

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「精神・神経疾患の分子病態理解に  
基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」  
研究課題「分子的理解に基づく抗アミロイド療法  
および抗タウ療法の開発」

## 研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成26年3月

研究代表者：井原 康夫  
(同志社大学生命医科学部・教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究チーム全体では、アミロイドカスケード仮説に基づいたアルツハイマー病の発症機序の理解と治療戦略として、4つの研究テーマ(1、基質特異的 A $\beta$ 産生抑制剤の開発;2、ヒト剖検脳を用いた  $\gamma$ セクレターゼ活性の変化の検討;3、病因アミロイド分子の検証;4、微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明)で研究に取り組んできた。

基質特異的 A $\beta$ 産生抑制剤の開発では、抗 A $\beta$ 療法の基盤的研究として、副作用の少ない基質特異的な  $\gamma$ セクレターゼ活性阻害に取り組んだ。A $\beta$ 産生の直接の基質である C99 のアミノ末端に特異的に結合するペプチド(C99 結合ペプチド)を創製し、C99 の  $\gamma$ 切断を特異的に抑制することができた。また、C99 結合ペプチドは APP の  $\beta$ 切断も基質特異的に抑制することがわかり、創薬の標的としての C99 アミノ末端の有効性を示すことができた。一方で、学術的な成果として、 $\gamma$ セクレターゼが基質のアミノ末端を捕捉し、細胞外ドメインの短い基質ほど効率良く切断されることが分かった。

ヒト剖検脳を用いた  $\gamma$ セクレターゼ活性の変化の検討では、孤発性アルツハイマー病患者剖検脳から脂質ラフト  $\gamma$ セクレターゼを分離し、 $\gamma$ セクレターゼ modulator の効果を検討したところ、健康者由来の脂質ラフト  $\gamma$ セクレターゼの場合と比較して、 $\gamma$ セクレターゼ modulator の効果が限定的であることがわかった。この結果は、 $\gamma$ セクレターゼ modulator が治療薬として効果が小さい可能性を暗示している。また、この脳内の  $\gamma$ セクレターゼ活性の変化は、A $\beta$ 蓄積初期(AD 発症以前)から起きていることがわかった。

アミロイド・オリゴマーに関する総合研究については、種々のモデルマウス作製に成功した。まず大阪変異発現マウスでの脳画像所見では、[<sup>11</sup>C]標識した PiB をリガンドとしたアミロイド PET を使用して検討した結果、変異を有する患者脳画像と同じ結果であった。従来の老人斑を含む混合型モデルよりも、より単純なモデルとして、今後の活用が望まれる。

次に、オリゴマー A $\beta$  である異常 A $\beta$  種の下流に位置すると想定されているタウ病態像を解析するために、エクソン 10 周辺のイントロン 9、エクソン 10 とイントロン 10 の約 6kb のヒトミニゲノム構造wp導入した結果、エクソン 10 を含むタウアイソフォーム(4R型)と含まないタウアイソフォーム(3R型)を発現することを観察した。このマウスは、FTDP-17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked with chromosome 17)として知られている前頭側頭葉型認知症モデルとしての意義もある。異常 A $\beta$  種とタウの病態間相互作用の解析をするために、このマウスと大阪変異マウスの交配実験が現在進行中であり、予備的な結果で、病態間相互作用を捉えることができたので、現在論文作成を目指して精査しているところである。大阪市立大学研究グループによって構築されたモデルマウスは、同志社大学研究グループによって利用され、同志社大学で開発された治療薬ペプチドの有効性を検証される計画である。

微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明では、チューブリンとタウ発現比の異常がタウオパチーを惹起するとの仮説に基づいて研究を進めた。チューブリンの発現量コントロールによるタウオパチーの発症抑制の可能性について線虫モデルを用いて検証したが、チューブリン又はチューブリンフラグメントと蛍光タンパク質とのキメラタンパク質などを持ちいても生体内での十分な発現がみられず、十分な検証は出来なかった。また、線虫モデルを用いて、タウ神経毒性領域の同定をおこなった。タウフラグメントを発現するモデル線虫を作成し、行動障害を指標に解析した結果、タウの C-末端側に神経機能障害を引き起こす責任配列がある事を見出した。さらにタウのパラログである MAP2 について検証した。MAP2 の C-末端はタウと極めて相同性が高く同様な神経障害を引き起こす可能性が考えられるものの、神経変性疾患との関係は解析されてこなかった。タウと同様にモデル線虫を作成し、その神経障害について検証した結果、タウと同様に、C-末端側のフラグメントを発現することで神経障害が認められた。アルツハイマー病脳における NFT をはじめとするタウ封入体での MAP2 の共存の可能性について、新たにタウに交叉しない MAP2 C-末端認識抗体を作成し、検討した。その結果組織学的解析、生化学的解析においても MAP2 がタウと共に不溶性凝集体を形成するという証拠は得られなかった。へパリンによる *in vitro* 重合系での解析の結果、MAP2 はタウと僅か3残基のアミノ酸配列の違

いによって重合しないことを確認した。したがって、MAP2 にも神経障害性があるものの、その重合性に違いによりタウは蓄積、MAP2 は消失すると考えている。これらの結果からアルツハイマー病などの神経変性はこれまでの認識と異なり、様々な神経骨格タンパク質による変性によってもたらされている可能性が考えられた。次に、これらタウ関連タンパク質の病理学変化について正確に捉える手法を検討し、タウ、MAP2 その他骨格タンパク質、神経マーカーについて正確な局在を決定出来る手法を開発した。今後、疾患モデルマウス、剖検脳への応用を予定している。

## (2) 顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. $\gamma$ セクレターゼの基質認識機構の解明

概要:  $\gamma$  セクレターゼの基質認識機構の解明に取組み、この酵素が基質のアミノ末端を捕捉して切断することを明らかにした。また、細胞外領域の短い基質ほど  $\gamma$  セクレターゼとの相互作用が高まり、結果的に  $\gamma$  セクレターゼによる切断を受けやすいことがわかった。本研究により、 $\gamma$  セクレターゼに基質選択性が存在することがはじめて明らかになった (Nat. Commun. 2013)。

#### 2. $\gamma$ モデュレーター AD 脳への効果

概要: 孤発性アルツハイマー病患者剖検脳から脂質ラフト  $\gamma$  セクレターゼを分離し、 $\gamma$  モデュレーターの効果を検討した。その結果、健常者のそれと比較して、 $\gamma$  セクレターゼ modulator の効果が限定的であることがわかった。これは、 $\gamma$  モデュレーターが治療薬として効果が小さいことを示唆している。また、この脳内の  $\gamma$  セクレターゼ活性の軽度認知障害の時期から起きていることがわかった (Neurobiol. Aging 2013)。

#### 3. 大阪変異をもつモデルマウスを作製した。

概要: アルツハイマー病の病因解析のための生体モデルとして、とくにオリゴマー A $\beta$  である異常 A $\beta$  種の成因機構の解析では、唯一のモデルと言える。アルツハイマー病モデルとして純粋型モデルとしての位置づけがあり、創薬スクリーニングの対象としての意義がある。デザインおよび諸性質の観点からも新規性がある。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. C99 結合ペプチドによる基質特異的 $\beta$ / $\gamma$ セクレターゼ阻害方法の確立

概要: A $\beta$  産生の直接の基質である C99 のアミノ末端に特異的に結合するペプチド (C99 結合ペプチド) を創製し、基質特異的な  $\gamma$  セクレターゼ活性阻害を実現した。また、C99 結合ペプチドは APP の  $\beta$  切断も基質特異的に抑制した。本研究では、酵素ではなく、基質を創薬の標的にすることで、 $\gamma$  セクレターゼや  $\beta$  セクレターゼの活性阻害について特異性を高められることを実証した (PCT/JP2013/50663 ; Nat. Commun. 2013)。

#### 2. ヒトゲノム型タウマウスの作製

概要: イントロン内変異を持つマウスと持たないマウスについては、生理的遺伝子発現であり、産生されるタウタンパク質もすべてアミノ酸置換がない野生型配列となって居る。つまり、本モデルマウスは、一般認知症のモデルとしての位置づけがあり、本マウスを使用してスクリーニングした薬剤は、ヒトへの高い応用能力が期待できる。

#### 3. 大阪変異をもつノックインマウスモデルの作製

概要: この KI マウスは、ヒト型配列ではなく、マウス配列に大阪変異を導入したものであり、今後の異常 A $\beta$  種をターゲットとする治療薬のスクリーニングに貴重な研究資材となると考えられます。マウス配列を持つために、産生されるマウス A $\beta$  は、アミノ酸配列が異なるが、その特殊な配列がマウス同種分子間相互作用の解析に有利であり、そこで同定された対象分子のヒト相当分子の基礎研究に有意義である。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「同志社大学(特殊ペプチド評価)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
井原 康夫	同志社大学生命医科学部	教授	H21.10～
舟本 聡	同上	准教授	H21.10～
石原 聖子	同上	研究補助員	H21.10～
延原 美香	同上	研究補助員	H21.10～

研究項目

- ・  $\beta$  CTF アミノ末端結合特殊ペプチドの A $\beta$  産生抑制の評価と  $\beta$  CTF 以外の  $\gamma$  セクレターゼ基質の調整
- ・  $\beta$  切断阻害評価のための  $\beta$  セクレターゼ活性測定系の構築
- ・  $\beta$  セクレターゼ切断機構に着目した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制の検討
- ・ 膜画分を利用した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制の検討
- ・ 特殊ペプチドの膜透過性の向上
- ・ 生細胞を利用した特殊ペプチドによる A $\beta$  産生抑制の検討
- ・ 特殊ペプチドの膜透過性・安定性の向上
- ・ モデルマウスへの特殊ペプチド投与と A $\beta$  産生抑制の検討
- ・ 特殊ペプチドによる基質-酵素相互作用干渉の検証 (

#### ②「ペプチドリーム(特殊ペプチド創製)」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐々木 享	ペプチドリーム株式会社	主任研究員	H21.10～H23.3

研究項目

- ・  $\beta$  CTF アミノ末端結合特殊ペプチドの創製
- ・ 特殊ペプチドの膜透過性の向上
- ・ 特殊ペプチドの膜透過性・安定性の向上

#### ③「同志社大学ヒト脳組織評価」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
井原 康夫	同志社大学生命医科学部	教授	H21.10～
角田 伸人	同上	特別任用研究員	H24.4～H25.8

研究項目

- ・ A $\beta$  蓄積量が異なる剖検脳における  $\gamma$ -secretase の評価
- ・  $\epsilon$  2\*3, 3\*3, 3\*4 患者脳における  $\gamma$ -secretase 活性の評価

#### ④「大阪市立大学」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
森 啓	大阪市立大学大学院・医学研究科	教授	H21.10～

富山 貴美	同上	准教授	H21.10～
梅田 知宙	同上	助教	H21.10～
北島 えりか	同上	D3～D4	H21.10～H23.3
山本 圭一	同上	D3～D4	H21.10～H23.3
藤田 有紀	同上	D1～D2	H21.10～H23.3
山下 優希	同上	M1～M2	H21.10～H23.3
小山 惇	同上	M1～M2	H23.4～H25.3
前川 智美	同上	M1～M2	H23.4～H26.3
野村 幸子	同上	研究員	H22.10～
細谷 暁子	同上	研究補助員	H21.10～H23.3
坂間 直美	同上	研究補助員	H23.4～
藤田 玲奈	同上	研究補助員	H23.4～

#### 研究項目

- ・ 全体の総括及び病因アミロイドオリゴマーの設計・製作
- ・ モデルマウスの製作・管理・評価
- ・ アミロイドオリゴマーに関する評価
- ・ モデルマウス評価のためのデータ収集及び解析
- ・ アミロイドオリゴマーに関するデータ収集及び解析
- ・ 異常タウ相互作用に関するデータ収集及び解析
- ・ 病因アミロイドオリゴマーの解析
- ・ タウモデルマウスを使用した生化学実験
- ・ モデルマウスの管理及び整理

