

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

アルツハイマー病の発症メカニズムおよび治療薬開発 (28-46)

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

現在、我が国は4人に1人が65歳以上である超高齢社会に突入していることから、高齢者に多くみられる認知症に対する対策が求められている。特に、認知症の6割近くを占めるアルツハイマー病 (AD) に対する治療薬の開発が急務であることから、多くの大学や製薬企業では低分子化合物ライブラリーが整備されてきている。しかし、これまでのところ、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のが現状である。この主な要因として、ADの発症を経時的かつ定量的に評価できる *in vivo* 解析モデルが不足していることが挙げられ、発症メカニズム解析および薬剤開発が著しく遅れている。このため、これまで申請者は、ADの発症要因の一つであるアミロイドベータ ($A\beta$) による神経機能低下および神経変性誘導を、経時的かつ定量的に判定できるシステムをショウジョウバエおよびマウスで作製してきた。本研究課題では、これらモデルシステムを用いてADの発症メカニズム解析から治療薬開発までを目標としている。本年度はこれまでのところ、①[アルツハイマー病の重篤化メカニズムの解明]、②[新規マウスモデルの聴力低下の発症メカニズム解明]、③[AD治療薬の個体レベルでの探索研究]という3つのテーマに取り組んだ。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎える我が国において、高齢者に発症する疾患の予防・治療法の開発が急務である。しかしながら、高齢者に特有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、本研究プロジェクトでは、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、発症メカニズムの解明および治療薬の開発を目的としている。

B. 研究方法

アルツハイマー病重篤化メカニズムの解明

AD では発症の約 20 年前からアミロイド β ($A\beta$) が脳内に蓄積を開始し、軽度認知障害 (MCI) を経て認知障害を発症することが示されている。さらに、認知障害を発症した後も脳の萎縮に代表される病態の進行が観察される。このような AD 病態の重篤化におけるメカニズムに関してはほとんど明らかになっていない。我々は神経変性の誘導を指標として、AD 病態の重篤化のメカニズム解明に挑んでいる。AD における神経変性の誘導メカニズムとして、アミロイド β ($A\beta$) の N 末端が切断と環状化を伴う変異 (pE 化) されることが重要であることが示唆されていた。pE 化による神経変性誘導メカニズムを探るため ショウジョウバエで pE 化 $A\beta$ (pE- $A\beta$) を発現するシステムを確立し、 $A\beta$ と比較することにより神経変性誘導メカニズムの解明を試みた。

新規マウスモデルの聴力低下の発症メカニズム解明

AD の発症原因因子として $A\beta$ 産生の前駆体である APP が見いだされてから 20 年以上が経過している。その間、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こと等が創薬開発の問題として指摘されていた。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る。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。このモデルでは、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 $A\beta_{42}$ ($A\beta_{42}^{E22G}$) を内耳有毛細胞で発現している Tg マウス ($[Math1^E-A\beta_{42}^{E22G}]$) を作製した (特許第 6055123 号)。 $[Math1^E-A\beta_{42}^{E22G}]$ の聴覚を聴性脳幹反応 (ABR) により測定した結果、 $A\beta_{42}^{E22G}$ を内耳有毛細胞で発現させた系統に関して、生後 4 ヶ月で超高音域 ($>32\text{kHz}$) の聴力が特異的に低下していることが確認されている (Omata *et al.*, 2016)。本年度は、 $A\beta$ の発現により超高音刺激応答の低下が生じるメカニズムの解明を目指して、組織化学的な解析を行った。

AD 治療薬の個体レベルでの探索研究

AD の発症に関わる APP が同定されてから 20 年以上が経過している現在においても、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 of 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、要因として考えられる。そこで、本研究ではショウジョウバエモデルに対して、個体レベルでの薬剤スクリーニングを実施することにより治療薬の開発を目指す。本年度はショウジョウバエモデルを使って、米国食品医薬品局 (FDA) で既に薬剤として認可されている、いわゆる既存

薬ライブラリーから AD 治療薬としての活性を有する化合物の同定を目指した。

(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

アルツハイマー病重篤化メカニズムの解明

ショウジョウバエ脳神経細胞に $A\beta$ 42 あるいは pE- $A\beta$ を発現させ、頭部抽出液について $A\beta$ の凝集性を生化学的に検討した。その結果、pE- $A\beta$ の発現では $A\beta$ と比較した場合、界面活性剤に対する抵抗性が上昇し、蟻酸でしか抽出できない「不溶性分画」の割合が上昇してることが確認できた。面白い事に、 $A\beta$ は pE- $A\beta$ の存在下では有意に凝集性が上昇していることが確認された。この結果は、in vitro で提唱されていた「 $A\beta$ は pE- $A\beta$ 依存的に凝集性が上昇する」というシーズ仮説に合致し、AD 重篤化を考える上で重要であると思われる。さらに、 $A\beta$ と pE- $A\beta$ による神経変性誘導に関して検討した結果、pE- $A\beta$ の発現により小胞体ストレス (ER ストレス) 活性化が生じる結果、カスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導していることが明らかになった。さらに、AD の発症原因因子の一つである Tau との関係を検討した結果、pE- $A\beta$ とヒト Tau の同時発現により神経変性が著しく誘導されることが確かめられた。このときの遺伝子発現を調べた結果、pE- $A\beta$ とヒト Tau の同時発現により ER ストレス応答には影響せず、JNK シグナルが活性化していることが確かめられた。以上の結果から、pE- $A\beta$ には小胞体ストレスを介して慢性的に神経変性を誘導する一方で、Tau の発現が上昇してきた細胞では JNK シグナル応答を活性化させることにより急性的に神経変性を誘導する活性を有することが予想される (Tsuda *et al.* 2017)。

新規マウスモデルの聴力低下の発症メカニズム解明

新規マウスモデルでは $A\beta$ を内耳有毛細胞に発現させることにより、生後 4 ヶ月で超高音刺激応答の著しい減少が観察されることから、超高音刺激応答に関わる領域の有毛細胞に関して、組織化学的観察を行った。最初に、ファロイジン染色を行い、有毛細胞の脱落を観察したところ、生後 5 ヶ月での細胞脱落は観察されなかった。この結果から、 $A\beta$ の発現による超高音刺激応答の減少には有毛細胞の変性は関わっていないことが明らかになった。さらに、シナプス機能調節における変化を検討する目的で、有毛細胞側のシナプスマーカーである CtBP2 と聴神経側のシナプスマーカーである GluR2、それぞれに対する抗体で染色したところ、シナプス結合の数に変化は見られなかった。しかしながら、シナプスの形態をよく見てみたところ、シナプス自体の縮小が観察された。これらの結果はシナプス機能調節に何からの変化が生じている可能性を示唆する。現在、シナプス小胞のリサイクリングに関わるイノシトールリン脂質の代謝に関わる酵素である Synaptojanin (Synj) との遺

伝的相互作用を検討している。

ショウジョウバエとマウスを用いた AD 治療薬の開発研究

これまでに A β 42 の変異体を温度依存的に神経細胞で過剰発現するシステムをショウジョウバエで確立している。この系では飼育温度を 18°C から 29°C に上昇させるだけで神経細胞における変異型 A β の同調的な発現が保証され、発現誘導後 7 日で行動異常（負の重力走性）が確認されている。これまでの先行研究から、機能性食品由来の化合物ライブラリーの投与により、行動異常を回復する活性を有する化合物の同定に成功している（未発表）。本年度は FDA で既に承認されている薬物を 780 種類含む既承認薬ライブラリーをスクリーニングして、AD 治療薬の同定を試みた。その結果、2 つの化合物について、A β の発現による行動異常の回復を示す活性が確認された。

D. 考察と結論

本研究により AD の重篤化における pE-A β の重要性が確認された。特に神経変性の誘導メカニズムが明らかになってきたことから、pE-A β により小胞体ストレスがどのようにして誘導されるのかを明らかにすることが急務であると思われる。さらに、A β から pE-A β の産生に関わる酵素 (Glutaminyl cyclase; QC) は新たな創薬ターゲットとして注目される。さらに、新規マウスモデルの表現型としてシナプス機能調節機構も示唆されたことから、AD 病態における相関が予想される。さらに、本年度は FDA 既承認薬ライブラリーの中から A β による神経毒性効果を抑制する活性を有する薬剤を 2 つ同定することに成功している。これらの候補薬剤に関しては、pE-A β による神経誘導に対する効果についても検討することにより、AD の発症における効果を推定していきたい。さらに、新規マウスモデルにこれらの候補薬剤を投与することにより、表現型である聴力低下を抑制できるかどうかを検討したい。これらの研究から、開発が遅れている AD に対する疾患修飾薬の開発を期待している。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) **Tsuda L***, Omata Y, Yamasaki Y, Minami R, Lim YM*.

Pyroglutamate-amyloid- β peptide expression in *Drosophila* leads to caspase-dependent and endoplasmic reticulum stress-related progressive neurodegeneration.

Hum Mol Genet, 26: 4642-4656, 2017

2. 学会発表

1. Tsuda L.

Chemical genetic approach to identify the therapeutic drugs for Alzheimer's disease using *Drosophila* and mouse model.

4th Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC4)、May 8, 2017, Osaka, Japan

2. Lim YM, Tsuda L.

Establishment of new Alzheimer's disease mouse model using auditory hair cells.

Keystone Symposium, Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (E2), May 18, 2017, Yokohama, Japan

3. Lim YM, Tsuda L.

A β pE3-42 in *Drosophila* leads to endoplasmic reticulum stress-related neurodegeneration

第 40 回日本基礎老化学会大会, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋市

4. 南 竜之介、林 永美、山崎泰豊、津田玲生

ケミカルバイオロジーによるアルツハイマー病 (AD) 治療薬の開発研究.

第 36 回日本認知症学会学術集会, 2017 年 11 月 25 日, 金沢市

5. 林 永美、山崎泰豊、南 竜之介、津田玲生

ショウジョウバエ NRSF/REST 相同因子 Charlatan の転写後修飾による神経機能調節機構.

第 40 回日本分子生物学会学術集会, 2017 年 12 月 10 日, 神戸市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2017-099855

発明者：山崎泰豊、柳澤勝彦、津田 玲生

発明の名称：遺伝子組換え無脊椎動物アルツハイマー病モデルおよびその利用法

出願人：国立研究開発法人国立長寿医療研究センター

出願日：平成 29 年 (2017 年) 5 月 19 日

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

[総説]

津田 玲生

新規アルツハイマー病モデルマウス：加齢性感覚器障害とアルツハイマー病との関連.

日本基礎老化学会誌「基礎老化研究」, 41(1): 15-23, 2017