

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

アルツハイマー病先制治療のためのアミロイドβ蛋白重合抑止低分子化合物の開発  
(19-48)

主任研究者 柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 研究所長

研究要旨

アルツハイマー病 (AD) 発症の物質的基盤であるアミロイドβ蛋白 (Aβ) 重合体の形成を抑止する経口薬の開発を目指し、申請者が東京都健康長寿医療センター並びに慶應大学と共同開発した原子間力顕微鏡 (AFM) 実験系 (Oikawa et al., PLoS ONE, 2015) を、AFM 解析で優れた実績を有する企業 (生体分子計測研究所) に技術移転し、創薬に適した新規低分子化合物評価系を構築する。その上で、国立長寿医療研究センター (長寿研) が保有する低分子化合物 (リード化合物) の最適化に向けた活性評価を同企業において実施する。本研究の推進にあたっては、東京都健康長寿医療研究センターの村山繁雄博士、慶應大学理工学部の松原輝彦准教授ならびに東京薬科大学薬学部の林秀樹准教授の協力を頂く。

主任研究者

柳澤 勝彦 国立長寿医療研究センター 研究所長

分担研究者

河合 昭好 国立長寿医療研究センター 治療薬探索研究部長

A. 研究目的

本研究は、AD 脳における中核的病理所見である Aβ 重合を抑止する低分子化合物を開発することを目的とする。ヒト脳における Aβ 重合に関して申請者らは、神経細胞膜脂質の一つである GM1 ganglioside が重要な役割を果たすこと、すなわち、GM1 ganglioside-bound Aβ (GAB) が可溶性 Aβ の重合を誘導する内因性シードとして働くことを示した (Yanagisawa et al., Nature Med, 1995)。さらに最近、村山、松原らと共同し、ヒト脳より調製したシナプス膜脂質より抽出した脂質を AFM 下で再構成し、この膜上で Aβ 重合過程が詳細に観察可能であることを示した (Oikawa et al., PLoS One, 2015)。本研究はこれらの研究知見を基に、すでに長寿研・認知症先進医療開発センター・治療薬探索研究部 (部長: 河合昭好) において独自に探索、合成された Aβ 重合抑止低分子化合物の活性をさらに詳細

に評価し、これらの最適化により前臨床試験ならびに臨床試験への展開を図るものである。AD 先制治療薬開発は世界的に困難を極め未だ成功していないが、AD 成立の起始点にある AB 重合の分子構造学的解析に基づく低分子化合物の開発はこれまで例がなく、従来の AD 創薬とは一線を画す独創的な研究である。

## B. 研究方法

東京都健康長寿医療センターで剖検され保存されている脳試料より、AB 蓄積開始段階にある楔前部 (precuneus) 皮質および対照として AB 蓄積が回避される鳥距溝 (calcarine) 皮質を切離し、東京薬科大学においてシナプス膜を単離し、脂質を抽出する。この抽出脂質を慶應大学において AFM 基盤の上で再構成し、その上に可溶性 AB を反応させ、その結果誘導される AB 重合線維を AFM にて詳細に観察する。加えて、抗 GAβ 抗体による AB 重合抑止を確認する。尚、実験精度を確かなものとするため、ヒト脳シナプス膜由来脂質実験に先立ち、市販の脂質 (GM1 ganglioside, cholesterol, sphingomyelin) を用いた AFM 基盤上の AB 重合を予備的に確認することとする。上記 AFM 解析系については、慶應大学から (株) 生体分子計測研究所に段階的に技術移転し、創薬に適用しうる新規な低分子化合物定量的評価系を構築する。その上で、長寿研が保有する低分子化合物の定量的活性評価を実施する。得られた低分子化合物活性結果を踏まえ、低分子化合物の代謝安定性等を長寿研で総合的に評価する。本課題で AB の中でも神経細胞毒性の強い AB42 重合体の形成を有意に抑止する低分子化合物が得られた場合、速やかに製薬企業等と協議し、前臨床試験ならびに臨床試験への展開を検討する。

### (倫理面への配慮)

本課題の遂行に必要な倫理審査に関しては、長寿研、東京都健康長寿医療センター、東京薬科大学ならびに慶應大学に申請し、それぞれ審査を行った。

## C. 研究結果

### 原子間力顕微鏡を用いた AB42 重合評価系の構築

AD 脳におけるアミロイド形成を抑止しうる低分子化合物を開発するにあたり、その主要構成成分である AB42 の重合を正確に評価する解析系が必要となる。AB42 は自然重合性に富む蛋白であるため、通常のチオフラビン T 等の蛍光色素を用いた重合評価系では必要となる AB42 濃度が高過ぎ非特異的な重合が生じるという大きな障害があった。本研究では、申請者らがヒト脳試料より抽出した脂質を用いて、新たに開発した原子間力顕微鏡 (AFM) による AB42 重合観察法 (Oikawa et al., PLoS ONE, 2015) を、多数の試料について定量的な解析が可能な評価系への改良を行った。上記論文の共著者で申請者と共同研究

を行なっている慶應大学（松原輝彦准教授）から上記 AFM 解析の基本的作業手順を生体分子計測研究所に技術移転し、同研究所の独自の AFM 解析技術をも活用し、ガングリオシド、コレステロールならびにスフィンゴミエリンを用いた再構成脂質膜上に可溶性 A $\beta$ 42 を反応させ、それにより誘導される A $\beta$ 42 の重合ならびに線維化を観察した。その結果、ヒト脳で検出される典型的な太さと螺旋型の形状を伴うアミロイド線維が認められた。加えて、通常のアミロイド線維よりも細く、直線的な形状の線維性構造も観察された。これらの夾雑する重合体を分離し、典型的なアミロイド線維の形成のみを定量的に評価することを目的に、得られた AFM 画像を画像解析ソフトで処理し、一定の高さ以上の線維性構造物のみを抽出、定量する解析系を構築した（図 1）。

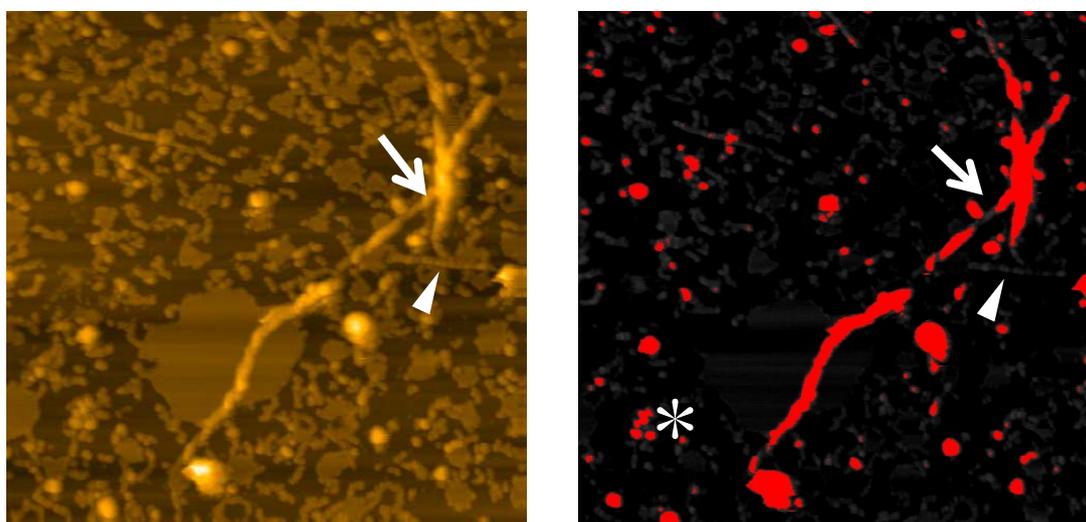


図 1. AFM を用いたアミロイド線維の定量解析法構築. AFM において観察された 2 種のアミロイド線維（螺旋型ならびに直線型）を太さ（AFM 上の高さ）の違いにより判別し、螺旋型線維のみを選択的に抽出する方法を開発した.（左）A $\beta$ 42 重合により形成されたアミロイド線維の高速 AFM 観察画像. 太い螺旋型線維（矢印）と細い直線型線維（矢頭）が観察される.（右）AFM 画像（左図）の高さによる二値化. 一定の高さ以上の粒子（\*）と螺旋型線維（矢印）が選択され、細い直線型線維（矢頭）は消去されている.

### 抗 GAB 抗体による A $\beta$ 42 重合の抑制

国立長寿医療研究センターで独自に探索、合成した A $\beta$ （A $\beta$ 40）重合抑制活性を有する低分子化合物群について、それらの A $\beta$ 42 に対する重合抑制活性を正確に定量的評価するための準備作業として、申請者らが作製した抗 GAB 抗体（脳内における A $\beta$ 42 重合の開始点を特異的に認識する抗体）を用い、本研究により構築した AFM 下における A $\beta$ 42 重合の抑制を評価、確認した。その結果、極めて低い濃度の同抗体によって A $\beta$ 42 重合による線維化は抑制されること（図 2）、また同抗体の線維断端への結合像が観察された。さらに、抗 GAB 抗体による A $\beta$ 42 重合抑制が定量的に観察可能であることが用量依存性実験にて確認された。令和 2 年 3 月中に約 30 種の低分子化合物の評価を終了した。

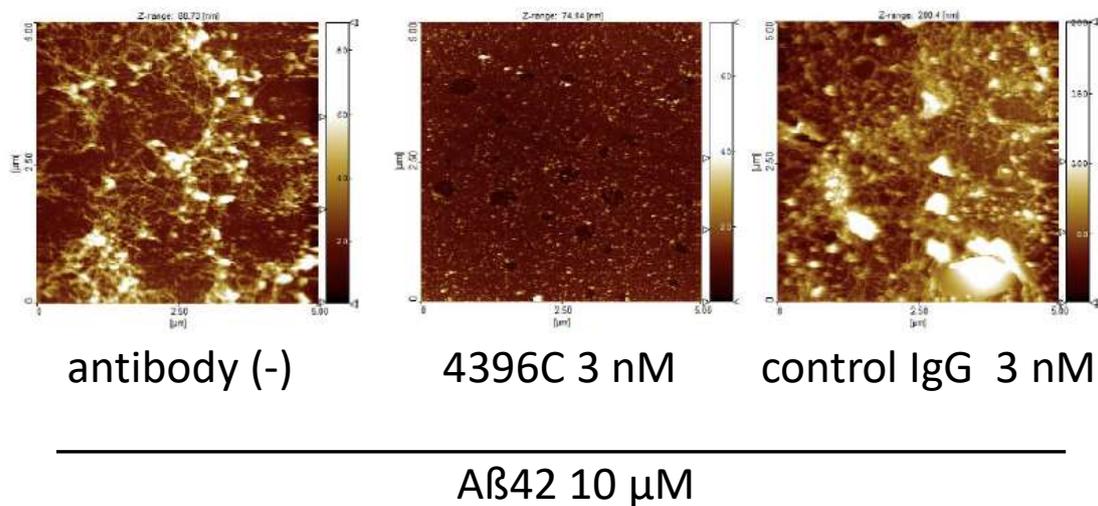


図2.GM1 ガングリオシド、スフィンゴミエリンならびにコレステロール（以上は市販の試薬を購入）を AFM 基盤に固着させた上で、可溶性 Aβ42 (10 μM) と抗 GAB 抗体 4396C (3nM) を反応させ、形成されたアミロイド線維を観察した。4396C は Aβ42 濃度の 0.1%以下の極めて低い濃度で Aβ42 重合を顕著に抑制した。

### ヒト脳シナプス膜構成脂質調製系の構築

Aβ (Aβ40 および Aβ42) 重合によるアミロイド線維の形状ならびに神経細胞毒性は、Aβ 重合が生じる環境に大きく依存することが知られている。アルツハイマー病脳におけるアミロイド形成を抑止しうる薬剤の開発を最終目標とする本研究においては、ヒト脳におけるアミロイド形成の環境を形成し実験を進めることが必要である。そこで、Aβ42 重合によるアミロイドの形成と蓄積が最も早期に、且つ、高度に生じる特異領域である楔前部 (precuneus) 大脳皮質に焦点をあて、同部位においてまさにアミロイド蓄積が始まりつつある段階の剖検脳を選択し、それよりシナプス膜を単離し、その構成脂質を抽出することとした。東京都健康長寿医療センター (村山繁雄博士) と共同し、同センターが保有する多数の剖検脳の中から本研究に適した対象脳を選択し、関心領域大脳皮質試料を切り出した。一方、大脳皮質試料からシナプス膜脂質を高い純度で抽出するにあたり、東京薬科大学 (林秀樹准教授) と共同し、まずラット脳で試行しシナプス膜の調製が正しく行われていることを、SNAP25、PSD95 等に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析で確認した。以上の準備作業の結果を踏まえ、上記剖検脳大脳皮質 (楔前部皮質ならびに対照として鳥距溝皮質) よりシナプス膜脂質の抽出を終了した。

#### D. 考察と結論

本研究課題が創出を目指す Aβ 重合抑止薬は、これまで大手製薬企業が手がけ、失敗に帰している、Aβ 産生阻害薬とは異なり、脳内における病的分子過程の最上流を選択的に阻止するものである。したがって、標的を攻撃することによる副作用 (on-target based adverse effect) は想定されず、中高年が長期間安全に服用できる可能性が期待される。AD 患者の急増が始まると予想される 2025 年を前に根治薬や予防薬は未だ開発されておらず、従前の創薬戦略とは一線を画した本研究は AD 先制治療薬開発に新たな可能性の道を開くものとして大きな意義を有する。

#### 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

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

以上