

長寿医療研究開発費 令和元年度 総括研究報告

創薬モデル動物を用いたアルツハイマー病治療薬探索
および発症メカニズムの解明（19-8）

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

我が国は、2015年から65歳以上が人口の4分の1を超える「超高齢社会」に突入していることから、多くの高齢者が罹患する認知症の患者数が増加の一途を辿っている。特に、認知症患者全体の6割以上を占めるアルツハイマー病（AD）に対する治療薬開発は、社会的なニーズとして求められている。しかし、国内外のこれまでの多大な努力にも関わらず、ADの進行そのものを抑制できる「疾患修飾薬」の開発には成功していない。この一つの要因としては、創薬開発に資する動物モデルがADの分野で不足していることが考えられている。これまで当研究室では、独自に開発したショウジョウバエとマウスモデルを用いて、ADに対する治療薬の開発および発症メカニズム解析を行ってきた。これまでの先行研究として、ショウジョウバエモデルを用いた薬剤スクリーニングを行い、機能性食品由来の化合物ライブラリー（100種類）、および既に米国食品医薬品局（FDA）で薬として承認されている既承認薬ライブラリー（800種類）から7種類の化合物同定に成功している。本年度の成果として、新規マウスモデルを用いて候補化合物の薬効を確認することができ、本研究アプローチの正当性が支持されている。さらに、ADモデルを用いた発症メカニズム解析を実施し、ADにおける神経変性誘導のメカニズムを明らかにすることができた。これらは、ADにおける新規のメカニズムであることから、AD治療薬開発の新たな標的になることが期待されている。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎える我が国において、高齢者に特有な疾患の予防・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、本研究課題では、寿命が短く遺伝学的な操作も容易なモデル動物であるショウジョウバエおよびマウスを用いて、創薬

開発に資するモデル系を構築し、unbiasedの薬剤スクリーニングおよび発症メカニズム解析を行うことにより、最終的には治療薬の開発を目指している。

B. 研究方法

AD 治療薬の個体レベルでの探索研究

ADの発症に関わるアミロイド前駆蛋白質 (APP) が同定されてから25年以上が経過しているにもかかわらず、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。従来のAD治療薬開発は特定の発症メカニズムに基づいて化合物の選定が行われてきたことも、失敗の要因として考えられている。そこで、本研究では機能未知の化合物からAD治療薬の候補化合物同定を目的として、ショウジョウバエモデルを用いて個体レベルでの薬剤スクリーニングを実施してきた。これまでの薬剤スクリーニングでは、米国食品医薬品局 (FDA) で認可されている薬剤を集めた既存薬ライブラリー (約800化合物) から2つ、食品由来の天然物ライブラリー (100化合物) から5つの化合物の同定に成功している。この中で、天然物ライブラリー由来のカテキン類であるE3、および既存薬ライブラリー由来の統合失調症治療薬FDA-1に関して、マウスを用いた検定を含めて詳しく作用機序の解析を行った。

アルツハイマー病重篤化メカニズムの解析

ADの発症を時系列的に見ると、発症から20年以上前にA β の産生が上昇し始め、その後、軽度認知障害 (MCI) を経て、脳の萎縮を伴う神経変性が誘導されている。従って、ADの重篤化を理解するためには、A β 産生から神経変性に至るまでの一連の過程を明らかにすることが重要だと思われる。これまでの報告から、A β 自身には神経変性誘導活性は低く、A β のN末端が切断と環状化という修飾 (pE化) を受けることにより産生された、pE化されたA β (pE-A β) に強い神経変性誘導活性があることが示唆されていた。当研究室でも、これまでの先行研究として、ショウジョウバエを用いてpE-A β がADにおける神経変性誘導の本体であることを明らかにしている (Tsuda *et al.*, Hum Mol Genet, 2017)。これらの研究から、A β がpE-A β へと変換される過程がADの重篤化においては重要な局面であることが予想されるため、本年度はADに伴うpE-A β の産生過程に着目し、pE化が誘導される分子メカニズムを探った。具体的には、A β がpE-A β に変換される時に必要な酵素であるGlutaminyl Cyclase (QC)の発現誘導を指標として、A β とpE-A β の産生との関係を探った。

新規マウスモデルの聴力低下の発症メカニズム解析

現在、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研究に広く用いられている。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等、創薬開発におけるモデルとしての妥当性が問題視されていた。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た。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 (Omata *et al.*, Aging, 2016)。これまでに、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)を導入した変異型 A β 42(A β 42^{E22G})を内耳有毛細胞で発現している Tg マウス (Math1-Arc)を作製してきた(特許第 6055123 号)。Math1-Arc の聴覚を聴性脳幹反応(ABR)および歪成分耳音響放射 (DPOAE) を用いて測定した結果、生後 4 ヶ月で超高音域(>24kHz)の聴力が特異的に低下する高音失墜型の聴覚異常を示すことが確認された。本研究では、Math1-Arc による聴覚異常はなぜ生じたのかを理解することにより、AD 発症におけるシナプス機能低下のメカニズム解明につながることを期待して研究を行なった。具体的には、AD にも高音失墜型の難聴にも共通して働く因子を検索した結果、シナプス小胞 (SV) のリサイクリングを制御するイノシトールリン脂質 PIP2 の代謝異常が候補として浮上してきた。

(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

AD 治療薬の個体レベルでの探索研究

これまでの薬剤スクリーニングから同定されてきた E3 および FDA-1 に関して、それぞれ作用機序解析およびマウスモデルを用いた検定を行なった。E3 に関しては E3 の投与により脳内 A β の分解促進が観察された。表面プラズモン共鳴法による分子間力の測定により E3 は A β に直接結合していることが確かめられたことから、E3 は A β に結合することにより分解を促進する“A β クリアランス促進薬”として働いている可能性が予想された。しかし、E3 は構造上、脳内への移行性が低いことが予想された。そこで、E3 自体での薬剤開発は困難だと判断し、E3 と同様な機構で A β に結合している化合物を検索することにより AD 治療薬を開発することにした。そこで、ドッキングシュミレーションを実施して、E3 と類似した機構で A β に結合できる可能性のある化合物を約 400 万化合物の中から 39 個に絞り込むことに成功した。一方、既存薬ライブラリーから同定されてきた FDA-1 は統合失調症の治療薬として知られ、脳内移行性も確かめられていることから、新規マウスモデルを用いた作用検定を実施した。具体的には、2 ヶ月齢の Math1-Arc に対して FDA-1 を 0.5mg/kg 体重という濃度で毎日経口投与したところ、生後 4 ヶ月で現れる高音刺激応答性 (>24kHz) の低下が抑制できることが確認できた。

アルツハイマー病重篤化メカニズムの解析

これまでに *in vivo* で詳しく A β と QC の発現誘導との関係を明らかにした例はない。そこで、我々はショウジョウバエを用いて A β の産生と QC 発現との関係を調べたところ、A

$\beta 42$ の産生により QC が mRNA レベルで発現誘導されることが確かめられた。QC の発現は $A\beta 40$ や pE- $A\beta$ では誘導されないことから、 $A\beta 42$ に特異的なシグナル伝達機構の存在が予想される。dsRNA を発現する系統を用いて、 $A\beta$ から QC 発現誘導に至るまでのシグナル伝達経路を探った結果、神経伝達因子受容体および細胞内キナーゼカスケードが QC の発現に関わっていることが明らかになってきた。特に、QC の発現誘導にはシナプスから核への情報伝達に働いている CREB が関わっていることが明らかになった。

新規マウスモデルの聴力低下の発症メカニズム解析

AD と高音失墜型難聴の両過程に関わる因子として、シナプス小胞 (SV) のリサイクリングに働くイノシトールリン脂質 PIP2 の代謝に着目した。実際 AD では、PIP2 の分解酵素である Synaptojanin 1 (Synj1) の変異をヘテロで導入することにより (Synj1-/+), APP マウスにおける記憶・学習障害の抑制が観察されている。内耳では Synj1 と Synj2 という 2 つのアイソフォームが発現していることが知られ、内毛細胞に Synj2 が発現し、シナプス後細胞である聴神経に Synj1 が発現している。そこで、Synj1 および Synj2 それぞれの機能欠損変異マウス (synj1-KO, synj2^{Moz}) を購入して、Math1-Arc と掛け合わせるにより、遺伝的な相互作用の可能性を探った。その結果、Synj1 +/- では聴覚異常に変化は見られなかったのに対して、Synj2^{Moz} /- では Math1-Arc による聴力低下が一部抑制できることが確認された。これらの結果から、Math1-Arc による高音失墜型の難聴に PIP2 の代謝が関わっている可能性が示唆されると同時に、Math1-Arc の作用点が有毛細胞であることが改めて確認された。

D. 考察と結論

ショウジョウバエおよびマウスによる解析系を用いて同定してきた薬剤 (E3, FDA-1) は、AD 治療薬開発における新たな可能性を示すことができた。E3 は、 $A\beta 42$ に直接結合して分解を促進するという“ $A\beta$ クリアランス促進薬”という新たな概念を創出した。また、既に統合失調症治療薬としての実績がある FDA-1 は、安全性および脳内移行性の担保があり、作用点も E3 とは異なることから、 $A\beta$ クリアランス促進薬と組み合わせて用いることにより強力な AD 治療薬になる可能性が期待される。

哺乳動物では pE- $A\beta$ の産生誘導する酵素として、グルタミルサイクレーズ (QC) が知られている。QC は AD の発症に伴って mRNA の発現が上昇し、老人斑が形成される場所に局在していることから、AD の重篤化に伴い $A\beta$ による QC の発現誘導が疑われていた。本研究により $A\beta 42$ が pE- $A\beta$ の産生酵素である QC の発現誘導に関わっていることを明確にしたことから、 $A\beta 42$ から QC 産生に至るまでのシグナル伝達経路は AD の重篤化にも関わる重要なものである可能性が考えられる。従って、このシグナル伝達経路は AD 治療薬開発における創薬標的を提供してくれる可能性が期待される。

本研究では、新規マウスモデルの表現型メカニズムとして、内耳有毛細胞におけるイノシトールリン脂質 PIP2 の代謝調節に関わる可能性を見出した。これまで、AD 患者あるいはマウスモデルを用いた解析から PIP2 の代謝異常が病態と関係していることが示唆され

ていることから、本研究結果は新規マウスモデルの正当性を支持した結果であると思われ、新規マウスモデルを用いた創薬開発が期待される。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1) 津田玲生

孤発性アルツハイマー病の発症における加齢と蛋白質代謝の役割.

第5回生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム、11月14日、前橋市

2) 津田玲生、山崎泰豊、林 永美

ショウジョウバエの脳神経で発現させたガングリオシドの機能解析.

第52回日本発生生物学会年会、5月15日、大阪市

3) 津田玲生

アミロイドBによるシナプス機能低下と加齢の関係.

第42回日本基礎老化学会大会、6月6日、仙台市

4) 南竜之介、林永美、津田玲生

聴覚機能を用いたアミロイドB (AB) によるシナプス機能低下の分子機構解析.

第38回日本認知症学会学術集会、11月8日、東京

5) 林永美、南竜之介、津田玲生

創薬モデル動物を用いたアルツハイマー病治療薬の開発.

第38回日本認知症学会学術集会、11月8日、東京

6) 津田玲生、南竜之介、林永美

Development of therapeutics for Alzheimer's disease using chemical biological approaches.

第42回日本分子生物学会年会ワークショップ、12月4日、福岡市

7) 南竜之介、林永美、津田玲生

Importance of nutrients in the late onset of Alzheimer's disease associated with aging.

第42回日本分子生物学会年会ワークショップ、12月4日、福岡市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明者：津田玲生、林 永美、立崎 仁、國吉智子

発明の名称：アミロイド β42 蓄積抑制用組成物、並びに、アルツハイマー型認知症予防治療用組成物及び脳アミロイドアンギオパチー予防治療用組成物。

出願年月日：国内出願 2020年3月31日

出願番号：特願 2020-62873 (国内)

出願人：国立研究開発法人国立長寿医療研究センター、常盤植物化学研究所(株)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

[総説]

津田玲生

第4章第2節 モデル動物を用いた機能性食品の認知症における評価.

認知症の早期診断技術と進行抑制／予防薬・機能性食品の開発, pp120-pp130, 技術情報協会, 2019年4月26日発刊