

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「アルツハイマー病根本治療薬創出の  
ための統合的研究」

## 研究終了報告書

研究期間 平成19年10月～平成25年3月

研究代表者氏名 岩坪 威  
(東京大学大学院医学系研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1)実施概要

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  $\beta$  アミロイド(A $\beta$ )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ことを目的に遂行した。

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した。A $\beta$  の凝集過程については、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した。また A $\beta$  免疫療法の分子メカニズムについて、遺伝子改変マウスやモデル細胞を用いた解明を行った。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った。

$\gamma$  セクレターゼに関しては、システイン化学等のケミカルバイオロジー手法と分子生物学的手法を用いてプレセニン1の活性中心ポア構造の全貌を明らかにし、さらに各種セクレターゼ阻害薬の作動機構を解明した(Sato et al. *J Neurosci* 2008, Takagi et al. *J Neurosci* 2010)。 $\gamma$  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が阻害薬として働くことを示し(Hayashi et al. *Oncogene* 2012)、本抗体を用い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。A $\beta$  42 選択的  $\gamma$  モジュレータ GSM-1 の結合部位をプレセニン1第一膜貫通部位に同定し、GSM のアロステリックな作動機序を解明した(Ohki et al. *EMBO J*, 2011)。さらに Notch 保存性  $\gamma$  阻害薬の結合部位も同定明した。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 $\beta$  量が低下することを見出した(Takasugi et al. *J Neurosci* 2011)。この発見は、非競合型 BACE1 阻害薬 TAK-070 の作動機序の解明につながり(Fukumoto et al. *J Neurosci* 2010)、同薬の東京大学附属病院早期探索室における医師主導治験の実現(2012)をもたらした。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、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(Hori et al. 投稿準備中)。主要な A $\beta$  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と軸索投射に不可欠の役割を果たすことを発見した(Tanaka et al. 投稿準備中)。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、ヒト化抗体 solanezumab がはじめてヒト治験で認知機能改善を示し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(Yamada et al. *J Neurosci* 2009)。自閉症の発症に関与するシナプスタンパク質 Neuroligin 1 が、アルツハイマー病 A $\beta$  の産生に関わるプロテアーゼ ADAM10( $\alpha$  セクレターゼ)と  $\gamma$  セクレターゼにより切断を受け、シナプス形成を負に制御することを実証、発達障害とアルツハイマー病の共通機序を初めて示した(Suzuki et al. *Neuron* 2012)。尾藤グループの奥野らは、樹状突起棘における inverse synaptic tagging において Arc が果たす役割を解明した(Okuno et al. *Cell* 2012)。荒井らはアミロイドPETプローブを用いたヒト臨床研究にて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、 $\gamma$  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 $\beta$  に選択的な阻害薬・モジュレータ薬の創薬・臨床応用につなげるとともに、A $\beta$  の凝集と細胞毒性の関連を解明、A $\beta$  除去機構についても解明し、新規治療方策の開発を実現する。臨床画像マーカーを含むこれらの治験は、AD の超早期治療・予防の実現に大きく貢献するものである。

(2) 顕著な成果

1. Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zheng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76:410-422, 2012

概要: 自閉症の発症に関与するシナプスタンパク質 Neuroligin 1 が、アルツハイマー病 A $\beta$  の産生に関わるプロテアーゼ ADAM10( $\alpha$  セクレターゼ)と  $\gamma$  セクレターゼにより切断を受け、シナプス形成を負に制御することを実証、発達障害とアルツハイマー病の共通機序を初めて示した。

2. Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T. *EMBO Journal* 30:4815-4824, 2011; doi:10.1038/emboj.2011.372

概要: アルツハイマー病の治療薬として、病原性の高い A $\beta$  42 の産生を特異的に抑制する GSM の標的を presenilin 1 の第 1 膜貫通領域に同定し、その作用機序が  $\gamma$  セクレターゼの活性中心の構造変化を導くアロステリック効果にあることを示した。この成果により GSM の臨床的有用性が強く支持され、製薬企業によるヒト応用が促進された。

3. 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

概要: アルツハイマー病の根本的治療として開発された抗 A $\beta$  抗体投与による受動免疫療法が末梢血液中ではなく、脳内に進入して治療効果を生じていることを証明した。本研究の成果は、用いた 266 抗体のヒト化抗体 solanezumab の薬効機序を裏付け、製薬企業によるグローバル治験における認知機能改善作用の実証(2012)という画期的成果にも結びついた。

## § 2. 研究構想

### (1) 当初の研究構想

アルツハイマー病(AD)の分子病態の理解に基づく、有効なAD根本治療・予防法の開発を目標にADの病因物質として最も重要視されている $\beta$ アミロイド(A $\beta$ )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ブロックないし改善する新機軸の治療薬リードを、低分子化合物を中心に創出する。A $\beta$ 産生については、C末端の切り出しを担うプロテアーゼである $\gamma$ セクレターゼにフォーカスし、その構造・機能連関の解析に基づき、ADの病因に直結するA $\beta$ 42分子種の産生機構を解明する。この知見に基づき、 $\gamma$ セクレターゼの全般的抑制に伴うNotchシグナル遮断の副作用を回避可能な、A $\beta$ 42もしくはAPP特異的阻害薬( $\gamma$ モジュレータ)を創出、その選択的作用メカニズムを解明する。A $\beta$ の中間凝集体であるオリゴマー、プロトフィブリルの形成・毒性機構、さらに $\beta$ 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。抗 $\beta$ アミロイド治療法として最も進んでいる「A $\beta$ 免疫療法」のメカニズムの1つとして注目されている脳から血中へのA $\beta$ ペプチドの排出(sink現象)のメカニズムを解明し、A $\beta$ クリアランスの促進による治療法を提案する。ADの根本治療を実現するために、ADの初期病態を鋭敏に反映するバイオマーカーとして、血漿A $\beta$ 及びアミロイドイメージングの意義をヒトで検証する。研究終了時にはA $\beta$ の産生・蓄積機構の全容を明らかにし、有機合成化学者の参加により治療薬リード化合物を創出する。同時に、AD発症を予測する有効な生化学マーカーを確定し、革新的治療法の実用化につなげ、さらにADと他の精神疾患に共通するメカニズムを同定することを目標とする。

### (2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

アミロイド $\beta$ に関する研究、ことに $\gamma$ セクレターゼの構造・機能連関に関する研究は、低分子化合物を用いたケミカルバイオロジー的展開を含めて順調に発展し、当初到達が予想されなかった $\gamma$ セクレターゼモジュレータ薬の標的構造の同定ならびに作動機構の解明という大きな成果が挙げられた。また、セクレターゼ切断の研究を進展させることにより、自閉症に関連の深いシナプス膜タンパクニューロリジンがA $\beta$ 産生に関わる $\alpha$ 、 $\gamma$ セクレターゼで連続的な切断を受け、シナプス形成を負に制御することを発見し、アルツハイマー病と自閉症に共通する分子マシナリーを同定することができた。A $\beta$ クリアランスに関しては、当初抗A $\beta$ 抗体がA $\beta$ ペプチドを血中に導くとする「シンク仮説」を実証すべく研究を進めたが、意外にも抗体が血中でなく脳内に進入して作動することを見出し、血液脳関門輸送体の検討は終息させ、脳内のA $\beta$ 重合機構に研究をシフトすることができた。バイオマーカーに関しても、上記のごとく脳と血液間でのA $\beta$ の交通性が乏しいことの実証に基づき、血漿バイオマーカーの検討は、中間評価での助言に従って中断し、脳アミロイドPETの検討に絞ることにより、AD病理の超早期診断における意義を実証、J-ADNI研究などの臨床研究の方向性に重要な示唆を与えることができた。

### § 3 研究実施体制

#### (1) 東京大学グループ

##### ① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岩坪威	東京大学大学院医学系研究科	教授	H19.10～25.3
尾藤晴彦	東京大学大学院医学系研究科	准教授	H19.10～23.3
奥野浩行	東京大学大学院医学系研究科	助教	H19.10～25.3
富田泰輔	東京大学大学院薬学系研究科	准教授	H19.10～25.3
伊藤弦太	東京大学大学院医学系研究科	助教	H19.10～25.3
福山透	東京大学大学院薬学系研究科	教授	H19.10～25.3
横島聡	東京大学大学院薬学系研究科	講師	H19.10～25.3
松尾祥子	東京大学大学院医学系研究科	技術補佐員	H20.4～25.3
坂口知子	東京大学大学院医学系研究科	技術補佐員	H20.4～25.3
高杉展正	東京大学大学院薬学系研究科	助教	H20.4～22.3
藤井哉	東京大学大学院医学系研究科	産官学連携研究員	H20.4～23.3
堀由起子	東京大学大学院薬学系研究科	日本学術振興会特別研究員	H20.4～22.3
杉本康昭	東京大学大学院薬学系研究科	D3	H20.4～22.3
高鳥翔	東京大学大学院薬学系研究科	日本学術振興会特別研究員	H20.4～23.3
宮下紘幸	東京大学大学院薬学系研究科	D3/日本学術振興会特別研究員	H20.4～22.3
一色隼人	東京大学大学院薬学系研究科	D3/日本学術振興会特別研究員	H20.4～24.3
高木穩香	東京大学大学院薬学系研究科	D2/日本学術振興会特別研究員	H20.4～24.3
上川路翔悟	東京大学大学院薬学系研究科	D2-3	H21.4～24.3
林ゆかり	東京大学大学院薬学系研究科	D3	H20.4～23.3
功刀隼人	東京大学大学院薬学系研究科	D1-3	H22.4～25.3
鈴木邦道	東京大学大学院薬学系研究科	D1-3	H22.4～25.3
竹尾浩史	東京大学大学院薬学系研究科	D1-3	H22.4～25.3
田中智弘	東京大学大学院薬学系研究科	D1-3	H22.4～25.3
大木 優	東京大学大学院薬学系研究科	D2-3	H21.4～24.3
山田薫	東京大学大学院薬学系研究科	日本学術振興会特別研究員	H20.4～22.3
橋本唯史	東京大学大学院医学系研究科	助教	H19.10～20.7
渡邊直登	東京大学大学院薬学系研究科	D3/日本学術振興会特別研究員	H20.4～21.3
佐藤千尋	東京大学大学院医学系研究科	日本学術振興会特別研究員	H20.4～H21.9
井原涼子	東京大学大学院医学系研究科	D4	H22.4～24.3
諸橋雄一	東京大学大学院薬学系研究科	助教	H22.4～25.3
若林朋子	東京大学大学院医学系研究科	助教	H21.4～25.3
佐々木朝輝	東京大学大学院薬学系研究科	D2	H23.4～25.3
富永綾	東京大学大学院薬学系研究科	D2	H23.4～25.3
大泉寛明	東京大学大学院薬学系研究科	D1	H24.4～25.3

② 研究項目

- 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
- 2)  $A\beta$  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
- 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
- 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
- 5)  $\beta$  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
- 6)  $A\beta$  結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究
- 7) 脳からの  $A\beta$  排出機構に関する研究
- 8) 脳からの  $A\beta$  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 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
荒井啓行	東北大学加齢医学研究所加齢脳・神経研究部門加齢老年医学研究分野	教授	H19. 10～25. 3
古川勝敏	東北大学加齢医学研究所加齢脳・神経研究部門加齢老年医学研究分野	准教授	H20. 4～25. 3
藤原博典	東北大学加齢医学研究所加齢脳・神経研究部門加齢老年医学研究分野	助教	H19. 10～H22. 3

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

## § 4 研究実施内容及び成果

### 4.1 $\gamma$ セクレターゼの解析と標的治療(東京大学 岩坪グループ)

#### (1) 研究実施内容及び成果

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した。

#### 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

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ること、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 (Sato et al. *J Neurosci* 2008, Watanabe et al. *J Biol Chem* 2010)。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 (Takagi et al. *J Neurosci* 2010)。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。またこの helix が最 C 末端の近傍に存在していることが示された。引き続き第 3、4、5 膜貫通領域について SCAM 解析を進めた。その結果、第 3 膜貫通領域は親水性ポアに直接露出しているヘリックス面をもつこと、特に内腔側が親水性環境に大きく面している、他の膜貫通領域にはない特徴的な構造をもっていた。第 4 膜貫通領域は細胞質側が完全に親水性環境内に存在し活性中心部位を形成しており、第 7 膜貫通領域と近接していること、その構造は  $A\beta$  42 産生能と相関して変化することを示した。第 5 膜貫通領域の大部分は脂質二重膜に埋没しているものの、一部のアミノ酸残基は直接親水性環境に面していることが明らかとなった。これらの結果を考えあわせ、PS は第 1 親水性ループと最 C 末端を内腔側で留め口とするリング様の構造をとり、第 1、3、4、5、6、7、9 膜貫通領域からなる活性中心ポアを脂質二重膜内で形成していることが明らかとなった。

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 (Ohki et al. *EMBO J* 2010)。異なるファーマコフォア (フェニルイミダゾール骨格) 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、PS および APH-1 を標的分子とすることが明らかとなった。興味深いことに、本モジュレータ薬は PS2 を含む  $\gamma$  セクレターゼに強く阻害能を示した。このモジュレータ薬の結合部位についてさらに詳細に解析を進め、PS の第 2 膜貫通領域から第 6 膜貫通領域までの間に存在する、PS1 と PS2 で異なるアミノ酸残基がそのモジュレータ活性発揮に特に重要であることが明らかとなった。一方、各種リコンビナントタンパク発現系を駆使し、PS が単体でも可溶化状態であれば酵素活性を発揮することを見出し、 $\gamma$  セクレターゼの酵素サブユニットとしての役割を再確認した。興味深いことに、フェニルイミダゾール骨格をもつモジュレータ薬は PS の酵素活性を亢進させることを明らかにした。すなわち、 $\gamma$  セクレターゼモジュレータ薬は酵素活性の中でも特に  $A\beta$  の C 末端長を決定する Processivity 活性を亢進させることで、毒性分子種である  $A\beta$  42 産生量を低下させることを見出した。プレセニリ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 (Miyashita et al. *J Biol Chem* 2011)。

#### 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

$\beta$  ペプチドの構造活性相関解析を行い、また 3 位にセリン残基を挿入することで Notch シグナルに対する抑制能を変化させずに  $A\beta$  産生に対する阻害能のみ 10 数倍上昇させることに成

功した。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。 $\beta$  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。特に 3 位に水酸基を持つペプチドは培養細胞において Notch シグナル抑制能は親ペプチドと同等であるにも関わらず、A  $\beta$  産生抑制能のみ 10 数倍亢進し、基質特異的に阻害活性を制御することに成功した。また  $\beta$  ペプチド光親和性標識プローブ化によって本ペプチドが PS1 の N 末端領域に直接結合することを明らかにし、この結合様式が既知のスルホンアミド型 Notch-sparing 阻害剤と競合しないことから、この  $\beta$  ペプチドの結合部位は基質認識過程における特異性の決定に重要なドメインであることが示唆された。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 の最 C 末端に結合することが明らかとなった。一方光親和性標識プローブを用いた競合実験とシステインを用いたクロスリンク実験から、第 1 親水性ループの C 末端側に存在するショートヘリックスと第 9 膜貫通領域による基質のヘリックス構造認識の後に、A  $\beta$  17–21 位が PS1 の最 C 末端部分と結合することが示唆された。また薬理的解析から、基質のヘリックス構造認識によって  $\gamma$  セクレターゼによる切断の最初のステップである  $\square$ 切断が生じ、その後の processive cleavage には PS の最 C 末端と基質の内腔側での相互作用が重要であ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 (Hayashi et al. *Oncogene* 2012)。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遺伝学的リスク因子 PICALM、BIN1、CD2AP、Rab7 の解析を行った。その結果、PICALM は  $\gamma$  セクレターゼのクラスリンを介したエンドサイトーシスを制御することで  $\gamma$  セクレターゼが主に存在する細胞内局在様式に影響を与えること、細胞表面近傍においては A  $\beta$  40 が優位に産生される一方で、リソソームに局在することでその酵素活性が pH による影響を受け A  $\beta$  42 産生能が亢進することを明らかにした。PICALM ヘテロノックアウトマウス脳を用いた解析で A  $\beta$  42 比率が低下していることを *in vivo* においても確認した。一方 BIN1 については、エンドサイトーシスされたあとのリサイクリングエンドソームにおける BACE1 の輸送、特に分解経路への移行に大きく寄与していること、BIN1 の欠損により BACE1 タンパク量が亢進し A  $\beta$  産生が上昇することを見出した。CD2AP についても検討を行い、APP がエンドサイトーシスされたあとのリサイクリング経路によって輸送される過程に重要な役割を果たしていること、CD2AP のノックダウンは APP 発現量を亢進させ A  $\beta$  産生が上昇することを明らかにした。Rab7 については、ノックダウンにより A  $\beta$  分泌が減少する一方で細胞内に A  $\beta$  が蓄積することを見出した。Rab7 がリソソームの成熟過程に必要な分子であること、また  $\gamma$  セクレターゼ活性がエンドソームからリソソームに存在することを考えると、A  $\beta$  がエンドサイトーシスされた APP より細胞内で産生されたあと、リソソームからの新規分泌経路によって細胞外に放出されていること、Rab7 はその分泌マシナリーに関与することが示唆された。

### 5) 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 Neuroigin を見出した。 $\alpha$  セクレターゼ (ADAM10) ならびに  $\gamma$  セクレターゼによる連続した切断が、Neuroigin 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 (Suzuki et al. *Neuron* 2012)。



## (2)研究成果の今後期待される展開

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策に道が開かれた。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。今後、これらの成果がヒトにおける AD 治療薬治験に実用化され、予防、超早期治療へと展開することが期待される。

## 4.2 $\beta$ セクレターゼ(BACE1)活性の脂溶性メディエータによる制御(東京大学 岩坪グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

スフィンゴシン1リン酸(S1P)はリグ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ことが知られている。神経細胞において、細胞内S1Pが $\beta$ セクレターゼ(BACE1)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(Takasugi et al. *J Neurosci* 2011)。この発見は前年に同定していた非競合型 BACE1 阻害薬 TAK-070 が膜貫通部位に作用し、アロステリックな作用により BACE1 活性を抑制することを示唆した(Fukumoto et al. *J Neurosci* 2010)。

### (2)研究成果の今後期待される展開

BACE1 が触媒部位以外に膜貫通部位を介した制御を受けることが実証され、 $A\beta$  降下療法に新しい道が開かれた。TAK-070 は東京大学における早期・探索的臨床試験(厚労省)における医師主導治験の対象薬として選定され、H25.3 より治験が開始される予定であり、BACE1 阻害によるヒト AD 治療へと繋がった。

## 4.3 $A\beta$ 結合タンパク質と凝集・毒性に関する研究(東京大学 岩坪グループ)

### (1)研究実施内容及び成果

$A\beta$  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検討した。

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。CLAC-P ノックアウトマウスの解析により、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することが分かった。また運動ニューロン軸索束は横隔膜に投射するが終板までは到達せずに 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、生存を維持する過程に必須の因子であることが分かった。

次に 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。

いま 1 つの主要な  $A\beta$  結合タンパク質として、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

### (2)研究成果の今後期待される展開

AD 脳におけるアミロイド結合分子として我々が同定した CLAC 前駆体タンパクという神経特異コラーゲン分子が、運動ニューロンの発生維持に必須の役割を果たすという思いがけない現象を見出すことができた。今後運動ニューロン疾患などの神経変性疾患における運動ニューロン維持療法への展開、神経筋発生の新規メカニズムのさらなる解明に発展が期待される。apoE については、同様の *in vivo* 解析系をさらに発展させることにより、A $\beta$  の毒性分子種と目されるオリゴマーなどの中間凝集体の毒性機構の解明につながる可能性がある。

#### 4.4 脳からの A $\beta$ 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(東京大学 岩坪グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

A $\beta$  の脳内からの排出・除去に、血液脳関門を構成する血管内皮細胞が重要な役割を果たす可能性を考え、脳毛細血管内皮から不活化された TR-BBB 細胞を用いて、A $\beta$  の取り込み実験を行い、本細胞が放射性ラベル A $\beta$  を急速に取り込み、排出すること、この取り込みが LRP1 阻害タンパク質 RAP ならびに LRP1 中和抗体、LRP1 に対する RNAi ノックダウンにて抑制されることから、LRP1 の関与を示した(Yamada et al. *J Biol Chem* 2008)。血管内皮特異的 LRP1 ノックアウトマウスを作出、放射標識 A $\beta$  の脳内注入により、A $\beta$  排出には影響が生じないことを見出し、*in vivo* では LRP1 以外のレスキュー系が作動する可能性を示唆した

AD の根本的治療法として有望視される抗 A $\beta$  抗体受動免疫療法において、抗体が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」と提唱されたモノクローナル抗体 266 を末梢投与すると、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。APP トランスジェニックマウス腹腔内に 266 抗体を投与すると、脳内の可溶・単量体型の A $\beta$  ・抗体複合体が増加した。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 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阻害するという新規作用メカニズムにより治療効果を発揮することを示唆した(Yamada et al. *J Neurosci* 2009)。

##### (2)研究成果の今後期待される展開

本検討で用いた 266 抗体のヒト化抗体 solanezumab は、製薬企業によるグローバル治験においてはじめて認知機能改善作用が実証されるに至ったが、本研究の成果はその薬効メカニズムの定説を正し、脳内におけるオリゴマー形成の抑制を示唆するものであった。今後ヒトにおける A $\beta$  免疫療法が、脳実質をターゲットとすべきことを明確に支持する所見であり、薬剤開発の方向性に大きな示唆を与えるものである。

#### 4.5 脳内 A $\beta$ 蓄積を反映するバイオマーカーの同定(東北大学 荒井グループ)

##### (1)研究実施内容及び成果

臨床研究を行う東北大学グループは、AD の発症前診断技術の開発ならびに AD の進行と治療効果の客観的評価法の確立のために、AD、軽度認知障害(Mild Cognitive Impairment:MCI)、健常高齢者(Aged Normal: AN)を対象に、アミロイドトレーサー BF-227 を用いたアミロイドイメージングによる脳内 A $\beta$  蓄積の評価と FDG を用いた糖代謝イメージング、さらに MRI による脳の volumetry 解析を施行し、各検査法の持つ特性、優位性を解析した。これらの検査法に加えて、AD の脳脊髄液の生化学マーカーを解析し、より優れた AD の客観的サロゲートマーカーを確定し、革新的治療薬の評価法確立につなげることを最終目標とした。また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もあわせて行った。

東北大学老年科を受診した AD 及び MCI 症例、また健常高齢者(AN)を対象に以下の研究を実施した。東北大学倫理審査委員会の承認を受け、患者及び家族からインフォームドコンセントを得た上で研究を遂行した。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。PET イメージングは島津製作所の SET-2400 スキャナーを用いて撮像した。アミロイド PET は

荒井らが開発した PET トレーサー  $[^{11}\text{C}]\text{-BF-227}$  を使用した。211-366 mBq の  $[^{11}\text{C}]\text{-BF-227}$  を静注後、ダイナミック PET イメージを 60 分間に渡り撮像した。 $[^{11}\text{C}]\text{-BF-227}$  の Standardized uptake value (SUV) イメージを体重と静注したトレーサーの放射線活性を基に作成した。脳の糖代謝 PET は  $[^{18}\text{C}]\text{-FDG}$  を用い、最低でも 4 時間の絶食後に、静寂かつ薄暗い環境下で撮像を行った。また脳 volumetry については、1.5T の MR スキャナーで得た T1-weighted gradient echo sequence を基に Voxel-Based Specific Regional Analysis System for AD (VSRAD) を用い、脳体積を定量化した。血液、脳脊髄液は最低 6 時間の絶食の後採取し、脳脊髄液  $\text{A}\beta$ 、total タウ、リン酸化タウは、Sandwich ELISA 法により定量を行った。AD での BF-227 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 で見られたものより小さかった。一方、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 を比較した場合、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。一方、脳脊髄液中の  $\text{A}\beta 42$ 、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これらのバイオマーカーの中で BF-227-PET が感度、特異度とも最も優れていた。漢方方剤の構成生薬に含まれている生理活性物質で化学構造の解明されている化合物 75 種について、 $\text{A}\beta$  凝集抑制作用および凝集脱重合作用を検討し、Baicalein や Wogonin (ともにオウゴンに含有) など 9 種の化合物に、用量依存的な凝集抑制作用および凝集脱重合作用を認めた。2011 年春、東日本大震災により東北大学における PET 使用が困難となったため、血液バイオマーカーに焦点を絞り、血液・脳脊髄液中 adiponectin の診断的意義を示すとともに、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。

