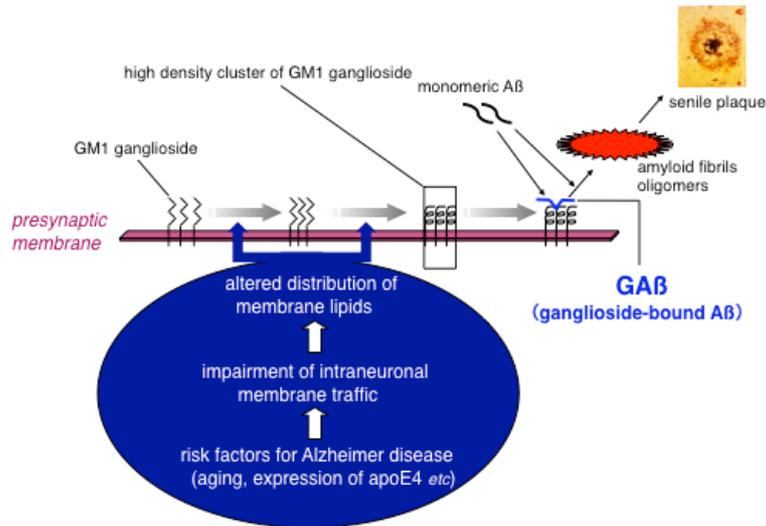


アルツハイマー病におけるアミロイド形成機序の解明 (25-19)

主任研究者 柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長

研究要旨

アミロイドβ蛋白質 (Aβ) の重合によるアミロイド形成は、アルツハイマー病 (AD) の起点で生じる異常事象である。従ってAβ重合の分子機序を解明し、それを抑止する手法を開発することは、ADの根本的な予防ならびに治療への確かな路程といえる。柳澤らは、脳内においてAβは神経細胞膜上でガングリオシドに結合し、特異なガングリオシド結合型Aβ (ganglioside-bound Aβ, GAB) が形成され、これがアミロイド形成の内因性seedとして働くことを示してきた (下図参照)。本研究はGABに焦点をあて、GAB形成の背景にある神経細胞膜脂質組成の変化、GABの超分子構造、ガングリオシド依存性アミロイド線維の毒性発現機序等を、NMR、質量分析、原子間力顕微鏡等を用いて解析する。同時に、GABを標的とするアミロイド形成阻害薬の開発研究を実施する。



主任研究者

柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長

分担研究者

加藤 晃一 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授
松崎 勝巳 京都大学大学院 薬学研究科 教授
鈴木 明身 東海大学 糖鎖科学研究所 所長・特任教授
松原 輝彦 慶應義塾大学工学部 講師
河合 昭好 国立長寿医療研究センター 治療薬探索研究部 部長

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) において神経細胞傷害を誘導するアミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) 重合体の形成機構を解明し、それを抑止する手法の開発により、AD の本質的な予防法ならびに治療法 (先制治療法) を確立することを目的とする。

《必要性》アルツハイマー病患者数は我が国で 200 万人、世界で 3200 万人を超えたと推定され、今後さらなる増加が懸念されている。本疾患病態生理への理解は深まってはいるものの、依然、分子病理学的発症機序の詳細は不明であり、根治的な治療薬 (疾患修飾薬) の開では不成功が相次いでいる。このような状況において、AD 発症機構を分子レベルで解明し、その理解に基づく先制治療法を確立することは喫緊の課題である。

《特色・独創的な点》本研究は、主任研究者の柳澤がヒト脳内で見出したアミロイド形成の内因性の「種」であるガングリオシド結合型 $AB(GAB)$ に焦点をあて研究を進めるものであり、際立った特色と高い独創性を有している。

B. 研究方法

(柳澤) ショウジョウバエを対象にヒト AB の産生とガングリオシド発現の誘導による新規のアルツハイマー病病態モデルを作製し、 GAB の脳内における病態解明を進める。

(加藤) 線維伸長の末端に現れる特異構造を保持しつつ線維伸長を抑止する実験系を設計・作出し、立体構造解析を実施する。

(松崎) ラフト膜での $A\beta$ 凝集過程を分子動力学シミュレーションする。また、毒性型アミロイド線維の構造をケミカルクロスリンクにより推定する。神経細胞に $A\beta$ を添加し、凝集に伴う膜流動性変化と細胞死の関係を調べる。また、マイクロアレイを用い、タンパク質発現プロファイル変化を網羅的に調べる。

(鈴木) 中性糖脂質の分析のためのサンプル前処理法を確立する。ガングリオシド、スフィンゴミエリンの解析を行い、それらの定量法を検討する。

(松原) 脳から抽出した脂質の単分子膜を作製し、累積して再構成膜を作製した後、脂質膜面の表面形状を AFM により観察して AB 形状の経時変化を画像化する。この実験により AB 重合とガングリオシドのナノスケールでの膜内分布の関係を明らかにする。

(河合) GAB 結合性低分子化合物の創出を目指し、 GAB 構造情報をもとに低分子化合物をデザインし、活性、薬物動態ならびに安全性等々を評価し、最適化を進める。

(倫理面への配慮)

本研究課題の遂行にあたってマウス等のモデル動物を対象とする実験が必要となる場合には、国立長寿医療研究センター動物実験委員会での承認を受け、また同センターが定める動物実験指針に従い、動物愛護に十分留意する。本研究の一部においては、平成 24 年度までにヒト脳より分離精製した神経細胞膜標品を使用するが、これは東京都健康長寿医療センターにおいて、同センターが定める規程に沿って遺族の同意のもとに実施された剖検により得られた脳より調製された試料である。これらの使用にあたっては、研究代表者が所属する国立長寿医療センターにおいて厚生労働省が定めた臨床研究に関する倫理指針のもとに審議される倫理委員会での承認が得られており、また当該分担研究者の所属機関においても、その解析が実施されることに関しての承認が得られている。

C. 研究結果

脳内におけるアミロイド形成における内因性の”種”分子である GAB の病的役割をさらに確認するべく新規アルツハイマー病病態モデル動物の作出を目指し、ショウジョウバエ神経系からの脂質抽出ならびに質量分析法による脂質組成解析の手法を確立した。あわせて、ショウジョウバエ神経系における複合糖脂質の発現様式等を詳細に検討し、同種には生理的に形成されていないガングリオシド (GM3) の発現誘導に向けた基本的操作手順を確認し、最終年度に向けた解析の準備を整えた。

NMR を GAB 構造の解析においては、抗 GAB 抗体の Fab ドメインと A β の複合体の X 線結晶構造解析を行うため、抗 GAB 抗体および A β ペプチドを混合し、約 300 種類の結晶化条件スクリーニングを実施するも良質な結晶は得ることはできなかった。一方、タンデム型 A β のキャラクタライズに関しては、A β (1-40)を 2 分子連結させたタンデム型 A β の NMR スペクトル取得に成功した。その結果、このタンデム型 A β は可溶性の多量体を溶液中で安定に形成していることが判明し、アミロイド線維断端の最小モデルとして有用であることが示された。

ガングリオシドに依存して形成されるアミロイド線維の神経細胞毒性に関する検討においては、NA マイクロアレイチップを用いた解析により、A β 非添加群と比較して A β 添加群において有意に変動が認められた蛍光プローブが約二千個あった。さらに A β 線維が及ぼす細胞毒性の発現機構を調べるために、A β 以外の化合物の細胞毒性発現機構を調べているマイクロアレイの解析データを十数種類、データベース上より検索した。その結果、興味深いことに、細胞死 (アポトーシス) に関連する遺伝子発現の変動が観察された。

また、細胞膜上におけるガングリオシド依存性の A β 重合開始過程の詳細な解明に向けた原子間力顕微鏡 (AFM) による解析の結果、ガングリオシド (GM1) クラスターの重要性、さらにはクラスター上で形成されるガングリオシド糖鎖構造を認識するペプチドの有用性があらためて確認された。

最後に、GAB と特異的に結合する低分子化合物の創成においては、これまでの探索で獲得されたヒット化合物の周辺化合物を多数デザインし、有機合成し、それらの A β 重合阻害活性、薬物動態ならびに安全性等に関する評価を実施し、リード化合物の獲得、さらにそれらの最適化へと進めた。

D. 考察と結論

GAB の発見から 20 年が経過した。この間、我々を含め、国内外の多くの研究グループにより研究が展開され、それらの結果、GAB がヒト脳内におけるアミロイド形成の内因性の”種”であることを支持する多くの検証結果が得られている。本研究班では、これまでの研究では十分に解明されていない GAB 関連の課題をとりあげ、研究活動を展開している。幸い、これまでの 2 年間に、研究は期待通りの進捗を示している。最終年度には、アルツハイマー病の中核病理であるアミロイド形成とアミロイドによる神経細胞傷害の分子機構の理解に資する成果をあげ、あわせて、アミロイドの形成を先制的に抑止しうる薬剤開発を鋭意

推進したいと考える。

E. 健康危険情報

特に記載すべき事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gandy S., Knight E., Williams H., Steven A., Kim S., Kottwitz J., Morant A., Steele J., Klein W., Yanagisawa K., Boyd R., Lockhart D., Sjoberg E., Ehrlich M. and Wustman B.
Evidence that small molecule enhancement of β -hexosaminidase activity corrects the behavioral phenotype in Dutch APP-E693Q mice through reduction of ganglioside-bound A β . *Molecular Psychiatry* 1-9, 2014
- 2) Kaneko N., Nakamura A., Washimi Y., Kato T., Sakurai T., Arahata Y., Bundo M., Takeda A., Niida S., Ito K., Toba K., Tanaka K. and Yanagisawa K.
Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 90: 353-364, 2014
- 3) Okabayashi S., Shimosawa N., Yasutomi Y., Yanagisawa K and Kimura N.
Diabetes mellitus accelerates A β pathology in brain accompanied by enhanced GAB generation in non-human primates. *PlosONE* 2015 Feb 12; 10(2): e0117362
- 4) Oikawa N, Matsubara T, Fukuda R, Yasumori H, Hatsuta H, Murayama S, Sato T, Suzuki A, Yanagisawa K.
Imbalance in Fatty-Acid-Chain Length of Gangliosides Triggers Alzheimer Amyloid Deposition in the Precuneus. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0121356.
- 5) Yanagisawa K.
GM1 ganglioside and Alzheimer's disease. *Glycoconjugate Journal* (in press)
- 6) Sato, S., Yoshimasa, Y., Fujita, D., Magi-Utsumi, M., Yamaguchi, T., Kato, K., and Fujita M.
Self-assembled spherical complex displaying a gangliosideic glycan cluster capable of interacting with amyloidogenic proteins *Angew. Chem.* in press (2015)
- 7) Yagi-Utsumi, M., Kato, K.
Structural and dynamic views of GM1 ganglioside. *Glycoconj J.* in press (2015)
- 8) Kitago, Y., Nagae, M., Nakata, Z., Yagi-Utsumi, M., Takagi-Niidome, S., Mihara, E., Nogi, T., Kato, K. and Takagi, J.
Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA.

Nature Struct. Mol. Biol. 22, 199-206 (2015)

- 9) Sugiyama, M., Yagi, H., Yamaguchi, T., Kumoi, K., Hirai, M., Oba, Y., Sato, N., Porcar, L., Martele, A. and Kato, K.
Conformational characterization of a protein complex involving intrinsically disordered protein by small-angle neutron scattering using the inverse contrast matching method: a case study of interaction between α -synuclein and PbaB tetramer as a model chaperone. J. Appl. Crystallography 47, 430-435 (2014)
 - 10) Hiroshi Ueno, Takahiro Yamaguchi, Saori Fukunaga, Yuki Okada, Yoshiaki Yano, Masaru Hoshino, and Katsumi Matsuzaki
Comparison between the aggregation of human and rodent amyloid β -proteins in GM1 ganglioside clusters. Biochemistry 53, 7523–7530 (2014)
 - 11) Katsumi Matsuzaki
How do membranes initiate Alzheimer's Disease? Formation of toxic amyloid fibrils by the amyloid β -protein on ganglioside clusters.
Acc. Chem. Res. 47,2397–2404 (2014)
 - 12) 松崎勝巳
神経細胞膜を介した毒性型アルツハイマーアミロイド β ペプチド線維の形成.
化学工業 65, 880–883 (2014)
2. 学会発表
- 1) Oikawa N., Hatsuta H., Murayama S., Suzuki A., Yanagisawa K.
Effect of APOE genotype and Alzheimer pathology formation on synaptic membrane lipids of human brains.
Experimental Biology April 26-30, 2014, San Diego
 - 2) Wustman B.A., Knight E.M., Williams H.N., Stevens A.C., Kim S.H., Kottwitz J.C., Morant A.D., Steele J.W., Klein W.L., Yanagisawa K., Boyd R.E., Lockhart D.J., Sjoberg E.R., Ehrlich M.E., Gandy S.
Increasing gangliosidase activity corrects the behavioral phenotype in Dutch APPE693Q mice through reduction of ganglioside-bound A β .
The 7th conference Clinical Trials in Alzheimer's Disease (CTAD) Nov 22, 2014, Philadelphia, USA.
 - 3) Ueda N, Yanagisawa K., Kimura N.
The relationship between age-dependent endocytic disturbance and presenilin-1.
ADPD2015 Mar.18-22, Nice (France)

- 4) 柳澤勝彦
アルツハイマー病の開始点を糖質化学で解明する.
日本生化学会中部支部会 シンポジウム「挑戦と情熱が切り開く生化学の魅力」, 2014年5月24日, 名古屋
- 5) 柳澤勝彦
認知症、アルツハイマー病先制治療薬開発の展望.
ASIAN AGING SUMMIT 2014, 11月12日, 東京
- 6) 柳澤勝彦
アルツハイマー病の開始点を糖質化学で解明する.
第78回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 2014年5月24日, 名古屋
- 7) 柳澤勝彦
アミロイド蓄積を検出する血液バイオマーカー.
北陸認知症プロフェッショナル医養成プランキックオフシンポジウム, 2015年3月22日, 金沢市
- 8) Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Christopher M. Dobson
Studying molecular recognition processes of intrinsically disordered proteins by NMR spectroscopy.
Royal Society of Chemistry NMR Discussion Group Meeting "NMR in Structural Biology" 2014年4月10日 (Cambridge)
- 9) Koichi Kato 【招待講演】
Structural views of glycosylation as potential drug target.
The 4th Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference 2014年5月20日 (Jeju)
- 10) Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato, Christopher M. Dobson
Assembly mechanism of hereditary amyloid- β variants promoted on their specific gangliosides. Biophysics of Amyloids and Prions 2014年5月25日 (Napoli)
- 11) Maho Yagi-Utsumi, Takumi Yamaguchi, and Koichi Kato
NMR characterization of molecular recognition process of intrinsically disordered proteins associated with neurodegenerative diseases.
XXVIth ICMRBS 2014年8月25日, 28日 (Dallas)
- 12) Koichi Kato 【招待講演】
Structural basis for fate determination and functional regulation of proteins mediated by sugar chains.
The Cordeliers Research Center Seminar 2014年9月19日 (Paris)
- 13) Koichi Kato 【招待講演】

NMR exploration of dynamic conformations and interactions of oligosaccharides and glycoconjugates.

