

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 認知症先進医療開発センター 創薬モデル動物開発室（室長）

研究要旨

3年間全体について

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。これまでに、AD治療薬の開発を目指して、国内外の多くの研究機関で開発が進められているが、いまだに成功していない。そこで、本研究では従来の手法とは異なり、個体レベルのスクリーニングからAD治療薬の開発を行うと同時に、発症メカニズム解析を遂行することにより、新たな創薬標的の同定も目指して研究を行った。

薬剤開発に資するモデル系をショウジョウバエおよびマウスで確立することに成功し、米国食品医薬品局（FDA）で既に認可されている既存薬ライブラリー（800種類）について検定を行った結果、アミロイドβ（Aβ）による神経機能低下を抑制する活性を有する薬剤としてFDA1が見いだされた。FDA1は統合失調症治療薬として使われている薬剤で、脳内移行性および安全性の担保があることから臨床治療薬としての可能性が期待される。

AD発症メカニズム解析としては、以下の2つの方向から解析を進めた。一つは、ヒト脳内のAβ蓄積に働いていると考えられている糖鎖脂肪酸であるガングリオシドの機能に注目した。ガングリオシドの機能をin vivoで詳しく解析するため、ガングリオシドを持たない無脊椎動物であるショウジョウバエにヒトの酵素群を導入することにより、ショウジョウバエ脳神経細胞にガングリオシドを産生することに成功した。この解析系を用いてAβの凝集促進にガングリオシドが働いていることをin vivoで示す事ができた。もう一つの発症メカニズムとして、ADの重篤化に関わる神経変性誘導を詳細に解析した。これまでの研究で、ADの進行に伴いAβ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るpE-Aβが強い神経毒性効果を有することが示唆されていた。そこで、pE-Aβをショウジョウバエで発現させて、詳細に解析した結果、加齢にともない小胞体ストレス応答により神経変性が誘導されることを突き止めた。これらの結果からpE化修飾がADの重篤化において重要な役割をしていることが予想されたことから、pE化修飾に働く酵素であるグルタミルシクラーゼの発現を調べた結果、Aβにより発現誘導されることが明らかになってきている。

平成30年度について

前年度までに、ショウジョウバエによるADモデルを用いて、FDA 既存薬ライブラリーの中から統合失調症治療薬として使われている薬剤 (FDA1) が見いだされていた。そこで本年度は、この FDA1 がマウスによる解析系でも効果を示すかどうかを検定した。その結果、FDA1 の投与により、生後4ヶ月で観察される聴力低下 (>24kHz に対する反応) に対する回復が観察され、ショウジョウバエだけではなくマウスでも効果が確認された。さらに、本年度はショウジョウバエを用いてADの重篤化に対する理解を進めた。これまでの研究でADの重篤化にはAβのN末端がpE化という修飾を受けることが重要だということが示唆されていた。そこで、本年度はこのpE化に関係する酵素であるグルタミルシクラーゼ (QC) の発現誘導メカニズムを解析した。その結果、QCの発現はAβ42の作用により上昇してくることが明らかになった。

主任研究者

津田 玲生 認知症先進医療開発センター 創薬モデル動物開発室 (室長)

研究期間 平成28年4月1日～平成31年3月31日

A. 研究目的

ADの発症原因としてアミロイドカスケード仮説が提唱されてから25年以上が経過しているが、根本治療薬の開発には誰も成功していないのが現状である。Aβによる神経機能低下を短期間で定量的かつ経時的に判定できるシステムが不足していたことが要因の一つとして考えられる。そこで、本研究では創薬開発に資するモデルをショウジョウバエ及びマウスで作製し、個体レベルで薬剤探索研究を展開することにより、これまでになかった根本治療薬の創出を目的としている。さらに、作製したAD解析モデルを用いてADの発症メカニズムを明らかにすることにより、新たな創薬標的の同定を目指した。

B. 研究方法

3年間全体について

個体レベルでの薬剤スクリーニング

個体レベルで薬剤スクリーニングを行うため、ショウジョウバエを用いてAβによる神経機能低下が同期的に誘導される系統を樹立した。具体的には *elav-Gal4/Y; UAS-Aβ42; tub-gal80^{ts}* という系統を作出し、飼育温度を18℃から30℃にするだけでAβ42が脳神経細胞で同期的に誘導できるシステムを確立した。このショウジョウバエ系統に対して既存薬ライブラリーを投与することにより、Aβにより誘発される行動異常が抑制できる薬剤を検索した。さらに、ショウジョウバエで効果が見られた薬剤については、これまでに作製してきた新規マウスモデルに投与して作用検定を行った。具体的には、2ヶ月齢の新規マ

ウスモデルに対して、ショウジョウバエを使った薬剤検索で見いだされてきた FDA1 を週 5 日で経口投与した (5mg/kg 体重)。各月に聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分時音響放射 (DPOAE) を測定して聴力低下に対する薬剤の効果を検討した。

AD 重篤化のメカニズム解析

AD の発症過程では、 $A\beta$ 42 の上昇に従って記憶・学習能力が低下するのにつき、神経細胞死が誘導されることが解っている。これまで、 $A\beta$ 42 による神経機能低下に関しては多くのメカニズム解析が行われてきたが、神経変性の誘導メカニズムに関しては不明な点が多く残されていた。そこで、AD 患者において $A\beta$ の産生に続いて誘導される $A\beta$ の N 末端修飾に着目した。ショウジョウバエの光受容神経細胞に pE- $A\beta$ を発現させ、経時的に変性を誘導出来る系を確立し、神経変性のメカニズム解析を行った。さらに、pE- $A\beta$ と $A\beta$ の違いを見いだすため、pE- $A\beta$ および $A\beta$ をそれぞれ神経細胞で誘導させて、マイクロアレイ解析を行った。

次世代型ショウジョウバエ AD 解析モデルの作製

シアル酸を含む糖脂質であるガングリオシドは高等動物の神経系で多く発現し、 $A\beta$ の凝集を促進することにより AD の発症に関与していることが示唆されていた。しかし、ガングリオシドはショウジョウバエを含む無脊椎動物では産生されていないことから、遺伝学的な解析はこれまであまり行われていなかった。そこで、ヒトでガングリオシドの産生に働く酵素群 (SAT1, GALT6) をショウジョウバエの神経系で発現させ、シアル酸 (Neu5Ac) を餌に混入させて供給させた。

平成 30 年度について

統合失調症治療薬による新規マウスモデルの抑制効果

これまで、ショウジョウバエによる薬剤探索研究から見いだされて来た統合失調治療薬、FDA1 に関して新規マウスモデルに投与することにより、表現型である聴力低下に対する効果を検討した。具体的には、2ヶ月齢の新規マウスモデルに対して FDA1 (5mg/kg 体重) を週 5 日で経口投与した。各月に聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分時音響放射 (DPOAE) を測定した。

AD 重篤化のメカニズム解析

AD の重篤化には $A\beta$ の N 末端修飾 (pE 化) が関与していることが示唆されている。pE 化した $A\beta$ (pE- $A\beta$) と $A\beta$ の違いを見いだすため、pE- $A\beta$ と $A\beta$ をそれぞれ神経細胞で誘導されて、マイクロアレイを行った。

(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

3年間全体について

個体レベルでの薬剤スクリーニング

ショウジョウバエの脳神経細胞に A β 42 を誘導出来る系を用いて薬剤スクリーニングを行った。ケミカルライブラリーとしては機能性食品由来の化合物 (100種類) および FDA 既存薬ライブラリー (800種類) を検定した結果、6個の化合物が候補として同定されてきた。このうち既存薬ライブラリーから同定されてきた FDA1 は統合失調症に対する治療薬として使用されているものであることから、脳内への薬剤移行制が確認されている。そこで、FDA1 を2ヶ月齢の新規マウスモデルに投与した結果、生後4ヶ月における聴力低下が抑制されることが確認された。これらの結果から、FDA1 はショウジョウバエとマウスに共通した分子メカニズムで働いていることが示唆される。

ADの重篤化メカニズム解析

pE-A β を光受容神経細胞で発現させた後、経時的に神経変性を観察した結果、羽化後4週間で光受容細胞が変性することが明らかになった。詳しいメカニズムを解析したところ、カスパーゼ依存的なアポトーシスにより死んでいることが解った。遺伝学的な解析により詳しいメカニズムを調べた結果、小胞体ストレスにより変性が誘導されていることを突き止めた (Tsuda *et al*, 2017)。さらに pE-A β はヒト Tau と同時に発現させることにより神経変性誘導が早まることが確認された。遺伝子発現プロファイリング解析から、pE-A β は Tau と共存することによりストレス応答で働くキナーゼである JNK の活性化を促進していることが明らかになった。従って、pE-A β は Tau によるストレス応答シグナルの増強が生じていることが示唆されている。

これまでの研究から pE-A β が AD における神経変性誘導に重要な役割を持っていることが示唆されていることから、AD の重篤化メカニズムを知るためには pE-A β と A β の違いを知ることが重要であると思われる。pE-A β と A β の違いを見いだすため、pE-A β あるいは A β をそれぞれ神経細胞で誘導されて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、A β では発現上昇するが pE-A β では変化が見られない遺伝子を数個同定することに成功した。この中で、グルタミルシクラーゼ (QC) は pE 化に関わる酵素として知られ、A β から QC の発現に至るシグナル伝達が存在することが期待されている。

次世代型ショウジョウバエ AD 解析モデルの作製

ヒトでガングリオシドの産生に働く酵素群 (SAT1, GALT6) をショウジョウバエの神経系で発現させ、シアル酸 (Neu5Ac) を餌に混入させて供給させた。薬剤投与後、1週間目の頭部抽出液を質量分析機で解析した結果、GM3 が産生されていることが確認できた。これまで、A β 42 の2番目のグルタミン酸がグルタミンに変化した変異型 A β (Dutch 変異) では、GM3 に対する強い相互作用が確認されていたことから、A β 40 に Dutch 変異を導入したもの (A β 40^{Dutch}) をショウジョウバエ神経系で産生させ、ガングリオシドの存在、非存在下で A β 40^{Dutch} の凝集を検討した。その結果、ガングリオシドの産生に伴って A β ^{Dutch}

の凝集促進が観察された (Yamasaki *et al.*, 2018)

平成30年度について

個体レベルでの薬剤スクリーニング

ショウジョウバエのスクリーニングから同定されてきた FDA1 は統合失調症に対する治療薬として使用されているものであることから、脳内への薬剤移行制が確認されている。そこで、FDA1 を2ヶ月齢の新規マウスモデルに投与した結果、生後4ヶ月における聴力低下が抑制されることが確認された。これらの結果から、FDA1 はショウジョウバエとマウスに共通した分子メカニズムで働いていることが示唆される。

ADの重篤化メカニズム解析

これまでの研究から pE-A β が AD における神経変性誘導に重要な役割を持っていることから、AD の重篤化メカニズムを知るためには pE-A β と A β の違いを知ることが重要であると思われる。pE-A β と A β をそれぞれ神経細胞で誘導させて、マイクロアレイを行った結果、A β では発現上昇するが pE-A β では変化が見られない遺伝子を4個同定することができた。この中で、グルタミルシクラーゼ (QC) は pE 化に関わる酵素として知られている。

D. 考察と結論

3年間全体について

これまでのショウジョウバエとマウスによる個体レベルの薬剤スクリーニングから FDA1 という統合失調症治療薬が見いだされてきたことから、このモデル動物を組み合わせた解析系の有効性が確認できた。FDA1 は既に統合失調症治療薬としての実績がある薬剤であることから、安全面での担保があり、臨床適用可能な AD 治療薬開発に有利である。さらに、FDA1 はショウジョウバエとマウスに共通して働くことから、進化的に保存された作用機序が予想される。今後はショウジョウバエによる解析系を駆使することにより FDA1 の作用メカニズムを明らかにすることにより、FDA1 の治療薬としての信頼性を高めると同時に、分子改変を行う事により高い活性を有する治療薬開発にもつなげていきたい。

本研究では、ショウジョウバエの脳神経系でグングリオシドを産生させるという、世界初の試みに成功した。グングリオシドはアルツハイマー病だけではなく、パーキンソン病や糖尿病等の疾患の発症にも関与すると考えられていることから、本研究成果は AD 以外の疾患研究に対しても有用なツールになることが期待される。

さらに本研究では、AD の重篤化メカニズムとして pE-A β の重要性を見いだしている。これまでの研究では AD に伴う神経変性誘導についてはメカニズムがはっきりとしなかったが、本研究により pE-A β が小胞体ストレス応答を誘導する結果、神経変性が誘導されることを見いだしている。このことから、pE-A β による神経変性誘導をターゲットとした薬剤開発を行う事により AD の重篤化を抑制できる可能性が期待される。これまで行ってき

た薬剤スクリーニングと併用して開発を行う事により、AD の発症の広いステージで働く治療薬開発が行えると思われる。

平成30年度について

統合失調症治療薬である FDA1 により新規マウスモデルの表現型が抑制されることが確認されたことから、FDA1 はショウジョウバエからマウスまで共通したメカニズムで働いている可能性が予想される。FDA 1 は既に統合失調症治療薬として臨床適用されていることから、今後の開発によりヒトに適用出来る可能性が期待される。

さらに、本年度の解析結果として見いだされてきた A β の N 末端を修飾する酵素 (QC) が A β により誘導される事実は、AD の重篤化にも関わることが予想される。従って、本研究結果をさらに詳細に解析し、A β 42 から QC の発現に至迄のシグナル伝達機構を知ることにより、新たな創薬標的の同定につながる可能性が期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成28年度

- 1) Sofola-Adesakin O, Khericha M, Snoeren I, Tsuda L, Partridge L.
pGluA β increases accumulation of A β in vivo and exacerbates its toxicity.
Acta Neuropathologica Communications, 4: 109, 2016.
- 2) Omata Y, Tharasegaran S, Lim YM, Yamasaki Y, Ishigaki Y, Tatsuno T, Maruyama M, and Tsuda, L
Expression of amyloid-b in mouse cochlear hair cells caused eearly-onset auditory defect against high frequency sound stimulation.
Aging, 8: 1-14, 2016.
- 3) Lim YM, Tsuda L
Ebi, a *Drosophila* homologue of TBL1, regulates the balance between cellular defense responses and neuronal survival.
Am J Neurodegener Dis, 5: 62-68, 2016.

平成29年度

- 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) 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

平成30年度

1) Yamasaki Y., Tsuda L*., Suzuki A., Yanagisawa K.

A novel *Drosophila* model of Alzheimer's disease: Induction of ganglioside synthesis accelerates assembly of amyloid β -protein in the brain.

Scientific Reports, 8: 8345, 2018

2) Tsuda L*, Lim YM.

An Alzheimer's disease model system using *Drosophila*. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology Series**, *Drosophila* Models for Human Disease, Chapter 3.

(edited by Yamaguchi M.)

Springer Nature, pp25-40, 2018

2. 学会発表

平成28年度

1) Leo Tsuda, Yasutoyo Yamasaki, Young-Mi Lim

Ubiquitin-modifications of Charlatan, a *Drosophila* NRSF/REST, is required for the invertible regulation of neuron specific genes expression

第39回日本分子生物学会年会、横浜、12月1日、平成28年

2) 津田玲生

アルツハイマー病の発症に伴った神経変性の定量的解析モデル作成

第35回日本認知症学会学術集会、東京、12月1日、平成28年

3) Leo Tsuda

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

The 13th International Congerence on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Vienna, March 29, 2017.

4) Young-Mi Lim, Yasutoyo Yamasaki, Leo Tsuda.

A β E3-42 expression in *Drosophila* leads to Caspase-dependent and endoplasmic reticulum stress-related progressive neurodegeneration.

The 13th International Congerence on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, Vienna, March 31, 2017.

平成29年度

- 1) Tsuda L.
Chemical genetic approach to identify the therapeutic drugs for Alzheimer's disease using *Drosophila* and mouse model.
14th 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.
AβpE3-42 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

平成 30 年度

- 1) Tsuda L.
Chemical genetic approach to evaluate the toxicity of amyloid-beta using mouse and *Drosophila*.
Asian Society for Aging Research Symposium. April 19, 2018, Republic of Korea
- 2) 津田玲生
Molecular commonarities between auditory hair cells and neurons in the study of age-related neuronal disorder
第 51 回日本発生生物学会年会ワークショップ(オーガナイザー)、2018 年 6 月 8 日、東京
- 3) Minami R, Lim YM, Tsuda L.
Analysis of neuronal dysfunction mechanism common to dementia and senile deafness.
第 41 回日本基礎老化学会大会、2018 年 5 月 31 日、東京
- 4) 林永美、山崎泰豊、南竜之介、津田玲生
Charlatan, a *Drosophila* NREF/REST, is implicated in the neuronal diversity formation
第 13 回日本ショウジョウバエ研究会学術集会、2018 年 9 月 11 日、京都府
- 5) 南竜之介、林 永美、津田玲生

新規アルツハイマー病 (AD) モデルマウスにおける神経機能低下の分子メカニズム解析

第 37 回日本認知症学会学術集会、2018 年 10 月 13 日、札幌市

6) 南 竜之介、林 永美、津田玲生

加齢性神経疾患の研究における内耳有毛細胞と神経細胞との分子的共通性

第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 30 日、横浜

7) Lim YM., Yamasaki Y., Minami R., Tsuda L.

Chemical biological approaches to identify therapeutic drugs for Alzheimer's disease using mouse and Drosophila in vivo model systems.

14 th International conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD/PD 2019), Mar 29, 2019, Lisbon, Portugal

8) Yamasaki Y., Lim YM., Tsuda L.

Induction of ganglioside synthesis accelerates assembly of amyloid β protein in the brain.

14 th International conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases (AD/PD 2019), Mar 29, 2019, Lisbon, Portugal

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成 29 年度

発明者 : 津田玲生、林 永美

発明の名称 : ベクターの開発

出願年月日 : 国内出願 平成 23 年 4 月 7 日

特許登録日 : 平成 28 年 12 月 9 日

特許番号 : 特許第 6055123 号 (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

平成 30 年度

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

出願年月日 : 国内出願 平成 29 年 5 月 19 日

出願番号 : 特願 2017-099855 (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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし