

200821069A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病の根本的治療薬開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病の根本的治療薬開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 21 (2009) 年 3 月

目次

I.	総括研究報告	
	アルツハイマー病の根本的治療薬開発に関する研究—————	1
	道川 誠	
II.	分担研究報告	
	(ア)脳内脂質代謝調節によるアルツハイマー病予防・治療薬の開発————	15
	道川 誠	
	(イ)A β 分解酵素活性調節によるアルツハイマー病治療薬の開発————	21
	西道隆臣	
	(ウ)A β オリゴマー抗体療法の開発—————	25
	松原悦朗	
	(エ)A β 産生調節薬によるアルツハイマー病治療薬の開発—————	28
	富田泰輔	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

I. 総括研究報告
(平成 20 年度)

アルツハイマー病の根本的治療薬
開発に関する研究

研究代表者 道川誠

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

研究代表者: 道川 誠 国立長寿医療センター研究所・
アルツハイマー病研究部部長

研究要旨

道川:(1)危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 産生を調節する薬剤探索を行い、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに6種類の漢方薬を同定した。(2)予備実験で、脂肪酸を含む餌が脳内 $A\beta$ 沈着を強く抑制することを発見した。臨床応用(経口摂取)への基盤を確立する(予防法開発)ために、本年度は、分子メカニズムとして、炎症性サイトカインの産生抑制作用があることを明らかにした。目標(3):ACE の活性制御による AD 予防法開発の基盤情報を得ることを目標に、本年度は、ACE-Ko と APP-Tg マウスの交配マウス脳を解析し、ACE-Ko マウス脳では $A\beta$ 沈着が増強することを示すデータを得た。

西道:ヒト脳では加齢に伴う $A\beta$ 分解酵素ネプリライシン(NEP)の発現・活性の低下が $A\beta$ 蓄積の原因の一つと考えられる。そこで、NEP をノックアウトした NEP-KO マウスを APP-Tg と交配し、NEP が N 末端が2残基欠落し3位のグルタミン酸がピログルタミン酸(pE)に変化した $A\beta$ 3(pE)-42 形成に関与するか否かについて検討した。その結果、APP-Tg と比較して、APP-Tg X NEP-KO では $A\beta$ 3(pE)-42 の蓄積が顕著に増加した。また、グルタミン酸を環化してピログルタミン酸を形成する酵素グルタミルサイクラーゼの発現量がダブル Tg マウスで増加していた。以上のことから、NEP は $A\beta$ の定常量だけではなく、 $A\beta$ 3(pE)-42 生成にも関与することが明らかになった。

松原: $A\beta$ 重合体はアルツハイマー病の発症病態の分子基盤であるが、その神経変性誘導機序は不明である。本年度の研究から、 $A\beta$ 重合体の作用部位は後シナプスで、その特異的な受容体もしくは $A\beta$ 重合体自身がカルシウムチャンネルを形成し、神経変性を惹起している可能性を明らかとした。この可能性を in vivo で検証するための新規 $A\beta$ 重合体も再度取得に成功し、来年度以降の準備を完了することができた。

富田: β および γ セクレターゼは、脳における $A\beta$ 産生を担う酵素であり、その活性の特異的制御は AD の根本治療法となることが期待されている。本年度は、特許情報およびオリジナル低分子化合物ライブラリーより Notch シグナル遮断による副作用を回避する可能性を持つ複数の γ セクレターゼモジュレーターの開発に成功し、これら化合物の構造活性相関を解析した。また一部の化合物についてはトランスジェニック動物投与実験を開始した。一方両セクレターゼが膜結合型プロテアーゼであることに注目してその酵素活性と膜脂質との関連を解明し、「脂質環境の変化によるセクレターゼ活性制御」という新たなコンセプトに基づいた創薬標的候補分子群を同定と活性制御法の開発を行った。特に本年度の研究結果として、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)の合成酵素である Sphingosine kinase (Sphk)阻害剤が神経細胞特異的に $A\beta$ 産生を特異的に抑制することを明らかにし、その作用点の検証と分子機構に基づく Sphk 阻害剤の開発を目指して研究を遂行した。

研究目的: (道川)アルツハイマー病(AD)はアミロイドβ蛋白(Aβ)の産生、凝集・沈着の増加を原因とする神経変性疾患である。従って、その根本的治療薬開発には Aβ 代謝系を標的にした介入が有効である。本研究班は、Aβ 代謝系における複数の標的(Aβ の産生・分解・重合への介入、HDL 療法の確立)の攻略を目的とする。研究終了時までには前臨床試験を終了し、AD 病理・認知機能に対する新規治療薬の有効性を確認するとともに、5年後の治験実施、10年後の実用化への基盤成果を得ることを目指す。研究班の研究を分担する道川は、コレステロール代謝変動がタウオパチーを誘導すること、ApoE による脳内 HDL 産生に ApoE3>ApoE4 の違いがあることを見出し、(i)危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 療法の概念を創出した(独創性)。ABC 蛋白質の発現・機能調節によって HDL 産生を調節する薬剤探索を行い、期間内に前臨床試験を終了させる。また、コレステロール以外にスフィンゴ脂質が Aβ 産生を制御することを発見した(*J Biol Chem*,2004)が、最近(ii)ある脂肪酸を含む餌が脳内 Aβ 沈着を強く抑制することを発見した。期間内にこの脂肪酸による Aβ 沈着抑制の分子機構解明を行い、臨床応用(経口摂取)への基盤を確立する(予防法開発として独創的)。(iii) ACE の Aβ42 を Aβ40 に変換する作用(*J Neurosci*, 2007)については、期間内に Aβ 変換作用の調節法を確立する。(西道)アルツハイマー病患者の脳に大量に蓄積する Aβ3(pE)-42 の生成機構が不明である。APP-Tg マウスにおいて、Aβ3(pE)-42 の生成と蓄積に Aβ 分解酵素 NEP がどのように関与するかについて明らかにすることを目的とした。(松原)本研究では、Aβ重合体の神経

変性制御機構メカニズム解明を目指す。本年度は、具体的に以下の2点について解明を進めた。1)予防的治療効果を発揮した Aβ重合体の効果発現機序をモデル動物脳と神経変性をきたすモデル動物脳から取得した培養神経細胞で検討した。2)当初使用予定であったモノクローナル抗体産生ハイブリドーマから、原因不明ながら抗体産生が認められぬ自体となり、新規 Aβ重合体抗体を作製した。(富田)本研究では、セクレターゼ活性阻害による脳内 Aβ量の制御により、副作用のないアルツハイマー病の予防・治療法の確立を目指す。本年度は、具体的に以下の2点について解明を進めた。1)γセクレターゼモジュレーターと同定と構造活性相関解析、2)S1Pによるβセクレターゼ活性の制御機構解明

B. 研究方法

(道川) (1)HDL療法(治療薬開発): 薬剤ライブラリーを用いて ABCA1・ABCG1 発現・機能増強を誘導する薬剤を探索した。(2)脂肪酸組成を変えた餌による AD発症予防法開発: 再確認の動物実験を継続する。細胞膜の脂肪酸変化が Aβ産生、分解のどこに影響するかを細胞レベルで確定した。(3)ACEによる Aβ分解機構の解明: ACEノックアウトマウスにおける Aβ沈着増加を検証する。すなわち、APPswe/ACE^{-/-}、APPswe/ACE WTマウスの作製: ACE^{-/-}マウスを Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) から購入し、APPswe マウスと交配し、APPswe/ACE^{-/-}、APPswe/ACE WTマウスを作製し、それぞれのマウス脳切片を Thioflavin-S 染色し、Thioflavin-S 陽性アミロイド斑を蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50) 上で観察

しカウントした。

また、マウス脳切片を抗 A β 40、A β 42 抗体で免疫染色した。さらに、各マウス脳の大脳皮質および海馬の A β を ELISA 法によって定量した。

(西道) APP-Tg マウスと NEP-KO マウスを交配し、神経病理学的・生化学的表現型を解析した。

(松原) 1) A β 重合体抗体予防治療マウス脳を免疫組織科学的に検証し、交代作用発現機序を検討した。また、神経変性をきたすアルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg)の初代培養神経細胞で、A β 重合体の毒性発現機序・抗体での中和効果発現機序を解析した。

2) 予防治療効果を発現した抗体取得方法に準じて、新規 A β 重合体抗体を作製した。

(富田) 1) 特許情報を元に作出された各種化合物や有機化学研究者らによって作出されたオリジナルライブラリーに含まれる化合物の β セクレターゼ活性制御効果について、培養細胞および *in vitro* アッセイ系を用いて検討した。

2) S1P 代謝経路に関わる遺伝子群の過剰発現およびノックダウンが β セクレターゼ活性に与える影響について培養神経細胞を用いて検討すると同時に、*in vitro* アッセイ系を用いて Sphk 阻害剤の作用点を検証した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。動物実験については、国際医科学評議会 (CIOMS) によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」などの動物福祉の基本原則と、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、
「厚生労働省大臣官房厚生科学課長

通知における基本指針」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来試料を用いる実験においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの法令等を遵守して研究を行った。

C. 研究結果と D. 考察

全体計画 (1): 危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 産生を調節する薬剤探索を完了させ、期間内に前臨床試験を終了させる。進捗状況 (1): H20 年度の計画通り、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに 6 種類の漢方薬を同定した (計画の達成率 100%)。当該年度に、構造解析などを行って類縁構造の薬物サーチからリード化合物を同定し、動物モデルへの投与を開始する。

計画 (2): 予備実験で、脂肪酸を含む餌が脳内 A β 沈着を強く抑制することを発見したが、3 年以内にこの脂肪酸による A β 沈着抑制の分子機構解明を行い、臨床応用 (経口摂取) への基盤を確立する (予防法開発)。進捗状況

(2): H20 年度の計画通り、脂肪酸構成比を変えた餌で APP トランスジェニックマウス (Tg) の長期飼育 (17 ヶ月) を行った (計画通り)。更に分子メカニズムとして、炎症性サイトカインの産生抑制作用があることを明らかにした (達成率 90%)。当該年度は、長期飼育モデルマウスの行動認知試験ならびに病理学的検討を行い、脂肪酸経口投与の有効性を明らかにする。

計画 (3): ACE の活性制御による AD 予防法開発の基盤情報を得る。進

捗状況(3): H20年度は、計画通り ACE-Koと APP-Tg マウスの交配マウス脳を解析し、ACE-Ko マウス脳では A β 沈着が増強することを示すデータを得た(達成率 90%)。すなわち、APPswe/ACE^{-/-} マウスでは、血清中の ACE 活性は有意に低下していたが、大脳新皮質における ACE 活性は統計学的有意差が見られなかったものの低下傾向を示した。次に、これらマウス群の脳内 A β 沈着を定量するため、Thioflavin-S 染色法によるアミロイド斑定量、A β 40、A β 42 断端特異的抗体を用いた免疫染色法による A β 沈着斑の定量、サンドイッチ ELISA 法による解析を行った。APPswe/ACE^{-/-} マウスでは、APPswe/ACE WT マウスと比較して、Thioflavin-S 染色、A β 40、A β 42 免疫染色、A β 40、A β 42 サンドイッチ ELISA いずれの実験系においても A β 沈着量が増加する傾向を示したが、統計学的有意差には至らなかった。当該年度は、更に ACE-Tg;APP-Tg マウス脳を解析し、ACE 活性の増減がアルツハイマー病病理に及ぼす作用の全貌を明らかにする。

E. 結論

(道川) (1)HDL 療法(治療薬開発): 薬剤ライブラリーを用いて ABCA1・ABCG1 発現・機能増強を誘導する薬剤を探索した。その結果、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに 6 種類の漢方薬を同定した。

(2)脂肪酸組成を変えた餌による AD 発症予防法開発では、細胞膜の脂肪酸変化が炎症性サイトカインの発現調節に影響することを細胞レベルで明らかにした。

(3) ACE 阻害薬服用は、AD モデルマウス脳における A β 沈着を増加させ、

ACE ノックアウトマウス(ヘテロ)では、A β の脳内蓄積を増加させる傾向が示された。これらの結果は、ACE 活性の増減が A β 代謝に影響することを示している。高血圧は高齢者において頻繁にみられる症状であり、本研究の知見は高齢者における AD のリスクファクターを考える上で重要な示唆を与える。

(西道) APP-Tg と比較して、APP-Tg X NEP-KO では A β 3(pE)-42 の蓄積が顕著に増加した。これは、質量分析でも確認した。また、グルタミン酸を環化してピルグルタミン酸を形成するグルタミルサイクラーゼの発現量がダブル Tg マウスで増加していた。以上のことから、NEP は A β の定常量だけではなく、A β 3(pE)-42 生成にも関与することが明らかになった。

(松原) ①抗体投与動物脳では後シナプスの指標であるドレブリンの有意な保存効果が蛋白解析で明らかとなり、抗体の作用発揮部位は後シナプスのスパインである可能性が考えられた。また p75NTR-Sortilin 受容体発現が抗体非投与群で有意に増加していることから A β 重合体の受容体である可能性も考えられた。また抗体投与群脳では神経細胞内カルシウムシグナル系の活性化の抑制を認めた。3X-Tg では wild-type の初代培養神経細胞に比し、A β 重合体投与で細胞内カルシウム流入量が増加し細胞死が誘導されること、既存のカルシウムブロッカーではカルシウム流入抑制・細胞死抑制がかからぬが抗体ではその抑制がかかり、A β 重合体が既存のカルシウムチャンネルとは異なる新規のカルシウムチャンネルを形成し、その毒性を発揮している可能性が示唆された。

②A β 単量体を認識せず、重合体に特異

的な抗体クローンの取得に成功した。

(富田) ①Notch 切断を保ちながら A β 42 産生のみ、若しくは A β 40/42 産生を低下させる各種 γ セクレターゼモジュレーターを同定し、その構造活性相関からカルボン酸がモジュレーター能に重要であることを見出した。

②各種 S1P 産生・分解酵素の RNAi を行い、Sphk ではなく、最終産物である S1P そのものが β セクレターゼ活性のモジュレーターとして機能していることを見出した。この効果は神経細胞系に特異的であった。

③Sphk 阻害剤である SKI II がリコンビナント BACE を用いた *in vitro* アッセイでは β セクレターゼ切断を阻害しなかった。しかし SKI II 処理をした培養細胞では BACE 蛋白の量に変化がないにもかかわらず、その膜画分中の BACE 活性が低下していることが明らかとなり、BACE の TMD から細胞質内領域で S1P となんらかの直接的な機能的相互作用があることが示唆された。

E. 結論

(道川) (1)HDL 療法(治療薬開発): 薬剤ライブラリーを用いて ABCA1・ABCG1 発現・機能増強を誘導する薬剤を探索した。その結果、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに 6 種類の漢方薬を同定した。

(2)脂肪酸組成を変えた餌による AD 発症予防法開発では、細胞膜の脂肪酸変化が炎症性サイトカインの発現調節に影響することを細胞レベルで明らかにした。

(3) ACE 阻害薬服用は、AD モデルマウス脳における A β 沈着を増加させ、ACE ノックアウトマウス (ヘテロ)

では、A β の脳内蓄積を増加させる傾向が示された。これらの結果は、ACE 活性の増減が A β 代謝に影響することを示している。高血圧は高齢者において頻繁にみられる症状であり、本研究の知見は高齢者における AD のリスクファクターを考える上で重要な示唆を与える。

(西道) 加齢に伴う脳内 NEP 活性の低下は、病原性の高い A β 3(pE)-42 の蓄積の原因となることが示された。

(松原)

1) A β 重合体の神経変性誘導には複数の作用機序の存在が推測された。

2) *in vivo* での神経変性制御を可能とする A β 重合体に特異的な抗体クローンの取得に成功した。

(富田)

1) A β 42 産生を低下させる GSM はカルボン酸を介してその薬効を発揮している。

2) S1P は神経細胞において直接的に BACE と機能的に相互作用し、その活性を制御している。

3) 以上の結果から、Notch シグナルを保持したままの A β 産生低下を行うことが可能であること、さらに神経細胞特異的な脂質環境を利用したセクレターゼ活性制御システムの理解により、副作用の軽減された治療薬開発が見込めることを提案する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Minagawa K, Gong J-S, Jung C-G, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips M C, Saito H, Michikawa M. Mechanism underlying

apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture.

J Neurosci Res, in press.

Zou K, Maeda T, Michikawa M, Komano H.

New amyloid plaques or a game of hide-and- seek ?

Int J Biol Sci, 4:200-201, 2008.

Zou K, Hosono T, Nakamura T, Shiraishi H, Maeda T, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M. Novel role of presenilins in maturation and transport of integrin $\beta 1$.

Biochemistry 47(11): 3370-3378, 2008.

Zou K and Michikawa M

Angiotensin-converting enzyme as a potential target for treatment of Alzheimer's disease: Inhibition or activation?

Rev Neurosci, 19: 203-212, 2008.

Suzuki, T., Miyamoto, H., Nakahari, T., inoue, I., Suemoto, T., Jiang, B., Hirota, Y., Itohara, S., Saido, T.C., Tsumoto, T., Sawamoto, K., Hensh, T.K., Delgado-Escueta, A.V., Yamakawa, K. (2009) Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increase seizure susceptibility. **Hum. Mol. Ganet.**, in press

Nakazawa, T., Shimura, M., Mourin, R., Kondo, M., Yokokura, S., Saido, T.C., Nishida, L., Endo, S. (2009) Calpain-mediated degradation of G-substrate plays a critical role in retinal excitotoxicity for amacrine

cells, **J. Neurosci. Res.**, in press

Nakajima, R., Takao, K., Huang, S.-M., Takano, J., Iwata, N., Miyakawa, T., Saido, T.C. (2008). Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. **Mol. Brain**, 1(7), 1-15.

Cynis, H., Scheel, E., Saido, T.C., Schilling, S., Demuth, H.U. (2008). Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutamyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid- β . **Biochemistry**, 47, 7405-7413.

Wang, J., Ohno-Matsui, K., Yoshida, T., Kojima, A., Shimada, N., Nakahama, K., Safranova, O., Iwata, N., Saido, T.C., Mochizuki, M. & Morita, I. (2008). Altered function of factor I caused by amyloid β . Implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from drusen. **J. Immunol.**, 181, 712-720.

Vetrivel, K.S., Zhang, X., Meckler, X., Cheng, H., Lee, S., Gong, P., Lopes, K.O., Chen, Y., Iwata, N., Yin, K-J., Lee, J-M., Parent, A.T., Saido, T.C., Li, Y-M., Sisodia, S.S. & Thinakaran, G. (2008). Evidence that CD147 modulation of A β levels is mediated by extracellular degradation of secreted A β . **J. Biol. Chem.**, 283, 19489-19498.

Ikeda M, Kawarabayashi T, Harigaya

Y, Sasaki A, Yamada S, Matsubara E, Murakami T, Tanaka Y, Kurata T, Wuhua X, Ueda K, Kuribara H, Ikarashi Y, Nakazato Y, Okamoto K, Abe K, Shoji M. Motor impairment and aberrant production of neurochemicals in human alpha-synuclein A30P+A53T transgenic mice with alpha-synuclein pathology. **Brain Res.** 2009 Jan 23;1250:232-41.

Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E, Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Harigaya Y, Shoji M, Maeda S. Transthyretin accelerates vascular Abeta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. **Brain Pathol.** 2009 Jan;19(1):48-57.

Kumano K, Masuda S, Sata M, Saito T, Lee SY, Yanagimoto-Sakata M, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S: Both Notch1 and Notch2 contribute to the regulation of melanocyte stem cells. **Pigment Cell Research** 21:70-78, 2008

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 γ -secretase. **J Neurosci** 28:6264-6271, 2008

Cheung KH, Shineman D, Müller M, Cárdenas C, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM, Foscett JK: Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin

regulation of InsP(3) receptor channel gating. **Neuron** 58:871-883, 2008

Laras Y, Pietrancosta N, Tomita T, Iwatsubo T, Kraus JL: Synthesis and biological activity of N-substituted spiro[benzoxazepine-piperidine] A β -peptide production inhibitors. **J Enzyme Inhib Med Chem** 23:996-1001, 2008

Tomita T: Peptides inhibiting specific cleaving activities of presenilins. **Expert Opin Pat** 18:1097-1100, 2008

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 γ -secretase subunits nicastrin and APH-1. **J Biol Chem** 284:1373-1384, 2009

道川 誠
アルツハイマー病とスタチン
BioClinica 23 巻: 52-57, 2008 年

道川 誠、柳澤勝彦
アルツハイマー病—病態・治療と脂質—
BioClinica 23 巻: 33-29, 2008 年

道川 誠
Alzheimer 病研究の進歩と治療戦略
別冊・医学のあゆみ「老化と疾患」—
病態の理解と診断・治療の進歩
pp39-46, 2008 年

道川 誠
アポリポ蛋白 E

日本臨床66巻増刊号1:156-1162, 2008年

道川 誠
コレステロール代謝とアルツハイマー病
臨床検査 52巻3号:325-329, 2008

道川 誠
アルツハイマー病とスタチン
BioClinica 23巻: 52-57, 2008年

道川 誠、柳澤勝彦
アルツハイマー病—病態・治療と脂質—
BioClinica 23巻: 33-29, 2008年

道川 誠
アポリポ蛋白Eはアミロイド蛋白 β の分解を促進させる
Cognition and Dementia 7巻(4号): 58-59, 2008
2. 学会発表

道川 誠
アルツハイマー病の制圧を目指して—その臨床から予防・治療法開発の最前線まで
名市大薬友会 特別講演
2008年4月19日、名古屋市立大学薬学部水野会館

Michikawa M.
Cholesterol Metabolism in the Central Nervous System and Alzheimer's Disease.
Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference) 名古屋市立大学水野ホール、2008年2月23日、名古屋

道川 誠
アルツハイマー病研究の最前線と未来(財)中部科学技術センター主催「プロジェクト形成研究会E-アルツハイマー病の血液診断法の開発」第5回研究会 名古屋、平成20年1月24日、

道川 誠
アルツハイマー病の病態生理と治療戦略
名古屋市立大学大学院薬学研究科講義
2008年6月25日、名古屋市立大学薬学部

Minagawa H, Gong J-S, Lund-Katz S, Phillips M, Saito H, Michikawa M
Inhibitory effect of homocysteine on ApoE3-mediated cholesterol efflux from cultured astrocytes.
第51回日本神経化学会総会、2008年9月12日、富山

道川 誠
脂質代謝と神経変性疾患—その現状と未来への展望
育成セミナー講義 第51回日本神経化学会総会、2008年9月12日、富山

Minagawa H, Gong J-S, Lund-Katz S, Phillips M, Saito H, Michikawa M
ホモシステインはApoE3によるHDL産生を阻害する
第27回日本認知症学会、2008年10月10日、前橋

赤津裕康、小川倫弘、兼坂岳志、山本孝之、道川 誠
アルツハイマー病患者での血中A β とアンギオテンシン変換酵素活性相関

解析 第 27 回日本認知症学会、2008 年 10 月 10 日、前橋

Zou Kun, 細野 崇、中村俊行、白石博久、前田智司、駒野宏人、道川 誠
Presenilin regulates the maturation of membrane proteins in opposite directions. 第 27 回日本認知症学会、2008 年 10 月 10 日、前橋

道川 誠
A β 代謝における脂質の意義—Cholesterol paradox を紐解く—考察
第 27 回日本認知症学会、ワークショップ II、2008 年 10 月 11 日、前橋

源川博久、道川 誠
遺伝子多型で判断できるアルツハイマー病になりやすい人、なりにくい人
ゲノム広場 2008 in 名古屋 (主催: 文部科学省科学研究費 特定領域ゲノム 4 領域)
名古屋大学豊田講堂、2008 年 10 月 24-25 日、名古屋

道川 誠
アルツハイマー病の分子メカニズムと治療戦略
11 月 19 日、神経内科認知症研究会、名古屋

道川 誠
脳内コレステロール代謝調節によるアルツハイマー病の予防・治療法 (HDL 療法) 開発
11 月 28 日、代謝異常治療研究会、大阪

道川 誠
脳の老化とアルツハイマー病

2008 年 12 月 5 日、名古屋市立大学オープンカレッジ、名古屋

道川 誠
アルツハイマー病って何?
—その予防と治療法開発の最前線—
あいち健康長寿産業クラスター形成事業 国立長寿医療センター県民講座、2008 年 12 月 2 日、東浦町

Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T:
The functional roles of transmembrane domains of presenilin 1 in the formation of active γ -secretase complex. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago

Sugimoto Y, Fuwa H, Yokoshima S, Fukuyama T, Sasaki M, Tomita T, Iwatsubo T: Chemical biological analysis of γ -secretase using arylsulfonamide-type inhibitors. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago

Takasugi N, Suzuki K, Isshiki H, Tomita T, Iwatsubo T: Neuron-specific regulation of γ -secretase activity by sphingosine kinase. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago

Takagi S, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Transmembrane domain 1 of presenilin 1 contributes to the formation of the catalytic pore of γ -secretase. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July

2008, Chicago

Tomita T, Sato C, Takagi S, Iwatsubo T: C-terminal PAL motif of Presenilin 1 comprises the subsite of γ -secretase within the catalytic pore. International Conference on Alzheimer's disease 2008. July 2008, Chicago

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

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 γ -secretase. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 2008, Washington DC

Isshiki H, Takasugi N, Suzuki K, Tomita T, Iwatsubo T: Identification and analysis of a substrate-specific genetic modulator for γ -secretase activity. Society for Neuroscience 38th Annual Meeting. November 2008, Washington DC

富田泰輔:アルツハイマー病治療を目指した γ -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

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

Tomita T, Sato C, Takagi S, Iwatsubo T: The structure and function relationships of γ -secretase analyzed by SCAM. 2008年7月 第31回日本神経科学大会 横浜

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

富田泰輔:アルツハイマー病治療を目指した・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

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回日本神経化学学会大会

富田泰輔: γ セクレターゼモジュレーターによる $A\beta$ 産生制御機構 2008年10月11日 第27回日本認知症学会 前橋
西道 隆臣
千葉大学 MCS21 「タンパク質代謝異常とアルツハイマー病」.千葉. 2008年7月15日.

Iwata, N., Tsubuki, S., Higuchi, M., Saido, T.C. Pathological significance of $A\beta_{N3pE}$ accumulation in Alzheimer's disease. Neuroscience 2008 (第31回日本神経科学学会大会), Tokyo, 2008, 7

Suemoto, T., Saito, T., Takano, J.,

Matsuba, Y., Mihira, N., Nishimura, M., Iwata, N., Saido, T.C.

Accelerated A β plaque formation by low level expression of presenilin-1 with R278I mutation in knock-in mouse. Neuroscience 2008(第31回日本神経科学学会大会), Tokyo, 2008, 7

Nishida, Y., Ito, S., Iwata, N., Uchihara, T., Jishage, K., Ohtsuki, S., Saido, T.C., Terasaki, T., Mizusawa, H., Yokota, T., Oxidative stress increase A β accumulation by decreasing its efflux in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 2008(第31回日本神経科学学会大会), Tokyo, 2008, 7

Saido, T.C.

Mechanistic involvement of calpain-calpastatin system in Alzheimer pathology. ICAD2008/ International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, USA, 2008, 7.

Iwata, N., Tsubuki, S., Higuchi, M., Watanabe, K., Staufenbiel, M., Mann DMA, Saido, T.C.

Accumulation A β starting with proglutamate at position 3 in the brain and its impact on amyloid pathology of Alzheimer's disease. ICAD2008/ International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, USA, 2008, 7.

Saito, T., Iwata, N., Takano, J., Suemoto, T., Saido, T.C.

The 2nd generation mouse model for Alzheimer's disease. ICAD2008/

International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, USA, 2008, 7.

Suemoto, T., Saito, T., Takano, J., Matsuba, Y., Mihira, N., Nishimura, M., Iwata, N., Saido, T.C.

Accelerated A β plaque formation by low level expression of presenilin-1 with R278I mutation in knock-in mouse. ICAD2008/ International Conference on Alzheimer's Disease, Chicago, USA, 2008, 7.

Asai, M., Iwata, N., Saido, T.C., Maruyama, K.

Cathepsin B inhibitor CA-074Me cause the alteration of APP catabolism independently of secretase activities. 11th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Portoro, Slovenia, 2008, 8-9.

Saido, T.C.

Regulation of A β amyloidosis, tau phosphorylation, microgliosis and somatodendritic dystrophy by calpain-calpastatin system. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, 2008, 12.

Asai, M., Iwata, N., Saido, T.C., Maruyama, K.

Cathepsin B inhibitor CA-074Me cause the alteration of APP catabolism independently of secretase activities. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, 2008, 12.

立田 由里子、北爪 しのぶ、丸山 敬、西道 隆臣、谷口 直之。

血管内皮細胞由来の APP に存在するユニークな糖鎖解析。

BMB 2008(第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同大会), Kobe, 2008, 12

Sasai, K., Tabu, K., Saito, T., Matsuba, Y., Saido, T.C., Tanaka, S.

GLI1 but not FOXM1 induces oncogenic transformation of immortalized astrocytes.

BMB 2008(第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同大会), Kobe, 2008, 12

浅井 将、柳下 聡介、岩田 修永、西道 隆臣、石浦 章一、丸山 敬
カテプシン B 阻害剤 CA-074Me 処理によるアミロイド前駆体蛋白質の代謝機構の変化。

BMB 2008(第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同大会), Kobe, 2008, 12

Saido, T.C.

Metabolism of Amyloid® peptide and Alzheimer's disease.

ISNM 2009 & Asian Core Symposium, Okazaki, 2009, 2

松原悦朗, 瓦林毅, 東海林幹夫. アルツハイマー病の超早期バイオマーカー開発. 第 49 回日本神経学会総会. パシフィコ横浜. 2008 年 5 月 17 日

松原悦朗. アルツハイマー病の画期的創薬. アルツハイマー病における A β オリゴマー特異的受動免疫療法. 日本薬学会第 128 会: 2008 年 3 月 28 日: 横浜

松原 悦朗. アルツハイマー病治療の進歩. 2008 老年医学サマーセミナー. 軽井沢プリンスホテル. 2008, 7 月 31 日

松原悦朗. 神経毒性 A β オリゴマーはアルツハイマー病発症の分子基盤である. 文部科学省科学研究費補助金・特定領域研究「病態脳」5 領域 夏のワークショップ, 札幌. 2008, 8 月 9 日

松原悦朗. A β 蓄積とアルツハイマー病. アミロイド夏のワークショップ, 金沢, 2008, 8 月 21 日

松原悦朗. A β ワクチン療法 overview と複合作用機序支持派からみた A β ワクチン療法の展望: 第 27 回日本認知症学会シンポジウム I, 前橋. 2008, 10 月 10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

II 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

(分担)研究報告書

分担研究者: 道川 誠 国立長寿医療センター研究所・
アルツハイマー病研究部部長

研究要旨

三年間の目標(1): 危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 産生を調節する薬剤探索を完了させ、期間内に前臨床試験を終了させる事を目標に、本年度は、ほぼ計画通り、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに 6 種類の漢方薬を同定した。次年度に、構造解析などを行って類縁構造の薬物サーチからリード化合物を同定し、動物モデルへの投与を開始する。目標(2): 予備実験で、脂肪酸を含む餌が脳内 A β 沈着を強く抑制することを発見したが、3 年以内にこの脂肪酸による A β 沈着抑制の分子機構解明を行い、臨床応用(経口摂取)への基盤を確立する(予防法開発)。本年度は、脂肪酸構成比を変えた餌で APP トランスジェニックマウス(Tg)の長期飼育(17ヶ月)を行った。更に分子メカニズムとして、炎症性サイトカインの産生抑制作用があることを明らかにした。次年度は、長期飼育モデルマウスの行動認知試験ならびに病理学的検討を行い、脂肪酸経口投与の有効性を明らかにする。目標(3): ACE の活性制御による AD 予防法開発の基盤情報を得ることを目標に。本年度は、ACE-Ko と APP-Tg マウスの交配マウス脳を解析し、ACE-Ko マウス脳では A β 沈着が増強することを示すデータを得た。次年度は、更に ACE-Tg;APP-Tg マウス脳を解析し、ACE 活性の増減がアルツハイマー病病理に及ぼす作用の全貌を明らかにする。

A. 研究目的: アルツハイマー病(AD)はアミロイド β 蛋白(A β)の産生、凝集・沈着の増加を原因とする神経変性疾患である。従って、その根本的治療薬開発には A β 代謝系を標的にした介入が有効である。本研究班は、A β 代謝系における複数の標的(A β の産生・分解・重合への介入、HDL 療法の確立)の攻略を目的とする。研究終了時まで前臨床試験を終了し、AD 病理・認知機能に対する新規治療薬の有効性を確認するとともに、5 年後の治験実施、10 年後の実用化への基盤成

果を得ることを目指す。研究班の研究を分担する道川は、コレステロール代謝変動がタウオパチーを誘導すること、ApoE による脳内 HDL 産生に ApoE3>ApoE4 の違いがあることを見出し、(i)危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 療法の概念を創出した(独創性)。ABC 蛋白質の発現・機能調節によって HDL 産生を調節する薬剤探索を行い、期間内に前臨床試験を終了させる。また、コレステロール以外にスフィンゴ脂質が A β 産生を制御することを発見した(*J Biol Chem*,2004)が、

最近(ii)ある脂肪酸を含む餌が脳内 A β 沈着を強く抑制することを発見した。期間内にこの脂肪酸による A β 沈着抑制の分子機構解明を行い、臨床応用(経口摂取)への基盤を確立する(予防法開発として独創的)。(iii) ACE の A β 42 を A β 40 に変換する作用 (*J Neurosci*, 2007)については、期間内に A β 変換作用の調節法を確立する

B. 研究方法

(1)HDL 療法(治療薬開発):薬剤ライブラリーを用いて ABCA1・ABCG1 発現・機能増強を誘導する薬剤を探索した。

(2)脂肪酸組成を変えた餌による AD 発症予防法開発:再確認の動物実験を継続する。細胞膜の脂肪酸変化が A β 産生、分解のどこに影響するかを細胞レベルで確定した。

(3)ACE による A β 分解機構の解明: ACE ノックアウトマウスにおける A β 沈着増加を検証する。すなわち、APP^{swe}/ACE^{-/-}、APP^{swe}/ACE WT マウスの作製: ACE^{-/-}マウスを Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) から購入し、APP^{swe} マウスと交配し、APP^{swe}/ACE^{-/-}、APP^{swe}/ACE WT マウスを作製し、それぞれのマウス脳切片を Thioflavin-S 染色し、Thioflavin-S 陽性アミロイド斑を蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50) 上で観察しカウントした。

また、マウス脳切片を抗 A β 40、A β 42 抗体で免疫染色した。さらに、各マウス脳の大脳皮質および海馬の A β を

ELISA 法によって定量した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。動物実験については、国際医科学評議会 (CIOMS) によって策定された「医学生物学領域の動物実験に関する国際原則」などの動物福祉の基本原則と、わが国における「動物の愛護及び管理に関する法律」、「厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知における基本指針」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「動物の処分方法に関する指針」等の遵守、また遺伝子組換え実験においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、ヒト由来試料を用いる実験においては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などの法令等を遵守して研究を行った。

C. 研究結果と D. 考察

全体計画 (1): 危険因子 ApoE4 の機能増強を標的に HDL 産生を調節する薬剤探索を完了させ、期間内に前臨床試験を終了させる。進捗状況 (1): H20 年度の計画通り、薬剤ライブラリーの中から 187 個の化合物ならびに 6 種類の漢方薬を同定した (計画の達成率 100%)。当該年度に、構造解析などを行って類縁構造の薬物サーチからリード化合物を同定し、動物モデルへの投与を開始する。

計画 (2): 予備実験で、脂肪酸を含む餌が脳内 A β 沈着を強く抑制するこ

とを発見したが、3年以内にこの脂肪酸による $A\beta$ 沈着抑制の分子機構解明を行い、臨床応用(経口摂取)への基盤を確立する(予防法開発)。進捗状況(2): H20年度の計画通り、脂肪酸構成比を変えた餌で APP トランスジェニックマウス(Tg)の長期飼育(17ヶ月)を行った(計画通り)。更に分子メカニズムとして、炎症性サイトカインの産生抑制作用があることを明らかにした(達成率90%)。当該年度は、長期飼育モデルマウスの行動認知試験ならびに病理学的検討を行い、脂肪酸経口投与の有効性を明らかにする。計画(3): ACEの活性制御によるAD予防法開発の基盤情報を得る。進捗状況(3): H20年度は、計画通り ACE-Koと APP-Tgマウスの交配マウス脳を解析し、ACE-Koマウス脳では $A\beta$ 沈着が増強することを示すデータを得た(達成率90%)。すなわち、APPswe/ACE^{-/-}マウスでは、血清中のACE活性は有意に低下していたが、大脳新皮質におけるACE活性は統計学的有意差が見られなかったものの低下傾向を示した。次に、これらマウス群の脳内 $A\beta$ 沈着を定量するため、Thioflavin-S染色法によるアミロイド斑定量、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 断端特異的抗体を用いた免疫染色法による $A\beta$ 沈着斑の定量、サンドイッチELISA法による解析を行った。APPswe/ACE^{-/-}マウスでは、APPswe/ACE WTマウスと比較して、Thioflavin-S染色、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 免疫染色、 $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ サンドイッチELISAいずれの実験系においても $A\beta$

沈着量が増加する傾向を示したが、統計学的有意差には至らなかった。当該年度は、更に ACE-Tg;APP-Tgマウス脳を解析し、ACE活性の増減がアルツハイマー病病理に及ぼす作用の全貌を明らかにする。

E. 結論

(1)HDL療法(治療薬開発):薬剤ライブラリーを用いて ABCA1・ABCG1発現・機能増強を誘導する薬剤を探索した。その結果、薬剤ライブラリーの中から187個の化合物ならびに6種類の漢方薬を同定した。

(2)脂肪酸組成を変えた餌によるAD発症予防法開発では、細胞膜の脂肪酸変化が炎症性サイトカインの発現調節に影響することを細胞レベルで明らかにした。

(3)ACE阻害薬服用は、ADモデルマウス脳における $A\beta$ 沈着を増加させ、ACEノックアウトマウス(ヘテロ)では、 $A\beta$ の脳内蓄積を増加させる傾向が示された。これらの結果は、ACE活性の増減が $A\beta$ 代謝に影響することを示している。高血圧は高齢者において頻繁にみられる症状であり、本研究の知見は高齢者におけるADのリスクファクターを考える上で重要な示唆を与える。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表