

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に関する研究  
(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 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)

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  $\beta$  の蓄積機序や APOE 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  $\beta$  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. $A\beta$ 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 の作用機序についての研究、治療薬の開発

APOE は大きく 3 つの多型に分かれる。そのうち APOE4 多型は AD の紛れもない危険因子であり世界中で研究が進められているが、その作用機序の詳細はまだ十分に分かっていない。一方で APOE2 は保護因子でありまた長寿にも関連するが、その作用について研究はほとんど進んでいない。我々は動物モデルのみならず臨床データを活用することで、独自の成果を挙げており (Shinohara et al., Ann Neurology 2016)、それを踏襲する形で研究を進める。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、APOE2 の保護作用に着目した治療法開発も進める。

(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 ノックインマウスの繁殖、交配を進めた。その過程で導入したAPOE4 ノックインマウスが、作成時の129系統が残っていることが判明し、遺伝子解析も取り入れバッククロスを続けている。また12か月齢前後のAPOE2 ノックインマウスとAPOE3 ノックインマウスについては、活動量を評価する行動実験を開始した。加齢に伴う変化を今後検討する。
- 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した。同一被験者由来の多数の領域のサンプルを、マイクロアレイにて遺伝子網羅発現解析を行い、A $\beta$ やタウの領域分布と相関する遺伝子を探索した。生命情報科学解析も取り入れ、A $\beta$ やタウの領域分布と相関する遺伝子や経路や明らかにした。
- 昨年度報告したことであるが、より公共のデータベース探索を行い、A $\beta$ やタウの領域分布と相関し、ADでその発現が増加している神経系の遺伝子としてXを同定している。今年度はその遺伝子Xに対する特異抗体を開発した。現在、その抗体を使いELISAの開発を進めている。
- 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、論文を投稿した（報告書を書いている2021年4月に採択）。
- A $\beta$ と結合する因子を同定するために、マウス脳ホモジネートを抗A $\beta$ 抗体で免疫沈降後のサンプルを電気泳動し、銀染色にてAPP過剰発現するマウスに特異的に確認できるバンドを複数同定した。切り出したゲルを質量分析にて解析を行っている。
- 家族性変異にも効果のある新規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、開発した培養細胞からの A $\beta$  測定系を用いて、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行った。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、市販化合物ライブラリーとオリジナルライブラリー約 6 万化合物のスクリーニングを終えるとともに、東京大学 創薬機構の約 21 万化合物のスクリーニングを進めた。大阪大学のライブラリーについては検証作業 (再現性、濃度依存性試験) を進め、A $\beta$  の産生に影響を与える複数の化合物を同定した。

- 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た論文「APOE2 is associated with longevity independent of Alzheimer's disease」を eLife という学術誌で発表した (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研究)。
- APOE と受容体の結合阻害を標的とした治療法を開発するため、開発した APOE と受容体の結合評価系を用いて、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、市販化合物ライブラリーの中から代表的な化合物約 6 千個を用いて、スクリーニングを行い、いくつかの候補化合物を得た。

#### D. 考察と結論

本研究開発費は 3 年計画の 2 年目にあたる。本年は、論文化や創薬研究での候補化合物の同定など、成果が徐々に得られており、おおむね順調にできたと考えている。組織改変による室長から副部長への移行に伴い本研究開発費は今年度で終了となるが、今後も研究を引き続き行い、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, Kikuchi M, Onishi-Takeya M, Tashiro Y, Suzuki K, Noda Y, Takeda S, Mukouzono M, Nagano S, Fukumori A, Morishita R, Nakaya A, Sato N  
Upregulated expression of a subset of genes in APP;ob/ob mice: Evidence of an interaction between diabetes - linked obesity and Alzheimer's disease.  
FASEB BioAdvances, 02 March 2021, doi : 10.1096/fba.2020-00151
- 2) Shinohara M, Kanekiyo T, Tachibana M, Kurti A, Shinohara M, Yuan Fu, Jing Zhao, Xianlin Han, Patrick M Sullivan, G William Rebeck, John D Fryer, Michael G Heckman, Guojun Bu  
APOE2 is associated with longevity independent of Alzheimer's disease

eLife 2020; 9:e62199 doi: 10.7554/eLife.62199

2. 学会発表

1) 篠原 充

原因因子や危険因子に着目した病態解明, 治療薬開発

第 39 回日本認知症学会学術集会 シンポジウム 9 Aβ 仮説再考: Aβ は AD 治療のメインターゲットとなり得るか. 2020 年 11 月 26 日 名古屋市 (一部 LIVE・オンデマンド配信)

2) 篠原 充, 田代 善崇, 鈴木 香, 福森 亮雄, 森島 真帆, 村山 繁雄, 里 直行

タウ ELISA の剖検脳での検討

第 39 回日本認知症学会学術集会 ポスター<基礎系: tau, a-syn, TDP-43 関連>  
2020 年 11 月 26 日 名古屋市 (一部 LIVE・オンデマンド配信)

3) 篠原 充, 鈴木 香, Bu Guojun, 里 直行

APOE 多型と糖尿病の認知機能や寿命への交互作用の検討

第 39 回日本認知症学会学術集会 ポスター<認知症全般: 疫学, リスクなど>  
2020 年 11 月 26 日 名古屋市 (一部 LIVE・オンデマンド配信)

4) 篠原 充

危険因子にも着目したアルツハイマー病の病態機構の解明、治療薬開発の研究

第 62 回日本老年医学会 第 2 回日本老年医学会 YIA 受賞講演 2020 年 8 月 4 日  
東京都 (WEB 開催)

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