

201311015A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 道川 誠

平成 26 (2014) 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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	20
西道隆臣	
(ウ)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	
(エ) タウの異常病理を再現する新しい細胞モデルの構築	28
長谷川成人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

I. 総括研究報告書  
(平成 25 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)

平成 25 年度 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 (H23-認知症-指定-005)

研究代表者:道川 誠(公立大学法人 名古屋市立大学)

研究概要： 道川：(1)脳内 HDL を増加させる化合物のスクリーニングを行った結果、3つの化合物が低濃度で HDL 産生を増加させることを見出した。これらの候補化合物を seed にした薬剤開発を企業との共同研究で開始した。また、microRNA-33 は ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制する。本研究では、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。(2)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A $\beta$  結合分子であり、A $\beta$  の細胞内分解を促進することを発見し特許出願した。LPL の代謝調節は治療標的になると考え、LPL-Tg マウスと APP-Tg マウスの交配マウスを作成し、加齢させ現在解析中である。(4)歯周病、歯牙欠損マウスでは認知障害の増悪と、A $\beta$  沈着の増加、海馬神経脱落が見られた。これらの口腔疾患の予防・治療が AD の予防・治療に応用できる可能性を示した。富田：A $\beta$  産生経路における膜脂質環境の重要性が明確となった。特に  $\beta$  セクレターゼについてはスフィンゴ脂質やセラミドが  $\beta$  セクレターゼの安定性や活性に大きな影響を与えること、また  $\gamma$  セクレターゼ活性制御については PI(4,5)P を始めとするフォスファチジルイノシトールが制御する細胞内小胞輸送経路が重要であることが明らかとなった。今後これらの脂質の変化が孤発性 AD 脳で生じているかどうか、また AD 発症リスクを診断するバイオマーカーとして利用可能かどうかを検証する必要がある。これらが創薬の介入点となりうるかを前臨床モデルで検証する必要がある。西道：A $\beta$  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ことが明らかになった。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された。これらの結果から、ネプリライシン活性賦活化の新規創薬標的を提示できた。ネプリライシンを基軸とした A $\beta$  分解促進のための新たな抗 AD 戦略を示せた長谷川：AD 脳に蓄積する異常タウは、培養細胞に発現する正常タウを異常に変換し、その蓄積を引き起こした。このプリオン様性質は、熱やプロテアーゼに強い安定性を示すが、抗体を用いて免疫除去が可能であった。AD におけるタウ病変の広がりには異常タウのプリオン様性質によって起こる可能性が考えられる。本細胞モデルは、タウを標的とする薬剤探索に有用であり、進行を抑える治療薬の開発への応用が期待される。

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 $\beta$  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、(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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  代謝にどのような作用を持つかを、A $\beta$  との結合、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 $\beta$  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) ①A $\beta$  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。②GWAS 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 $\beta$  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 $\alpha$ 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

アルツハイマー病(AD)の分子病態を引き起こし進行させる分子メカニズムである「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によって、真に有効な AD の治療法開発を目指した。複数の標的とは、(1)  $A\beta$  産生機構の解明と調節法の開発、(2)  $A\beta$  分解調節法の開発、(3)  $A\beta$  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、(4) タウ病変の伝播制御である。本年度は以下の成果を得た。

道川) 本研究では、以下を目的とした研究を行った。(1)脳内 ApoE-HDL レベルを調節することで、ApoE-HDL に結合した A $\beta$  代謝(分解)を低濃度で制御する化合物を探索すること、(2)脳内 A $\beta$  は、ApoE-HDL に結合し、血液脳関門(BBB)を介して血液中に排出されることから、BBB 機能調節機構を解明すること、(3)microRNA-33 が、ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制することから、アンチセンス-microRNA-33 が治療薬になる可能性を示すこと、(4)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が新規 A $\beta$  結合分子であることを突き止め、その発現調節により A $\beta$  レベルを下げて治療効果を持つことを明らかにすること、(5)従来から歯周病、歯牙欠損と AD との関連が多く文献で指摘されている。歯科治療は比較的容易であり、これらの因果関係が明らかになれば、有効な予防法になる可能性があるため、本研究では動物モデルで因果関係を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

その結果、(1)脳内 HDL を増加させる化合物のスクリーニングを行った結果、3つの化合物が低濃度で HDL 産生を増加させることを見出した。これらの候補化合物を seed にした薬剤開発を企業との共同研究で開始した。また、microRNA-33 は ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制する。本研究では、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を見出した。(2) A $\beta$  は分解以外に血液脳関門(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。本研究により内皮・周皮・アストロサイトから成る BBB 培養モデルを確立して解析した結果、ApoE4 型の BBB は、バリア形成が不良で BBB 透過性が脆弱であること、ApoE-HDL が BBB 形成・機能維持に重要なこと、ApoE3-HDL と ApoE4-HDL では、BBB 形成・機能維持に違いのあることを明らかにした。(3)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A $\beta$  結合分子であり、A $\beta$  の細胞内分解を促進することを発見し特許出願した。LPL の代謝調節は治療標的になると考え、LPL-Tg マウスと APP-Tg マウスの交配マウスを作成し、加齢・解析中である。(4)歯周病、歯牙欠損マウスでは認知障害の増悪と、A $\beta$  沈着の増加、海馬神経脱落が見られた。これらの口腔疾患の予防・治療が AD の予防・治療に応用できる可能性を示した。

富田) 本研究においては、神経細胞膜脂質組成及び小胞輸送系に着目し A $\beta$  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った。特に、1) スフィンゴ脂質・セラミド代謝経路による A $\beta$  産生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。

その結果、1) スフィンゴ脂質経路に関連する低分子化合物として SKI II、ABC294640、THI を見出し、これらを用いて S1P が直接  $\beta$  セクレターゼの膜貫通領域と結合することでアロステリックに切断活性を制御することを見出した。一方、S1P 受容体アンタゴニストである FTY720、KRP203 が  $\gamma$  セクレターゼの活性を抑制すること

を見出し、その標的候補分子として RNAi スクリーニングにより脂質結合型オーファン GPCR である EDG3 を同定した。また FTY720 の AD モデルマウスへの準慢性投与により、脳内 A $\beta$  量の低下が認められた。2) AD の遺伝学的危険因子である BIN1 はリサイクリングエンドソームにおいて脂質と結合し、 $\beta$  セクレターゼのリソソームへの輸送を促進する A $\beta$  産生抑制因子であることを明らかにした。一方、PICALM は  $\gamma$  セクレターゼの細胞表面膜からの内在化速度を決定し、A $\beta$ 42 産生活性を規定している分子であることが明らかとなった。特に AD 発症を低下させ、PICALM が結合する PI(4,5)P の結合部位におけるアミノ酸置換を惹起する Rare variant 変異や、PI(4,5)P 産生を抑制する化合物が A $\beta$ 42 産生を低下させることを見出した。

西道) 本研究では、AD の発症に深く関与する A $\beta$  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し、これを治療標的として、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した。

その結果、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。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。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 (論文未発表)。A $\beta$  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 $\beta$  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る。

長谷川) タウの病変の分布、広がりやアルツハイマー病 (AD) の病態、臨床症状の進行と密接な関係が示されているが、その蓄積機序は不明であるばかりか、試験管内で同じ病変を再現するモデルは構築できていない。申請者は、患者脳内に生じた異常タウがプリオン様の性質を獲得し、それが正常タウを異常に変換することでタウの蓄積がおこり、さらに細胞間を広がることで脳内での病変が拡大するという仮説を提唱し、検証をおこなっている。患者脳に蓄積する異常タウのプリオン様伝播の可能性を探ると共に、培養細胞内でタウの病変を再現するモデルの構築を目的とした。

その結果、培養細胞にタウを発現させただけでは、不溶化タウや細胞内凝

集は観察されなかったが、患者脳由来の異常タウを導入すると、培養細胞内にリン酸化、ユビキチン化されたタウ陽性の凝集体が観察され、また不溶性画分にリン酸化タウの蓄積が検出された。タウを発現しない細胞に同様の処理をしても蓄積はおこらないこと、脳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、細胞内に発現したタウが患者脳タウを鋳型として構造変化をおこして蓄積したと考えられる。興味深いことに、この活性は熱、プロテアーゼに対して高い抵抗性を示すことが確認された。

#### E. 結論

道川) (1)脳内 ApoE-HDL レベルを上昇させる seed 化合物を 3 つ同定した。薬剤開発を目指して企業と共同研究を開始した。実用化へ向けた 1 歩を踏み出した。また、ApoE-HDL による BBB 形成・機能調節の分子機構を明らかにした。BBB 機能 (脳内 A $\beta$  排出) 調節を創薬標的にできる。BBB へのアクセスは血液側からも可能であり、治療薬開発に有利になる。さらに、アンチセンス-microRNA-33 が脳内 ApoE-HDL を増加させることが明らかになり、マイクロ核酸治療薬の可能性を示した。(2)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)は、新規 A $\beta$  結合分子であり A $\beta$  レベルの低下を標的にした LPL 発現調節薬の開発の可能性を示せた。(3)歯周病、歯牙欠損が、AD モデルマウスで認知機能障害と AD 分子病態の増悪を引き起こすことが明らかになり、歯科疾患の予防治療が AD 発症予防になる可能性があり、臨床試験をすべきと考えられる。富田) A $\beta$  産生経路における膜脂質環境の重要性が明確となった。特に  $\beta$

セクレターゼについてはスフィンゴ脂質やセラミドが  $\beta$  セクレターゼの安定性や活性に大きな影響を与えること、また  $\gamma$  セクレターゼ活性制御については PI(4,5)P を始めとするフォスファチジルイノシトールが制御する細胞内小胞輸送経路が重要であることが明らかとなった。今後これらの脂質の変化が孤発性 AD 脳で生じているかどうか、また AD 発症リスクを診断するバイオマーカーとして利用可能かどうかを検証する必要がある。これらが創薬の介入点となりうるかを前臨床モデルで検証する必要がある。

西道) A $\beta$  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ことが明らかになった。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された。これらの結果から、ネプリライシン活性賦活化の新規創薬標的を提示できた。ネプリライシンを基軸とした A $\beta$  分解促進のための新たな抗 AD 戦略を示せた (意義)。

長谷川) AD 脳に蓄積する異常タウは、培養細胞に発現する正常タウを異常に変換し、その蓄積を引き起こした。このプリオン様性質は、熱やプロテアーゼに強い安定性を示すが、抗体を用いて免疫除去が可能であった。AD におけるタウ病変の広がりには異常タウのプリオン様性質によって起こる可能性が考えられる。本細胞モデルは、タウを標的とする薬剤探索に有用であり、進行を抑える治療薬の開発への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ito J, Kheirollah A, Nagayasu Y, Ueda H, Yokoyama S, Michikawa M. Involvement of cdc42/Rho kinase in apoA-I-mediated cholesterol efflux through interaction between cytosolic lipid-protein particles and microtubules in rat astrocytes .  
**J Neurosci Res**, in press.
- Hoshino H, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Takeda-Uchimura Y, Michikawa M, Kadomatsu K and Uchimura K  
KSGal6ST is essential for the 6-sulfation of galactose within keratan sulfate in early postnatal brain  
**J Histochem Cytochem**, in press
- Oue H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung CG, Michikawa M, Akagawa, Y. Tooth loss induces memory impairment and neuronal cell loss in APP transgenic mice. **Behav Brain Res** 252: 318-325, 2013
- Zou K, Liu J, Watanabe A, Hiraga S, Liu S, Tanabe C, Maeda T, Terayama Y, Takahashi S, Michikawa M, Komano H.  
A $\beta$ 43 is the earliest depositing A $\beta$  species in APP transgenic mouse brain and is converted to A $\beta$ 41 by two active domains of ACE  
**Am J Pathol**, 182: 2322-2331, 2013
- Ito J, Nagayasu Y, Hoshikawa M, Kato K.H., Miura Y, Asai K, Hayashi H, Yokoyama Y, Michikawa M. Enhancement of FGF-1 release along with cytosolic proteins from rat astrocytes by hydrogen peroxide  
**Brain Res.**, 1552: 12-21, 2013
- Takagi-Niidome, S., Osawa, S., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) **Biochemistry** 52, 61-69
- 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., and Iwatsubo, T. (2012) **Neuron** 76, 410-422
- Takeo, K., Watanabe, N., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2012) **J Biol Chme** 287, 25834-25843
- Hayashi, I., Takatori, S., Urano, Y., Miyake, Y., Takagi, J., Sakata-Yanagimoto, M., Iwanari, H., Osawa, S., Morohashi, Y., Li, T., Wong, P. C., Chiba, S., Kodama, T., Hamakubo, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2012) **Oncogene** 31, 787-798
- Iwatsubo, T., Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Tomita, T., and Morohashi, Y. (2013) **Rinsho Shinkeigaku** 53, 956
- Li, Y., Lu, S. H., Tsai, C. J., Bohm, C., Qamar, S., Dodd, R. B., Meadows, W., Jeon, A., McLeod, A., Chen, F., Arimon, M., Berezovska, O.,

- Hyman, B. T., Tomita, T., Iwatsubo, T., Johnson, C. M., Farrer, L. A., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P. E., and St George-Hyslop, P. H. (2013) **Structure**
- Hoshi, M., Ohki, Y., Ito, K., Tomita, T., Iwatsubo, T., Ishimaru, Y., Abe, K., and Asakura, T. (2013) **BMC Biochem** **14**, 16
- Takasugi, N., Sasaki, T., Ebinuma, I., Osawa, S., Isshiki, H., Takeo, K., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) **PloS One** **8**, e64050
- Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2013) **J Biol Chem** **288**, 14673-14680
- Imamura, Y., Umezawa, N., Osawa, S., Shimada, N., Higo, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Kato, N., Tomita, T., and Higuchi, T. (2013) **J Med Chem** **56**, 1443-1454
- Tsuji, H., Arai, T., Kametani, F., Nonaka, T., Yamashita, M., Suzukake, M., Hosokawa, M., Yoshida, M., Hatsuta, H., Takao, M., Saito, Y., Murayama, S., Akiyama, H., Hasegawa, M., Mann, D. M., and Tamaoka, A. (2012) **Brain** **135**, 3380-3391
- Parker, S. J., Meyerowitz, J., James, J. L., Liddell, J. R., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kanninen, K. M., Lim, S., Paterson, B. M., Donnelly, P. S., Crouch, P. J., and White, A. R. (2012) **PloS One** **7**, e42277
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., 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, M. C., Gage, F. H., Yamanaka, S., and Inoue, H. (2012) **Sci Translational Med** **4**, 145ra104
- Hasegawa, M. (2012) **Brain and Nerve** **64**, 675-679
- Iguchi, Y., Katsuno, M., Takagi, S., Ishigaki, S., Niwa, J., Hasegawa, M., Tanaka, F., and Sobue, G. (2012) **Neurobiology of Disease** **45**, 862-870
- Tsuji, H., Nonaka, T., Yamashita, M., Masuda-Suzukake, M., Kametani, F., Akiyama, H., Mann, D. M., Tamaoka, A., and Hasegawa, M. (2012) **Biochem Biophys Res Comm** **417**, 116-121
- Mann, D. M., Rollinson, S., Robinson, A., Bennion Callister, J., Thompson, J. C., Snowden, J. S., Gendron, T., Petrucelli, L., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., Davidson, Y., and Pickering-Brown, S. (2013) **Acta Neuropathol Comm** **1**, 68
- Hosokawa, M., Arai, T., Yamashita, M., Tsuji, H., Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Tamaoka, A., Hasegawa, M., and Akiyama, H. (2013) **Inter J Neurosci**

- Moujalled, D., James, J. L., Parker, S. J., Lidgerwood, G. E., Duncan, C., Meyerowitz, J., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kanninen, K. M., Grubman, A., Liddell, J. R., Crouch, P. J., and White, A. R. (2013) **PloS One** **8**, e67433
- Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D. M., Akiyama, H., and Hasegawa, M. (2013) **Cell Reports** **4**, 124-134
- Funamoto, S., Sasaki, T., Ishihara, S., Nobuhara, M., Nakano, M., Watanabe-Takahashi, M., Saito, T., Kakuda, N., Miyasaka, T., Nishikawa, K., Saido, T. C., and Ihara, Y. (2013) **Nat Commun** **4**, 2529
- Iwata, A., Nagata, K., Hatsuta, H., Takuma, H., Bundo, M., Iwamoto, K., Tamaoka, A., Murayama, S., Saido, T., and Tsuji, S. (2013) **Human Molecular Genetics**
- Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., Zhang, M. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Ono, M., Masamoto, K., Takano, H., Sahara, N., Iwata, N., Okamura, N., Furumoto, S., Kudo, Y., Chang, Q., Saido, T. C., Takashima, A., Lewis, J., Jang, M. K., Aoki, I., Ito, H., and Higuchi, M. (2013) **Neuron** **79**, 1094-1108
- Huang, Z., Rose, A. H., Hoffmann, F. W., Hashimoto, A. S., Bertino, P., Denk, T., Takano, J., Iwata, N., Saido, T. C., and Hoffmann, P. R. (2013) **J Immunol** **191**, 3778-3788
- Frost, J. L., Le, K. X., Cynis, H., Ekpo, E., Kleinschmidt, M., Palmour, R. M., Ervin, F. R., Snigdha, S., Cotman, C. W., Saido, T. C., Vassar, R. J., St George-Hyslop, P., Ikezu, T., Schilling, S., Demuth, H. U., and Lemere, C. A. (2013) **Am J Pathol** **183**, 369-381
- Hubener, J., Weber, J. J., Richter, C., Honold, L., Weiss, A., Murad, F., Breuer, P., Wullner, U., Bellstedt, P., Paquet-Durand, F., Takano, J., Saido, T. C., Riess, O., and Nguyen, H. P. (2013) **Hum Mol Genetic** **22**, 508-51

## 2. 学会発表

Michikawa M.

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

アルツハイマー病はここまでわかった  
オープンカレッジ、2013年9月20日、  
名古屋市大

道川 誠

脳内脂質輸送とアルツハイマー病分子病態  
第55回「脳の医学・生物学研究会」  
2013年8月10日、名古屋

道川 誠

脳の健康を考えるー認知症研究のいまー

栄養学若手研究者の集い 第47回サ  
マーセミナー  
2013年8月23-25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

Saido TC.  
Pyroglutamyl A $\beta$  deposition in the  
Single-locus knockin mouse model of  
AD.  
11<sup>th</sup> International Conference on  
Alzheimer's and Parkinson's Disease  
(AD/PD 2013),  
Mar 7, 2013, Florence, Italy

Saido TC.  
New and more relevant mouse  
models of Alzheimer's disease:  
Distinguishing facts from artifacts.  
OECD Expert Consultation on  
"Unlocking Global Collaboration to  
Accelerate Innovation for Alzheimer'  
Disease and Dementia"  
June 20, 2013, Oxford, England

Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Iwata  
N, Takano J, Nilsson P, Saido TC.  
Update of novel type and more  
relevant model mouse for  
Alzheimer's disease.  
Alzheimer's Association  
International Conference 2013(AAIC  
2013)  
July 15, 2013, Boston, USA

Saido TC.  
Single APP locus knockin mouse  
models of Alzheimer's disease:  
Distinguishing facts from artifacts.  
Alzheimer's Association  
International Conference 2013(AAIC  
2013)  
July 17, 2013, Boston, USA

Saido TC.  
Single APP locus knockin mouse  
models of Alzheimer's disease:  
Distinguishing facts from artifacts.  
Public Seminar of The Hong Kong  
University of Science and  
Technology  
Aug. 26, 2013, Kowloon, Hong Kong

Saido TC.  
Single APP locus knockin mouse  
models of AD.  
The Cold Spring Harbor Asia  
conference Molecular Basis of Aging  
& Disease  
Sep. 12, 2013, Suzhou, China

垣矢直雅、齊藤貴志、Per Nilsson、西  
道隆臣  
ソマトスタチンを介したネプリライ  
シン活性制御機構の解明による AD  
新規創薬標的の提起 第86回日本生  
化学会大会 2013年9月13日、横浜

Saido, T.C.  
Current status of the single APP  
locus knock-in mouse models of AD.  
Workshop on Alzheimer's disease  
and related disorders.  
Oct. 11, 2013, Kyoto, Japan

西道隆臣  
次世代型アルツハイマー病モデルマウスの作製と応用  
第 32 回日本認知症学会学術集会、  
2013 年 11 月 9 日、松本

西道隆臣  
アルツハイマー病の治療標的: アミロイド前とアミロイド後  
日本学術会議公開シンポジウム, 2013 年 1 月 21 日、六本木

西道隆臣  
次世代型アルツハイマー病モデルマウスとアルツハイマー病遺伝子治療の現状. 新たな時代への躍進! 診断・治療・創薬研究の Strategy〜がん 老化 再生医療〜、学術セミナー、2013 年 1 月 21 日、品川

Taisuke Tomita\*: Development of preemptive medicine for Alzheimer disease based on molecular basis of A $\beta$  production and synaptic toxicity. April 25-26, 2013, Symposium "Memory Traces and Tags". Queretaro, Mexico

Taisuke Tomita\*, Koji Takeo, Shun Tanimura, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. May 13-17, 2013, CSH - ASIA Meeting, MEMBRANE PROTEIN STRUCTURE & FUNCTION, Suzhou, China

Aya Tominaga, Taisuke Tomita\*, Takeshi Iwatsubo: Identification of

the structural change of Presenilin 1 associated with altered A $\beta$ 42 production. May 13-17, 2013, CSH - ASIA Meeting, MEMBRANE PROTEIN STRUCTURE & FUNCTION, Suzhou, China

Taisuke Tomita\*, Kunimichi Suzuki, Azusa Shiohara, Satoko Osawa, Takeshi Iwatsubo: Pathophysiological role of proteolytic cleavage of Neuroligins. July 20-25, 2013, AAIC, Boston, USA

Nobumasa Takasugi, Tomoki Sasaki, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo: FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- $\beta$  production in neurons. July 20-25, 2013, AAIC, Boston, USA

Taisuke Tomita\*: Modulation of BACE1 activity by membrane environment. Oct 6-8, 2013, Kloster Seeon Meeting on BACE Proteases in Health and Disease. Bavaria, Germany.

Taisuke Tomita\*: Mechanistic insight of the  $\alpha$ -secretase-mediated intramembrane cleavage. Oct 20-24, 2013, 8th General Meeting of the International Proteolysis Society. Cape Town, South Africa.

Kunihiko Kanatsu, Yuichi Morohashi, Toshio Watanabe, Taisuke Tomita\*, Takeshi Iwatsubo: CALM impacts on A $\beta$ 42 production ratio through

modulation of clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. Neuroscience 2013. November 9-13, 2012, San Diego, USA

Taisuke Tomita\*, Koji Takeo, Shun Tanimura, Satoshi Yokoshima, Tohru Fukuyama, Takeshi Iwatsubo: Molecular mechanism of phenylimidazole-type  $\gamma$ -secretase modulators. Neuroscience 2013. November 9-13, 2013, San Diego, USA

岩坪威、橋本唯史、若林朋子、富田泰輔\*、諸橋雄一：アルツハイマー病：遺伝学的・環境的リスク因子に関する実験的検証の現況 2013年5月29日-6月1日 第54回日本神経学会学術大会 東京

富田泰輔\*：シナプス接着分子 Neuroligin の神経活動依存性プロセッシング 2013年6月7日 平成25年度生理学研究所研究会「シナプス恒常性維持の分子基盤とその破綻」 岡崎

富田泰輔\*：アルツハイマー病の分子病態解明：先制医療の開発に向けて 2013年6月8日 東京大学生命科学シンポジウム 東京

富田泰輔\*：アルツハイマー病先制医療の開発に向けて：現状と展望 2013年6月9日 星薬科大学認定薬剤師研究 薬剤師生涯学習・講演会シリーズ 東京

Taisuke Tomita\*: For the study of human cerebral neurodegeneration.

June 20-23, 2013, Neuro2013. Kyoto, Japan.

Taisuke Tomita: Biology of  $\gamma$ -secretase. June 23-27, 2013, 11th World Congress of Biological Psychiatry. Kyoto, Japan.

富田泰輔\*：国際誌に論文を投稿するのは四苦八苦 2013年7月5日 英語論文セミナー2013～国際誌に投稿するために知っておきたいこと～ 東京

Taisuke Tomita\*: Structure and function relationship of intramembrane-cleaving  $\gamma$ -secretase. 2013年9月12日 第86回日本生化学会 横浜

富田泰輔\*：先制医療を目指したアルツハイマー病治療薬開発に向けて 2013年9月23日 第46回日本薬剤師会学術大会 大阪

富田泰輔\*：先制医療を目指したアルツハイマー病治療薬開発に向けて 2013年10月2日 第9回東京女子医大テニューアトラック教員支援セミナー

富田泰輔\*：先制医療の開発に向けたアルツハイマー病の分子病態解明 2013年10月26日 第57回日本薬学会関東支部大会 東京

木棚究、秋下雅弘、大内尉義、富田泰輔\*、岩坪威：グリア系培養細胞上清中に含まれるセリンプロテアーゼ様  $A\beta$  分解活性の解析 2013年11月

8-10 日 第 32 回日本認知症学会学術  
集会 松本

Hasegawa M: Prion-like propagation  
of pathological alpha-synuclein. The  
4th Korea Japan Symposium, Seoul  
[2013. 2. 26]

Hasegawa M: Prion-like propagation  
of pathological alpha-synuclein. The  
86th Annual Meeting of the Japanese  
Biochemical Society Symposium  
3S05a, Yokohama [2013. 9. 13]

長谷川成人 神経変性疾患の細胞病理  
を形成する蛋白質のプリオン様特性  
第 8 回臨床ストレス応答学会, 松本  
[2013. 11. 16]

長谷川成人 神経変性疾患の分子基  
盤と進行機序 –患者脳の解析から導  
かれた新しい考え方とその検証– 平  
成 2 5 年度 文部科学省 新学術領域  
研究 生命科学系 3 分野 がん・ゲノ  
ム・脳 支援活動合同シンポジウム  
[2013. 8. 6]

長谷川成人 神経変性疾患の原因とな  
るタンパク質の構造異常とその伝播  
第 4 回神経科学と構造生物学の融合  
研究会, 岡崎 [2013. 11. 20]

## 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)  
平成 25 年度 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・治療薬開発  
研究代表者:道川 誠(公立大学法人 名古屋市立大学)

研究の概要:アルツハイマー病(AD)の分子病態を引き起こし進行させる分子メカニズムである「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によって、真に有効な AD の治療薬開発を目指した。本研究では、以下の研究を行った。(1)脳内 ApoE-HDL レベルを調節することで、ApoE-HDL に結合した A $\beta$  代謝(分解)を低濃度で制御する化合物を探索すること、(2)脳内 A $\beta$  は、ApoE-HDL に結合し、血液脳関門(BBB)を介して血液中に排出されることから、BBB 機能調節機構を解明すること、(3)microRNA-33 が、ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制することから、アンチセンス-microRNA-33 が治療薬になる可能性を示すこと、(4)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が新規 A $\beta$  結合分子であることを突き止め、その発現調節により A $\beta$  レベルを下げて治療効果を持つことを明らかにすること、(5)従来から歯周病、歯牙欠損と AD との関連が多く文献で指摘されている。歯科治療は比較的容易であり、これらの因果関係が明らかになれば、有効な予防法になる可能性があるため、本研究では動物モデルで因果関係を分子レベルで明らかにすること、を目的とした。

その結果、(1)脳内 HDL を増加させる化合物のスクリーニングを行った結果、3 つの化合物が低濃度で HDL 産生を増加させることを見出した。これらの候補化合物を seed にした薬剤開発を企業との共同研究で開始した。また、microRNA-33 は ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制する。本研究では、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を見出した。(2) A $\beta$  は分解以外に血液脳関門(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。本研究により内皮・周皮・アストロサイトから成る BBB 培養モデルを確立して解析した結果、ApoE4 型の BBB は、バリア形成が不良で BBB 透過性が脆弱であること、ApoE-HDL が BBB 形成・機能維持に重要なこと、ApoE3-HDL と ApoE4-HDL では、BBB 形成・機能維持に違いのあることを明らかにした。(3)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ(LPL)が、新規 A $\beta$  結合分子であり、A $\beta$  の細胞内分解を促進することを発見し特許出願した。LPL の代謝調節は治療標的になると考え、LPL-Tg マウスと APP-Tg マウスの交配マウスを作成し、加齢・解析中である。(4)歯周病、歯牙欠損マウスでは認知障害の増悪と、A $\beta$  沈着の増加、海馬神経脱落が見られた。これらの口腔疾患の予防・治療が AD の予防・治療に応用できる可能性を示した。

**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)脳内 ApoE-HDL レベルを調節することで、ApoE-HDL に結合した A $\beta$  代謝 (分解) を低濃度で制御する化合物を探索すること、(2)脳内 A $\beta$  は、ApoE-HDL に結合し、血液脳関門 (BBB) を介して血液中に排出されることから、BBB 機能調節機構を解明すること、(3)microRNA-33 が、ABCA1 レベルを低下させ、脳内 HDL 産生を抑制することから、アンチセンス-microRNA-33 が治療薬になる可能性を示すこと、(4)脳内に存在するリポタンパクリパーゼ (LPL) が新規 A $\beta$  結合分子であることを突き止め、その発現調節により A $\beta$  レベルを下げて治療効果を持つことを明らかにすること、(5)従来から歯周病、歯牙欠損と AD との関連が多く文献で指摘されている。歯科治療は比較的容易であり、これらの因果関係が明らかになれば、有効な予防法になる可能性があるため、本研究では動物モデルで因果関係を分子レベルで明らかにすること、を目的とした。

**B. 研究方法** (1) 脂質代謝を制御する酵素 LPL が、A $\beta$  代謝にどのような作用を持つかを、A $\beta$  との結合、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) 脳内に存在するリポタンパクリパーゼ (LPL) を過剰発現するマウスを作成し、それと APP-Tg マウスの交配マウスを作成して、認知機能の評価、脳内 A $\beta$  沈着を解析した。(5) 従来から歯周病、歯牙欠損と AD との関連が多く文献で指摘されている。本研究ではマウスに抜歯、液体餌の摂取、歯周病感染を起こさせ、認知機能ならびに脳内病態の生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組換え実験およびヒト由来試料を用いる実験は、それぞれの研究施設の審査機関 (倫理委員会または実験動物倫理委員会等) で審査を受け、承認を得て行った。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、