## (2) 研究成果の今後期待される展開

アミロイドイメージングを駆使した臨床研究により、脳アミロイド PET が AD 病変の最も確実な早期診断法であることが確立された。今後のアルツハイマー病治験における被験者選択や予後予測におけるアミロイド PET の活用につながる先駆的な成果と言える。

## § 5 成果発表等

- (1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 60件)
- 1) Isoo N, Sato C, Miyashita H, Shinohara M, Takasugi N, Morohashi Y, Tsuji S, Tomita T, Iwatsubo T: A  $\beta$  42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase: common effects of Pen-2 amino-terminal elongation and fenofibrate. *J Biol Chem* 282:12388-12396, 2007
  - 2) Haleem K, Lippa CF, Wong M, Abdelhak T, Smith TW, Kowa H, Iwatsubo T: Space-occupying plaques in PS-1 C410Y Alzheimer's disease contain synaptic-terminal specific proteins. *American Journal of Alzheimer's Disease* 22:137-144, 2007
  - 3) Kan T, Kita Y, Morohashi Y, Tominari Y, Hosoda S, Tomita T, Natsugari H, Iwatsubo T, Fukuyama T: Convenient synthesis of photoaffinity probes and evaluation of their labeling abilities. *Org Lett* 9:2055-2058, 2007
  - 4) Fuwa H, Takahashi Y, Konno Y, Watanabe N, Miyashita H, Sasaki M, Natsugari H, Kan T, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Divergent synthesis of multifunctional molecular probes to elucidate the enzyme specificity of dipeptidic  $\gamma$ -secretase inhibitors. *ACS Chemical Biology* 2:408-418, 2007
  - 5) Kato M, Kinoshita H, Enokita M, Hori Y, Hashimoto T, Iwatsubo T, Toyo'oka T: Analytical method for  $\beta$ -amyloid fibrils using CE-laser induced fluorescence and its application to screening for inhibitors of  $\beta$ -amyloid protein aggregation. *Anal Chem* 79:4887-4891, 2007
  - 6) Kaneko H, Kakita A, Kasuga K, Nozaki H, Ishikawa A, Miyashita A, Kuwano R, Ito G, Iwatsubo T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Sisodia SS, Ikeuchi T: Enhanced accumulation of phosphorylated  $\alpha$ -synuclein and elevated A  $\beta$  42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1  $\Delta$ T440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer disease. *J Neurosci* 27:13092-13, 2007
  - 7) Takatori S, Ito G, Iwatsubo T: Cytoplasmic localization and proteasomal degradation of N-terminally cleaved form of PINK1. *Neurosci Lett* 430:13-17, 2008
  - 8) Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee S-Y, Sakata-Yanagimoto M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S. Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte homeostasis. *Pigment Cell & Melanoma Research* 21:70-78, 2008
  - 9) Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H 2-(2-(2-Dimethylaminothiazol-5-yl)Ethenyl-6-(2-FluoroEthoxy) Benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J. Nucl. Med.* 48:553-561, 2007
  - 10) Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 28: 6264-6271, 2008
  - 11) Akanuma SI, Ohtsuki S, Doi Y, Tachikawa M, Ito S, Hori S, Asashima T, Hashimoto T, Yamada K, Ueda K, Iwatsubo T, Terasaki T: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid- $\beta$  peptide (1-40) at the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 52:956-961, 2008
  - 12) Yoshihara T, Takiguchi S, Kyuno A, Tanaka K, Kuba S, Hashiguchi S, Ito Y, Hashimoto T, Iwatsubo T, Tsuyama S, Nakashima T, Sugimura K: Immunoreactivity of phage library-derived human single-chain antibodies to amyloid  $\beta$  conformers in vitro. *J Biochem* 143:475-486, 2008
  - 13) Cheung K-H, Shineman D, Muller M, Cardenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM-Y, Fosskett K: Mechanism of Ca<sup>2+</sup> disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP<sub>3</sub> receptor channel gating. *Neuron* 58:871-883, 2008
  - 14) Laras Y, Pietrancosta N, Tomita T, Iwatsubo T, Kraus JL: Synthesis and biological

- activity of N-substituted spiro[benzoxazepine-piperidine] A  $\beta$  -peptide production inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 7:1, 2008
- 15) Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, Liu Q, Bu G, Basak JM, Holtzman DM, Ohtsuki S, Terasaki T, Iwatsubo T: The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid  $\beta$  peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem* 283: 34554-34562, 2008
  - 16) Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:316-321, 2009
  - 17) Matsushita S, Miyakawa T, Maesato H, Matsui T, Yokoyama A, Arai H, Higuchi S, Kashima H. Elevated cerebrospinal fluid tau protein levels in Wernicke's encephalopathy. *Alcoholism: Clin Exp Res.* 32:1091-1095, 2008
  - 18) Hashimoto M, Shahdat HM, Yamashita S, Katakura M, Tanabe Y, Fujiwara H, Gamoh S, Miyazawa T, Arai H, Shimada T, Shido O. DHA disrupts in vitro amyloid b1-40 fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex tissue of Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem* 107:1634-1646, 2008
  - 19) Miyashita A, Arai H, Asada T, Imagawa M, Shoji M, Higuchi S, Urakami K, Toyabe S, Akazawa K, Kanazawa I, Ihara Y, Kuwano R. GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur. J. Hum. Genetics*, Epub 2008
  - 20) Cheng H, Vetrivel KS, Drisdell RC, Meckler X, Gong P, Leem JY, Li T, Carter M, Chen Y, Nguyen P, Iwatsubo T, Tomita T, Wong PC, Green WN, Kounnas MZ, Thinakaran G: s-Palmitoylation of  $\gamma$ -secretase subunits nicastrin and Aph-1. *J Biol Chem* 284:1373-1384, 2009
  - 21) 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* Epub ahead of print 2009
  - 22) 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
  - 23) 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
  - 24) 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
  - 25) 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
  - 26) Kamikawaji S, Ito G, Iwatsubo T: Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2 linked to familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 48:10963-10975, 2009
  - 27) 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

- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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* 2009 Nov 28. [Epub ahead of print]
- 33) 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 [(11C)BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 Dec 17. [Epub ahead of print]
- 34) 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  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15950, 2010 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3318-10.2010
- 35) 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.
- 36) 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  $\gamma$ -secretase. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010 doi: 10.1074/jbc.M110.101287
- 37) 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 A $\beta$  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
- 38) Kurosumi M, Nishio Y, Osawa S, Kobayashi H, Iwatsubo T, Tomita T, Miyachi H: Novel Notch-sparing  $\gamma$ -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
- 39) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M: Seeded aggregation and toxicity of  $\alpha$ -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285:34885-34898, 2010 doi: 10.1074/jbc.M110.148460
- 40) Asai M, Iwata N, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K: Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- $\beta$  peptide for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 88:3588-3597, 2010 doi: 10.1002/jnr.22503

- 41) 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.
- 42) 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
- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 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
- 48) 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
- 49) 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
- 50) 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.
- 51) Yonemura Y, Futai E, Yagishita S, Sudo S, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S: Comparison of presenilin1 and presenilin 2  $\gamma$ -secretase activities using a yeast reconstitution system. *J Biol Chem* 286:44569-44575, 2011 doi: 10.1074/jbc.M111.270108
- 52) 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.
- 53) 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

- 54) Ito G, Iwatsubo T: Re-examination of the dimerization state of leucine-rich repeat kinase 2: predominance of the monomeric form. *Biochem J* 441:987-994, 2012
- 55) 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* 31:787-798, 2012
- 56) Kuwahara T, Tonegawa R, Ito G, Mitani S, Iwatsubo T: Phosphorylation at Ser129 reduces  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity by lowering its membrane-binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 287:7098-7109, 2012
- 57) Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Une K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Brain accumulation of amyloid  $\beta$  protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int*. doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00880.x. [Epub ahead of print], 2012
- 58) Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287:25834-25843, 2012
- 59) Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII  $\beta$ . *Cell* 149:886-898, 2012
- 60) Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zheng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T: Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76:410-422, 2012

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

- 1) 岩坪威:アルツハイマー病:基礎研究から根本治療への新たな潮流 実験医学 16:2550-2553, 2008
- 2) Tomita T: Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. *Expert Rev Neurotherapeutics* 131:7353-7359, 2009
- 3) 富田泰輔:アルツハイマー病治療薬創出に向けた  $\gamma$  セクレターゼの構造解析と機能制御 蛋白質核酸酵素 54(12):1684-1689, 2009
- 4) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼによる膜内配列切断を介したバイオロジーと疾患 蛋白質核酸酵素 54(13):1747-1753, 2009
- 5) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼ活性制御によるアルツハイマー病治療 臨床神経学 49(11):845-847, 2009
- 6) De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS: Presenilins and  $\gamma$ -Secretase: Structure, Function and Role in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006304, 2012

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 35 件、国際会議 26 件)

- 1) Iwatsubo T: Alzheimer's disease:  $\beta$ -amyloid and  $\gamma$ -secretase. 10th International Hong Kong/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy. March 1, 2008 Hong-Kong
- 2) Iwatsubo T: Structure and function of  $\gamma$ -secretase. Keystone symposia, Alzheimer's disease. March 26, 2008 Keystone
- 3) Bito H. Elucidating the critical role of CaMKK/CaMKI pathways in neuronal morphogenesis. US-Japan Brain Research Collaborative Program "Workshop on Receptor Trafficking and Cell Biology of Neurons: Physiology and Disease" February



- 24-27, 2008, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California, USA.
- 4) 富田泰輔:アルツハイマー病治療を目指した  $\gamma$ -セクレターゼの構造活性相関の理解 2008年5月16日 第49回日本神経学会総会 横浜
  - 5) 岩坪威 アルツハイマー病の根本治療法を求めて:分子病態から臨床へ 第3回青森神経内科談話会 2008年5月24日 弘前
  - 6) 岩坪威アルツハイマー病の根本治療法を求めて 第12回認知症を考える会 2008年5月31日 京都
  - 7) 富田泰輔:膜蛋白の膜蛋白による膜蛋白のための膜内配列切断 2008年6月 第60回日本細胞生物学会 横浜
  - 8) Iwatsubo T: Normal and pathological function of LRRK2. 12th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 26, 2008 Chicago
  - 9) 岩坪威:アルツハイマー病:根本治療薬開発への道程 第24回 DDS 学会ランチョンセミナー 2008年6月29日 東京
  - 10) 岩坪威:アルツハイマー病の分子病態と根本治療 第16回神経内科認知症研究会 2008年7月2日 名古屋
  - 11) 岩坪威:アルツハイマー病の根本治療法開発とJ-ADNI project 第13回認知神経科学会学術集会ランチョンセミナー 2008年7月12日 東京
  - 12) Tomita T, Sato C, Takagi S, Iwatsubo T: The structure and function relationships of  $\gamma$ -secretase analyzed by SCAM. 2008年7月 第31回日本神経科学大会 横浜
  - 13) 岩坪威:アルツハイマー病の根本治療とADNI 第10回山陰認知症研究会 2008年7月18日 米子
  - 14) Iwatsubo T: Structure of the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase. The 11th ICAD meeting. July 30, 2008 Chicago
  - 15) 富田泰輔:アルツハイマー病治療を目指した  $\gamma$  セクレターゼ活性制御法の開発 2008年8月23日 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会(CPIPT) 大阪
  - 16) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: unraveling the structure-function relationship of  $\gamma$ -secretase. Gordon research conference. "Neurobiology of brain disorders. Circuit Dysfunction & Neurodegeneration. August 25, 2008 Oxford
  - 17) 富田泰輔:膜内でタンパクがどのように加水分解されるのか:膜内配列切断プロテアーゼの構造 2008年9月13日 第51回日本神経化学会大会
  - 18) 岩坪威:アルツハイマー病:分子病態に基づく根本治療法の開発 第9回東北神経変性疾患研究会 2008年9月19日 秋田
  - 19) 山田薫、矢吹千織、Peter Seubert, Dale Schenk, 橋本唯史、岩坪威:A $\beta$ ワクチン療法の展望:sink hypothesisの実験的検証から シンポジウムI「A $\beta$ ワクチン療法を考える」第27回日本認知症学会 2008年10月10日 前橋
  - 20) 富田泰輔  $\gamma$  セクレターゼモジュレーターによる A $\beta$  産生制御機構 ワークショップII「 $\beta$ タンパクの代謝と蓄積—update」第27回日本認知症学会 2008年10月11日 前橋
  - 21) 岩坪威:アルツハイマー病の病態・治療とJ-ADNIのとりくみ 認知症メディアセミナー GE 横河メディカルシステム 2008年10月14日 東京
  - 22) 岩坪威:アルツハイマー病 ~基礎研究の進歩と診断・治療の今後の方向性~ 第1回SPシンポジウム「アルツハイマー病 診断・治療の将来展望」2008年11月5日 東京
  - 23) Iwatsubo T: New therapeutic paradigm of Alzheimer's disease. International Symposium, Disease modifying approaches to Alzheimer's disease. Dec 6, 2008, Seoul
  - 24) 岩坪威:アルツハイマー病:分子病態から根本治療に向けて 文部科学省特定領域研究「統合脳」一般公開シンポジウム 2008年12月12日 東京
  - 25) Iwatsubo T:  $\gamma$ -Secretase: a structure-function perspective. 9th International Conference AD/PD 2009. March 11, 2009 Prague Czech Republic
  - 26) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: unraveling the structure-function relationship of  $\gamma$ -secretase. 2009 International Conference on Molecular Neurodegeneration. May 18, 2009 Xiamen, China

- 27) Iwatsubo T: Mechanism of A $\beta$  immunotherapy in Alzheimer's disease: intracerebral, rather than peripheral, sequestration of A $\beta$  by an anti- A $\beta$  monoclonal antibody 266. The VIIIth Cerebral Vascular Biology International Conference. July 2, 2009, Sendai
- 28) Iwatsubo T: Molecular mechanism of A $\beta$  immunotherapy in Alzheimer's disease. International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology. Tokyo Medical and Dental University, Aug 13, 2009, Tokyo
- 29) Iwatsubo T: Molecular pathology of Alzheimer's disease. Taiwan Clinical Dementia Meeting. Sep 27, 2009, Taipei
- 30) Iwatsubo T: Mechanism of A $\beta$  reducing therapy in Alzheimer's disease. The 9<sup>th</sup> Eibsee meeting. November 12, 2009, Eibsee, Germany
- 31) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼ活性制御によるアルツハイマー病治療 2009年5月21日 第50回日本神経学会総会 仙台
- 32) 富田泰輔: アルツハイマー病治療薬開発を目指した  $\gamma$  セクレターゼの構造活性相関 2009年7月26日 日本ヒトプロテオーム機構第7回大会 東京
- 33) Tomita T, Isshiki H, Takasugi N, Shinohara M, Iwatsubo T: Functional analysis genetic modulators for  $\gamma$ -secretase activity (GAMMOs). 2009年7月30日 第4回 Notch 研究会 三島
- 34) 富田泰輔: 膜内配列切断酵素  $\gamma$  セクレターゼの構造活性相関解析 2009年9月24日 タンパク質研究所セミナー「膜蛋白質の機能発現メカニズムの解明に向けて」 大阪
- 35) Tomita T: Structure and function relationship of the  $\gamma$ -secretase toward development of treatment of Alzheimer's disease. October 28, 2009, 6<sup>th</sup> General meeting of the International Proteolysis Society, Surfers Paradise, Australia
- 36) Tomita T: Functional analysis of genetic modulators for the  $\gamma$ -secretase activity 2009年12月10日 第32回日本分子生物学会 横浜
- 37) 岩坪威: アルツハイマー病の分子病態と根本治療 日本精神神経学会学術総会シンポジウム 広島 2010年5月20日
- 38) 岩坪威: アルツハイマー病の最新の基礎研究について 江東ブロック病院勤務薬剤師会東京 2010年8月26日
- 39) 岩坪威: アルツハイマー病研究においてアミロイドが教えてくれるもの J-CAN 2010 東京 2010年8月28日
- 40) 岩坪威: アルツハイマー病の根本治療をめざして 第396回国際治療談話会例会 東京 2010年9月16日
- 41) 岩坪威: アルツハイマー病の分子病態~糖尿病・インスリン作用異常との関連の解明をめざして~ Hisayama Study Conference 2010 福岡 2010年9月28日
- 42) アルツハイマー病: 分子病態から根本治療へ 大阪バイオサイエンス研究所 Monthly Lecture 2010年9月30日 吹田
- 43) 岩坪威: アルツハイマー病の分子病態と根本治療 第15回静岡健康・長寿学術フォーラム静岡 2010年10月15日
- 44) 岩坪威: アルツハイマー病: 分子病態から根本治療に向けて 第31回富山大学和漢薬研究所セミナー 富山 2010年10月22日
- 45) 岩坪威: アルツハイマー病の分子病態と根本治療 第45回日本成人病(生活習慣病)学会 東京 2011年1月15日
- 46) 岩坪威: アルツハイマー病: 分子病態研究から予防・治療へ 第3回脳プロ公開シンポジウム 未来を拓く脳科学研究 東京 2011年2月5日
- 47) Iwatsubo T: Molecular pathology and disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. AAN-JSN joint symposium at the 52<sup>nd</sup> Japanese Society for Neurology meeting. May 18, 2011, Nagoya
- 48) Iwatsubo T: Neuropathology of Alzheimer's disease and omics sciences. The 52<sup>nd</sup> annual meeting of the Japanese Neuropathological Society. June 4, 2011, Kyoto

- 49) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapies. The 34<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Neuroscience Society Sep 17, 2011 Yokohama
- 50) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapy. MPS-UT Joint Symposium "Neuroscience". Oct 29, 2011 Tokyo
- 51) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapy. International Symposium for 70<sup>th</sup> anniversary of IDAC, Tohoku University Nov 28, 2011 Sendai
- 52) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapy. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium. Dec 1, 2011 Tokyo
- 53) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modification. APRU-BMAP 2012/FIRST 2012 Symposia. August 31, 2012, Tokyo
- 54) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼ活性制御機構の理解に基づいたアルツハイマー病治療薬開発 2012年5月22日 第53回日本神経学会学術集会 東京
- 55) 富田泰輔: 認知症への先制医療: アミロイド蓄積をいつ、どのように防ぐか 2012年9月29日 第34回日本生物学的精神医学会学術集会 神戸
- 56) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼの構造活性相関 2012年10月4日 第三回神経科学と構造生物学の融合研究会 大阪
- 57) Taisuke Tomita: Activity dependent membrane protein processing and AD. October 7, 2012, Workshop on Alzheimer's disease and related disorders. Taipei, Taiwan.
- 58) 富田泰輔:  $\gamma$  セクレターゼ抑制薬 2012年10月28日 第31回日本認知症学会学術集会 つくば
- 59) 富田泰輔: アルツハイマー病の先制医療開発に向けた  $A\beta$  代謝システムの理解 2012年11月27日 第30回神経治療学会総会 小倉
- 60) Taisuke Tomita: Development of pre-emptive medicine for Alzheimer disease based on molecular basis of  $A\beta$  production. December 6, The 17th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. Osaka, Japan
- 61) Taisuke Tomita, Kunimichi Suzuki, Takeshi Iwatsubo: Activity-dependent proteolytic cleavage of Neuroligin 1. December 13, 2012, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Fukuoka, Japan.

② 口頭発表 (国内会議4件、国際会議16件)

- 1) Tomita T, Hayashi I, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T: Neutralization of the  $\gamma$ -secretase activity by antibody against extracellular domain of nicastrin. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 2007, San Diego
- 2) Tomita T:  $\gamma$ -secretase: intramembrane proteolysis for signaling and neurodegeneration. October 2007, 1st Dependence Receptor Meeting and 10th Neuroblastoma Research Meeting, Tokyo
- 3) Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Fujii H, Okuno H, Bito H. Differential control of cortical axonogenesis and dendritogenesis by alternate activation of CaMKII $\alpha$  and  $\gamma$ . Soc. Neurosci. Abstr. 114.3, 2007. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA.
- 4) Okuno H, Naruse H, Kawashima T, Fujii H, Nonaka M, Chowdhury S., Worley P, Bito H. Synaptic targeting of Arc via high affinity interaction with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II beta. Soc. Neurosci. Abstr. 221.3. 第37回北米神経科学学会年会、2007.11.3-11.7, San Diego, USA.
- 5) Taisuke Tomita, Chihiro Sato, Shizuka Takagi, Takeshi Iwatsubo: C-terminal PAL motif of presenilin 1 comprises the subsite of gamma-secretase within the catalytic pore. International Conference on Alzheimer's Disease 2008 July 26-31, 2008 Chicago, USA

- 6) Tomita T, Sato C, Takagi S, Iwatsubo R: Both the N- and C-terminal fragments of Presenilin 1 participate in the formation of the catalytic pore in  $\gamma$ -secretase. Society for Neuroscience 38<sup>th</sup> Annual Meeting. November 2008, Washington DC
  - 7) Tomita T, Isshiki H, Takasugi N, Shinohara M, Suzuki K, Iwatsubo T: Identification and analysis of a substrate-specific genetic modulator for the  $\gamma$ -secretase activity. 2009 International Conference on Molecular Neurodegeneration. May 18-20, 2009, Xiamen, China
  - 8) Tomita T, Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T: Single chain variable fragment against Nicastrin inhibits the  $\gamma$ -secretase activity. International Conference on Alzheimer's disease 2009. July 11-16, 2009, Vienna, Austria
  - 9) Tomita T, Imamura Y, Watanabe N, Iwatsubo T, Kato N, Umezawa N, Higuchi T: Helical beta-peptide foldamers specifically inhibit the  $\gamma$ -secretase activity. Society for Neuroscience 39<sup>th</sup> Annual Meeting. October 17-21, 2009, Chicago
  - 10) 高杉展正、佐々木朝輝、鈴木邦道、富田泰輔、岩坪威: スフィンゴシンキナーゼによる神経特異的な $\beta$ セクレターゼ活性制御機構の解析 2009年10月24日 第82回日本生化学大会 神戸
  - 11) 竹尾浩史、渡邊直登、富田泰輔、岩坪威:  $\gamma$ セクレターゼ活性中心ポア構造の形成機構の関する解析 2009年11月20日 第28回日本認知症学会 仙台
  - 12) 鈴木邦道、林ゆかり、富田泰輔、岩坪威: 新規 $\gamma$ セクレターゼ基質としてのNeuroiginの同定およびその解析 2009年11月20日 第28回日本認知症学会 仙台
  - 13) 岩坪威: 分子生物学的方法と神経病理学 第51回日本神経病理学会シンポジウム「神経病理の更なる発展に向けて」東京 2010年4月24日
  - 14) Iwatsubo T: Molecular pathology of amyloid  $\beta$  peptides in Alzheimer's disease. XVII<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology. Salzburg Sep 13, 2010,
  - 15) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapy. Workshop on Alzheimer's disease and related disorders. Fidelity Biosciences Research Initiative. Hangzhou China October 17, 2010
  - 16) Iwatsubo T: Alzheimer's disease: from molecular pathology to disease-modifying therapy. Focusing on  $\gamma$ -secretase. The 10<sup>th</sup> International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. Barcelona March 11, 2011
  - 17) T. TOMITA, Y. OHKI, S. YOKOSHIMA, T. HIGO, N. SHIMADA, H. KOIZUMI, S. OSAWA, T. FUKUYAMA, T. IWATSUBO: Structure and function relationship analysis of  $\gamma$ -secretase modulator GSM-1. SFN 40<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
  - 18) G. ITO, T. IWATSUBO Biochemical characterization of the dimerization of LRRK2. SFN 40<sup>th</sup> Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
  - 19) Hayato Isshiki, Yuta Yamashita, Tomoyuki Ishiwata, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Identification and functional analysis of a genetic regulator for the trafficking of  $\gamma$ -secretase substrate. 2011年11月14-15日 第6回日本Notch研究会 野田
  - 20) Taisuke Tomita: Notch-Notch ligand interactions modulate the levels of synaptic vesicle proteins in neurons. The Notch Meeting. October 2-6, 2011, Athens, Greece
- ③ポスター発表 (国内会議 17件、国際会議 35件)
- 1) Miyashita H, Ogura T, Kazuhiro M, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Three dimensional structure of the reconstituted  $\gamma$ -secretase complex. Society for Neuroscience 37<sup>th</sup> Annual Meeting. November 2007, San Diego
  - 2) Takasugi N, Isshiki H, Tomita T, Iwatsubo T: Sphingosine kinase inhibitor diminishes the amyloid beta production through the inhibition of  $\gamma$ -secretase activity. Society for Neuroscience 37<sup>th</sup> Annual Meeting. November 2007, San Diego

- 3) Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: Structural analysis of C-terminal fragment of Presenilin 1 by substituted cysteine accessibility method. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 2007, San Diego
- 4) Isoo N, Sato C, Miyashita H, Takasugi N, Tsuji S, Tomita T, Iwatsubo T: A $\square$ 42 overproduction associated with structural changes in the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase. Society for Neuroscience 37th Annual Meeting. November 2007, San Diego
- 5) Taisuke Tomita:  $\gamma$ -Secretase: intramembrane proteolysis for signaling and neurodegeneration. October 2007, 1st Dependence Receptor Meeting and 10th Neuroblastoma Research Meeting, Tokyo, Japan.
- 6) Tomita T, Hayashi I, Takatori S, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T: Functional antibody strategies for the regulation of  $\gamma$ -secretase activity. Keystone symposia: Alzheimer's Disease (C7). March 2008, Keystone
- 7) Hayashi Y, Tomita T, Kopan R, Iwatsubo T: The role of Notch signaling in synaptogenesis. 2008年7月 第31回日本神経科学大会 横浜
- 8) Yukiko Hori, Tadafumi Hashimoto, Hidetoshi Nomoto, Takeshi Iwatsubo: Isoform-specific effects of apolipoprotein E on the stability of Abeta protofibrils. Posters P1. Sunday Posters (P1-478) International Conference on Alzheimer's Disease 2008 July 26-31, 2008 Chicago, USA
- 9) Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: The functional roles of transmembrane domains of presenilin 1 in the formation of active  $\gamma$ -secretase complex. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago
- 10) Sugimoto Y, Fuwa H, Yokoshima S, Fukuyama T, Sasaki M, Tomita T, Iwatsubo T: Chemical biological analysis of  $\gamma$ -secretase using arylsulfonamide-type inhibitors. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago
- 11) Takasugi N, Suzuki K, Isshiki H, Tomita T, Iwatsubo T: Neuron-specific regulation of  $\beta$ -secretase activity by sphingosine kinase. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago
- 12) Takagi S, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Transmembrane domain 1 of presenilin 1 contributes to the formation of the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago
- 13) 長江 裕亮ら 脳A $\beta$ クリアランスにおけるLRP1の役割: 条件的ノックアウトマウスを用いた検討、第27回日本認知症学会 2008年10月10日 前橋
- 14) Hayashi Y, Tomita T, Kopan R, Iwatsubo T: Notch ligands expressed in nonneuronal cells increase synaptic vesicle proteins in glutamatergic neurons. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 2008, Washington DC
- 15) Isshiki H, Takasugi N, Suzuki K, Tomita T, Iwatsubo T: Identification and analysis of a substrate-specific genetic modulator for  $\gamma$ -secretase activity. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 2008, Washington DC
- 16) 佐々木朝樹、高杉展正、大沢智子、富田泰輔、岩坪威: APP分子内に存在する新規 $\gamma$ -secretase活性制御領域の同定と解析 第29回日本認知症学会総会 名古屋 2010年11月5日~7日
- 17) 富田泰輔、大木優、横島聡、肥後拓也、島田尚明、小泉一二三、大沢智子、福山透、岩坪威:  $\gamma$ セクレターゼモジュレーターGSM-1はプレセニリンN末端断片を標的とする 第29回日本認知症学会総会 名古屋 2010年11月5日~7日
- 18) 富永綾、高木穂香、富田泰輔、岩坪威:  $\gamma$ -secretase活性中心サブユニット Presenilin 1の第4膜貫通領域の構造解析 第29回日本認知症学会総会 名古屋 2010年11月5日~7日
- 19) 福田磨育子、高鳥翔、林幾雄、大沢智子、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: 抗ニカストリン一本鎖抗体の性状解析 第29回日本認知症学会総会 名古屋 2010年11月5日~7日
- 20) 豊川佳祐、渡邊直登、大沢智子、富田泰輔、岩坪威: Presenilin単独での $\gamma$ セクレターゼ活性の再構成の試み 第29回日本認知症学会総会 名古屋 2010年11月5日~7日

- 21) T. TANAKA, T. HASHIMOTO, T. SATO, A. HARADA, D. FUJII, T. WAKABAYASHI, T. IWATSUBO: CLAC-P/Collagen XXV is essential to the survival of motor neurons during development. SFN 40th Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
- 22) R. IHARA, T. HASHIMOTO, Y. NAGATA, T. WAKABAYASHI, H. TANAKA, Y. HORI, S. TSUJI, E. KURANAGA, M. MIURA, T. IWATSUBO: RNA binding mediates neurotoxicity in the Drosophila transgenic model of TDP-43 proteinopathy. SFN 40th Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
- 23) H. KUNUGI, G. ITO, T. IWATSUBO: Rotenone treatment enhances apoptosis caused by G2019S familial Parkinson mutant LRRK2. SFN 40th Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
- 24) K. TAKEO, N. WATANABE, T. TOMITA, T. IWATSUBO: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. SFN 40th Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
- 25) Y. OHKI, S. YOKOSHIMA, T. HIGO, N. SHIMADA, H. KOIZUMI, S. OSAWA, T. FUKUYAMA, T. TOMITA, T. IWATSUBO:  $\gamma$ -Secretase modulator GSM-1 directly targets the N-terminal fragment of presenilin 1. SFN 40th Annual Meeting. San Diego, November 13-17, 2010
- 26) Sho Takatori, Ikuo Hayashi, Takeshi Kawamura, Tatsuhiko Kodama, Takao Hamakubo, Takeshi Iwatsubo, Taisuke Tomita:  $\gamma$ -Secretase interacting tetraspanin protein CD81 is involved in the internalization of the  $\gamma$ -secretase and its substrates to the endocytic compartment. 2011年6月28日~7月1日 第30回内藤カンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学[II]脂質ドメイン、脂肪滴、疾患 札幌
- 27) Kunihiro Kanatsu, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: The role of phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (PICALM) in the metabolism of amyloid precursor protein. 2011年6月28日~7月1日 第30回内藤カンファレンス 生体膜ダイナミクスと脂質生物学[II]脂質ドメイン、脂肪滴、疾患 札幌
- 28)大木優、肥後拓也、島田尚明、大沢智子、福山透、横島聡、富田泰輔、岩坪威:  $\gamma$  セクレターゼモジュレーターGSM-1のアミロイドペプチド切断調節機構の解析 2011年11月11日-13日 第30回 日本認知症学会学術集会 東京
- 29)山下雄大、一色隼人、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: Notch の  $\gamma$  セクレターゼ切断を制御する XPR1 の機能解析 2011年11月11日-13日 第30回 日本認知症学会学術集会 東京
- 30)一色隼人、山下雄大、石渡智之、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: Identification and functional analysis of a genetic regulator for  $\gamma$ -secretase substrate trafficking. 2011年11月11日-13日 第30回 日本認知症学会学術集会 東京
- 31)竹尾浩史、谷村瞬、ザハリエブイヴァンクラスイミロブ、横島聡、福山透、富田泰輔、岩坪威: 光親和性標識を用いたフェニルイミダゾール型  $\gamma$  セクレターゼモジュレーターの作用標的分子の同定 2011年11月11日-13日 第30回 日本認知症学会学術集会 東京
- 32)石渡智之、一色隼人、桑原知樹、諸橋雄一、三谷昌平、富田泰輔、岩坪威: Functional analyses of *sft-4* in the *C. elegans* Notch pathway. 2011年11月11日-13日 第30回 日本認知症学会学術集会 東京
- 33)Kunihiro Kanatsu, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo : PICALM regulates the endocytosis of  $\gamma$ -secretase. 2011年11月14-15日 第6回日本 Notch 研究会 野田
- 34)Koji Takeo, Shun Tanimura, Ivan Krasimirov Zahariev, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Molecular target of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. 2011年11月14-15日 第6回日本 Notch 研究会 野田
- 35)Tomoyuki Ishiwata, Hayato Isshiki, Tomoki Kuwahara, Yuichi Morohashi, Shohei Mitani, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Functional analysis of *sft-4* in the *C. elegans* Notch pathway. 2011年11月14-15日 第6回日本 Notch 研究会 野田
- 36)今村優希、大沢智子、梅澤直樹、富田泰輔、岩坪威、加藤信樹、樋口恒彦: ガンマセクレター

ゼ阻害フォルダマーの構造活性相関研究 2012年3月28-31日 日本薬学会 第132年会  
札幌

- 37) Tomoki Sasaki, Nobumasa Takasugi, Satoko Osawa, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Functional analysis of a novel domain modulating  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage within amyloid precursor protein. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
- 38) Shizuka Takagi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: The monoclonal antibody targeting the juxtamembrane region of TMD1 of Presenilin 1 decreases the  $\gamma$ -secretase activity. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
- 39) Taisuke Tomita, Shizuka Takagi, Takeshi Iwatsubo: The  $\alpha$ -helical structure of the hydrophilic loop1 of presenilin 1 contributes to the formation of the substrate binding site. Gordon Research Conference on Regulated Proteolysis of Cell Surface Proteins. July 10-15. 2011, Davidson College, Davidson, NC
- 40) Taisuke Tomita, Nobumasa Takasugi, Tomoki Sasaki, Satoko Osawa, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Virginia Lee, John Trojanowski, Takeshi Iwatsubo: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. The Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) 2011, July 16-21, 2011, Paris, France
- 41) Kunimichi Suzuki, Yukari Hayashi, Soichiro Nakahara, Ryuta Koyama, Norio Matsuki, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Proteolytic processing of neuroligin 1 modulates its spinogenic function. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
- 42) Aya Tominaga, Shizuka Takagi, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Structural analysis of transmembrane domain 4 of Presenilin 1, a catalytic subunit of  $\gamma$ -secretase. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
- 43) Yuichi Morohashi, Kunihiko Kanatsu, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: PICALM impacts the production and secretion of A $\beta$ 42 in cultured cells. Neuroscience 2011. November 12-16, 2011, Washington DC
- 44) Taisuke Tomita, Yuichi Morohashi, Kunihiko Kanatsu, Takeshi Iwatsubo: PICALM regulates A $\beta$ 42 production by modulation of  $\gamma$ -secretase trafficking. AAIC2012. July 16, 2012, Vancouver, Canada
- 45) Taisuke Tomita, Shizuka Takagi-Niidome, Takeshi Iwatsubo: The  $\alpha$ -helical structure of the hydrophilic loop1 of presenilin 1 contributes to the formation of the substrate binding site. Neuroscience 2012. October 15, 2012, New Orleans
- 46) Toji Miyagawa, Yuichi Morohashi, Shoji Tsuji, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: BIN1 negatively modulates A $\beta$  production from cultured cells. Neuroscience 2012. October 15, 2012, New Orleans
- 47) Taisuke Tomita, Shizuka Takagi-Niidome, Tomoki Sasaki, Takeshi Iwatsubo: Hydrophilic loop 1 and the C terminus of presenilin 1 are involved in the initial substrate binding of the  $\gamma$ -secretase. March 6-10, 2013, AD/PD 2013, Florence, Italy
- 48) Koji Takeo, Shun Tanimura, Ivan Krasmirov Zahariev, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. March 6-10, 2013, AD/PD 2013, Florence, Italy
- 49) 富永綾、富田泰輔、岩坪威:  $\gamma$ -secretase 活性中心サブユニット Presenilin1 の第4膜貫領域の構造解析 2012年10月26日第31回日本認知症学会学術集会 つくば
- 50) 金津邦彦、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: PICALM がアルツハイマー病の病態形成に寄与する分子機構の解明 2012年10月26日第31回日本認知症学会学術集会 つくば
- 51) 福島正哉、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: 低分子量Gタンパク質 Rab2A、Rab30によるA $\beta$ 産生・分泌調節機構の解析 2012年10月26日第31回日本認知症学会学術集会 つくば

- 52) 高杉展正、佐々木朝樹、富田泰輔、岩坪威:スフィンゴ脂質類似化合物 FTY720 及び KRP203 によるアミロイド  $\beta$  産生制御機構の解析 2013 年 3 月 21 日 第 86 回日本薬理学会年会 福岡

(4)知財出願

国内出願 (1 件)

1. 「 $\gamma$  セクレターゼ活性調節因子」発明者:富田泰輔、岩坪威、高鳥翔、児玉龍彦ら  
出願年月日:平成 21 年 12 月 7 日 出願番号:特願 2009-277604

(5)受賞・報道等

①受賞

- 1) MetLife Foundation 2008 Award for Medical Research (岩坪威) CREST 研究の主題である  $\gamma$  セクレターゼ研究をはじめとするアルツハイマー病基礎研究に対して授与された。
- 2) Alzheimer's Association Henry Wisniewski Lifetime Achievement Award 2010(岩坪威)アルツハイマー病の基礎研究と治療薬開発へ向けての臨床橋渡し研究活動に対して授与された。
- 3) 2011 年 ベルツ賞(岩坪威、富田泰輔) アミロイド、 $\gamma$  セクレターゼの研究に対して授与された。
- 4) 2012 Potamkin Prize for Research in Pick's, Alzheimer's Disease and Related Diseases(岩坪威) CREST 研究の主題である  $\beta$  アミロイド、 $\gamma$  セクレターゼ研究による創薬への貢献に対して授与された。なお本賞を授与された日本人は 2 人目である。

②マスコミ(新聞・TV等)報道

- 1) アルツハイマー病研究ウェブページ「Alzforum」に、 $\gamma$  セクレターゼのシステインスクヤニングによる構造解析の成果が紹介された。  
<http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=1812> (2008.4.29)
- 2) 日経バイオテクオンラインに掲載 2009 年 9 月 10 日「東京大学、Elan 社、東北大学、アルツハイマー治療抗体が脳内に進入し、A $\beta$  多量体形成を抑えることを発見」
- 3) 記者会見「自閉症関連分子 Neuroigin の神経活動依存性代謝が神経細胞シナプス形成を制御する」平成 24 年 10 月 18 日(富田泰輔、岩坪威ら)Neuron 誌における発表についてプレスリリースを施行

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・本研究により作用機序を見出した非競合型 BACE1 阻害薬 TAK-070 につき、東京大学医学部附属病院「早期・探索的臨床試験拠点整備事業」においてヒト臨床試験を開始。
- ・ $\gamma$  セクレターゼ修飾薬の作用機序解析につき、複数の製薬企業と共同研究を展開中

②社会還元的な展開活動

- ・ $\gamma$  セクレターゼ阻害作用を有する抗ニカストリン抗体はアカデミックで広く頒布し研究に活用されている。
- ・SCAM などの構造生化学的研究手法の  $\gamma$  セクレターゼへの応用につき、内外の研究グループに研究手法を広く伝授した。



## §6 研究期間中の活動

### 6.1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2007.12.2	講演:アルツハイマー病根治薬の開発の現状	つくば国際会議場	200名	認知症の人と家族の会メンバーを中心に、一般の方にアルツハイマー病のメカニズムに即した創薬の現状につき解説した。
2008.2.7	講演:アルツハイマー病の分子病態と根本治療薬開発の現状(会員に公開)	米子市 県西部医師会館	60名	鳥取県の開業医師を中心に、アルツハイマー病の最新知見について講演した。
2009.6.5	高等学校における授業:アルツハイマー病の神経病理学(校内公開)	高松市立高松第一高等学校	120名	高校2,3年の理系生徒に対し、アルツハイマー病の基礎知識を解説した。
2009.8.6	東京大学オープンキャンパス 2009 高校生に対する模擬授業:アルツハイマー病への挑戦	東京大学	300名	東大オープンキャンパスに参加した約300名の高校生にアルツハイマー病について解説した。
2009.8.13	International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology (研究者向け公開,CREST協賛)	東京医科大学	60名	本CREST研究で国際共同研究中のワシントン大学 Cirrito 助教授をはじめ8名の内外の著名な研究者による講演、討論を行った。
2009.11.29	認知症市民講演会 アルツハイマー病治療の未来	高松国際会議場	150名	高松市の一般市民に対し、アルツハイマー病研究と治療薬開発の現状につき解説
2010.9.21	フォーラム認知症 in さいたま アルツハイマー病の薬～現在そして未来へ～	大宮ソニックシティ	1000名	NHK エジュケーションナルの企画した市民講演会で、アルツハイマー病研究と治療薬開発の現状と問題点につき解説した。
2012.9.15	アルツハイマー病はどこまでわかり、どのような治療戦略が開発されつつあるのか	名古屋	300名	第35回日本神経科学大会市民公開講座 脳とこころの健康科学において解説を行った。

## §7 結び

本研究により、アルツハイマー病における $\beta$ アミロイドの産生、代謝機構と、それらを標的とする治療法の原理を多岐にわたって解明し、一部は臨床応用にも繋げることができ、所期の目的を十分に達成することができたと考えております。6年間にわたるご指導に深く感謝するとともに、実用化に向けて、さらなるご支援を期待いたしております。

