

危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発（19-18）

主任研究者 篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（室長）

研究要旨

現代の超高齢社会において、認知症患者は今後も増加の一途を辿ると想定されており、その対策は社会的急務である。認知症の半数以上を占めるアルツハイマー病（AD）は、その大部分が孤発性であり、原因は十分には分かっていない。AD患者脳内の主蓄積物質であり、疾患の原因とされるアミロイドβ（Aβ）や、脳内のもう一つの主蓄積物であるタウの役割、また疾患の危険因子であるAPOE遺伝子多型や糖尿病の役割も含めた、さらなる病態の理解や、新たな着眼点からの治療薬開発を今後も継続的に行っていくことが必要である。そこで本研究では、剖検脳や動物モデル、臨床データを用い、研究倫理面にも配慮しながら、これまで我々が得てきた結果をさらに展開させる形で、（1）Aβやタウの蓄積・伝搬機構についての研究、治療薬の開発とともに、（2）危険因子であるAPOEや糖尿病の作用機序についての研究を行っていく。本研究が成功した暁には、ADの病態機序のより詳細な理解や、それに関連した新規治療標的の同定、患者個々の病態に即した治療薬開発が可能になるのではと考える。最終的には、ADをはじめとする認知症に対して、新たな治療法や診断法を提供し、健康長寿が実現する社会に貢献できるのではと考える。

主任研究者

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（室長）

分担研究者

里 直行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（部長）

福森 亮雄 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（室長）

A. 研究目的

世界的にも類をみないほどの早さで高齢化が進む日本では、2015年において500万人以上が認知症を有し、今後もその数は増大すると想定されており、その社会的対策は急務である。アルツハイマー病（AD）は認知症の半数以上を占めるが、その大部分は孤発性であり、原因は十分には分かっていない。AD患者脳内の主蓄積物質であり、原因とされるアミロイドβ（Aβ）を標的とした抗体療法や産生阻害薬などの治療法が臨床試験中であるが、

少なくとも発症してからではあまり効果がないのではないかというコンセンサスになりつつあり、より早期発見、早期介入を目指した診断方法や治療方法の開発が行われている。そのような状況下にて、脳内のもう一つの主蓄積物であるタウの役割や、危険因子として確立されている APOE 遺伝子多型や糖尿病の役割も含めたさらなる病態の理解や、現在開発されている治療法がターゲットできていない新たな着眼点からの治療薬開発を今後も継続的に行っていくことが、最終的に人類がアルツハイマー病を克服することにつながっていくのではと考えている。

これまでに我々は、剖検脳や動物モデルを用いて、アルツハイマー病におけるアミロイド β の蓄積機序や APOE、糖尿病の役割について独自の成果を挙げてきた。本研究ではさらにその成果を発展させ、アミロイド β のみならず、タウの蓄積機序や、それら危険因子がもたらす効果、相互修飾についての理解を深め、新規治療標的の同定を目指すとともに、新たな着眼点からの治療薬開発にも挑戦する。本研究ではこれまでの我々自身の研究成果や研究方法に立脚し、また長寿研が長年培ってきたリソースも生かしながら、臨床検体や臨床データならびに動物モデル、細胞モデルを柔軟に取り入れることにより研究展開を行う。それによって独自の研究成果が見込まれ、病態機序のより詳細な理解や、それに伴う新規治療標的の同定、患者個々の病態に即した治療薬開発が可能になるのではと考える。

B. 研究方法

(1) 全体計画

1. $A\beta$ やタウの蓄積・伝搬機構についての研究、治療薬の開発

領域分布に着目した剖検脳を用いた我々の解析から、シナプスが初期の $A\beta$ の蓄積に関係し、何か別の因子が後期の $A\beta$ の蓄積に関係していると考えられる (Shinohara et al., Brain 2017)。そこでそれについて、剖検脳や動物モデル、細胞モデルを用いて、さらに詳細な作用機序を明らかにするとともに、同様の手法にてタウの蓄積に関与する因子を同定する。同定した因子については、細胞や動物モデルを導入し検証を進めるとともに、バイオマーカーとしての検討も行う。また $A\beta$ を標的とした治療薬の開発も並行してすすめる。

2. 危険因子である APOE や糖尿病の作用機序についての研究、治療薬の開発

APOE や糖尿病はアルツハイマー病の危険因子であるが、同時に健康長寿にも影響を与える。そこで、それらがどのようにアルツハイマー病や健康長寿に関与しているのかについて我々独自の成果 (Shinohara et al. FASEB 2020, Shinohara et al., Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring 2020, Shinohara et al., Ann Neurology 2016, Takeda et al., PNAS 2010) を踏まえながら研究をすすめる。長寿研の縦断研究である NILS-LSA 等の臨床データからヒトレベルで実際に起きている事象を検討するとともに、動物モデルの解析から APOE とともにコレステロールなどの脂質代謝関連因子の役割を検討する。また治療薬開発も進める。

(2) 年度別計画

2019年度

1. A β やタウの蓄積・伝搬機構についての研究、治療薬の開発

- ヒト剖検脳を東京都健康長寿医療センターブレインバンクをはじめとする国内外の機関から入手し、A β やタウの蓄積と相関する因子を生化学や生命情報学を用いて同定する。
- A β を標的とした治療薬開発を主に細胞モデルを用いてすすめる。福森亮雄室長の協力のもとに、新規A β 産生阻害剤のスクリーニングを行う。

2. 危険因子であるAPOEや糖尿病の作用機序についての研究

- 動物モデルを導入、解析し、APOEや糖尿病のアルツハイマー病や健康長寿に対する作用についての理解を深める。里直行部長の指揮のもとに、糖尿病をはじめとする動物モデルを解析する。
- NILS-LSAを始めとする臨床データを解析し、APOEや糖尿病のアルツハイマー病や健康長寿に対する作用についての理解を深める。

2020年度

1. A β やタウの蓄積・伝搬機構についての研究、治療薬の開発

- ELISAによるタウの測定方法について、種々の抗体の組合せを検討し確立する。剖検脳での反応性ととも、脳脊髄液や血液での測定も試みる。場合によっては高感度ELISAを導入、開発する。
- A β の蓄積機序の分子的機序を理解するために、A β に結合する因子の同定ならびに、N末端が断片化する際の機序について検討する。N末端が断片化したA β の高感度ELISAを開発する。
- 剖検脳の解析をつづけ、A β やタウの蓄積に相関するとして同定した因子の妥当性を、動物モデルや細胞モデルを用いて検証する。バイオマーカーとしての検討するために、同定した因子の測定法を確立する。
- A β の産生阻害を標的とした治療薬開発をすすめ、薬剤スクリーニングを行う。同定した薬剤の最適化を行う。

2. 危険因子であるAPOEや糖尿病の作用機序についての研究

- 引き続き動物モデルを解析し、APOEや糖尿病のアルツハイマー病や健康長寿に対する作用についての理解を深める。
- 全米のNACCデータベースや長寿研コホートであるNILS-LSAの臨床データの解析を行う。
- APOEもしくは糖尿病の作用を基に、アルツハイマー病や健康長寿に作用する治療法

を開発する。現時点では、APOEの量やAPOEと関連する脂質分子がその標的と考えている。評価系の開発ならびにスクリーニングを行う。

2021年度

1. A β やタウの蓄積・伝搬機構についての研究、治療薬の開発

- A β やタウの蓄積に相関するとして同定した因子の妥当性を、動物モデルや細胞モデルを用いて検証を続け、妥当性が確認できた場合、治療法の開発を行う。患者検体を用いたバイオマーカーとしての検討も引き続き行う。
- A β を標的とした治療薬開発をすすめ、動物モデルで効果を検証する。

2. 危険因子であるAPOEや糖尿病の作用機序についての研究

- 引き続き、動物モデルを導入、解析し、APOEや糖尿病のアルツハイマー病や健康長寿に対する作用についての理解を深める。
- APOEを標的とした治療法を開発する。スクリーニングを行い、治療薬を同定する。同定した薬剤の最適化を行う。

(倫理面への配慮)

すべての基礎研究は事前に組み替えDNAおよび動物実験プロトコルなどが国立長寿医療研究センターで承認された後に開始する。組み換えDNA実験に関しては2004年2月に施行されたカルタヘナ法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）を遵守し、規定に則った実験プロトコルを作成し遵守して研究を行う。

加えて本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

「動物の愛護および管理に関する法律」（1973年法律第105号）

「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針」（2006年6月1日科発第0601001号厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）

また、剖検脳を用いた研究に関しては、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」

（2014年度文部科学省・厚生労働省告示第3号）を遵守する。国立長寿医療研究センターでの倫理委員会に本研究での解析の申請を行う。高齢者ブレインバンクにて設定された連結可能匿名化番号を付けた書類、サンプルが国立長寿医療研究センターに送付される。

C. 研究結果

- 本研究に必要な、APOE ノックインマウスや、ノックアウトマウス、また APP ノックインマウスやノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、糖尿病モデルマウスなどの繁殖、交配を進めた。

- ヒト剖検脳を東京都健康長寿医療センターブレインバンクや福祉村ブレインバンクから入手し解析に着手するとともに、 $A\beta$ やタウの蓄積、病態と相関する因子を、生命情報学的解析を用いて同定した。特に注目している神経系遺伝子 X については、AD 患者脳にてその発現が蛋白レベルで顕著に増加することを見出した。バイオマーカーとしての応用も踏まえ、その遺伝子 X に対する ELISA の開発を進めようとしている。
- タウに対する複数の ELISA を開発し、AD 患者剖検脳の不溶性画分での反応性が ELISA によって大きく変わることを見出した。論文の投稿準備中である。
- 東京都医学総合研究所の長谷川成人博士らが開発したタウの伝搬マウスモデルの導入をするため、長寿研にて倫理申請を行い承認された。
- 神経と $A\beta$ の関係性を探るため、マイクロダイアリシスを用いた *in vivo* マウス実験を行った。また結合因子の同定に向けた予備検討も進めている。
- 新規 $A\beta$ 産生阻害剤を大規模化合物ライブラリーからのスクリーニングにより見つけるため、培養細胞からの $A\beta$ 測定系の開発を行い、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) の支援のもとに、化合物スクリーニングをする準備を整えた。まず、大阪大学薬学系研究科 創薬サイエンス支援拠点が保管している、約 12 万化合物のスクリーニングを行おうとしている。
- APOE の長寿に与える影響を米国臨床データベースや動物モデルを用いて評価し、論文「APOE2 contributes to longevity independent of Alzheimer's disease」を投稿した (前所属機関である米国メイヨークリニックから続けている仕事)。
- APOE 機能制御を狙った治療法開発を行うために、アッセイ系の開発を行っている。ELISA ベースのアッセイ系の開発は大まかにできた。今後はカウンターアッセイの開発や薬剤の分注方法など詳細を詰めた後、スクリーニングにとりかかる。また *in vivo* での評価方法も検討している。
- 糖尿病合併アルツハイマー病モデルの寿命に関する論文「Increased levels of $A\beta$ 42 decrease the lifespan of *ob/ob* mice with dysregulation of microglia and astrocytes」が The FASEB Journal 誌に採択された。
- 糖尿病合併アルツハイマー病モデルマウスで発現が増加する遺伝子 LSS (Lanosterol synthase) について、大阪大学の真下先生の協力のもと、ゲノム編集記述によりコンディショナルノックアウトマウスを作製し、導入した。現在バッククロスを進めている。またそれに関連して、アストロサイト特異的に Cre recombinase を発現するマウスをジャクソンラボ社より導入した。
- 米国臨床データベースを用いて APOE 多型と糖尿病の認知機能低下に与える影響を明らかにし、論文「Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline: an analysis of NACC database」を Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring 誌に投稿し、採択された。

D. 考察と結論

前回の研究開発費の支援により研究の土台作りがある程度できていたこともあり、本研究開発費の支援が始まってまだ1年目ではあるが、論文報告という形で成果を出し始めることが出来ている。今後もそれらに関連する研究を引き続き行うとともに、AD発症機序理解のためのヒト剖検脳解析や、新規治療法開発のためのAPOEやA β を標的とした創薬研究を進め、ADの病態解明、治療薬開発を目指していきたいと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinohara M, Tashiro Y, Shinohara M, Hirokawa J, Suzuki K, Onishi-Takeya M, Mukouzono M, Takeda S, Saito T, Fukumori A, Saido T, C, Morishita R, Sato N. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *The FASEB Journal*, 34(2):2425-2435, 2020
2. Shinohara M, Tashiro Y, Suzuki K, Fukumori A, Bu G, Sato N. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 12(1): e12006, 2020
3. Shinohara M, Shinohara M*, et al. 5-HT3 Antagonist Ondansetron Increases ApoE Secretion by Modulating the LXR-ABCA1 Pathway *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(6), 1488
*筆頭著者および責任著者

2. 学会発表

1. 篠原 充. サンドイッチELISAを活用した剖検脳研究からの知見. 第38回日本認知症学会学術集会 ホットトピック徹底討論「A β , ApoE, タウの病態形成における役割再考」
2019年11月8日 東京都
2. 篠原 充 他 ob/obマウスにおけるA β 42の増加は寿命を短くさせる. 第38回日本認知症学会学術集会 ポスター発表<基礎A β , APP, presenilin>. 2019年11月7日 東京都
3. 篠原 充 危険因子にも着目したアルツハイマー病の治療標的の同定と治療薬の開発
第8回 大阪大学神経難病フォーラム、2019年8月30日 吹田市
4. Shinohara M et al. Increased Levels of A β 42 Decrease the Lifespan of Ob/Ob Mice with Dysregulation of Microglia and Astrocytes. *Alzheimer's Association International Conference 2019*. July 16, 2019, Los Angeles, United States

5. 篠原 充 他. ob/ob マウスにおける $A\beta 42$ の増加は寿命を短くさせる。
第 61 回日本老年医学会学術集会 一般演題、口述 2019 年 6 月 7 日 仙台市
6. Shinohara M. Implications from Alzheimer's disease risk factors. The 5th
NCGG-ICAH Symposium Apr. 11th, 2019, Obu city

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし