

200922015A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 22 (2010) 年 3 月

別添1

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成22(2010)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	11
道川 誠	
(イ)A β オリゴマー抗体療法の開発	15
松原悦朗	
(ウ)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	17
西道隆臣	
(エ)A β 産生分子機構の解明と特異的制御による治療法の開発	20
富田泰輔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

1. 総括研究報告書
(平成21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(認知症対策総合研究事業)

総括研究報告書

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 (国立長寿医療センター)

研究要旨 (道川) (1)脳内に存在するリポ蛋白は主に ApoE によって産生される HDL であり、その供給がシナプス可塑性維持や神経修復に重要な役割を果たし、また A β 分解・除去に関与すること、などが示されている。アルツハイマー病 (AD) の危険因子として ApoE4 が知られている。研究代表者は、ApoE による HDL 産生は ApoE のアイソフォーム依存的である (ApoE3>ApoE4) ことなどを明らかにし、脳内 HDL を増加させる薬剤開発を行っている。本年度は、脳内 A β 分解・除去を目的に HDL 産生を増加させる薬物の探索を行い、いくつかの候補化合物を同定した。(2)加齢に従って変動すると考えられる脳内脂質代謝との関連から必須多価脂肪酸の脳内における APP 代謝への影響を検討した。その結果、アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルにおける脳内 A β 沈着の減少と認知障害発症が予防された (前臨床試験終了)。(3)慢性脳虚血が加えたマウス脳における ACE 発現量の低下を明らかにした。ACE は A β 分解作用を持つことから、慢性脳虚血は A β 分解能が低下することによって AD 発症の危険因子となっていることが示唆された。(4)脳内脂質代謝を担う酵素が、新規 A β 分解・除去する作用を持つことを発見した。この酵素は、A β との結合ならびにその取り込みを促進させることで、脳内 A β の除去・分解に貢献していると考えられた。AD 治療薬開発のために、この酵素の発現・活性上昇薬の探索を開始した。本研究に関連して特許申請 1 件を行った。(松原)A β 重合体を特異的に細胞外でその特異的抗体で制御すると、細胞内 A β 重合体蓄積が阻害され、AT8 陽性神経原線維変化にも形成阻害がかかり、神経変性を解除できることが明らかとなった。さらに、新奇物体認識試験において、有意な記憶障害改善も確認され、A β 重合体を標的とした抗体療法のアルツハイマー病治療への有用性が確認された。(西道)アミロイド β ペプチド (A β) の分解や代謝を制御する因子として、カルパイン-カルパスタチン系を同定した。アミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスにカルパスタチン (CS)-KO マウスを交配したところ、ネプリライシン活性が低下し、A β 病理の増悪、タウ蛋白リン酸化亢進、CS-Tg の場合は、A β 病理の減弱、タウ蛋白リン酸化の抑制が認められた。これにより、カルパイン過剰活性化が A β 蓄積やタウ蛋白リン酸化を促進することが初めて明らかになった。(富田) β および γ 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、「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 AD 創薬標的候補分子群の同定と活性制御法の開発を行った。 β セクレターゼ活性を制御することを見出していたスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の合成酵素である Sphingosine kinase (Sphk) 阻害剤を用い、準慢性経口投与実験により脳内アミロイド蓄積が減少することをモデル動物において確認した。

研究分担者

松原悦朗(国立大学法人弘前大学)

西道隆臣(理化学研究所脳科学総合研究センター)

富田泰輔(国立大学法人東京大学)

A. 研究目的

超高齢社会に突入した我が国では、高齢者の生活の質を保つことが、高齢者自身にとってもまた、家族や社会の心理的・経済的な負担軽減の視点からも重要である。高齢者の生活の質を脅かす最も大きな原因の一つは高齢になるに従って発症率が増加する認知症であり、その予防・治療法開発が急務となっている。認知症を引き起こす主な原因疾患であるアルツハイマー病に焦点を絞り、研究は、アミロイドカスケードの複数の標的を攻略することで、真に有効な AD の予防・治療法開発を目指す。複数の標的とは下記の目的を指す。

(道川) (1) HDL の産生増加を促進する薬剤探索、(2) 経口摂取した脂肪酸種類の違いによる A β 沈着への影響の分子メカニズムの解、(3) 慢性脳虚血が及ぼす脳内 A β 分解・除去機構に関する研究、(4) 新規脂質代謝酵素による A β 分解除去機能を解析し、新規治療標的として確立すること。

(松原) 本研究では、A β 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、老人斑と神経原線維変化の2大病理変化を再現するアルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg AD)に A β 重合体特異的抗体を静脈投与し、神経原線維変化形成の有無と記憶障害改善効果を検証した。

(西道) アルツハイマー病の発症機構におけるカルパイン-カルパスタチン系の役割を、特にネプリライシン系との関連や A β 病理、タウリン酸化や神経細胞体・樹状突起変性との関連で明らかにすることを目的とした。

(富田) セクレターゼ活性阻害による脳内 A β 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3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) 脂質代謝と APP、A β 代謝との関連では、ApoE-HDL 量の増加薬を、HDL 産生の鍵分子 ABCA1 プロモーター活性を指標にしたアッセイ系を用いて探索した。脂肪酸の効果解析では、脂肪酸組成を変えた餌を APP-tg マウスに長期投与し、A β 産生・沈着への効果を生化学的、病理学的に解析する。また、A β 代謝(分解)に対する ACE 機能解析を進めるとともに、慢性脳虚血が脳内 A β 分解系(ApoE、ACE 発現)に与える影響を解析する。

(松原) 25 ヶ月齢アルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg AD) に 0.4mg/Kg/週の A β 重合体特異的抗体(6H4)もしくは IgG を5週間静脈投与し、神経変性(タウオパチー)予防効果判定を新奇物体認識試験と病理解析にて行った。病理解析は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。使用抗体は AT8(モノクローナル, 1:400, Pierce), A11(ポリクローナル, 1:500, Biosource), DAPI (1:300, 核染色, Invitrogen), 6H4(モノクローナル), IgG(ポリクローナル, Millipore), Alexa Flour 488 標識 anti-mouse IgG (2 μ g/ml), Alexa Flour 488 標識 anti-rabbit IgG (2 μ g/ml), Alexa Flour 594 標識 anti-mouse IgG (2 μ g/ml), Alexa Flour 594 標識 anti-rabbit IgG (2 μ g/ml) である。

(西道) APP-Tg マウスと CS-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。

(富田) 1) 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 γ 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) Sphk 阻害剤のモデル動物への投与実験を行った。また Sphk 活性測定系を樹立し、各種サンプルでの Sphk 活性変化を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、それぞれ各分担研究者の所属する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。ヒトサンプルの取り扱いならびに解析を含む研究では、生命倫理委員会で審査承認を得るとともに、インフォームドコンセントを徹底し個人情報保護、サンプルの匿名化を行い守秘義務を履行して行った。

C. 結果と D. 考察

(道川) (1) ABCA1 のプロモーター活性を指標としたスクリーニング系を立ち上げ、10,000 種類の化合物ライブラリーならびに118 種の天然化合物から ABCA1 プロモーター活性を上昇させる薬剤をスクリーニングした。その結果、1,117 種類の化合物と、2 種類の天然化合物を同定した。さらに二次スクリーニングによって ABCA1 蛋白レベルを増加させたものを146 種、天然化合物1種類を同定した。現在より低濃度での効果のあるものを探索中である。これらの候補化合物の

構造機能解析を行い、リード化合物を決定後にモデル動物への投与によるアルツハイマー病病理への作用や認知機能障害の改善効果などを検証し、臨床試験へ向けたデータの集積を行う予定である。

(2) アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルにおける脳内 A β 沈着の減少と認知障害発症が予防された(前臨床試験終了)。また、アラキドン酸摂餌のモデルマウス脳内 A β 沈着に対する影響を解析した。アラキドン酸摂餌マウスでは、脳内 Ab 量が対照群に比し有意に減少していた。また、A β 代謝に関連する A β 産生酵素の BACE1、PS1 と A β 分解酵素の neprilysin、IDE、ACE 量を測定したところ、有意な変化は見られなかった。APP レベルは一定であったが、sAPPa, sAPPb 量は低下しており、更に CTFa, CTFb レベルも低下していた。また、脳内アラキドン酸のレベルはこれらの結果は、アラキドン酸摂餌マウスでは増加していた。これらの結果から、脂肪酸経口摂取によって APP 代謝が低下し Ab 産生が低下した結果、脳内 Ab 沈着が抑制されると考えられた。次年度は、臨床実用化に向けて、長期縦断疫学研究結果を解析し、ヒトにおける認知症予防効果を検証する。

(3) また加齢に伴って脳の慢性虚血が出現すると考えられるが、本研究班における班員間に共同研究によって、慢性脳虚血が加えたマウス脳における ACE 発現量の低下を明らかにした。ACE は A β 分解作用を持つことから、慢性脳虚血は A β 分解能が低下することによって AD 発症の危険因子となることが示唆された。

(4) 脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A β 分解・除去酵素を発見した。この酵素は、中性脂肪を代謝する酵素であり A β との結合ならびにその取り込みを促進させることで、脳内 A β の除去・分解に貢献していると考えられた。AD 治療薬開発のために、この酵素の発現・活性上昇薬の探索を開始し

た。本研究に関連して特許申請 1 件を行った。

(松原) (1) 新奇物体認識試験: A β 重合体特異的抗体(6H4)投与群は IgG 抗体投与群に比較して、獲得施行(10 分)で記憶した物体を、24 時間後もよくその記憶を把持し、新奇物体への探索時間の割合が有意に長くなった。この結果は一旦記憶障害を発症しても、神経変性を予防することで記憶障害を改善することができることを示唆している。

(2) 病理解析結果(26 ヶ月齢): A β 重合体特異的抗体(6H4)投与群は IgG 抗体投与群に比較して、脳内移行した抗体が効率よく神経細胞を選択的に標的とし、A β 重合体細胞内蓄積を予防していることと、AT8 陽性神経原線維変化の形成が抑制されていることが明らかとなった。26 ヶ月齢のアルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg AD)脳内には 100%神経原線維変化が形成されることが報告されており、今回観察した AT8 陽性リン酸化タウは pre-tangle と PHF の両者を含んでであると考えられる。静脈投与された 6H4 抗体の作用点が細胞外や細胞膜上であることを考慮すると、今回観察された病理所見から、細胞外 A β 重合体が細胞内へと蓄積し、神経原線維変化形成を誘導する神経変性発症メカニズムの存在が示唆された。

(西道) APP-Tg マウスと比較して、APP-Tg x CS-KO マウスでは、A β 病理が増悪化し、タウタンパク質リン酸化が上昇した。さらに、炎症反応が増強され、嗅内野における神経細胞体および樹状突起における変性が観察された。一方、APP-Tg x CS-Tg では、これらの現象が抑制されていた。これらのことは、アルツハイマー病の発症機構においてカルパイン-カルパスタチン系が重要な役割を果たすことを示すと考えられる。

(富田) (1) 脳内移行性を考慮し、脂質をリガンドとする核内受容体や GPCR に注目し、これらのアゴニスト・アンタゴニストおよび誘導体を含んだフォーカストライブラリーを用いて

検討した。その結果 Notch 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た。

(2) 蛍光 Sphingosine を用い、*in vitro* Sphk assay を確立した。各種サンプルについて検討を行い、マウス脳および初代培養神経細胞においても Sphk 活性が十分存在し、Sphk 阻害剤である SKI II により活性が抑制されることを確認した。また合成 A β を凝集させたアミロイド線維を初代培養神経細胞に投与したところ、Sphk 活性の上昇が観察された。

(3) SKI II を当研究室において樹立された AD モデルマウス A7 に対して、脳内アミロイド蓄積の見られる前の 8 ヶ月齢個体に対して 50mg/kg/day で 6 日経口投与し、大脳半球内の A β 量を測定したところ、20 数%の有意な減少を確認した。

E. 結論

(道川) (1) HDL 産生を増加させる候補化合物を複数同定した。(2) アラキドン酸を豊富に含む食餌によって AD 発症を予防できる可能性がある(前臨床試験終了)。(3) 慢性脳虚血は ACE 発現低下を招き、その結果 AD 発症を促進している可能性がある。(4) 新規 A β 分解・除去酵素を発見し、AD 治療法と薬剤開発への応用で特許出願した。全体的にみて、ほぼ予想通り研究計画を達成した。(松原) (1) A β 重合体の神経変性機序として、細胞内 A β 重合体蓄積が神経原線維変化形成を誘導する可能性が示唆された。(2) *in vivo* で A β 重合体を選択的に抗体療法で制御すると神経変性予防と記憶障害改善効果が得られることが明らかとなった。(西道) カルパイン特異的阻害剤はアルツハイマー病の予防薬・治療薬となる可能性が示唆された。(富田) (1) 脂溶性が高く、新規骨格を持つ A β 42 産生を低下させる GSM の同定に成功した。(2) Sphk 活性が神経細胞に存在し、アミロイド線維処理によって上昇

することが明らかとなった。(3) Sphk 阻害剤である SKI II の準慢性投与により脳内 A β 量の低下が観察された。(4) 以上の結果から、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

Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, and Michikawa M

Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells

Mol. Neurodegener., 4: 35, 2009.

Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, and Suzumura A. Microglia activated with toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease.

Am. J. Pathol., 175: 2121-2132, 2009.

Maeda T, Marutani T, Zou K, Araki W, Yagishita N, Yamamoto Y, Amano T, Michikawa M, Nakajima T, and Komano H. An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin is involved in the degradation of immature Nicastrin, and regulates the production of amyloid b-protein.

FEBS J., 276: 5832-5840, 2009.

Zou K, Maeda T, Oba R, Komano H, and

Michikawa M.

A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities in different domain of angiotensin-converting enzyme

J. Biol. Chem., 284:31914-31920, 2009.

Tesseur I, Brecht W, Corn J, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M, Weisgraber K, Huang Y, and Wyss-Coray T.

Bioactive TGF- β can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3.

J. Neurochem., 110(4): 1254-1262, 2009

Minagawa K, Gong J-S, Jung C-G, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips M C, Saito H, and Michikawa M. Mechanism underlying apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture.

J. Neurosci. Res., 87: 2498-2508, 2009.

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 α -synuclein A30P+A53T transgenic mice with α -synuclein pathology.

Brain Res. 1250: 232-241, 2009.

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

Nilsson, P., Iwata, N., Muramatsu, S.,

- Tjernberg, L.O., Winblad, B. & Saido, T.C. (2010). Gene therapy in Alzheimer's disease -Potential for disease modification. **J. Cell. Mol. Med.** in press.
- Choi, Y.S., Lee, B., Cho, H.Y., Reyes, I.B., Pu, X.A., Saido, T.C., Hoyt, K.R., Obrietan, K. (2009). CREB is a key regulator of striatal vulnerability in chemical and genetic models of Huntington's disease. **Neurobiol. Dis.**, 36, 259-268.
- Nishida, Y, Ito, S., Ohtsuki, S., Yamamoto, N., Takahashi, T., Iwata, N., Jishage, K.I., Yamada, H., Sasaguri, H., Yokota, S., Piao, W., Tomimitsu, H., Saido, T.C., Yanagisawa, K., Terasaki, T., Mizusawa, H., Yokota, T. (2009). Depletion of vitamin E increases A β accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. **J. Biol. Chem.**, 284, 33400-33408.
- Fujiwara, H., Tabuchi, M., Yamaguchi, T., Iwasaki, K., Furukawa, K., Sekiguchi, K., Ikarashi, Y., Kudo, Y., Higuchi, M., Saido, T.C., Maeda, S., Takashima, A., Hara, M., Yaegashi, N., Kase, Y., Arai, H. (2009). A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β -proteins in vitro and in vivo. **J. Neurochem.**, 109, 1648-1657.
- Adachi, A., Kano, F., Saido, T.C., Murata, M. (2009) Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive β -amyloid secretion. **Genes Cells**, 14, 355-369.
- Imamura Y, Watanabe N, Umezawa N, Iwatsubo T, Kato N, Tomita T, Higuchi T: Inhibition of γ -secretase activity by helical β -peptide foldamers. **J Am Chem Soc** 131:7353-7359, 2009
- 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(12):2444-2450, 2009
- 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 γ -secretase activity. **J Biol Chem** 284:27838-27847, 2009
- 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
- Tomita T: Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. **Expert Rev Neurotherapeutics** 5:661-679, 2009
- 学会発表
道川 誠

レニンアンジオテン系とアミロイドβ蛋白代謝
第28回日本認知症学会シンポジウム、平成
21年11月21日、仙台

道川 誠 The cholesterol paradox in the
pathogenesis of Alzheimer's disease.
第51回 日本脂質生化学会シンポジ
ウム、平成21年7月30日、名古屋
道川 誠

アルツハイマー病の予防・治療法開発
の最前線、平成21年度日本大学生
物資源科学部市民講座講演、平成
21年7月4日、藤沢

道川 誠
脳内脂質代謝の生理学的ならびに病理学的
意義について
日本膜学会シンポジウム「脂質低下療法時代
の生体膜研究」

東京理科大学森戸記念館 平成21年5月22
日、東京

Horike H, Jung CG, Cha BY, Uhm KO,
Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Woo
JT, Michikawa M. Honokiol increases
ABCA1 expression level by activating
retinoid X receptor beta.

文部科学省科学研究費補助金・特定領域研
究「統合脳」5領域 冬のワークショップ、2009
年12月17日、東京

細野崇、西辻和親、紺谷昌仙、鄭 且均、河
島 洋、木曾良信、道川 誠。多価不飽和脂
肪酸経口摂取による脳内アミロイドβ蛋白沈着
抑制。

第28回日本認知症学会学術集会、2009年11
月20日、仙台

Jung CG, Kawaguchi M, Miura Y, Akatsu
H, Hosono T, Uhm KO, Michikawa M. The
role of ATBF1 in Alzheimer's disease.
International Society for Neurochemistry
(ISN)/ Asia-Pacific Society for

Neurochemistry (APSN), August 24, 2009,
Busan, Korea.

Jung CG, Kawaguchi M, Miura Y, Akatsu
H, Hosono T, Uhm KO, Michikawa M. Aβ
enhances the ATBF1 expression
responsible for the neuronal cell death.
International conference on Alzheimer's
disease (ICAD), July 12-16, 2009, Vienna,
Austria.

Minagawa K, Gong GS, Akatsu H, Jung
CG, Watanabe A, Nishitsuji K, Hosono T,
Lund-Katz S, Phillips M C, Komano H,
Saito H, and Michikawa M. Mechanism
underlying apolipoprotein E (ApoE)
isoform-dependent HDL generation and
impairment of ApoE3-mediated HDL
generation by homocysteine.

International conference on Alzheimer's
disease (ICAD), July 12-16, 2009, Vienna,
Austria.

Jung CG, Kawaguchi M, Miura Y, Akatsu
H, Hosono T, Uhm KO, Yamaguchi T,
Horike H, Kim TS, Michikawa M. Aβ
enhances the ATBF1 expression
responsible for the neuronal cell death.

Asian Core Symposium-Nano and
Biomedical Molecular Science. 2009年2月
7日、岡崎

Tomita T, Isshiki H, Takasugi N,
Shinohara M, Suzuki K, Iwatsubo T:
Identification and analysis of a
substrate-specific genetic modulator for
the γ-secretase activity. 2009 International
Conference on Molecular
Neurodegeneration. May 18-20, 2009,
Xiamen, China

Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Intrabody against immature nicastrin disrupts the proper folding and the glycosyl maturation of the extracellular domain of nicastrin. International Conference on Alzheimer's disease 2009. July 11-16, 2009, Vienna, Austria

Miyashita H, Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Iwatsubo T, Tomita T, Sato C: Three dimensional structure of signal peptide peptidase. International Conference on Alzheimer's disease 2009. July 11-16, 2009, Vienna, Austria

Tomita T, Hayashi I, Takatori S, Urano Y, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T: Single chain variable fragment against Nicastrin inhibits the γ -secretase activity. International Conference on Alzheimer's disease 2009. July 11-16, 2009, Vienna, Austria

Tomita T, Isshiki H, Takasugi N, Suzuki K, Iwatsubo T: Identification and analysis of a substrate-specific genetic modulator for γ -secretase activity. September 27-October 1, 2009, Athens, Greece

Tomita T, Imamura Y, Watanabe N, Iwatsubo T, Kato N, Umezawa N, Higuchi T: Helical beta-peptide foldamers specifically inhibit the γ -secretase activity. Society for Neuroscience 39th Annual Meeting. October 17-21, 2009, Chicago

Takagi S, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Structure and functional roles of

transmembrane domain 1 of Presenilin 1 in the γ -secretase activity. Society for Neuroscience 39th Annual Meeting. October 17-21, 2009, Chicago

Tomita T: Structure and function relationship of the γ -secretase toward development of treatment of Alzheimer's disease. October 28, 2009, International Proteolysis Society 2009, Gold Coast, Australia

富田泰輔: γ 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

富田泰輔: アルツハイマー病治療薬開発を目指した γ 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

Tomita T, Isshiki H, Takasugi N, Shinohara M, Iwatsubo T: Functional analysis genetic modulators for γ -secretase activity (GAMMOs). 2009年7月30日 第4回 Notch 研究会 三島

Takatori S, Hayashi I, Iwanari H, Kodama T, Hamakubo T, Iwatsubo T, Tomita T: Functional antibody strategies for the regulation of γ -secretase activity. 2009年7月30-31日 第4回 Notch 研究会 三島

Isshiki H, Takasugi N, Suzuki K, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of Surf4, an ERGIC protein, as a Notch activity modulator. 2009年7月30-31日 第4回 Notch 研究会 三島

Takagi S, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Structural analysis of the catalytic pore of

gamma-secretase by Substituted Cysteine Accessibility Method. 2009年7月30-31日 第4回 Notch 研究会 三島

富田泰輔:膜内配列切断酵素 γ セクレターゼの構造活性相関解析 2009年9月24-25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

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 β 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

竹尾浩史、渡邊直登、富田泰輔、岩坪威: γ 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 大阪

鈴木邦道、林ゆかり、富田泰輔、岩坪威:新規 γ 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

Tomita T: Functional analysis of genetic modulators for the γ -secretase activity. December 10, 2009, 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan

Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Seino Y, Takamura A, Nakahata N, Watanabe Y, Watanabe M, Matsubara E, Shoj M: Accumulation of protein in lipid rafts in mouse models of neurodegenerative diseases. Neuroscience 2009, the Society for Neuroscience, 39th Annual Meeting, Chicago, Oct 17-21, 2009.

松原悦朗. アルツハイマー病の予防・治療最前線. Brain Science Conference. 2009年10月10日 京都

松原悦朗. アルツハイマー病の発症病態解明に向けて. 特別講演会. 北海道大学. 2009年11月2日 札幌

松原悦朗. アルツハイマー病の分子メカニズムと治療戦略. 第18回東北老年期認知症研究会 2009年11月14日:仙台

松原悦朗. アルツハイマー病 病態解明の現状 第16回東北脳循環カンファレンス 2009年11月28日 仙台

Saido, T.C.

Regulation of pyroglutamyl amyloid beta peptide formation by neprilysin. ICAD2009/International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria, 2009, 7

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

The biological effects of R278I-Presenilin-1 familial mutation on gamma-secretase activity and amyloid pathology. ICAD2009/International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria, 2009, 7

Iwata, N., Tsubuki, S., Saido, T.C.

Reduced neprilysin activity is associated with increased formation of pyroglutamylated amyloid-beta peptides through upregulation of aminopeptidases and glutaminyl cyclase in the brain. ICAD2009/International Conference on Alzheimer's Disease, Vienna, Austria,

2009, 7

Saido, T.C.. Proteolysis in Alzheimer Disease: Metabolism of amyloid beta peptide and involvement of the calpain-calpastatin system. Gottingen University Lab Seminar, Gottingen, Germany, 2009, 11

岩本 成人、齊藤 貴志、河野 俊之、西道 隆臣、寺沢 宏明
「アミロイドベータペプチド(A β)の蓄積機構に関する構造生物学的研究」. 第9回日本蛋白質科学会年会 熊本、2009年5月21日.

Saido, T.C.

Regulation of Alzheimer pathology by the calpain-calpastatin system. 第32回日本神経科学会、名古屋、2009年9月16日.

Saido, T.C.

Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer pathology.

第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月22日

齊藤 貴志、末元 隆寛、高野 二郎、三平 尚美、松葉 由紀夫、岩田 修永、西村 正樹、西道 隆臣. プレセニリン1変異が持つユニークな機能～胎生致死とA β 43産生に伴うアミロイド病理の促進～. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月24日

岩田 修永、津吹 聡、Matthias Staufenbiel、樋口 真人、西道 隆臣.
ピログルタミル型A β 産生・蓄積のメカニズム.
第28回日本認知症学会学術集会、仙台、2009年11月20日

齊藤 貴志、末元 隆寛、高野 二郎、三平 尚美、松葉 由紀夫、岩田 修永、西村 正樹、西道 隆臣. R278I-プレセニリン1家族性変異による新知見～胎生致死とA β 43産生に伴うアミロイド病理の促進～. 第28回日本認知症学会学術集会、仙台、2009年11月20日

特許の出願および取得状況

1. 発明の名称:アルツハイマー病の予防及び治療薬並びにアルツハイマー病の予防及び治療薬のスクリーニング方法
発明者:道川 誠、西辻和親
出願者:財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願日:平成21年12月21日

出願番号:特願2009-289487

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

分担研究報告書

HDL 療法開発に関する研究

分担研究者：道川 誠 (国立長寿医療センター)

研究概要) 脳内に存在するリポ蛋白は主に ApoE によって産生される HDL であり、その供給がシナプス可塑性維持や神経修復に重要な役割を果たすこと、lipidated ApoE(HDL-ApoE)は A β 分解・除去に関与すること、などが示されている。アルツハイマー病 (AD) 予防法の開発では、(1)加齢に従って変動すると考えられる脳内脂質代謝との関連から必須多価脂肪酸の脳内における APP 代謝への影響を検討した。その結果、アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルにおける脳内 A β 沈着の減少と認知障害発症が予防された (前臨床試験終了)。また、加齢に伴って脳の慢性虚血が出現すると考えられるが、本研究班における班員間に共同研究によって、慢性脳虚血が加えたマウス脳における ACE 発現量の低下を明らかにした。ACE は A β 分解作用を持つことから、慢性脳虚血は A β 分解能が低下することによって AD 発症の危険因子となっていることが示唆された。脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A β 分解・除去酵素を発見した。この酵素は、中性脂肪を代謝する酵素であり A β との結合ならびにその取り込みを促進させることで、脳内 A β の除去・分解に貢献していると考えられた。これは創薬の新たな標的になりうると考えられた。一方、ApoE による HDL 産生には ApoE3>ApoE4 の違いがあることを明らかにしたが、本年度は ApoE-HDL が、血液脳関門(BBB)形成に重要な役割を果たすこと、その作用に ApoE アイソフォーム依存性があることを見出した。

A. 研究目的 (1) 脂肪酸種類の違いによる A β 沈着への影響の分子メカニズムの解、(2) 脳内における新規 A β 分解・除去機構に関する研究、(3) ApoE によって産生される HDL の血液脳関門形成に果たす役割の解析、を目的とした研究を行った。

B. 研究方法 アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 A β 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果を評価し、更に、そのメカニズムの解明を行った。また、ヒト ApoE3、ApoE4 ノックインマウスの BBB 機能をエバンスブルー法によって評価した。野生型マウスから準備した血管内皮細胞、

ペリサイトおよび ApoE3、ApoE4 ノックインマウスから準備したアストロサイトを 2 重底のプレートで培養し(3 層培養)in vitro BBB モデルを作製した。この系において endothelial cell 間の tight junction 形成を電気抵抗値で評価した。更に、ACE-Ko と APP-Tg マウスの交配マウス脳における Abeta 沈着を生化学的手法により解析した。また、脂質代謝を制御する酵素 X が、アストロサイトによる A β の取り込み、A β の分解・除去に大きな役割を果たしているかどうかを解析した。

C. 結果および D. 考察

(1) 脂肪酸種類の違いによる A β 沈着へ

の影響の分子メカニズムの解明：経口脂肪酸摂取によって、アルツハイマー病病理である脳内 A β 沈着抑制効果ならびに認知機能障害予防効果を検討するプロジェクトを行っている。本年度は、アルツハイマー病モデル動物に様々な脂肪酸構成を変化させた餌を長期投与し、脳内 A β 沈着ならびに認知機能進行に対する予防効果を評価し、更に、そのメカニズムの解明を行った。アラキドン酸含有餌の摂取によってアルツハイマー病モデル動物脳における A β 沈着が抑制されること、アラキドン酸またはDHA含有餌は APP トランスジェニックマウスにおける認知機能障害を予防することを明らかにした。また、その分子機構としてアラキドン酸やDHAが脳内APP代謝を変化させるためであることを明らかにした。これらの結果は、脂肪酸の経口摂取によってアルツハイマー病発症を予防できる可能性を示している。今後は、疫学研究による検証を行い、介入試験の実施の可能性を探る。

(2) 脳内における新規 A β 分解・除去機構に関する研究

(i) ACE に関する研究：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(ii)脂質代謝を制御する酵素Xが、アストロサイトによる A β の取り込み、及びアストロサイトへの A β の結合を著しく促進させ、A β の分解・除去に大きな役割を果たしていること

を発見した。酵素Xの効果ならびにその作用機序について、ApoE-HDL との関連を含めた分子メカニズムの観点から更なる解析が必要である。また、酵素Xの機能・発現量の調節により予防治療薬への応用の可能性について検討を進めている。

(3) ApoE4 ノックインマウスでは ApoE3 ノックインマウスに比べて BBB のバリアー機能が低下していた。(ii) ApoE4 発現アストロサイトを用いた系は ApoE3 発現アストロサイトを用いた系に比べて BBB のバリアー機能が低下しており、tight junction 形成に関与する分子のリン酸化の程度に違いがあった。これらの違いは、アストロサイトから分泌される ApoE-HDL に起因すると考えられた。

E. 結論

(1) アルツハイマー病モデルマウスに不飽和脂肪酸を経口摂取させることにより、脳内 A β 代謝を調節することができると明らかになった。このことは食餌療法やサプリメント投与によってアルツハイマー病発症予防ができる可能性を示しており、今後、疫学研究や介入研究をする必要がある。

(2) A β 分解機構における ACE の役割の解明、ならびに新規 A β 分解作用のある分子を同定した。

(3) 血液脳関門形成における ApoE-HDL の新規作用ならびに ApoE のアイソフォーム依存性を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, and Michikawa M
Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells.

Mol. Neurodegener., 4: 35, 2009.

2. Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, and Suzumura A. Microglia activated with toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease.

Am. J. Pathol., 175: 2121-2132, 2009.

3. Maeda T, Marutani T, Zou K, Araki W, Yagishita N, Yamamoto Y, Amano T, Michikawa M, Nakajima T, and Komano H. An E3 ubiquitin ligase, Synoviolin is involved in the degradation of immature Nicastrin, and regulates the production of amyloid b-protein.

FEBS J., 276: 5832-5840, 2009.

4. Zou K, Maeda T, Oba R, Komano H, and Michikawa M.

A β 42-to-A β 40- and angiotensin-converting activities in different domain of angiotensin-converting enzyme.

J. Biol. Chem., 284:31914-31920, 2009.

5. Tesseur I, Brecht W, Corn J, Gong J-S, Yanagisawa K, Michikawa M,

Weisgraber K, Huang Y, and Wyss-Coray T.

Bioactive TGF- β can associate with lipoproteins and is enriched in those containing apolipoprotein E3.

J. Neurochem., 110(4): 1254-1262, 2009

6. Minagawa K, Gong J-S, Jung C-G, Watanabe A, Lund-Katz S, Phillips M C, Saito H, and Michikawa M. Mechanism underlying apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture.

J. Neurosci. Res., 87: 2498-2508, 2009.

道川 誠 (アルツハイマー病研究部)

第4章: コレステロール代謝とアルツハイマー病. 脳内老化制御とバイオマーカー: 基盤研究と食品素材. (株) シーエムシー出版、東京、2009. pp129-136.

2. 学会発表:

道川 誠

レニンアンギオテン系とアミロイド β 蛋白代謝. 第28回日本認知症学会シンポジウム、平成21年11月21日、仙台

道川 誠

The cholesterol paradox in the pathogenesis of Alzheimer's disease.

第51回 日本脂質生化学会シンポジウム、平成21年7月30日、名古屋

道川 誠

アルツハイマー棒の予防・治療法開発の最前線、平成21年度日本大学生物資源科学部市民講座講演、

平成 21 年 7 月 4 日、藤沢

道川 誠

脳内脂質代謝の生理学的ならびに病理学的意義について

日本膜学会シンポジウム「脂質低下療法時代の生体膜研究」

東京理科大学森戸記念館 平成 21 年 5 月 22 日、東京

H. 特許申請

1. 発明の名称：アルツハイマー病の予防及び治療薬並びにアルツハイマー病の予防及び治療薬のスクリーニング方法
発明者：道川 誠、西辻和親
出願者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
出願日：平成 21 年 12 月 21 日
出願番号：特願 2009-289487

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

分担研究報告書

神経変性予防法(免疫療法)の 開発

研究分担者: 松原悦朗 弘前大学大学院医学研究科

研究要旨

Aβ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、Aβ重合体を特異的に細胞外でその特異的抗体で制御すると、細胞内 Aβ重合体蓄積が阻害され、AT8 陽性神経原線維変化にも形成阻害がかかり、神経変性を解除できることが明らかとなった。さらに、新奇物体認識試験において、有意な記憶障害改善も確認され、Aβ重合体を標的とした抗体療法のアルツハイマー病治療への有用性が確認された。

A. 研究目的: 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、老人斑と神経原線維変化の2大病理変化を再現するアルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg AD)にAβ重合体特異的抗体を静脈投与し、神経原線維変化形成の有無と記憶障害改善効果を検証した。

B. 研究方法

25ヶ月齢アルツハイマー病モデルマウス(3X-Tg AD)に0.4mg/Kg/週のAβ重合体特異的抗体(6H4)もしくはIgGを5週間静脈投与し、神経変性(タウオパチー)予防効果判定を新奇物体認識試験と病理解析にて行った。病理解析は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。使用抗体はAT8(モノクローナル, 1:400, Pierce), A11(ポリクローナル, 1:500, Biosource), DAPI(1:300, 核染色, Invitrogen), 6H4(モノクローナル), IgG(ポリクローナル, Millipore), Alexa Flour 488 標識 anti-mouse IgG (2μg/ml), Alexa Flour 488 標識 anti-rabbit IgG (2μg/ml), Alexa Flour 594 標識

anti-mouse IgG (2μg/ml), Alexa Flour 594 標識 anti-rabbit IgG (2μg/ml)である。

(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。特に動物実験については当施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果と D. 考察

①新奇物体認識試験:

Aβ重合体特異的抗体(6H4)投与群はIgG抗体投与群に比較して、獲得施行(10分)で記憶した物体を、24時間後もよくその記憶を把持し、新奇物体への探索時間の割合が有意に長くなった。この結果は一旦記憶障害を発症しても、神経変性を予防することで記憶障害を改善することができることを示唆している。

②病理解析結果(26ヶ月齢):

Aβ重合体特異的抗体(6H4)投与群はIgG抗体投与群に比較して、脳内移行した抗体が効率よく神経細胞を選択的に標的とし、Aβ