The "6th Iberoamerican NMR meeting // IV Iberian NMR meeting // VII Reunion Bienal del GERMN" 2014年9月24日 (Alcala de Henares)

- 14) Maho Yagi-Utsumi, Koichi Kato 【優秀ポスター賞受賞】
The 3rd International Symposium of JSPS Grand-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas “Dynamical ordering of biomolecular systems for creation of integrated functions”, 2015年1月10日 (志摩)
- 15) 加藤晃一 【招待講演】
生命分子構造学を基礎とする生命分子システムの動的秩序形成の仕組みの探求
第54回生物物理若手の会 夏の学校 2014年8月10日 (西浦温泉)
- 16) M. Yagi-Utsumi, T. Yamaguchi, K. Kato
Assembly mechanisms of intrinsically disordered proteins upon their specific interactions with gangliosides.
岡崎統合バイオサイエンスセンター リトリート, 2014年11月5日 (岡崎)
- 17) 矢木真穂、加藤晃一
NMR法を用いたアミロイドβペプチドと小胞体シャペロンとの相互作用解析
日本薬学会第135年会、2015年3月28日 (神戸)
- 18) Naoya Itoh, Yoshiaki Yano, and Katsumi Matsuzaki
Aggregation of amyloid b-peptides on GM1 ganglioside-expressing cell membranes.
The 51st Japanese Peptide Symposium, October 22–24 (2014), Tokushima
- 19) 高田絵里、岡田祐貴、矢野義明、星野大、飯田桂子、平澤明、松崎勝巳
マイクロアレイを用いたアミロイドβタンパク質による細胞死メカニズムの考察。
第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014年11月20–21日、徳島
- 20) 岡田祐貴、矢野義明、星野大、松崎勝巳
ガングリオシドクラスターを介して形成される毒性型アミロイドβ蛋白質線維の構造解析。
第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014年11月20–21日、徳島
- 21) Suzuki, A., Fujiwake, H., Uemura, Y., Oikawa, N., Yanagisawa, K., Go, S., Inokuchi, J
Targeted LC-MS analysis of glycopshingolipids.
6th ACGG 2014 Conference, Dec 9-12, 2014, Hyderabad, India
- 22) 鈴木明身
Targeted glycolipidomics が可能にする新展開。
ランチョンセミナー、第87回生化学会大会、2014.10.18 京都

- 23) Hanaki Yasumori, Masaya Nishihara, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato
AFM Observation of Beta-Amyloid Aggregates Induced by Ganglioside
GM1-containing Lipid Membrane.
SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting, 2014 年 11 月 19 日, Honolulu (USA)
- 24) 松原輝彦、西原昌哉、佐藤智典
ガングリオシド GM1 含有脂質膜における A β 凝集過程の観察
第 24 回バイオ・高分子シンポジウム, 2014 年 7 月 25 日, 東京工業大学 (東京)
- 25) 松原輝彦、安盛花季、西原昌哉、福田竜統、佐藤智典
GM1 により誘起されるアミロイド β の凝集過程の原子間力顕微鏡観察
第 33 回糖質学会年会, 2014 年 8 月 11 日, 名古屋大学 (名古屋市)
- 26) 安盛花季、松原輝彦、福田竜統、及川尚人、初田裕幸、村山繁雄、柳澤勝彦、佐藤智典
ヒト脳由来脂質を用いた生体膜モデルにおける A β 凝集メカニズムの解析, 日本化学
会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 28 日, 日本大学 (船橋市) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2014-140625 「新規ベンズオキサジン誘導体及びこれを含有する医薬」
(平成 26 年 7 月 8 日出願済)

特願 2015-62815 「新規オキサジアゾール誘導体及びこれを含有する医薬」
(平成 27 年 3 月 25 日出願済)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし