

201218012A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 25 (2013) 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)A β 分解除去における ApoE-HDL の役割に着目した治療法開発	15
	道川 誠	
	(イ)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	
	(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	25
	西道隆臣	
	(ウ) タウの異常病理を再現する新しい細胞モデルの構	28
	長谷川成人	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	36
IV.	研究成果の刊行物・別刷	41

1. 総括研究報告書
(平成 24 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: A β 除去とコレステロール代謝恒常性維持を目的とした HDL 療法の開発のを目指している。A β は分解される以外に血液脳関門(BBB)を介して排出される。昨年まで、BBB 培養モデルによる検討と ApoE ノックインマウスの検討から、ApoE4 型脳では BBB 透過性が亢進することを見出した。また、ApoE-HDL 産生に必要な ABCA1 欠損マウスでは、BBB 透過性の上昇が見られた。以上から、BBB 機能維持には HDL が重要であることが示唆された。また、アンチセンス-microRNA-33 処理により培養アストロサイトで ApoE, HDL 産生を増加させることを確認した。化合物とは異なる創薬の可能性がある。脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A β 結合分子であり、A β の細胞内取り込みと分解を促進することを発見した。LPL トランスジェニックマウスを作成し、APP-Tg マウスとの交配マウスを作成した。また、AD 治療法としてワクチン療法や抗体療法が試みられているが、BBB を介した脳内への抗体移行の効率が悪い。本年度我々は、A β 抗体修飾による脳内移行促進させる薬剤開発を開始し、いくつかの候補化合物が抗体の脳内移行効率を高めることを明らかにした。●富田: A β は前駆体タンパク APP より、 β および γ セクレターゼによる切断を受け産生・分泌される。この A β 産生システムはいずれも膜タンパクであり、細胞膜脂質環境と小胞輸送系に大きく影響を受けることが知られている。申請者はこれまでに、 β セクレターゼがスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 代謝系、 γ セクレターゼがセラミド代謝系の影響を受けることを明らかにした。一方、孤発性アルツハイマー病の成因については、近年の GWAS 解析により、BIN1、PICALM、CD2AP など小胞輸送関連分子遺伝子の SNP がアルツハイマー病発症リスクと相関することが示され、発症メカニズムと細胞内小胞輸送経路の変容が示唆された。本研究においては、セクレターゼ活性を制御するこれら膜脂質代謝経路および小胞輸送系に関わる分子群を解析し、その活性を制御する低分子化合物を開発することで、新規アルツハイマー病治療薬の開発を目指す。●西道: 本年度は、ネプリライシンが、その細胞内領域のリン酸化/脱リン酸化の状態によって、細胞膜への局在および活性が規定されており、リン酸化状態を制御する PP1a が、重要な役割を担っている事を明らかにした。さらに、PP1a の上流にあると考えられるソマトスタチン受容体(SSTR-1 および SSTR-4)が、ネプリライシン活性の増強に関与する可能性も見出し、これらが新たな創薬標的となる事が示唆された。一方、脳特異的な発現を示すアデノ随伴ウイルスを用いた系により、ネプリライシンによる遺伝子治療へ展開できる可能性を示すことに成功した。このような、薬理的アプローチや遺伝子治療法の確立は、ネプリライシンを基軸とした A β 分解促進のための新たな抗 AD 戦略へ発展することが大きく期待される。●長谷川: タウの蓄積機序として、最初に凝集核(シード)が形成され、正常タウがシードに結合して線維化が進行する機構を考えて、その検証を行っている。培養細胞に様々なタウオパチー患者の不溶性画分を導入し、患者脳で認められる病的なタウ蓄積を培養細胞内で再現することを試みた。ヒトタウを発現させた細胞に、タウオパチー患者脳サルコシル不溶性画分を導入したところ、発現させたタウがリン酸化されて凝集体を形成し、界面活性剤の不溶性画分に回収することが示された。タウ蓄積のない患者脳不溶性画分の場合には蓄積がおこらないこと、また不溶性画分からタウを免疫除去すると蓄積が起こらないことから、不溶性画分内の異常タウがシードとして働き、発現したタウが不溶化することが強く示唆された。また、シードとして作用する患者脳の異常タウは異常プリオンと同様、熱やプロテアーゼに対して強い安定性を有していることが示された。

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。

(道川) 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) 新たに発見した A β 結合蛋白の機能解析 (A β 分解除去機能) を行い、治療標的として確立すること、(3) 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、(4) 抗 A β 抗体を BBB を越えて脳内に効率的に移行させる技術の開発研究を行った。(富田) 本研究計画においては、神経細胞膜脂質組成及び小胞輸送系に着目し A β 産生を選択的に阻害する創薬標的分子の同定と低分子化合物のスクリーニングを行う。本年度は具体的に、1) S1P 代謝経路による A β 制御機構の分子機構解明と *in vivo* における治療効果の解析、2) GWAS より同定された孤発性 AD の遺伝学的危険因子の機能解明、の 2 点について解明を進めた。(西道) アルツハイマー病 (AD) の発症に深く関与する A β の脳内における代謝を制御する神経ペプチド-受容体-シグナル伝達システムを同定し、その機構を明らかにする。さらに、同定した機構に対するモジュレーターをマウスに投与し、脳内 A β レベルを制御することによって、アルツハイマー病の予防と治療に応用することを目的とする。

B. 研究方法

(道川) (1) 脂質代謝を制御する酵素 LPL が、A β 代謝にどのような作用を持つかを、A β との結合、アストロサイトによ

る A β の取り込み、A β の分解・除去にどのような役割を果たしているかを明らかにするために各種生化学的解析を行った。

(2) 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、どの受容体に関与するかを解析した。また、ABCA1 ノックアウトマウスを用いてエバンスブルー法による BBB 透過性解析を行った。(3) 培養アストロサイトを準備し、これに microRNA-33 およびコントロール microRNA, antisense-microRNA-33 を処理して、培地における ApoE, HDL レベルを解析した。(4) A β 抗体に化合物を結合させて修飾し、BBB を介して脳内に移行する効率を解析した。(富田) ① A β 産生に影響を与える新規 GPCR の RNAi スクリーニングにより得られた候補分子について、主に培養細胞と薬理学的実験を利用して解析を進めた。② GWAS 解析より AD の遺伝学的危険因子と同定された遺伝子のうち、BIN1 (Bridging integrator 1) および PICALM (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) の発現変動が A β 産生に与える分子機構について精査した。

(西道) ネプリライシン活性制御因子として、神経ペプチドの一つソマトスタチンや神経成長因子 (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) の同定に至っている。これらによるネプリライシン活性制御機構の詳細を明らかにし、新たな創薬標的を提示する。一方、末梢投与により脳特異的な発現を示すアデノ随伴ウイルス系を確立しており、この系を用いたネプリライシンによる AD に対する遺伝子治療法の可能性を提起するために、AD モデルを用いて、そ

の効果を検証する。(長谷川) 培養細胞でアルツハイマー病(AD)の患者脳に蓄積するタウのリン酸化や蓄積を再現するモデルは多数報告されているが、リン酸化の質、量、ユビキチン化、さらには蓄積の状態や不溶性タウの構造は、実際のAD患者脳に蓄積するタウのものとは本質的に異なっている。我々は、線維化したタウや α シヌクレインをリポフェクション試薬を用いて細胞内に導入すると細胞内で発現した正常蛋白分子がリン酸化やユビキチン化を受けて蓄積することを見いだした。この結果から、細胞内に形成した異常蛋白分子が一つの細胞に留まらず、細胞間を伝わることにより、同じ病変が脳全体に広がることで病気が進行するという考えに至り、「細胞内異常タンパク質伝播仮説」(図1)を提唱している。今年度はADを含むタウオパチー患者脳に実際に蓄積する異常タウを細胞内に導入し、発現させたタウを蓄積させるかどうか、またそのシード能はどのような性質によるものかを検討した。AD、ピック病 (PiD)、FTDP-17 (Intron 10+16 変異)のそれぞれの患者剖検脳(側頭葉あるいは頭頂葉)を1% Sarkosyl, 0.8M NaClを含むトリス緩衝液でホモジナイズし、15000rpm, 10分の遠心後、上清をとり、それを超遠心することでSarkosyl不溶性画分を調製した。得られた画分を生理食塩水にて洗浄後、少量のリン酸緩衝液にけん濁し、超音波処理により均一に分散させ、これをシードとして、ヒト3リピート(3R)タウ、4リピート(4R)タウを発現するSH-SY5Y細胞に遺伝子導入試薬を用いて導入した。シード添加後2日間培養を行った後、細胞を回収し、50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1% Sarkosylを含む緩衝液で順次可溶化し、得られたそれぞれの画分を電気泳動した。PVDF膜に転写後、抗タウ抗体(T46, HT7)、抗リン酸化タウ抗体(pS396)等を用いてイムノブロット解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験についてはそれぞれの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て行った。すべての遺伝子操作はそれぞれの施設の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関わる申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。また、剖検脳からの試料調製については各施設の倫理委員会に申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C. 結果および D. 考察

●道川: ABCA1 マウスの BBB 透過性をエバンスブルー法で定量した結果、野生型マウスに比べて BBB 透過性亢進が認められた。昨年の結果と考え合わせると、脳内における HDL 産生が、BBB 機能維持にとって重要であると考えられた。脳内 HDL を増加させることを目的に microRNA-33 に注目した研究を行った。microRNA-33 は血中において ABCA1 発現を負に制御し、HDL 産生を低下させることが知られている。しかし脳内作用は不明であった。そこでアストロサイト培養を用いて、microRNA-33 およびアンチセンス microRNA-33 の効果を解析した。結果として、神経系細胞である培養アストロサイトにおいても、microRNA-33 が HDL 産生を抑制し、アンチセンス microRNA-33 は産生を増加させた。この結果は、化合物による治療法開発以外に短い核酸による療法の可能性を示している。LPL は脳内でも発現することが知られているが、その役割は不明であった。最近我々は、LPL がアミロイド β (A β)の新規結合蛋白であり、A β の分解に非常に大きな役割を果たすという発見をした。LPL の生体における A β 分解除去作用を明らかにするために LPL トランスジェニックマウス(LPL-Tg)を昨年度作製した。本研究では、LPL が脳内 A β 代謝ならびに認知機能に与える影響を、LPL-Tg マウスならびに APP-Tg マウス(アルツハイマー病モデルマウス)を用いて検討する。また、LPL が全身で過剰発現されたときの、体循環系ならびに脳内における脂肪酸代謝への影響も合わせて解析する。

我々は、リポタンパクリパーゼ (LPL) が A β の新規結合蛋白であり、A β の分解に非常に大きな役割を果たすという発見をした。LPL が生体においても A β 分解除去に働いていることを明らかにするために LPL トランスジェニックマウス (LPL-Tg) を作製した。今年度は、LPL-Tg マウスとアルツハイマー病のモデルマウスである APP-Tg マウスとのダブルトランスジェニックマウスを作成した。現在このマウスを加齢させている。これらのマウスの脳解析は、来年度に行う予定である。

また、細胞レベルで LPL の A β 取り込み・分解作用を検証するために、培養細胞に APP 遺伝子ならびに LPL 遺伝子を過剰発現させた培養系を確立し、*in vitro* における LPL の機能を解析した。その結果、細胞内に発現する LPL によっても細胞外の A β を取り込み、分解させることが明らかになった。次年度以降に動物モデルでの検討に備え LPL トランスジェニックマウスを作成し、APP-TG マウスとの交配マウスを作成し、現在加齢させている。解析は平成 25 年度になる予定である。A β は ApoE-HDL に結合して分解されるもの、LPL に結合して分解されるもの、ならびに BBB を介して脳外へ排出されるものがある。現在 AD 治療法としてワクチン療法や抗体療法が試みられているが、BBB を介した脳内への抗体移行の効率が悪い。仮に BBB を介した脳内への抗体移行の効率を促進される方法が開発されれば、使用する抗体量を減らすことが可能といなり、大きな財政的な貢献ができる。本年度我々は、A β 抗体修飾による脳内移行促進させる薬剤開発を開始し、いくつかの候補化合物が抗体の脳内移行効率を高めることを明らかにした。また、この化合物による脳内移行効率の増加が、ApoE アイソフォーム依存的であるかどうかを検討する必要がある。

● (富田①)前年度までに見出していた A β 産生を低下させる γ セクレターゼモジュレーター FTY720、KRP-203 の標的候補

分子を検討し、特に神経系培養細胞において EDG6/S1PR4 のノックダウンにより FTY720 による A β 産生効果が失われることを見出した。また FTY720 の薬理作用において Gi 阻害剤である Suramin が影響を与えなかった。②GWAS 解析より孤発性 AD 患者において BIN1 および PICALM 遺伝子近傍に存在する SNP が遺伝学的危険因子として同定された。これまでに培養細胞を用い BIN1 が BACE1 の発現量を制御していること、PICALM が γ セクレターゼの局在を制御していることを見出していた。それぞれの分子機構についてさらに検討を進め、BIN1 については BACE1 の細胞質内領域と直接結合し、リサイクリングエンドソームからリソソームへの輸送を正に制御している、A β 産生抑制因子であることが明らかとなった。一方 PICALM は γ セクレターゼ構成因子のうち特に Nicastrin の細胞質内領域に直接結合していること、 γ セクレターゼのリソソーム局在化を亢進することで A β 42 産生を亢進させる因子であることが示された。実際、リソソーム成熟化を抑制する PIKfyve 阻害剤である YM201636 によっても A β 42 産生比率の低下が確認された。またマウス *Picalm* ノックアウトマウスの解析を開始し、ホモノックアウトマウスが耐性致死であるがヘテロノックアウトマウスでは発生異常が見られないこと、さらにヘテロノックアウトマウスでは脳内 A β 42 存在比率が有意に低下していることが明らかとなった。①神経細胞における FTY720、KRP-203 の標的分子として、EDG6/S1P4 受容体が示唆された。またこのシグナル経路は低分子量 G タンパク質を介していない、新規メカニズムであることが示唆された。この受容体に関連する特異的リガンドや低分子化合物の開発はアルツハイマー病治療薬開発につながる可能性がある。② BIN1 の BACE1 発現量へ与える分子メカニズムとして、リソソームへの分解経路の制御であることが示唆され、BIN1 機能を亢進させることで A β 産生を抑制でき

る可能性が考えられた。また BIN1 は神経細胞シナプスにおける活動電位依存性神経伝達物質の放出にも関与しており、神経活動に応じた A β 産生・分泌に関連していることも考えられた。一方、PICALM については、 γ セクレターゼのリソソーム局在化による A β 42 産生亢進機能が示され、低分子化合物による制御の可能性についても明らかとなった。さらにノックアウトマウスを用いた個体レベルでの検証により、PICALM 機能の部分的抑制によって A β 42 蓄積の低下が期待されたことから、アルツハイマー病モデルマウス A7 との交配を開始した。

● (西道) 神経成長因子 (NGF, BDNF, NT-3, NT-4) によるネプリライシンの活性制御機構の解析から、ネプリライシンの局在は、ネプリライシン細胞内領域 (N 末端から 6 残基目のセリン) のリン酸化/脱リン酸化により制御されている事が明らかとなった (Kakiya N. et al. JBC 2012)。特に、protein phosphatase 1a (PP1a) が、ネプリライシン活性の増強に関与している事が明らかとなった。これは、以前我々が報告した、ネプリライシン活性増強因子: ソマトスタチンの作用と共通の分子機構である可能性が示唆された。そこで、初代培養神経細胞へソマトスタチンを添加した結果、PP1a の発現が増強する事を明らかにした。また、PP1a は、DARPP32 の作用により活性化している事も示唆された。次に、ネプリライシン活性に対するソマトスタチン受容体 (SSTR) アゴニストのスクリーニングを行った結果、SSTR-1 と SSTR-4 特異的なアゴニストにより、ネプリライシン活性が増強する事を明らかにした。一方、ネプリライシンによる遺伝子治療を確立するために、末梢投与ながら脳特異的な発現を示すアデノ随伴ウイルス (rAAV9) にネプリライシン cDNA を神経特異的なプロモーターと共に組み込んだ rAAV9-NEP を作製し、マウスでの効果を検証した。その結果、導入したネプリライシンは想定通りの発現パターンを示す事が確認されたため、次に AD モデルマウスとしてまず、APP トラン

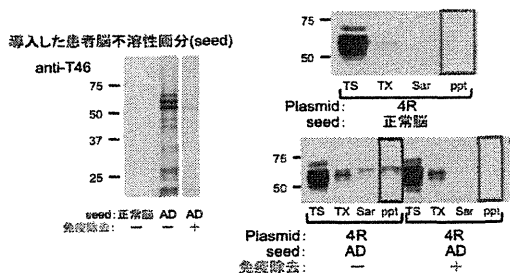
スジェニックマウス (APP-Tg) への、rAAV9-NEP の導入を試みた。rAPPV9-NEP の導入により、APP-Tg マウスの脳内 A β レベルの低下が確認され、行動異常の改善も認められた (Iwata N. et al. Sci. Rep. 2013)。A β 分解酵素ネプリライシンの活性は、その細胞内領域のリン酸化/脱リン酸化状態により規定されていることから、これら制御に関与する因子が新規創薬候補として挙げられる。特に、ネプリライシン活性の増強に関与するソマトスタチンは、その受容体 SSTR がヘテロダイマーを形成することや、SSTR-4 単独の欠損マウスの解析では、ネプリライシン活性の変化や脳内 A β 量に変化が認められていないことから、SSTR-1 と SSTR-4 が協調的に作用している可能性が考えられる。細胞膜に局在する受容体は、創薬標的として好都合であり、今後の詳細な解析が待たれる。rAAV9-NEP による遺伝子治療の可能性は、その発現特異性から、末梢投与という簡便な方法で脳 (神経) 特異的な遺伝子導入が可能になると考えられ、汎用性と安全性を両立させた方法となりえるだろう。

● (長谷川) 1. 培養細胞内への患者脳タウシードの導入: はじめに、培養細胞内にシードを導入し、内在性に発現しているタウが蓄積するかどうかを検討した。培養細胞内に患者脳由来シードを導入してから 2 日間培養した後、細胞を回収し界面活性剤を用いて細胞成分を 4 つの分画に分けてイムノブロット解析を行った。しかし、いずれの患者脳由来シードを細胞内に導入しても、ppt 画分にはバンドが検出されなかった。次に、培養細胞に 3R1N、4R1N タウ、あるいはその両方を発現させ、イムノブロットにて解析した。その結果、TS 画分に強いバンドが検出され、細胞内にタウが発現し、それが可溶性画分に回収されることが確認されたが、培養細胞にタウを一過性に過剰発現させただけでは ppt 画分にはバンドは検出されなかった。一方、タウを発現させた細胞に患者脳由来シードを導入すると、TS 画分だけでなく、ppt 画分にもバンドが検出された。興味深いことに、細

胞に発現させたタウのアイソフォームと導入したシード内に含まれているタウのアイソフォームが一致するときに ppt 画分にバンドが検出され、タウの蓄積が起きていることが確認された (下図)。

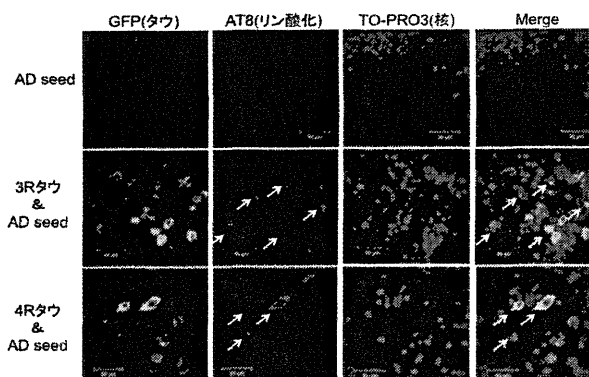
免疫除去によるタウの蓄積阻害の検討

- ①タウの蓄積がない正常脳の不溶性画分を細胞内に導入
- ②タウ抗体を用いて免疫除去した患者脳シードの導入



患者脳不溶性画分からタウを免疫除去すると、タウ蓄積は起こらない → タウの免疫療法の可能性

すなわち、3R タウと 4R タウが両方蓄積する AD 由来シードを加えた細胞では、3R タウあるいは 4R タウ発現細胞いずれの細胞でもタウは蓄積し、3R タウが蓄積する PiD 由来シードを加えた細胞では 3R タウ発現細胞でのみ蓄積した。また、4R タウが蓄積する FTDP-17 由来シードを加えた細胞では 4R タウ発現細胞でのみ蓄積がみられた。この蓄積は免疫組織染色による観察でも確認された (下図)。したがって、培養細胞に発現させたタウは、シード依存かつアイソフォーム依存的に蓄積することが示された。

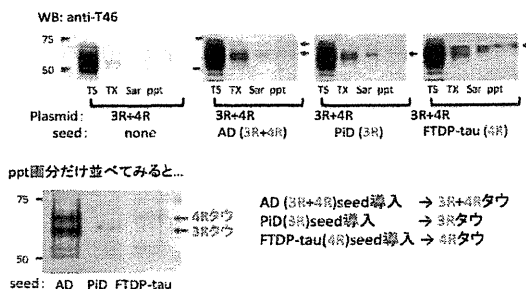


2. 免疫除去によるタウの蓄積阻害の検討

タウオパチー患者脳から抽出したサルコシル不溶性画分には、タウ以外に

様々なタンパク質が含まれている。これまで観察された培養細胞におけるシード依存的なタウの凝集が、シード内の異常タウが原因であるのかを調べる必要がある。そこで、タウ蓄積のない剖検脳不溶性画分、あるいはタウを選択的に取り除いた患者脳不溶性画分を培養細胞に導入し、培養細胞に発現させたタウが蓄積するかどうかを検討した。免疫除去は、非リン酸化タウ特異的抗体とリン酸化タウ特異的抗体の複数の抗体を組み合わせで行った。また、免疫除去後に患者脳由来不溶性画分内から異常タウの多くが除去されていることを確認した後、培養細胞内にこれらの不溶性画分を導入し、発現させたタウの不溶度を不溶性画分の免疫沈降前後で比較した。その結果、タウ蓄積がない患者脳不溶性画分を導入した場合や、タウを除去した不溶性画分を導入した細胞では、不溶性画分に全くタウのバンドが検出されず、タウ蓄積が起これないことが示された (下図)。

3Rタウと4Rタウを共発現させた細胞に患者脳不溶性画分を導入



→ アイソフォーム依存的な蓄積が確認

3. シードの熱安定性

タウのシード依存的な構造変化は、プリオン病の原因分子である異常プリオンのそれとよく似ている。蓄積するタウの構造も、クロス β 構造を有している点で異常プリオンと共通している。異常プリオンの構造は非常に安定であり、熱やプロテアーゼ、放射線、ホルマリンなどの処理をしてもシーディング能力は保たれることが知られている。そこで、患者脳に蓄積する異常タウが異常プリオンと同

様の性質を有しているか検討するため、患者脳由来不溶性画分に熱処理を加えシード能が保たれるかどうかを調べた。

熱処理前後の患者脳由来不溶性画分をタウ発現細胞に導入し解析しところ、いずれの患者脳シードにおいても、熱処理の有無に関わらず細胞内に発現させたタウが蓄積することが示された。すなわち、タウオパチ-患者脳に蓄積した異常タウは、異常プリオンと同様、熱に対して安定な性質を持つことが明らかとなった。

4. シードのプロテアーゼ安定性

次に、患者脳由来不溶性画分にプロテアーゼ処理を施し、シーディング能力が保たれるかどうかを調べた。患者脳に蓄積した異常タウをプロテアーゼで処理すると、特定の構造を持たない表層部分は分解されるが、分子同士が密に結合している線維の中心部分(線維のコア領域)は分解されずに残ることが報告されている。トリプシン、キモトリプシン、Protenase Kなどのプロテアーゼで処理した患者脳由来不溶性画分をタウ発現細胞に導入したところ、いずれの不溶性画分を加えた細胞においても不溶性画分にバンドが出現し、タウが蓄積することが示された。すなわち、タウオパチ-患者脳に蓄積した異常タウ線維は異常プリオンと同様、プロテアーゼに安定な性質を持っていることが示された。

E. 結論

●道川: 1) HDL 産生ができない ABCA1 ノックアウトマウスでは、BBB の透過性の更新が見られた。昨年度の結果と合わせて考えると、この原因として脳内 HDL が存在しないためである可能性が考えられた。(2) microRNA-33 が培養アストロサイトで ApoE, HDL 産生を低下させ、アンチセンス microRNA-33 が増加させることを確認した。化合物とは異なる創薬の可能性はある。(3) 脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A β 結合分子であり、A β の細胞内取り込みと分解を促進することを発見した。LPL

トランスジェニックマウスを作成し APP-Tg マウスと交配させたマウスを作成し加齢させている。(4) ワクチン療法や抗体療法が試みられているが、BBB を介した脳内への抗体移行の効率が悪い。本年度我々は、A β 抗体修飾による脳内移行促進させる薬剤開発を開始し、いくつかの候補化合物が抗体の脳内移行効率を高めることを明らかにした。●①FTY720 や KRP-203 による EDG6/S1PR4 経路を介した A β 産生制御システムは新規アルツハイマー病治療薬開発における新規創薬標的分子であると考えられた。②GWAS 解析より見出された BIN1、PICALM はそれぞれ β 、 γ セクレターゼの発現や局在を変化させることによって A β 産生レベルを調節、ひいてはアルツハイマー病発症に関与している。特に PICALM 機能の部分的抑制薬はアルツハイマー病発症を抑制する可能性がある。●西道: A β 分解酵素ネプリライシンの活性は、神経成長因子を起点とする MAPK 経路により抑制され、ソマトスタチンを起点とする PP1a を介した経路によりネプリライシン活性が増強される。また、ソマトスタチンは、SSTR-1 および SSTR-4 を介してシグナル下流の PP1a の活性化に関与している事も示唆された。このように、ネプリライシン活性の制御機構が明らかになったことで、ネプリライシン活性賦活化のための新規創薬標的を提示できた。更に、ネプリライシンの遺伝子治療の可能性を示したことで、ネプリライシンを基軸とした A β 分解促進のための新たな抗 AD 戦略へ発展することが期待される。この戦略を樹立するために、更に詳細な解析を進めている。●長谷川: 培養細胞に AD, PiD, FTDP-17 のそれぞれの患者剖検脳由来の不溶性タウを導入すると蓄積するタウのアイフォームに一致して、同じタウアイソフォームの蓄積が起こることが示された。タウの蓄積がない患者脳不溶画分やタウを免疫除去した不溶性画分を導入した場合には蓄積がおこらないことから、不溶性画分中の異常タウがシード能を有

することが強く示唆された。それぞれの患者脳不溶性画分中のタウのシーディング能は、異常プリオンと同様、熱安定、プロテアーゼ安定性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Zou K, Liu J, Watanabe A, Hiraga S, Liu S, Tanabe C, Maeda T, Terayama Y, Takahashi S, Michikawa M, Komano H.

A β 43 is the earliest depositing A β species in APP transgenic mouse brain and is converted to A β 41 by two active domains of ACE

Am J Pathol, in press.

Hosono-Fukao T, Ohtake-Niimi S, Hoshino H, Akatsu H, Hossain M, Nishitsuji K, van Kuppevelt, Kimata K, Michikawa M, Wyss-Coray T, Uchimura K. Heparan Sulfate Subdomains that are Degraded by Sulf Accumulate in Cerebral Amyloid β Plaques of Alzheimer's Disease : Evidence from Mouse Models and Patients.

Am J Pathol, 180(5): 2056-2067, 2012.

Yasuno F, Tanimukai S, Sasaki M, Hidaka S, Ikejima C, Yamashita F, Kodama C, Mizukami K, Michikawa M, Asada T.

Association between cognitive function and plasma lipids of the elderly after controlling for apolipoprotein E genotype. Am. J. Geriatr. Psychiat. 20(7): 574-583, 2012.

道川 誠

アルツハイマー病の分子病態と ApoE 細胞工学 31 巻 No10, p1135-1138, 2012

Ito and Michikawa

Regulation by FGF-1 of apoE/HDL generation in astrocytes.

Apolipoproteins-Regulatory Functions , Health Effects and role in disease,

Editors, Sidorov A.D, and Nikitin M.Y. Nova Biomedical. 131-143, 2012

道川 誠

アルツハイマー病研究の進歩—特に脂質代謝と関連して

老年期認知症研究会 19 巻(No. 2) 2012 年

道川 誠

アルツハイマー病の危険因子アポリポタンパク質 E4 の疾患発症の分子機構に関する最近の知見と新薬開発への応用おのの可能性

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス Vol 44, No1, 21-25, 2013

Takeo K, Watanabe N, Tomita T*, Iwatsubo T: Contribution of γ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. *J Biol Chem* 287(31):25834-25843, 2012

Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng 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 Cleavage of Neuroligin 1. *Neuron* 76(2):410-422, 2012

Takagi-Niidome S, Osawa S, Tomita T*, Iwatsubo T: Inhibition of γ -secretase activity by a monoclonal antibody against the extracellular hydrophilic loop of presenilin 1. *Biochemistry* 52(1):61-69, 2013.

Imamura Y, Umezawa N, Osawa S, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Iwatsubo T, Kato N, Tomita T*, Higuchi T: Effect of helical conformation and side-chain structure on γ -secretase inhibition by β -peptide foldamers: Insight into substrate recognition. *J Med Chem* in press

Kakiya, N., Saito, T., Nilsson, P., Matsuba, Y., Tsubuki, S., Takei, N., Nawa, H., Saido T.C. (2012) Cell-surface expression of the major A β degrading enzyme, neprilysin, depends on phosphorylation by MEK and dephosphorylation by protein phosphatase 1a. *J. Biol. Chem.*, 287, 29362-29372.

Y Abramowski, D., Rabe, S., Upadhaya, A.R., Reichwald, J., Danner, S., Staab, D., Capetillo-Zarate, E., Yamaguchi, H., Saido, T.C., Wiederhold, K.H., Thal, D.R., Staufenbiel, M. (2012) Transgenic expression of intraneuronal A β 42 but not A β 40 leads to cellular A β lesions, degeneration, and functional impairment without typical Alzheimer's disease pathology. *J. Neurosci.*, 32, 1273-1283.

Schlenzig, D., Rönicke, R., Cynis, H., Ludwig, H.H., Scheel, E., Reymann, K., Saido, T., Hause, G., Schilling, S., Demuth, H.U. (2012) N-terminal Pyroglutamate (pGlu) formation of A β 38 and A β 40 Enforces Oligomer Formation and Potency to Disrupt Hippocampal LTP. *J. Neurochem.*, 121, 774-784.

Iwata, N., Sekiguchi, M., Hattori, Y., Takahashi, A., Asai, M., Ji, B., Higuchi, M., Staufenbiel, M., Muramatsu, S., Saido T.C. (2013) Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice.

Sci. Rep., in press.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M, Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain. *Brain* in press.

Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya, Y Kokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. (2013). Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:15-20.

Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 2012; 7(12): e52389

Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama M, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DMA, Tamaoka A (2012). Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. *Brain* 135; 3380-3391.

Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Takashi Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H. A (2012). Drug-Screening Platform for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4(145): 145ra104.

- Parker SJ, Meyerowitz J, James JL, Liddell JR, Nonaka T, Hasegawa M, Kanninen KM, Lim SC, Paterson BM, Donnelly PS, Crouch PJ, White AR. (2012). Inhibition of TDP-43 accumulation by bis(thiosemicarbazonato)-copper complexes. *PLoS One* 7(8): e42277.
- Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S (2012). α -Synuclein Pathology in the Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71: 625-30.
- Wang Y, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Srujijes K, Trojanowski JQ, Lee VMY, Siderowf AD, Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind E, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J (2012). Phosphorylated α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Sci Transl Med.* 4: 121ra20.
- Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, and Hisanaga S (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32: 2430-2441.
- Takahashi M, China Y, Nonaka T, Hasegawa M, Watanabe N, Arai T, (2012). Prolonged nitric oxide treatment induces tau aggregation in SH-SY5Y cells, *Neurosci Lett* 510 : 48– 52.
- Iguchi Y, Katsuno M, Takagi S, Ishigaki S, Niwa JI, Hasegawa M, Tanaka F, Sobue G. (2012) Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol Dis.* 45: 188-195.
- Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A and Hasegawa M (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121.
2. 学会発表
- Makoto Michikawa
Effects of apoE on lipid transport in the brain and Alzheimer disease
ApoE, ApoE receptors and Neurodegeneration Symposium
June 4th-5th, 2012, Mayo Clinic
Jacksonville, FL, USA
- 道川 誠
口腔疾患とアルツハイマー病
第14回抗加齢歯科医学研究会
2012年11月11日、東京
- 道川 誠
アルツハイマー病の血管因子
第31回日本認知症学会 シンポジウム
「血管性認知症研究の最前線」
2012年10月26日、つくば
- Michikawa M.
Oral diseases as a risk for Alzheimer disease
Nagoya City University and Hallym University joint symposium.
2013,1.14, Hallym University, Korea
- 道川 誠
脳内脂質代謝変動とアルツハイマー病分子病態

一Apolipoprotein E 依存的脂質輸送との
関連から一

北海道大学大学院薬学研究院

2012-7-2

Michikawa M. et al, Arachidonic acid
diet prevents memory impairment and
brain Abeta deposition in Tg2576 mice.

Symposium: PUFA and its derivatives-
Brain and neuroprotective agents for
senescence. ISN-ESN, Aug 30, 2011,
Athens, Greece.

道川 誠

口腔疾患とアルツハイマー病

日本抗加齢医学会総会 シンポジウム

2012年6月23日(土) 横浜

道川 誠

特別講演 1. Apolipoprotein E の脳内機
能とアルツハイマー病

第9回合同地方会

2012年2月9日(土)、岡山

ゾウクン、劉俊俊、渡邊淳、劉しゅ余、
田邊千晶、前田智司、寺山靖夫、高橋智、
道川誠、駒野宏人

Early deposition of Ab43 in APP
transgenic mouse brain

第31回日本認知症学会 2012年10月26
日、つくば

辻田麻紀・秋田展克・横山信治・野路久
仁子・道川 誠

高グルコースにより誘発される低 HDL
産生の分子制御機構の解明

High D-glucose reduced apoA-I and
HDL generation in liver cells

第85回日本生化学会、2012年12月15
日、福岡

伊藤仁一、星川真理子、長安祐子、道川
誠

アストロサイトによって放出される
FGF-2 の apoE/HDL 新生促進作用

第85回日本生化学会、2012年12月15
日、福岡

Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, M Anwar
Hossain, Frank J Gonzalez, Shinji
Yokoyama and Makoto Michikawa

Stress-mediated acute corticosterone
production is depending on plasma HDL
level but not long-term stress response in
mice

チトクローム P450 発見 50 周年記念シン
ポジウム、2012年12月2日、福岡

Taisuke Tomita*, Yuichi Morohashi,
Kunihiko Kanatsu, Takeshi Iwatasubo:
PICALM regulates Aβ42 production by
modulation of γ-secretase trafficking.
AAIC2012. July 16, 2012, Vancouver,
Canada

Taisuke Tomita*: Activity dependent
membrane protein processing and AD.
October 7, 2012, Workshop on
Alzheimer's disease and related
disorders. Taipei, Taiwan

Taisuke Tomita*, Shizuka
Takagi-Niidome, Takeshi Iwatasubo: The
α-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

Toji Miyagawa, Yuichi Morohashi, Shoji
Tsuji, Taisuke Tomita*, Takeshi Iwatasubo:
BIN1 negatively modulates Aβ
production from cultured cells.
Neuroscience 2012. October 15, 2012,
New Orleans

Taisuke Tomita*, Shizuka
Takagi-Niidome, Tomoki Sasaki, Takeshi
Iwatasubo: Hydrophilic loop 1 and the C

terminus of presenilin 1 are involved in the initial substrate binding of the γ -secretase. March 6-10, 2013, AD/PD 2013, Florence, Italy

Koji Takeo, Shun Tanimura, Ivan Krasmirov Zahariev, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Taisuke Tomita*, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type γ -secretase modulators. March 6-10, 2013, AD/PD 2013, Florence, Italy

富田泰輔*: γ 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

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

富田泰輔*: γ 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

富永綾、富田泰輔*、岩坪威: γ -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 2012年10月26日 第31回日本認知症学会学術集会 つくば

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

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

富田泰輔*: γ 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

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

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

Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita*, Kunihiko Kanastu, Takeshi Iwatsubo: PICALM regulates $A\beta_{42}$ production by modulation of γ -secretase trafficking. December 11, 2012, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Fukuoka, Japan.

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.

富田泰輔*: セクレターゼ活性の制御によるアルツハイマー病治療薬開発 2013年3月1日 第29回高峰カンファレンス 東京

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 β 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

富田泰輔*: セクレターゼ活性の制御とシナプス機能の分子連関 2013年3月28日 日本薬学会 133 年会 横浜

- Saido, T.C. A single locus knockin mouse model of AD. Neuroscience 2012, New Orleans, USA 2012, 10.
- Saido, T.C. A single-locus knock-in mouse model of AD. Workshop on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Xinbei, Taiwan 2012, 10.
- 西道隆臣. アルツハイマー病の新しい遺伝子改変モデル. アルツハイマー病の最先端研究シンポジウム in 熊本, 熊本, 日本, 2012, 9.
- 西道隆臣. 新しいアルツハイマー病モデルマウス: Single locus knockin mice. 第45回広島神経医科学研究会, 広島, 日本, 2013, 1.
- Hasegawa M: Prion-like Spreading of Pathological a-synuclein in Brain. The 17th Takeda Science Foundation Symposium □on Bioscience, Osaka [2012. 12. 6]
- 長谷川成人: レビー小体と α シヌクレイン. 第6回 レビー小体型認知症研究会 (レビー小体発見100周年記念大会), 横浜 [2012.11.10]
- 長谷川成人: 非アルツハイマー型認知症研究の最前線 第2回 都医学研シンポジウム 脳神経疾患の臨床・研究の拠点形成による医療イノベーション, 東京 [2012. 11. 28]
- 長谷川成人: TDP-43 と関連疾患. 第31回 日本認知症学会学術集会 教育講演2 「病因仮説再考」, 筑波 [2012. 10. 26]
- 長谷川成人: 蓄積タンパク質の解析から発症機構の解明、治療法の開発へ. 国立精神・神経医療研究センター病院 第7回 精神医療セミナー, 東京 [2012.11.20]
- 鈴掛雅美, 長谷川成人: 異常 α シヌクレインの脳内伝播. 第3回神経科学と構造生物学の融合研究会/大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪 [2012. 10. 5]
- 長谷川成人ら: 難病 ALS や若年性認知症の TDP-43 の解析、病態を解明, 日経新聞朝刊, マイナビニュースなど [2012. 9. 12]
- 長谷川成人: 神経変性疾患の分子病態機序. 日本食品免疫学会 2012 年度大会 (JAFI2012) 「高齢化社会における食品免疫学の役割」シンポジウム1 「健康寿命の延伸と食品免疫学の可能性」, 東京 [2012. 10. 16]
- 長谷川成人: 神経疾患と異常タンパク質. 第13回北海道神経変性疾患治療研究会, 札幌 [2012. 9. 14]
- 秋山治彦、長谷川成人、野中隆: 「脳の老化を科学する」第10回サイエンスカフェ in 上北沢 東京 [2012. 8. 3]
- 長谷川成人: 神経疾患における異常タンパク質のプロテオミクス解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会 シンポジウム S5 医学の最前線とプロテオミクス, 東京 [2012. 7. 27]
- 長谷川成人: 神経疾患研究とプロテオミクス. 「包括脳ネットワーク」リソース・技術開発支援拠点「神経細胞プロテオミクス」チュートリアル「神経科学へのプロテオミクスの応用」仙台 [2012. 7. 25]
- 長谷川成人: 分子間の Propagation の機序と蛋白癌仮説. 神経変性疾患に関する調査研究班 平成24年度ワークショップ Propagation 仮説最前線 - 分子から細胞、細胞から個体へ -, 東京 [2012. 7. 20]
- 長谷川成人: 神経変性疾患は「蛋白癌」か?. 名古屋大学グローバル COE プログラム 機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点 グローバル COE 第5回国内シンポジウム, 名古屋 [2012. 7. 19]

長谷川成人, 野中隆, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村山繁雄, David Mann, 新井哲明, 秋山治彦: ALS と TDP-43 の生化学. 第 53 回神経病理学会総会シンポジウム 2 「筋萎縮性側索硬化症: TDP-43 の発見とその後」, 新潟 [2012. 6. 30]

長谷川成人, 野中隆, 増田 (鈴掛雅美, 辻浩史, 玉岡晃, 吉田眞理, 村山繁雄, 新井哲明, 秋山治彦: 「蛋白癌」としての神経変性疾患. 第 53 回神経学会総会シンポジウム S (3) 神経変性疾患の病態解明・その病態とバイオマーカーの開発を目指して, 東京 [2012. 5. 25]

長谷川成人: 認知症研究の最前線 -異常たんぱく質を排除しろ-. 第 1 回 都医

学研 都民講座 「たんぱく質からみた健康と病気」, 東京 [2012. 4. 18]

長谷川成人: 「蛋白癌」としてのアルツハイマー病. 北海道大学 IBL 寄附講座シンポジウム, アルツハイマー病研究の進展と治療戦略. 平成 23 年 2 月 23 日, 札幌 [2012. 2. 23]

長谷川成人: 異常タンパク分子から解明される神経変性疾患の新しい考え方. 首都大学東京 化学コースセミナー, 東京 [2012. 2. 3]

H. 特許申請
なし

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

A β 分解除去における ApoE-HDL の役割に着目した治療法開発

分担研究者：道川 誠 (国立長寿医療センター)

研究概要) A β 除去とコレステロール代謝恒常性維持を目的とした HDL 療法の開発を目指している。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。

A β は分解される以外に血液脳関門(BBB)を介して排出される。AD や ApoE 欠損マウスでは BBB 機能障害が知られるが、分子機構は不明である。昨年度は、内皮、周皮、アストロサイト細胞から成る BBB 培養モデルを作り、ApoE4 ノックイン(KI)マウスからアストロサイトを培養した BBB モデルでは ApoE3 に比して BBB 形成が不良であること、ApoE3-, ApoE4-KI マウスの BBB 透過性をエバンスブルー法で定量した結果、ApoE4 型マウスでは BBB 透過性亢進が認められた。また、ApoE-HDL 産生に必要な ABCA1 欠損マウスでは、BBB 透過性の上昇が見られた。以上から、BBB 機能維持には HDL が重要であることが示唆された。

また、アンチセンス-microRNA-33 処理により培養アストロサイトで ApoE, HDL 産生を増加させることを確認した。化合物とは異なる創薬の可能性はある。

脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A β 結合分子であり、A β の細胞内取り込みと分解を促進することを発見した。LPL の代謝調節は治療標的になると考え(特許出願済)、LPL トランスジェニックマウスを作成し、APP-Tg マウスとの交配マウスを作成した。現在加齢をさせて次年度に解析予定である。

現在 AD 治療法としてワクチン療法や抗体療法が試みられているが、BBB を介した脳内への抗体移行の効率が悪い。仮に BBB を介した脳内への抗体移行の効率を促進される方法が開発されれば、使用する抗体量を減らすことが可能といなり、大きな財政的な貢献ができる。本年度我々は、A β 抗体修飾による脳内移行促進させる薬剤開発を開始し、いくつかの候補化合物が抗体の脳内移行効率を高めることを明らかにした。

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) 新たに発見した A β 結合蛋白の機能解析 (A β

分解除去機能) を行い、治療標的として確立すること、(3) 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、(4) 抗 A β 抗体を BBB を越えて脳内に効率的に移行させる技術の開発研究を行った。

B. 研究方法 (1) 脂質代謝を制御する酵素 LPL が、A β 代謝にどのような作用を持つかを、A β との結合、アストロサイトによる A β の取り込み、A β の分解・除去にどのような役割を果たしているかを明

らかにするために各種生化学的解析を行った。(2) 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、どの受容体が関与するかを解析した。また、ABCA1 ノックアウトマウスを用いてエバンスブルー法による BBB 透過性解析を行った。(3) 培養アストロサイトを準備し、これに microRNA-33 およびコントロール microRNA, antisense-microRNA-33 を処理して、培地における ApoE, HDL レベルを解析した。(4) A β 抗体に化合物を結合させて修飾し、BBB を介して脳内に移行する効率を解析した。

C. 結果および D. 考察

ABCA1 マウスの BBB 透過性をエバンスブルー法で定量した結果、野生型マウスに比べて BBB 透過性亢進が認められた。昨年の結果と間が和え合わせると、脳内における HDL 産生が、BBB 機能維持にとって重要であると考えられた。脳内 HDL を増加させることを目的に microRNA-33 に注目した研究を行った。microRNA-33 は血中において ABCA1 発現を負に制御し、HDL 産生を低下させることが知られている。しかし脳内作用は不明であった。そこでアストロサイト培養を用いて、microRNA-33 およびアンチセンス microRNA-33 の効果を解析した。結果として、神経系細胞である培養アストロサ

イトにおいても、microRNA-33 が HDL 産生を抑制し、アンチセンス microRNA-33 は産生を増加させた。この結果は、化合物による治療法開発以外に短い核酸による療法の可能性を示している。LPL は脳内でも発現することが知られているが、その役割は不明であった。最近我々は、LPL がアミロイド β (A β) の新規結合蛋白であり、A β の分解に非常に大きな役割を果たすという発見をした。LPL の生体における A β 分解除去作用を明らかにするために LPL トランスジェニックマウス(LPL-Tg)を昨年度作製した。本研究では、LPL が脳内 A β 代謝ならびに認知機能に与える影響を、LPL-Tg マウスならびに APP-Tg マウス (アルツハイマー病モデルマウス) を用いて検討する。また、LPL が全身で過剰発現されたときの、体循環系ならびに脳内における脂肪酸代謝への影響も合わせて解析する。

我々は、リポタンパクリパーゼ (LPL) が A β の新規結合蛋白であり、A β の分解に非常に大きな役割を果たすという発見をした。LPL が生体においても A β 分解除去に働いていることを明らかにするために LPL トランスジェニックマウス (LPL-Tg) を作製した。今年度は、LPL-Tg マウスとアルツハイマー病のモデルマウスである APP-Tg マウスとのダブルトランスジェニックマウスを作成した。現在このマウスを加齢させている。これらのマウスの脳解析は、来年度に行う予定である。

また、細胞レベルで LPL の A β 取り込み・分解作用を検証するために、培養細胞に APP 遺伝子ならびに LPL 遺伝子を過