

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

アルツハイマー病の発症メカニズムおよび治療薬開発 (28-46)

主任研究者 津田 玲生 国立長寿医療研究センター  
創薬モデル動物開発室 (室長)

分担研究者

なし。

研究要旨

現在、我が国は4人に1人が65歳以上である超高齢社会に突入していることから、高齢者に多くみられる認知症に対する対策が求められている。特に、認知症の6割近くを占めるアルツハイマー病 (AD) に対する治療薬の開発が急務であることから、多くの大学や製薬企業では低分子化合物ライブラリーが整備されてきている。しかし、これまでのところ、ADの進行を抑制できる「疾患修飾薬」の開発には成功していないのが現状である。この主な要因として、ADの発症を経時的かつ定量的に評価できる *in vivo* 解析モデルが不足していることが挙げられ、発症メカニズム解析および薬剤開発が著しく遅れている。このため、これまで申請者は、ADの発症要因の一つであるアミロイドベータ ( $A\beta$ ) による神経機能低下および神経変性誘導を、経時的かつ定量的に判定できるシステムをショウジョウバエおよびマウスで作製してきた。本研究課題では、これらモデルシステムを用いてADの発症メカニズム解析から治療薬開発までを目標としている。本年度はこれまでのところ、以下の3つの課題に取り組んだ。①[アミロイド $\beta$ による神経変性誘導のメカニズム解明]を行い、 $A\beta$ による神経変性のメカニズムとして、 $A\beta$ のN末端がピログルタミル化修飾された  $A\beta_{pE3-42}$  の重要性を示すことができた。②[ガングリオシドとアミロイド $\beta$ の凝集性に関する *in vivo* 解析]を行い、ショウジョウバエでガングリオシドを産生することに世界で初めて成功し、 $A\beta$ の凝集性に対するガングリオシドの重要性を示すことができた。③[新規マウスモデルを用いたAD治療薬開発研究]を行い、 $A\beta$ による神経毒性を抑制する効果が期待される薬剤候補を用いて、薬剤検定を開始することができた。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎える我が国において、高齢者に発症する疾患の予防・治療法の開発が急務である。しかしながら、高齢者に特有の疾患は発症までに長い時間がかかることから、これまでに治療薬の開発が遅れているのが現状であった。そこで、本研究プロジェクトで

は、寿命が短く遺伝学的な操作も容易なモデル動物であるマウスとショウジョウバエを用いて、創薬開発に資するモデル系を構築することにより、老人性難聴や認知症等の高齢者に特有な神経疾患に対する有効な治療薬の開発を最終目的としている。

## B. 研究方法

### アミロイドβによる神経変性誘導のメカニズム解明

ADではアミロイドβ (Aβ) の発現上昇に伴い、脳の広い領域に神経変性を伴う脳萎縮が認められることから、Aβによる神経変性の誘導が注目されている。最近の研究では、Aβ42のN末端がピログルタミル化 (pE化) されたAβpE3-42がAβ42よりもADに伴った神経変性では重要な役割を持つことが予想されているが、*in vivo*での検証は遅れている。そこで、本研究ではショウジョウバエモデルを使って、Aβ42およびAβpE3-42の神経変性における機能を比較検討した。具体的にはAβ42およびAβpE3-42を発現する系統を用いて、複眼光受容神経細胞に対する変性誘導を比較した。

### ガングリオシドとアミロイドβの凝集性に関する *in vivo* 解析

これまでにAβ42の変異体を温度依存的に神経細胞で過剰発現するシステムを確立している。この系では飼育温度を18℃から29℃に上昇させるだけで神経細胞における変異型Aβの同調的な発現が保証され、発現誘導後8日で行動異常 (負の重力走性) が確認されている。そこで、これらの系統に企業から提供を受けた天然物由来のライブラリーを投与することにより、行動異常を回復する薬剤のスクリーニングを行った。

### 新規マウスモデルを用いたAD治療薬開発研究

ADの発症原因因子としてAβ産生の前駆体であるAPPが見いだされてから20年以上が経過している。その間、ヒトAPPをマウス脳神経系で過剰発現する、いわゆる“APPマウス”が世界中で作製され、AD研究に用いられている。APPマウスは行動試験により記憶・学習障害を判定できることから、AD研究において非常に有用な系として用いられているが、発症に時間がかかり (約1年)、定量的な解析に適していないこと等が創薬開発の問題として指摘されていた。これらの問題点は、最近開発されたヒト化マウスAPPをマウスAPP制御下で発現させる、“APPノックインマウス”でも改善できていないことから、創薬開発のためには新たなマウスモデルの登場が求められている。当研究室では、これまでの先行研究として、創薬開発に資するマウスモデルの確立を行ってきた。このモデルでは、神経細胞と内耳有毛細胞との共通性に着目して、家族性AD変異(E22G)を導入したAβ42(Aβ42<sup>E22G</sup>)を内耳有毛細胞で発現しているTgマウス([*Math1*<sup>E</sup>-Aβ42<sup>E22G</sup>])を作製した (特許第6055123号)。[*Math1*<sup>E</sup>-Aβ42<sup>E22G</sup>]の聴覚を聴性脳幹反応(ABR)により測定した結果、Aβ42<sup>E22G</sup>を内耳有毛細胞で発現させた系統に関して、生後4ヶ月で超高音域(>32kHz)の聴力が特異的に低下していることが確認されている(Omata *et al.*, 2016)。本研究では、[*Math1*<sup>E</sup>-Aβ42<sup>E22G</sup>]にAβ42の毒性を抑制する可能性を有する薬剤を投与することにより、生後4ヶ月の聴力低下が抑制されるかどうかを検討する。本年度は治療薬探索部が開発中であるAD治療薬候補を新規

マウスモデルに投与することにより、有効性を評価した。具体的には治療薬研究部が開発中であるガングリオシド依存的 A $\beta$  の凝集を抑制する薬剤 (872 および 790) を、2 ヶ月齢の [Math1<sup>E</sup>-A $\beta$ 42<sup>E22G</sup>] に 3 ヶ月間毎日経口投与した (30mg/kg 体重)。毎月、聴性脳幹反応を測定することにより聴力変化をモニターした。

(倫理面への配慮)

本研究ではモデル動物を用いることから、当研究所の動物実験の指針に基づいた研究を行った。

### C. 研究結果

#### アミロイド $\beta$ による神経変性誘導のメカニズム解明

A $\beta$ 42 と A $\beta$ pE3-42 を複眼光受容細胞でほぼ同量発現させたところ、A $\beta$ 42 の発現では神経変性が誘導されなかったのに対して、A $\beta$ pE3-42 の発現では羽化後 4 週間で神経変性が観察された。この結果から、AD の発症に伴う神経変性には A $\beta$ 42 よりも A $\beta$ pE3-42 が関与していることが強く示唆された。この A $\beta$ pE3-42 による神経変性はカスパーゼの活性を阻害することにより著しく抑制されたことから、アポトーシスが誘導されていることが確かめられた。カスパーゼ活性化の要因としては、JNK シグナルの活性化によるアポトーシス関連因子の発現上昇、あるいは小胞体ストレス (ER ストレス) 活性化の 2 つの可能性を検討した。その結果、A $\beta$ pE3-42 の発現により ER ストレス応答が誘導され、ER ストレス応答を特異的に阻害する薬剤 (tauroursodeoxycholic acid :TUDCA) の投与により神経変性の誘導が抑制されたことから、A $\beta$ pE3-42 の下流では ER ストレス応答が神経変性に関わっていることが確かめられた。AD の発症原因因子の一つである Tau との関係を検討した結果、A $\beta$ pE3-42 とヒト Tau の同時発現により神経変性が著しく誘導されることが確かめられた。このときの遺伝子発現を調べた結果、A $\beta$ pE3-42 とヒト Tau の同時発現により ER ストレス応答には影響せず、JNK シグナルが活性化していることが確かめられた。以上の結果から、A $\beta$ pE3-42 には小胞体ストレスを介して慢性的に神経変性を誘導する一方で、Tau の発現が上昇してきた細胞では JNK シグナル応答を活性化させることにより急性的に神経変性を誘導していることが予想される (Tsuda *et al.* 投稿中)。

#### ガングリオシドとアミロイド $\beta$ の凝集性に関する *in vivo* 解析

スフィンゴリン脂質の代謝を比較した場合、ショウジョウバエと哺乳動物はセラミド (Cer) からグルコースセラミド (Glc-Cer) に至までは共通している。しかし、これ以降の経路が異なるために、ショウジョウバエには最終的にガングリオシドの産生が見られない。そこで、ショウジョウバエの神経細胞に Glc-Cer に続くガングリオシドの合成に必要な酵素 (GalT6 および SAT1) を発現させると同時に、ガングリオシドの前駆体であるシアル酸を摂取させることにより、強制的なガングリオシドの産生を試みた。脳抽出液を質量分析器で調べた結果、GM3 が産生していることが確かめられた。この系は無脊椎動物にガン

グリオシドを産生させることに成功した世界で初めての例であり、グリオシドの *in vivo* における機能を明らかにするための有用なツールとして期待されている (Yamasaki *et al.*, 投稿準備中)。この系を用いて GA $\beta$  仮説を検証するため、これまで GM3 との親和性が確認されている Dutch 変異を有する A $\beta$ 40<sup>Dut</sup> を脳神経系に発現させた結果、GM3 の存在下で A $\beta$ 40<sup>Dut</sup> の凝集性が上昇していることが確かめられた。これらの結果は、GA $\beta$  仮説を支持し、A $\beta$  とグリオシドの関係を *in vivo* で理解するために有用な系であることが示唆される。

#### ショウジョウバエとマウスを用いた AD 治療薬の開発研究

*in vitro* でグリオシド依存的 A $\beta$  の凝集を抑制する薬剤のうち、872 に関しては [Math1<sup>E</sup>-A $\beta$ 42<sup>E22G</sup>] における生後 4~5 ヶ月の聴力低下に対して、抑制効果を示さなかった。一方、790 に関しては生後 4 ヶ月から抑制が見られ、5 ヶ月齢における聴力低下を有意に抑制することが確かめられた。ELISA 法による A $\beta$  の定量的解析において、790 は 872 に比較して蝸牛における A $\beta$  の量を減少させることが示唆された。

#### D. 考察と結論

本研究により AD に伴う神経変性誘導では、ピログルタミル化された A $\beta$  による ER ストレス応答が重要な役割を果たしていることが解ってきた。このことから、AD 治療薬開発の一つの戦略として、pE 化 A $\beta$  による ER ストレス応答の誘導を特異的に阻害する薬剤を同定することが有効である可能性が予想される。今後は、本研究で確立した pE 化 A $\beta$  の発現系を用いて ER ストレス応答の活性化に関わる因子をスクリーニングにより同定していきたい。

本研究で確立したショウジョウバエにおけるグリオシド発現系はグリオシドと A $\beta$  の凝集性を *in vivo* で理解する上で、非常に有用なツールを提供すると考えられる。そこで、本研究を発展させ、グリオシド産生系における神経機能低下のメカニズム解明、および A $\beta$  とグリオシドとの相互作用を抑制する薬剤開発への応用を検討していきたい。

さらに、本研究により新規マウス AD モデルの薬剤検定系としての有効性が確かめられ、本システムを用いることにより、AD 治療薬の薬剤検定が短期間で簡便に行うことができると考えられる。これにより、候補薬剤の最適化が可能になることから、AD 治療薬の開発がより加速されることが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sofola-Adesakin, O., Khericha, M., Snoeren, I., **Tsuda, L.**, Partridge, L. pGluA $\beta$  increases accumulation of A $\beta$  *in vivo* 1 and exacerbates its toxicity. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1): 109, 2016 (査読有り)

##### 2. 学会発表

1. Ubiquitin-modifications of Charlatan, a *Drosophila* NRSF/REST, is required for the  
inversible regulation of neuron specific genes expression Leo Tsuda, Yasutoyo  
Yamasaki, Young-Mi Lim. 第39回日本分子生物学会年会、平成28年12月1日、横浜

2. アルツハイマー病の発症に伴った神経変性の定量的解析モデル作成  
津田玲生

第35回日本分子生物学会学術集会、平成28年12月1日、東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許第6055123号

発明者：津田 玲生、林 永美

発明の名称：ベクターの開発

出願人：国立研究開発法人国立長寿医療研究センター

出願日：平成23年（2011年）4月7日

登録日：平成28年（2016年）12月9日

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。