

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

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に関する研究（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）

研究要旨

認知症の中でも6割近くを占めるアルツハイマー病は75歳以降に急激に発症率が上昇することから、我が国の団塊の世代が75歳に達する2025年までに治療薬の創出が求められている。これまで、国内外の研究機関ではアルツハイマー病の進行を抑制することができる低分子化合物の開発が盛んに行われてきたが、成功した例はまだ無い。この要因としては、機能未知の化合物からアルツハイマー病治療薬としての活性を有する化合物を選別できる、定量性が担保された解析システムが不足していることが考えられる。そこで、本研究室では、 $A\beta$ による神経毒性効果を経時的かつ定量的に判定できる解析システムをショウジョウバエおよびマウスで独自に作製し、アルツハイマー病治療薬の開発を進めてきた。本研究課題では個体レベルでの薬剤探索研究により、統合失調症治療薬として使われているフルフェナジン、および新規低分子化合物（N5, N6）に関して、 $A\beta$ による神経毒性効果に対する抑制効果を見出した。さらに、本研究課題ではショウジョウバエモデルを用いてアルツハイマー病の重篤化に関わることが予想されている、加齢と栄養摂取の関係について解析を進めた。その結果、アルツハイマー病の発症におけるタンパク質の摂取の重要性が明らかになってきた。

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）

研究期間 2019年4月1日～2021年3月31日

A. 研究目的

超高齢社会を迎えている我が国において、高齢者に特有なアルツハイマー病の予防・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、これまでにアルツハイマー病治療薬の開発は遅れている。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、アルツハイマー病治療薬の開発を目指している。同時に、本研究課題ではショウジョウバエモデルを用いて詳細な解析を行うことにより、これまで不明であったアルツハイマー病の重篤化に関わる発症メカニズムの解明を目的に研究を行った。

B. 研究方法

個体レベルでのアルツハイマー病治療薬の探索研究

当研究室では機能未知の化合物からアルツハイマー病 (AD) 治療薬の候補化合物同定を目的として、アミロイド β ($A\beta$) による毒性を経時的かつ定量的に判定できる動物モデルをショウジョウバエとマウスで確立してきた。ショウジョウバエモデルとしては、飼育温度の上昇 ($18^{\circ}\text{C} \rightarrow 30^{\circ}\text{C}$) により脳神経細胞に $A\beta 42$ を同期的に誘導できるシステムを確立している (*nSyb-Gal4; UAS-A β 42; tub-gal80^{ts}*)。一方、マウスモデルとしては、神経細胞と内耳有毛細胞との共通性に注目することにより、内耳有毛細胞に家族性 AD 変異 (Arctic) を導入した $A\beta 42$ ($A\beta 42^{\text{Arc}}$) を発現する Tg マウス (*Math1-Arc*) を作製している。この Tg マウスでは、高音域 ($>24\text{kHz}$) に対する応答性の低下が観察でき、 $A\beta$ の毒性を経時的かつ定量的に判定できる。聴力の測定には聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分耳音響放射 (DPOAE) を用いた。

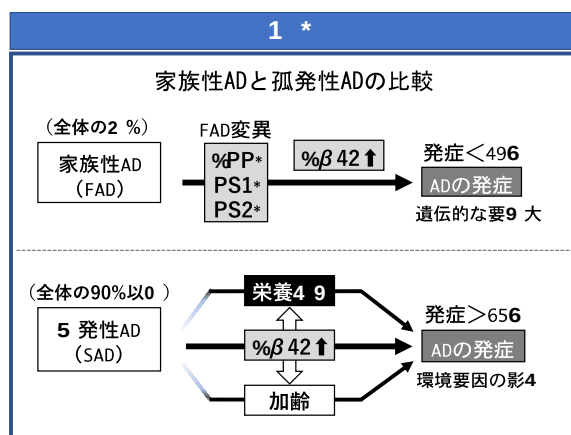
これまでに、ショウジョウバエモデルを用いて個体レベルでの薬剤スクリーニングを実施し、統合失調症治療薬として知られるフルフェナジン (FP) およびフラボノイド骨格を有する天然物 E3 を見出している。本研究課題では新規マウスモデル (*Math1-Arc*) を用いて FP の作用検定を行うと共に、E3 を出発点として $A\beta$ による神経毒性効果を抑制する作用を有する低分子化合物の同定を試みた。

孤発性アルツハイマー病の発症と栄養摂取の関係

アルツハイマー病 (AD) ではアミロイド前駆タンパク質 (APP) や APP 切断酵素である PSEN1/2 に変異を持つ、遺伝的要素の大きい家族性 AD (FAD) は全体の 10% 以下に過ぎず、殆どが 65 歳以降に発症する孤発性 AD (SAD) であることから、AD に対する治療法の確立のためにも SAD の発症メカニズムの解明が求められている (図 1)。

これまでの疫学調査研究から、SAD の発症には加齢と脳内 $A\beta 42$ の蓄積に加えて環境要因である食物からの栄養素の摂取低下が関わっていることが示唆され、「加齢」、「 $A\beta$ 」

そして「栄養素の代謝」が相乗的に働いて発症に至っていると考えられている（図1）。このような複雑な発症メカニズムを理解するためには、ショウジョウバエのように単純化されたモデルシステムが有用であることから、ショウジョウバエを用いて SAD 解析システムを開発した。具体的には、加齢した脳神経細胞に A β を発現させると同時に、与える栄養素の量を変化させることにより、加齢、A β 、栄養素という3つの要素を同時に解析することができるシステムを開発した。



（倫理面への配慮）

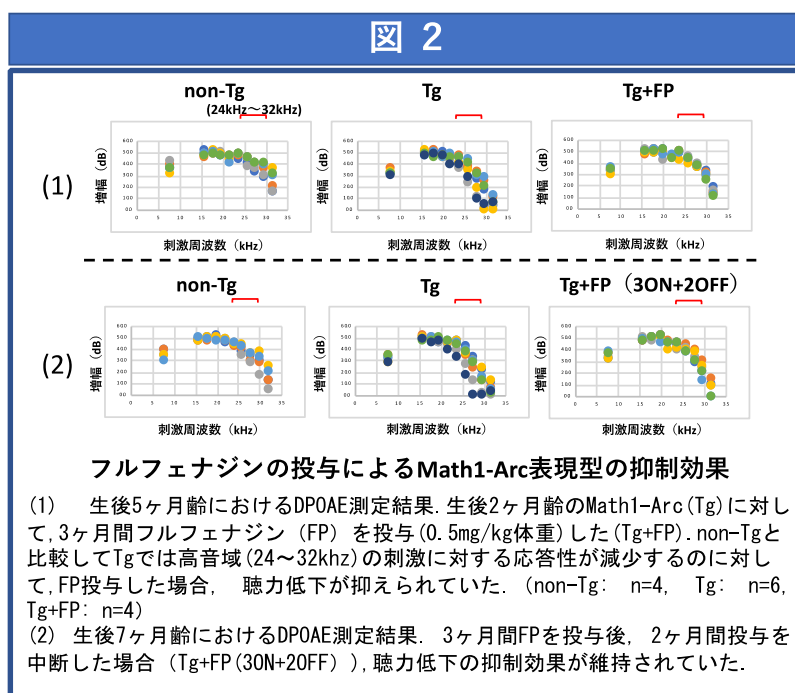
本研究ではモデル動物を用いることから、当研究所の動物実験の指針に基づいた研究を行った。

C. 研究結果

個体レベルでのアルツハイマー病治療薬の探索研究

成果1：統合失調症治療薬によるアルツハイマー病治療薬の可能性について

ショウジョウバエモデルに対して 800 種類の既存薬から構成される既存薬ライブラリーを検索した結果、統合失調症治療薬として知られるフルフェナジン（FP）が同定されてきた。そこで、生後2ヶ月齢の *Math1-Arc* に対して FP を 0.5mg/kg 体重という条件でゾンデを用いて経口投与した結果、生後5ヶ月齢における聴力低下が有意に抑制されることが明らかになった（図1(1)）。さら



に、FP を 0.5mg/kg 体重の条件で 3 ヶ月間投与後、中断してから 2 ヶ月後に聴力を測定したところ (7 ヶ月齢)、聴力低下に対する抑制効果が維持されていることが確認された (図 2 (2))。これまでの報告から、FP は *in vitro* における A β オリゴマー形成を阻害することが示めされていることから、FP の標的として A β を想定している (PLoS ONE 6:e24844, 2011)。

成果 2 : 新規低分子化合物 N5, N6 によるアルツハイマー病治療薬の可能性について

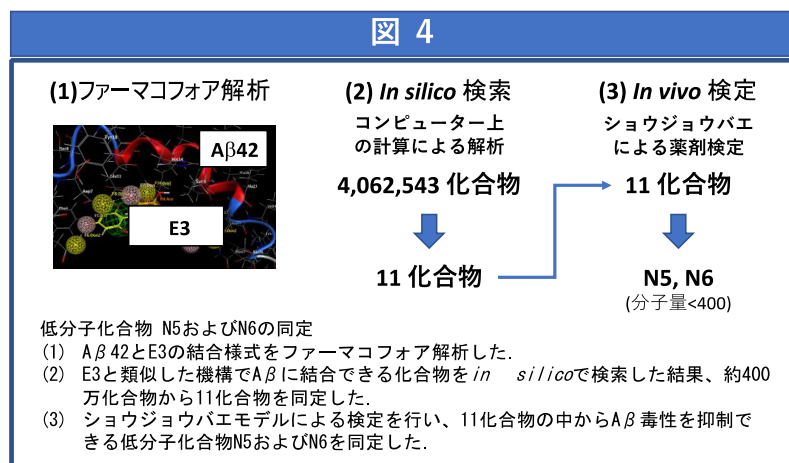
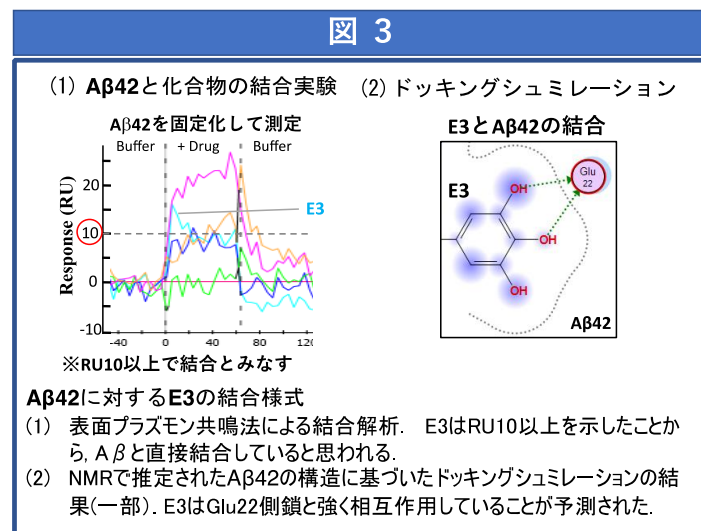
ショウジョウバエモデルに対して天然物ライブラリーを探索した結果、E3 というフラボノイド骨格を有する天然物が同定されてきている。E3 の作用機序を知るため、表面プラズモン共鳴法を利用した結合実験を行ったところ、E3 は A β と直接結合していることが判明した (図 3 (1))。そこで、NMR のデータから推定され

た A β 42 の構造に対してドッキングシュミレーションを行ったところ、E3 は A β の毒性発揮および安定性の制御に重要な役割が推定されている Glu22 側鎖と強く相互作用していることが予測された (図 3 (2))。しかし、E3 は構造から血液脳関門への透過性が低いことが予測されたことから、このままでは中枢神経作用薬としては適していないことが判明した。そこで我々は、E3 と類似した様式で A β 42 に結合できる化合物を検索することにより、A β 毒性を抑制でき、なおかつ BBB 透過性も高い化合物を同定できるのではないかと考えた。

このため、A β 42 に対する E3 の結合様式を考慮したファーマコフォア

(Pharmacophore) 解析を行なった (図 4 (1))。E3 に類似した様式で A β 42 に結合できる化合物を、*in silico* (コンピュー

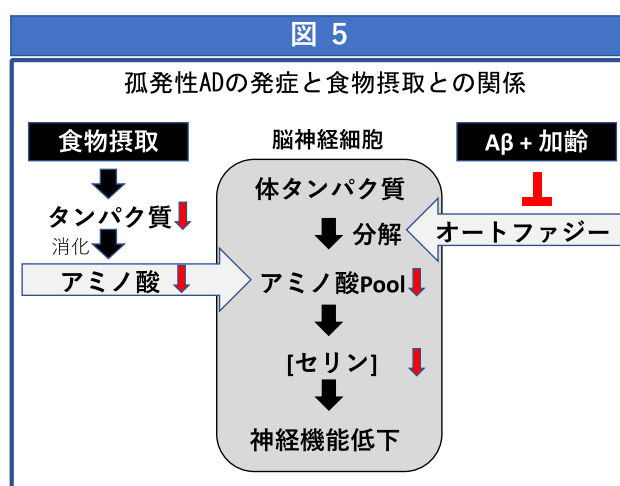
ター上) でスクリーニングした結果、約 400 万化合物の中から 11 個に絞り込むことが



できた (図 4 (2))。これらの中から A β 毒性に対する抑制効果を有する化合物を抽出するため、ショウジョウバエモデルを用いた作用検定を行ったところ、最終的に N5 および N6 が同定された (図 4 (3))。N5 および N6 は新規の低分子化合物 (分子量<400) であり、その構造から腸管上皮および血液脳関門 (BBB) の透過性が高いことが予測された。以上の結果から、N5 および N6 は Glu22 を中心として、A β と相互作用することにより神経毒性効果を抑制するという新規の作用機序を持つ低分子化合物であり、経口投与可能なアルツハイマー病治療薬になることが期待される。

孤発性アルツハイマー病の発症と栄養摂取の関係

孤発性 AD (SAD) の発症メカニズムを明らかにするため、栄養素の供給を調節することにより加齢して A β 発現が高まった時の栄養素の要求性が判定できるシステムをショウジョウバエで確立した。この系を用いた解析の結果、加齢した脳内で A β の発現が高まっている状況では、三大栄養素の一つであるタンパク質の摂取が減少したことによるアミノ酸摂取量の低下が神経機能阻害に寄与していることを突き止めた (図 5)。このとき、A β と加齢の効果については、細胞成分の代謝に働くオートファジーに対して抑制的に作用する事により、結果的に体タンパク質の分解によるアミノ酸の供給量を低下させていることが示唆された。従って、食物からのアミノ酸摂取量の低下に加えてオートファジーの機能が阻害



されるため、神経細胞内の総アミノ酸量 (アミノ酸 Pool) が著しく低下する結果、神経機能に異常が生じていると思われる。さらに応募者は、蛋白質を構成する 20 種類のアミノ酸の中で、どのアミノ酸の関与が大きいのかを調べた結果、セリンの濃度低下が病態発現に関わっていることを明らかにした (図 5)。以上のように、ショウジョウバエ SAD モデルを用いた解析から、加齢に伴った A β の毒性発揮にはタンパク質摂取量の低下が重要な鍵を握っており、これらが神経細胞におけるセリンの濃度低下に繋がって発症に至っていると思われる (Minami et al., 投稿準備中)。

D. 考察と結論

① アルツハイマー病治療薬の開発に関して

現在、日本のエーザイと米国バイオジェン社の共同開発により、凝集した A β に対する抗体薬であるアデュカヌマブが米国食品医薬品局 (FDA) の最終審査に入っている。こ

れが成功すれば、世界で初めてのアルツハイマー病に対する「疾患修飾薬」になることが期待されているが、抗体薬は薬価が高く、効果も弱いことから、安価で効果も強い低分子化合物による薬剤開発が求められている現状に変わりはない。本研究で見出した、2種類の化合物、フルフェナジンと N5/6 はいずれも低分子化合物であり、作用点もそれぞれ異なっていることから、開発に成功すればアデュカヌマブと相補的な薬剤になることが期待される。今後は、既存のアルツハイマー病マウスモデルを用いて、記憶・学習障害に対する化合物の効果を検定することにより、アルツハイマー病治療薬としての有効性を証明することにより臨床応用につなげていきたい。

② 孤発性アルツハイマー病の発症メカニズムに関して

本課題研究では孤発性アルツハイマー病の原因として予想されている栄養素摂取との関係を明らかにすることができた。加齢して $A\beta$ の発現が高まっている状況ではタンパク質の摂取量の低下と、続くアミノ酸摂取低下が神経機能低下に関わっていることが示唆される。これまでの疫学調査研究でも、タンパク質の摂取量の低下が認知症の発症リスクになる可能性が報告されていることから、本研究結果は病態の少なくとも一部は反映していると考えられる。さらに、本研究ではタンパク質を構成する全アミノ酸の中でも、特にセリンの濃度低下がアルツハイマー病の重篤化に関わっていることを突き止めた。AD 患者髄液を用いたメタボローム解析においても、AD の発症と髄液内セリン濃度の低下には相関が確認されていることから (Nagata *et al*, **Biomarker Res** 6: 5, 2018)、本研究成果はヒト AD 病態にも当てはまることが期待されている。

さらに、本研究成果で見出した孤発性 AD の発症メカニズムは、新たな創薬標的を同定する手がかりになると考えられる。最近の画像解析技術やバイオマーカーの発達により、アルツハイマー病の早期診断が可能になってきている。このため、現在のアルツハイマー病の治療戦略としては早期診断に続く先制治療が模索されている。しかし、依然としてアルツハイマー病が発症した後の病態の重篤化を抑制できる治療薬の開発が強く求められている現状に変わりはない。本課題研究から見出されてきたアルツハイマー病の発症における $A\beta$ 、加齢、そして栄養素摂取の関係性に関しては、アルツハイマー病の病態進行および重篤化にも関わると考えられるため、さらに詳しくメカニズム解析を行っていくことにより、新たな創薬標的の同定も期待される。

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

2019 年度

- 1) 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、2019 年、5 月 15 日、大阪市
- 2) 津田玲生
アミロイド β 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、2019 年、6 月 6 日、仙台市
- 3) 南竜之介、林永美、津田玲生
聴覚機能を用いたアミロイド β (A β) 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、2019 年、11 月 8 日、東京
- 4) 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、2019 年、11 月 8 日、東京
- 5) 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、2019 年、11 月 14 日、前橋市
- 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、2019 年、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、2019 年、12 月 4 日、福岡市

2020 年度

- 1) 津田玲生
アルツハイマー病の発症と食事の関係.
第 1 回基礎老化学会 市民フォーラム、2020 年、11 月 7 日、松本市
- 2) 南竜之介、林永美、津田玲生
アミロイド β によるシナプス機能低下の誘導メカニズム解析.
第 39 回日本認知症学会学術集会、2020 年 11 月 26 日、名古屋
- 3) 林永美、津田玲生
アルツハイマー病における神経変性誘導メカニズム解析.
第 39 回日本認知症学会学術集会、2020 年 11 月 26 日、名古屋
- 4) 林永美、南竜之介、津田玲生

ショウジョウバエとマウスを組み合わせたアルツハイマー病.

第 43 回日本分子生物学会年会ワークショップ、2020 年、12 月 2 日、東京

5) 津田玲生、南竜之介、林永美

内耳有毛細胞と神経細胞の共通性に着目したアルツハイマー病研究

第 43 回日本分子生物学会年会ワークショップ、2020 年、12 月 2 日、東京

6) Tsuda L, Minami R, Lim YM.

Searching for the therapeutic drugs for AD using *Drosophila* and mouse.

15 th International conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD/PD 2021) 2021 年、3 月 9 日 (On line)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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