

201026015A

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 23 (2011) 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	12
道川 誠	
(イ)A $\beta$ 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	
(ウ)A $\beta$ オリゴマー抗体療法の開発	21
松原悦朗	
(エ)A $\beta$ 産生分子機構の解明と特異的制御による治療法の開発	24
富田泰輔	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	32

**1. 総括研究報告書  
(平成 22 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(独立行政法人 国立長寿医療研究センター)

研究概要) (道川) ApoE によって産生される HDL は、シナプス可塑性維持や神経修復に重要な役割を果たし、HDL-ApoE は A $\beta$  分解・除去に関与する。(1) HDL 産生増加薬の探索を行い、3 種の化合物を同定した。(2) 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 $\beta$  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)。その分子機構も合わせて解明した。(3) 新規 A $\beta$  結合蛋白質としてリポ蛋白質リパーゼを同定した。この酵素は A $\beta$  と結合し、その取り込みを促進させ、脳内 A $\beta$  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。

(4) 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。(松原)、神経細胞外 A $\beta$  重合体が神経細胞内に取り込まれ蓄積し神経細胞死を惹起すること、インビボでも細胞内 A $\beta$  重合体蓄積が阻害され、神経変性を予防できることを明らかにした。さらに、アルツハイマー病患者脳でも細胞内 A $\beta$  重合体蓄積が神経細胞変性を惹起していることも確認され、A $\beta$  重合体が神経細胞変性を惹起し、記憶障害の分子基盤であることが実証された。

(西道) ノックイン戦略を用いて、次世代型 AD モデルマウスを作製した。マウスの A $\beta$  配列をヒト化し、スウェーデン変異とバイロイター変異を導入した。その結果、A $\beta$  42/A $\beta$  40 比がワイルドタイプと比較して約 100 倍上昇した。今後、生化学的・神経病理学的・行動遺伝学的解析を行う予定である。化合物評価などにおける有用なツールとなることが期待される。次に、A $\beta$  分解酵素の活性制御機構について検討した。ソマトスタチン受容体サブタイプを培養細胞に発現させ、ソマトスタチンの NEP 活性に対する作用を検討した。ソマトスタチン受容体 4 が欠損すると NEP の発現が低下した。NEP の細胞質におけるリン酸化反応の少なくとも一部は MAP キナーゼ (MAPK) によってなされ、NEP の活性を低下させる。また PP1A が脱リン酸化に関与し NEP 活性を制御することが明らかにした。(富田)  $\beta$  および  $\gamma$  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、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 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。新たにスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 受容体アゴニスト/機能的アンタゴニストである FTY720 を見出した。S1P が  $\beta$  セクレターゼである BACE1 活性と関連すること、BACE1 の膜貫通領域に S1P が直接相互作用することを見出した。また AD 患者脳において S1P 産生酵素 Sphk2 活性が上昇していることを見出し、アミロイドによる神経細胞ストレスが Sphk 活性上昇を惹起し、さらなる A $\beta$  産生上昇を導く Vicious Cycle の存在を確認した。

**A. 研究目的** 超高齢社会に突入した我が国では、高齢で発症率が増加する代表的な認知症疾患であるアルツハイマー病の予防・治療法開発が急務となっている。本研究は、アルツハイマー病発症機構を説明する仮説である「アミロイドカスケード」における複数の標的を攻略することで、真に有効なアルツハイマー病の予防・治療薬を開発することを目的とする。この目的達成のために、分担研究課題として、(1) HDLの産生増加を促進する薬剤探索を通じた治療薬開発、(2) 脂肪酸の経口摂取によるA $\beta$ 沈着、認知機能障害予防の検討を通じた予防法確立、(3) 新たに発見したA $\beta$ 結合蛋白の機能解析(A $\beta$ 分解除去機能)を行い、治療標的として確立すること、(4) 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かどうかの検討を行った。

## B. 研究方法

道川) (1) ABCA1発現を指標にしたHDL産生促進薬の開発の2次および3次スクリーニングを、蛋白レベルならびに同定した化合物の濃度依存性を生化学的に解析した。(2) 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 $\beta$ 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。(3) 脂質代謝を制御する酵素Xが、アストロサイトによるA $\beta$ の取り込み、A $\beta$ 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。(4) 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。

松原：①神経芽細胞腫(SH-SY5Y細胞)にFluor<sup>TM</sup> 488標識A $\beta$ 1-42単量体、Fluor<sup>TM</sup> 488標識A $\beta$ 1-42重合体、蛍光のみ(Fluor<sup>TM</sup> 488)に暴露させ、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内取り込みを10分、30分、180分間観察した。Fluor<sup>TM</sup> 488標識A $\beta$ 1-42重合体暴露後、10分、30分、180分、360分と24時間で、Fluor<sup>TM</sup> 488標識A $\beta$ 1-42単量体とFluor<sup>TM</sup> 488標識A $\beta$ 42-1単量体暴露24時間後、LDH assayを用いて神経細胞死を評価した。②4ヶ月齢アルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)に0.4mg/Kg/週のA $\beta$ 重合体特異的抗体(1A9 or 2C3)もしくはPBSを36週間静脈投与し、記憶障害予防効果が確認された13ヶ月齢で病理解析を行った。③アルツハイマー病患者脳4例、健常高齢者脳3例の病理解析を行った。病理解析は共焦点レーザー顕微鏡もしくは免疫組織化学的を用いて行った。使用抗体はA11(ポリクローナル, 1:500, Biosource), DAPI(1:300, 核染色, Invitrogen), 1A9 or 2C3(モノクローナル)である。

西道：新しいモデルマウスは、相同的組み換えを利用したノックイン戦略にもとづいて作製した。次に、初代神経培養においてソマトスタチンがNEP活性を上昇させることがわかっていたので、ソマト

スタチン受容体サブタイプを培養細胞に発現させ、ソマトスタチンの NEP 活性に対する作用を検討した。さらに、ソマトスタチン受容体タイプ 4 ノックアウトマウスを用いて NEP の発現量を定量した。NEP については、細胞質ドメインに 5 カ所のリン酸化サイトがあるので、リン酸化特異的抗体を作製して、リン酸化・脱リン酸化の影響を検討した。

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および公知の化合物の  $\gamma$  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) 昨年度に確立した Sphk 活性測定系により、AD 患者脳での Sphk 活性変化を検出した。3) 固相化 SIP を用いて BACE1 蛋白との結合について検討した。

### C. 結果および 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 種の天然化合物を用いてスクリーニングした。一次、二次スクリーニングによって ABCA1 蛋白発現を増加させたものを 3 種類を同定した。今後、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する。また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を検証し、臨床試験へ向けたデータの集積を行う。2) アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルの脳内 A $\beta$  沈着減少と認知障害発症予防が認められた（前臨床試験終了）。その分子機構として、脂肪酸摂取によって脳内

膜脂質組成の変化が起き、その結果 A $\beta$  産生が低下して脳内 A $\beta$  沈着が抑制されると考えられた。今後は、臨床応用に向け、長期縦断疫研究との共同研究を行い、ヒトにおける認知症予防効果を検証する。3) 脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A $\beta$  結合分子（リーパーゼ）を発見した。この酵素は A $\beta$  と結合し、その取り込みを促進させることで、脳内 A $\beta$  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出願 1 件を行った。4) 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。

松原：①A $\beta$ 重合体神経細胞取り込み試験：Fluor<sup>TM</sup> 488 標識 A $\beta$ 1-42 単量体、Fluor<sup>TM</sup> 488 標識 A $\beta$ 1-42 重合体、蛍光のみ (Fluor<sup>TM</sup> 488) をそれぞれ神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) とインキュベートした際、蛍光標識 A $\beta$  重合体のみが細胞内に取り込まれ顆粒状蓄積を呈した。24 時間後施行した LDH assay では Fluor<sup>TM</sup> 488 標識 A $\beta$ 1-42 重合体のみ神経細胞死が観察され、Fluor<sup>TM</sup> 488 標識 A $\beta$ 1-42 単量体と Fluor<sup>TM</sup> 488 標識 A $\beta$ 42-1 単量体では神経細胞死は認められなかった。②抗体治療

マウス脳病理解析結果：A $\beta$ 重合体特異的抗体(1A9 or 2C3)投与群ではPBS投与群に比較して、A11陽性A $\beta$ 重合体の神経細胞内蓄積が予防され、かつ神経細胞変性(Fluoro Jade-B陽性)も確実に抑制されていることが明らかとなった。③ヒト脳病理解析結果：ヒト脳内でのA $\beta$ 重合体局在は神経細胞内主体で、細胞外は瀰漫性老人斑にのみわずかに観察された。細胞内分布はアルツハイマー病患者では細胞底部と同部から分岐する樹状突起近位部に顆粒状蓄積を、健常者脳神経細胞では細胞質全体に瀰漫性分布を呈していた。前者ではFluoro Jade-B陽性で細胞核が巨大化した変性像が観察された。

**西道**：新しい次世代型のモデルマウスでは、A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ の比が100倍程度上昇している。今後、生化学的・神経病理的・行動遺伝学的解析を行う予定である。ソマトスタチン受容体が存在することによって、ソマトスタチン刺激に対するNEP活性上昇の応答が見られた。これは、海馬や大脳皮質に選択的に存在するタイプ4においても見られた。次に、NEPの細胞質におけるリン酸化反応の少なくとも一部はMAPキナーゼ(MAPK)によってなされ、これはNEPの活性を低下させる。さらに、フォスファターゼ阻害剤を用いた検討により、PP1Aが脱リン酸化に関与しNEP活性を制御することが明らかになった。MAPKは神経成長因子によって活性化されるが、実際にBDNF・NGF・NT3・NT4はNEPのリン酸化を昂進し、活性を抑制した。ソマトスタチンとNEPリン酸化の関係は現時点では明確ではないが、ソマトスタチンのNEPに対する作

用がMAPKによって制御される可能性は高い。

**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 $\beta$ 産生を低下させる各種 $\gamma$ シクレターゼモジュレーターとして、S1P受容体アゴニスト/機能的アンタゴニストであるFTY720(Fingolimod)を同定した。②昨年度に確立した、蛍光Sphingosineを用いた*in vitro* SphK assayを利用し、各種サンプルについて検討を行った。AD患者及びコントロール患者脳について検討を行い、AD患者脳においては単位神経細胞あたりのSphK2活性が上昇していることを見出した。③神経細胞由来膜画分に直接S1Pを付加することでBACE1活性の上昇を確認した。さらにS1Pを含めた各種脂質を固相化したビーズを用いた沈降実験により、BACE1の膜貫通領域がS1Pと直接相互作用することを見出した。

#### E. 結論

**道川**：(1) HDL産生を増加させる候補化合物を最終的に3種類にまで絞って同定した。(2) アラキドン酸を豊富に含む食事やサプリメント補給によってAD病理発現、認知障害の発症を予防できる可能性がある(前臨床試験終了)。(3) 新規A $\beta$ 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。(4) ApoE-HDLは血液脳関門形成に重要な

役割を担うこと、その作用に ApoE3>ApoE4 の違いがあることを明らかにした。

**松原:** 1) A $\beta$ 重合体は神経細胞に取り込まれ、細胞内に蓄積し、遅発性の神経細胞死を誘導することが明らかとなった。

2) *in vivo* で細胞外 A $\beta$ 重合体を選択的に抗体療法で制御すると、神経細胞内 A $\beta$ 重合体蓄積が抑制され、神経変性予防と記憶障害発症予防効果が得られることが明らかとなった。3)アルツハイマー病患者脳の神経細胞内では、粗大顆粒状の A $\beta$ 重合体が蓄積し、神経細胞変性を呈していることが明らかとなった。

西道) 新しい次世代型モデルは、今後、化合物評価などにおける有用なツールとなることが期待される。

**西道:** ソマトスタチン受容体タイプ4の活性化が NEP 活性上昇を引き起こすことから、この受容体を特異的に活性化する低分子アゴニストをスクリーニングすることの意義が明らかになった。また、MAPK によるリン酸化が NEP 活性を抑制することから、MAPK 阻害剤も NEP 賦活化に用いることができると期待される。

**富田:** 1) ごく最近多発性硬化症の治療薬として認可された Fingolimod が新規 GSM として機能することを見出した。中枢神経系での S1P シグナリングがセクレターゼ活性にも影響していると考えられる。2) 神経細胞に存在する Sphk 活性が AD 患者脳において上昇していることが明らかとなった。3) S1P は BACE1 に直接結合し、その活性を上昇させることが示された。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

Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mourri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E. Extracellular and intraneuronal HMW-A $\beta$  oligomers represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Mol. Neurodegener.*, 6: 20, 2011.

Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E. The dissociation of A $\beta$  from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A $\beta$ 42 assembly. *J Neurosci Res*, in press, 2011.

Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, and Michikawa M. Lipoprotein lipase is a novel A $\beta$ -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A $\beta$  in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 286: 6393-6401, 2011.

Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, Michikawa M. Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of



Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 88:3588-3597, 2010

Takagi S, Tominaga A, Tomita T\*, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15050, 2010

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 noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A $\beta$  pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:11157-11166, 2010

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

Watanabe N, Takagi S, Tominaga A, 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

Hayashi Y, Tomita T, Kopan R, Iwatsubo T: Notch ligands expressed in nonneuronal cells increase synaptic vesicle proteins in glutamatergic neurons. Keystone Symposium "Synapses:

Formation, Function and Misfunction (Z3)". April 12, 2010 Salt Lake City, Utah

Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Koyama R, Matsuki N, Tomita T, Iwatsubo T: Proteolytic processing of neuroligin 1. Keystone Symposium "Synapses: Formation, Function and Misfunction (Z3)". April 13, 2010 Salt Lake City, Utah

Tomita T: Molecular mechanism of action of  $\gamma$ -secretase inhibitors and modulators. July 12, 2010, AAICAD2010, Honolulu, Hawaii, USA

Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. November 13-17, 2010, San Diego

Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T:  $\gamma$ -secretase modulator GSM-1 directly target to N-terminal fragment of Presenilin 1. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. November 13-17, 2010, San Diego

Tomita T, Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Iwatsubo T: Structure and function relationship analysis of  $\gamma$ -secretase modulator GSM-1. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. November 13-17, 2010, San Diego

Tomita T: Alzheimer Drug Mechanisms. November 18, 2010, 2010 FIP Pharmaceutical Science World Congress (PSWC)/AAPS, New Orleans, Louisiana,

USA, USA

Morohashi Y, Hayashi I, Takatori S, Osawa S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of  $\gamma$ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Presenilin 1 Is a molecular target of phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

Tomita T, Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Iwatsubo T:  $\gamma$ -Secretase modulator GSM-1 directly targets the N-terminal fragment of presenilin 1. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

<国内>

富田泰輔: 化合物を基点としたケミカルバイオロジーによるアルツハイマー病治療薬開発 2010年7月30日 平成22年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 札幌

富田泰輔: セクレターゼ阻害薬 スタディグループ「次世代の対認知症戦略ー診断から予防までー」 2010年9月18日 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会 仙台

豊川圭祐、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 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

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 Presenilin1 の第4膜貫通領域の構造解析 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

佐々木朝輝、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 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

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 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

富田泰輔、大木優、横島聡、肥後拓也、島田尚明、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はプレセニンN末端断片を標的とする 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Koizumi H, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T:  $\gamma$ -Secretase modulator directly targets N-terminal fragment of presenilin-1. 2010年11月27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム."基礎研究と応用研究の融合による医療薬学研究の推進に向けて" 東京

Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of  $\gamma$ -secretase cofactors to the formation of the catalytic pore of presenilin 1. 2010年11月27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジ

ウム."基礎研究と応用研究の融合による  
医療薬学研究の推進に向けて" 東京

Sasaki T, Takasugi N, Oosawa S, Tomita T,  
Iwatsubo T: Identification and analysis of  
a novel domain modulating  
 $\gamma$ -secretase-mediated cleavage within  
amyloid precursor protein. 2010年11月  
27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬  
科学シンポジウム."基礎研究と応用研究  
の融合による医療薬学研究の推進に向け  
て" 東京

Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo  
T: Participation of transmembrane domain  
1 of presenilin 1 in the catalytic pore  
structure of the  $\gamma$ -secretase. 2010年12月  
7-10日 BMB2010 神戸

Tomita T: Structure and function  
relationships of  $\gamma$ -secretase complex. 2010  
年12月9日 BMB2010 神戸

道川 誠 アポリポ蛋白Eとアルツハイマ  
ー病 Clinical Neuroscience (月刊臨床神  
経科学), 28: 992-995, 2010

道川 誠 アルツハイマー病分子病態と  
アポリポ蛋白E 医療の広場、第50巻(10  
号):4-5, 2010

道川 誠  
アポリポ蛋白Eとアルツハイマー病  
Clinical Neuroscience, 28(9): 992-995,  
2010

ゾウケン、道川 誠、駒野宏人 (アルツ  
ハイマー病研究部)

アンギオテンシン変換酵素の新しい顔：  
 $A\beta$ 変換酵素  
ミニレビュー 生化学 82巻、1120-1124、  
2010

## 2. 学会発表：

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H,  
Michikawa M, Jung CG ATBF1 interacts  
with amyloid precursor protein and  
enhances amyloid  $\beta$ -protein production.  
The First International Conference on  
Neural Cell Culture (ICNCC 2010), June  
25, 2010, Seoul, Korea.

Michikawa M. Apolipoprotein E and  
Alzheimer's disease  
Hallym University, The 12th Ilsong  
International Symposium,  
Hallym-Nagoya Academic Joint Meeting  
June 24, 2010. Anyang, Gyeonggi-do,  
Korea

Kazuchika N, Hosono T, Nakamura T,  
and Michikawa M. Effect of  
apolipoprotein E isoform on formation  
and maintenance of blood-brain-barrier  
function.  
June 7, 2010. Washington University, St.  
Louis, USA

Zou K, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T,  
Michikawa M, Komano H.  
Potent inhibition of ACE leads to  
Alzheimer-like pathology in APP  
transgenic mouse brain.  
International Conference on Alzheimer's  
Disease (ICAD), July 11, 2010, Honolulu,  
Hawaii

Saido, T.C. N-terminal structure of  
amyloid  $\alpha$  peptide,  $A\alpha$ -42, determines  
its metabolic fate in brain. PSP2010,  
Halle(Saale), Germany, 2010, 5

Iwata, N., Higuchi, M., Tsubuki, S.,  
Staugenbiel, M., Saido, T.C. Reactive  
astrogliosis enhances proGlu- $A\alpha$   
formation via up-regulation of

glutaminy cyclase, and reduced neprilysin activity exacerbates this process. ICAD2010, Honolulu, USA, 2010, 7

Saito, T., Suemoto, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Takano, J., Nisson, P., Nishimura, M., Iwata, N., Saido, T.C. A $\beta$  43 is potently amyloidogenic in vivo. ICAD2010, Honolulu, USA, 2010, 7

Takano, J., Saido, T.C. Triple knockout mice deficient in calpain 1, calpain 2 and calpastatin: vital role of the calpain-calpastatin system for life. 2010 FASEB Summer Research Conferences : The Biology of Calpains in Health and Disease. Arizona, USA, 2010, 7

Saido, T.C. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in pathogenesis of Alzheimer's disease. AD Workshop for Alzheimer's Disease and Other Related Disorders. Hangzhou, China 2010, 10

道川 誠 アルツハイマー病  
名古屋市立大学大学院医学研究科講義、  
2010年5月24日、名古屋

道川 誠 アルツハイマー病の臨床、分子病態と治療戦略 名古屋市立大学大学院薬学研究科講義、2010年5月27日、名古屋

道川 誠 アルツハイマー病とスタチン  
脳を護るー認知症を防ぐー興和創薬・名古屋医師会共催シンポジウム  
2010年6月17日、名古屋

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠  
血液脳関門機能に対するアポリポタンパク質Eアイソフォームの影響

Neuro2010, 2010年9月4日、神戸

鄭 且均、巖 景玉、三浦 裕、赤津裕康、道川 誠

APP代謝及びAb産生機構におけるホメオチック因子ATBF1の機能解析  
Neuro2010, 2010年9月3日、神戸

ゾウクン、劉 俊俊、劉 しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人  
ACE阻害によるアルツハイマー病モデルマウス脳内変化の解析

Neuro2010, 2010年9月2日、神戸

道川 誠 炎症とアルツハイマー病  
日本歯周病学会シンポジウム、2010年9月19日、高松

道川 誠 Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease

招待講演(客員教授授与講演)、中国瀋陽医学院・何氏視覚科学学院、2010年9月27日、瀋陽

道川 誠

アポリポ蛋白Eとアルツハイマー病  
教育講演：第18回中部老年期認知症研究会  
平成22年10月30日、名古屋

巖 景玉、赤津裕康、三浦 裕、道川 誠、鄭 且均

APP代謝及びAb産生におけるATBF1の機能解析

日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

西辻和親、細野 崇、内村健治、道川 誠  
リポ蛋白質リパーゼは初代培養アストロサイトによるアミロイド $\beta$ の取り込みを促進する 日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

細野 崇、山内玲奈、紺谷昌仙、西辻和親、鄭 且均、河島 洋、木曾良信、道川 誠

多価不飽和脂肪酸餌は LPS で誘導される脳内炎症を抑制する

日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

ゾウケン、劉俊俊、劉しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人

Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain

日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

道川 誠 脳内脂質代謝は、アルツハイマー病発症に関わりうるか

第 8 回アルツハイマー病の早期診断・治療・予防法の開発研究会、2011 年 2 月 18 日、名古屋

道川 誠 脳内脂質代謝変動とアルツハイマー病分子病態

第 5 回関西・中部認知症学会、2011 年 2 月 19 日、ウインクあいち、名古屋

Ayumi Takamura, Takeshi Kawarabayashi, Tomoko Matsubara, Mikio Shoji, Etsuro Matsubara: Alzheimer Neuronal Degeneration: Extracellular vs. Intracellular A $\beta$  oligomers. International Conference on Alzheimer's Disease - ICAD 2010. Honolulu, July 10-15

松原悦朗. 日本内科学会東北地方会第 57 回生涯教育講演会 認知症治療の最前線 仙台国際センター, 2010, 2 月 19 日

松原悦朗, 高村歩美, 若佐谷保仁, 渡

辺有希子, 中畑直子, 渡辺光法, 瓦林毅, 東海林幹夫, A $\beta$  オリゴマー特異的受動免疫予防法の開発. 第 51 回日本神経学会総会 (2010 年 5 月 20-22 日, 東京)

西道 隆臣. 組織普遍型カルパイン-カルパスタチン系の逆遺伝学. 臨床研セミナー 鈴木絃一先生メモリアルシンポジウム〜カルパイン研究の今昔〜. 東京, 日本, 2010.7.

斉藤 貴志, 末元 隆寛, 三平 尚美, 松葉 由紀夫, Per Nilsson, 高野 二郎, 西村 正樹, 岩田 修永, 西道 隆臣. アルツハイマー病病態形成における A $\beta$ 43 の役割. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋, 2010 年 11 月

岩田 修永, 津吹 聡, Matthias Staufenbiel, 樋口 真人, 西道 隆臣. ネプリライシン活性低下によるアミロイド病理形成メカニズム: 炎症反応と ApoE 産生の増強およびピログルタミン型 A $\beta$  産生・蓄積との関連性. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会大会合同大会, 神戸, 2010 年 12 月

垣矢 直雅, 斉藤 貴志, 津吹 聡, 西道 隆臣. A $\beta$  分解酵素ネプリライシンの活性制御メカニズムの解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学学会大会合同大会, 神戸, 2010 年 12 月

#### H. 特許申請

西道隆臣: US Patent: US 7,745,688 B2, Model Mouse of Alzheimer's Disease Expressing FAD APP716 and Use of Thereof.

## 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

#### 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

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 $\beta$  分解・除去に関与すること、などが示されている。(1)アルツハイマー病 (AD) 予防法の開発では、加齢に従って変動す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 $\beta$  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)。その分子機構として、脂肪酸摂取によって脳内脂質組成の変化が起き、その結果 A $\beta$  産生が低下して脳内 A $\beta$  沈着が抑制されると考えられた。(2) 脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A $\beta$  結合蛋白としてリポ蛋白リパーゼを同定した。この酵素は、中性脂肪を代謝する酵素であり A $\beta$  と結合し、その取り込みを促進させることで、脳内 A $\beta$  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。本研究に関連して特許出願 1 件を行った。(3) 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** 超高齢社会に突入した我が国では、高齢で発症率が増加する代表的な認知症疾患であるアルツハイマー病の予防・治療法開発が急務となっている。本研究は、アルツハイマー病発症機構を説明する仮説である「アミロイドカスケード」における複数の標的を攻略することで、真に有効なアルツハイマー病の予防・治療薬を開発することを目的とする。この目的達成のために、分担研究課題として、(1) HDL の産生増加を促進する薬剤探索を通じた治療薬開発、(2) 脂肪酸の経口摂取による A $\beta$  沈着、認知機能障害予防の検討を通じた予防法確立、(3) 新たに発見した A $\beta$  結合蛋白の機能解析 (A $\beta$  分解除去機能) を行い、治療標的として確立すること、(4) 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かどうかの検討を行った。

**B. 研究方法** (1) ABCA1 発現を指標にした HDL 産生促進薬の開発の 2 次および 3 次スクリーニングを、蛋白レベルならびに同定した化合物の濃度依存性を生化学的に解析した。(2) 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 $\beta$  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。(3) 脂質代謝を制御する酵素 X が、アストロサイトによる A $\beta$  の取り込み、A $\beta$  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。(4) 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。

### C. 結果および D. 考察

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 種の天然化合物を用いてスクリーニングした。一次、二次スクリーニングによって ABCA1 蛋白発現を増加させたものを 3 種類を同定した。今後、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する。また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を検証し、臨床試験へ向けたデータの集積を行う。2) アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルの脳内 A $\beta$  沈着減少と認知障害発症予防が認められた (前臨床試験終了)。その分子機構として、脂肪酸摂取によって脳内脂質組成の変化が起き、その結果 A $\beta$  産生が低下して脳内 A $\beta$  沈着が抑制されることが考えられた。今後は、臨床応用に向け、長期縦断疫研究との共同研究を行い、ヒトにおける認知症予防効果を検証する。3) 脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A $\beta$  結合分子 (リーパーゼ) を発見した。この酵素は A $\beta$  と結合し、その取り込みを促進させることで、脳内 A $\beta$  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出願 1 件を行った。

4) 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) HDL 産生を増加させる候補化合物を最終的に 3 種類にまで絞って同定した。(2) アラキドン酸を豊富に含む食事やサプリメント補給によって AD 病理発現、認知障害の発症を予防できる可能性がある (前臨床試験終了)。(3) 新規 A $\beta$  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。(4) ApoE-HDL は血液脳関門形成に重要な役割を担うこと、その作用に ApoE3>ApoE4 の違いがあることを明らかにした。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara

E. Extracellular and intraneuronal HMW-A $\beta$  oligomers represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Mol. Neurodegener.*, 6: 20, 2011.

Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E. The dissociation of A $\beta$  from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A $\beta$ 42 assembly. *J Neurosci Res*, in press, 2011.

Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, and Michikawa M. Lipoprotein lipase is a novel A $\beta$ -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A $\beta$  in astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 286: 6393-6401, 2011.

Akatsu H, Ogawa N, Kanetsaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, Michikawa M. Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 300: 67-73, 2011.

Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung C-G, Komano H, and Michikawa M. Homocysteine, another risk factor for Alzheimer's disease, impairs apolipoprotein E3 function. *J. Biol. Chem.*, 285:38382-38388, 2010.

Jung C-G, Horike H, Cha B-Y, Uhm K-O, Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Iida K, Woo J-T, Michikawa M. Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor  $\beta$ .

*Biol. Pharm. Bull*, 33:1105-1111, 2010.

道川 誠 アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病 *Clinical Neuroscience* (月刊臨床神経科学), 28: 992-995, 2010

道川 誠 アルツハイマー病分子病態とアポリポ蛋白 E *医療の広場*, 第 50 巻(10号):4-5, 2010

道川 誠  
アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病  
*Clinical Neuroscience*, 28(9): 992-995, 2010

ゾウケン、道川 誠、駒野宏人 (アルツハイマー病研究部)  
アンギオテンシン変換酵素の新しい顔 : A $\beta$ 変換酵素  
ミニレビュー *生化学* 82 巻、1120-1124, 2010

## 2. 学会発表 :

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H, Michikawa M, Jung CG ATBF1 interacts with amyloid precursor protein and enhances amyloid  $\beta$ -protein production. The First International Conference on Neural Cell Culture (ICNCC 2010), June 25, 2010, Seoul, Korea.

Michikawa M Apolipoprotein E and Alzheimer's disease  
Hallym University, The 12th Iisong International Symposium, Hallym-Nagoya Academic Joint Meeting  
June 24, 2010. Anyang, Gyeonggi-do, Korea

Kazuchika N, Hosono T, Nakamura T, and Michikawa M. Effect of apolipoprotein E isoform on formation and maintenance of blood-brain-barrier function. June 7, 2010. Washington University, St. Louis, USA

Zou K, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T,

Michikawa M, Komano H.

Potent inhibition of ACE leads to Alzheimer-like pathology in APP transgenic mouse brain.

International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 11, 2010, Honolulu, Hawaii

道川 誠

アルツハイマー病

名古屋市立大学大学院医学研究科講義、2010年5月24日、名古屋

道川 誠

アルツハイマー病の臨床、分子病態と治療戦略 名古屋市立大学大学院薬学研究科講義、2010年5月27日、名古屋

道川 誠

アルツハイマー病とスタチン

脳を護るー認知症を防ぐー興和創薬・名古屋医師会共催シンポジウム  
2010年6月17日、名古屋

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠

血液脳関門機能に対するアポリポタンパク質Eアイソフォームの影響

Neuro2010, 2010年9月4日、神戸

鄭 且均、巖 景玉、三浦 裕、赤津裕康、

道川 誠

APP代謝及びAb産生機構におけるホメオティック因子ATBF1の機能解析

Neuro2010, 2010年9月3日、神戸

ゾウクン、劉 俊俊、劉 しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人

ACE阻害によるアルツハイマー病モデルマウス脳内変化の解析

Neuro2010, 2010年9月2日、神戸

道川 誠

炎症とアルツハイマー病

日本歯周病学会シンポジウム、2010年9月19日、高松

道川 誠

Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease

招待講演(客員教授授与講演)、中国瀋陽医学院・何氏視覚科学学院、2010年9月27日、瀋陽

道川 誠

アポリポ蛋白Eとアルツハイマー病

教育講演:第18回中部老年期認知症研究会

平成22年10月30日、名古屋

巖 景玉、赤津裕康、三浦 裕、道川 誠、鄭 且均

APP代謝及びAb産生におけるATBF1の機能解析

日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

西辻和親、細野 崇、内村健治、道川 誠

リポ蛋白質リパーゼは初代培養アストロサイトによるアミロイドbの取り込みを促進する 日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

細野 崇、山内玲奈、紺谷昌仙、西辻和親、

鄭 且均、河島 洋、木曾良信、道川 誠  
多価不飽和脂肪酸餌はLPSで誘導される脳内炎症を抑制する

日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

ゾウクン、劉俊俊、劉しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人

Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain

日本認知症学会、平成22年11月5日、名古屋

道川 誠 (アルツハイマー病研究部)

脳内脂質代謝は、アルツハイマー病発症に関わりうるか

第8回アルツハイマー病の早期診断・治療・予防法の開発研究会、2011年2月18日、名古屋