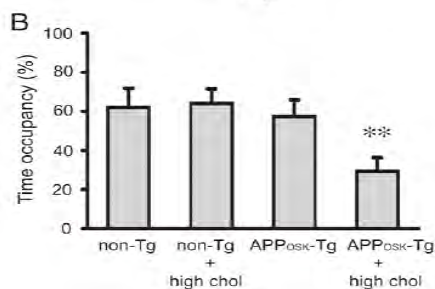
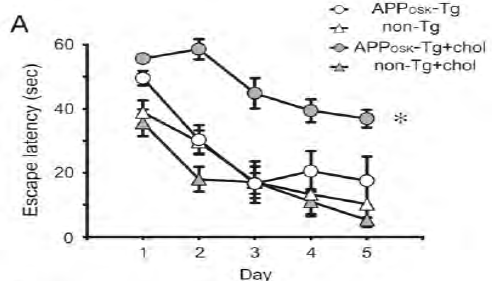


図 3. 高コレステロール食餌による空間認知症能の障害。Morris の水迷路実験による認知機能評価をした。高コレステロール食餌を与えられたアルツハイマー病モデルマウスだけが (A) 標的到達時間と (B) 標的認知能時間で空間認知機能障害をしめした。脂質異常症を示した正常マウスも認知能力には異常がない。

まず高濃度にコレステロールを含有した食餌を与えたマウス群と正常食餌を与えたマウス群を用意し、コレステロールを測定したところ、変異の有無に関係なく、高コレステロール食餌により血漿コレステロール (図 2 A) および脳海馬コレステロール (図 2 B) の各濃度が高いことが確認された。この結果から、血漿値で優位差が観察された。

次に、図 2 で得られたマウス群を用いて、記憶試験を実施した。正常マウスおよび大阪変異型モデルマウスは、5ヶ月齢では、行動異常が観察されない (Tomiyama et al (2011) J Neurosci)。しかしながら、高コレステロール食餌により、水迷路試験での標的までの経路記憶が優位さを以て低下することが示された (図 3 A)。さらに標的領域に留まる時間でも高度な有意差を認めた (図 3 B)。

高コレステロール食餌を与えられた6ヶ月齢マウスの脳組織を、2つのA $\beta$ 抗体での検索した。その結果、モデルマウスでのニューロン内A $\beta$ オリゴマー異常蓄積は8ヶ月齢から始まるのに対して、高コレステロール食餌によって、少なくとも2ヶ月早まることが観察された。アルツハイマー病の老人斑と並ぶもう1つの病変であるタウ病変についても検索した。ニューロン内A $\beta$ オリゴマー異常蓄積は、大阪変異型モデルマウスだけの特別な反応であるかを調査する目的で、通常のアミノ酸配列を高度発現する老人斑モデルマウス(Tg2576)の7ヶ月齢で実施した。その結果、通常のアムツハイマー病モデルマウスでもニューロン内A $\beta$ オリゴマー異常蓄積が、A $\beta$ オリゴマー高進変異である大阪変異ほどではないが、高進することが観察された(原著論文2)。

A $\beta$ オリゴマーによる影響について、蛋白レベルで比較検討した(原著論文3、4)。これらのなかで特に注目したのは、チャネルタンパク質(VDAC)が変化しないのに対し、dynaminなど多くの変化を認めたが、総合してみると、一般的に代謝関連分子は高進していたが、シナプス関連分子は、発現低下していることが確かめられた。この結果は、シナプトフィジンなどについて、これまで解析してきた結果と合致した。今後、これらの分子変化の意義についてさらに検討することにした。

文献: Tomiyama et al (2011) J. J. Neurosci. 30: 4845-4856., Umeda et al (2012) Life Sciences 01: 1169-1176., Takano et al (2012) Neurochem Int. 61: 347-355.

#### 「抗タウ治療戦略の検討」

前年度までの研究成果より、線虫モデルにおいてMAP2がタウと同等な神経毒性を呈することを明らかとした。また、ヒト剖検脳における解析により、MAP2のC-末端を認識する抗体が神経原線維変化を染色することを見出した。しかし、その後の詳細な解析により、タウ、MAP2それぞれの微小管結合領域に対する抗体の多くは互いに交叉反応する事実が判明し、厳密な存在の証明とはならなくなった。これに対し、MAP2の微小管結合領域にのみ反応し、タウと交叉しない3種のポリクローナル抗体の作成に成功し、組織学的、生化学的においても厳密なMAP2の解析を可能とした。これらの抗体を用いて新たにヒト材料を用いた免疫組織学的解析の結果、やはり神経原線維変化を認識することを見出した。またヒト脳凍結材料を用いた生化学解析により、SDS不溶性の神経原線維変化(NFT-core)にMAP2の微小管結合領域が存在することを確認した。一方同様にサルコシル不溶性/SDS可溶性画分を調整し、ウエスタンブロット法により解析した結果、アルツハイマー病脳に特異的なMAP2の蓄積は確認出来なかった。これまでの解析からSDS不溶性のNFT-coreは比較的初期に蓄積し、より強い不溶性を獲得したものであり、サルコシル不溶性、SDS可溶性のNFTは比較的後期に蓄積したものであるとされている。これらの結果からMAP2はNFT形成の極めて初期にのみ蓄積し、NFTが促進的に形成する時期にはMAP2はむしろ消失する可能性を示唆している。現在、さらなるNFT形成過程とMAP2蓄積の横断的解析を目的とし、マイクロスライサーとfree floating immunostaining法の組み合わせによる正常神経細胞、NFT形成細胞におけるタウ、MAP2の組織学的解析手法につい

て確立している。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y; The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiatives. Suspected limited efficacy of  $\gamma$ -secretase modulators. *Neurobiol. Aging* 34: 1101-1104, 2013 (DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.017)
2. Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A $\beta$  oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. **Life Sciences**. 91: 1169-1176, 2012 (DOI:10.1016/j.lfs.2011.12.022)
3. Takano M, Maekura K, Otani M, Sano K, Nakamura-Hirota T, Tokuyama S, Min KS, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S. Proteomic analysis of the brain tissues from a transgenic mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers. **Neurochem Int.** 61: 347-355, 2012 (DOI:org/10.1016/j.neuint.2012.05.018)
4. Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. **Neurosci. Lett.** 534:85-89, 2013 (DOI:org/10.1016/j.neulet.2012.11.010)
5. Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. **Am J Pathol.** (in press)

#### (3-2) 知財出願

- ①平成 24 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)