#### ⑤「同志社大タウ仮説検証」グループ

##### 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
井原 康夫	同志社大学生命医科学部	教授	H21.10～
宮坂 知宏	同上	助教	H21.10～
謝 策	同上	研究員	H22.4～
吉村 智美	同上	研究補助員	H21.10～H22.3
新崎 由紀	同上	研究補助員	H21.10～

#### 研究項目

- ・ 微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明
- ・ タウ神経毒性領域の同定
- ・ 抗タウオパチーペプチドスクリーニング
- ・ タウオパチー脳を用いた神経細胞骨格変性課程の検証

#### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

##### 「同志社大学(特殊ペプチド評価)」グループ:

スモールスケールのペプチド合成については同志社大学生命医科学部の西川喜代孝教授のグループに、動物実験については理化学研究所の西道隆臣チームリーダーのグループの協力を得た。

### § 3 研究実施内容及び成果

#### 3. 1 基質特異的 Aβ 産生抑制剤の開発 (同志社大学 特殊ペプチド評価グループ)

##### (1) 研究実施内容及び成果

先行研究によって C99 のアミノ末端を特異抗体で捕捉すると、C99 の  $\gamma$  セクレターゼによる切断が阻害することがわかっていた。本研究では、抗体に替わる化合物を創製し(ペプチドリーム特殊ペプチド創製グループ担当)、基質特異的な A $\beta$  産生抑制の実現を検討した。A $\beta$ 1-28 に結合するペプチド(23 アミノ酸)を得て、組換え C99 基質と CHAPSO 可溶化 CHO 膜フラクション(以下、 $\gamma$  セクレターゼフラクション)からなる  $\gamma$  セクレターゼ活性評価系に添加して、A $\beta$  産生抑制能を検討した。その結果、MSIRVCDYCHGDLFCYSCINS (#1)、MDTVICDCYCDNYVCFYSCSHV (#2)、MHLVICDCYCTTDICYCYSTPN (#4) の3種類のペプチドが、顕著な A $\beta$  産生抑制を示した(図1)。最も抑制能の高い #4 ペプチドについて、他の基質への結合を検討したところ、C99 への結合と比較すると、C83 や Notch への結合は極端に低かった。このことから、#4 ペプチドは C99 の1-16領域に結合すると考えられた。また、ビアコアによって、#4 ペプチドの C99 への解離定数を求めたところ、2.6  $\mu$ M あるのに対して、Notch への解離定数は測定できないほど低かった。#4 ペプチドについて、C99、C83、Notch の  $\gamma$  セクレターゼによる切断抑制能を検討したところ、濃度依存的に C99 切断を阻害するが、C83、と Notch 切断に干渉することはなかった(図2 B)。

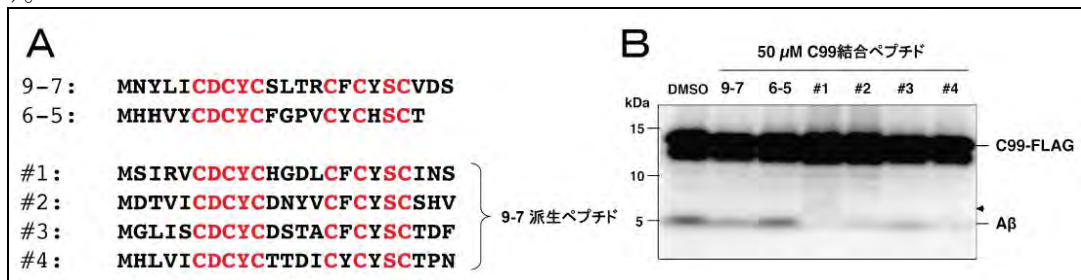


図1 C99 結合ペプチド

得られた C99 結合ペプチド配列(A)。In vitro  $\gamma$  セクレターゼ活性評価系における、C99 結合ペプチドによる A $\beta$  産生抑制(B)。

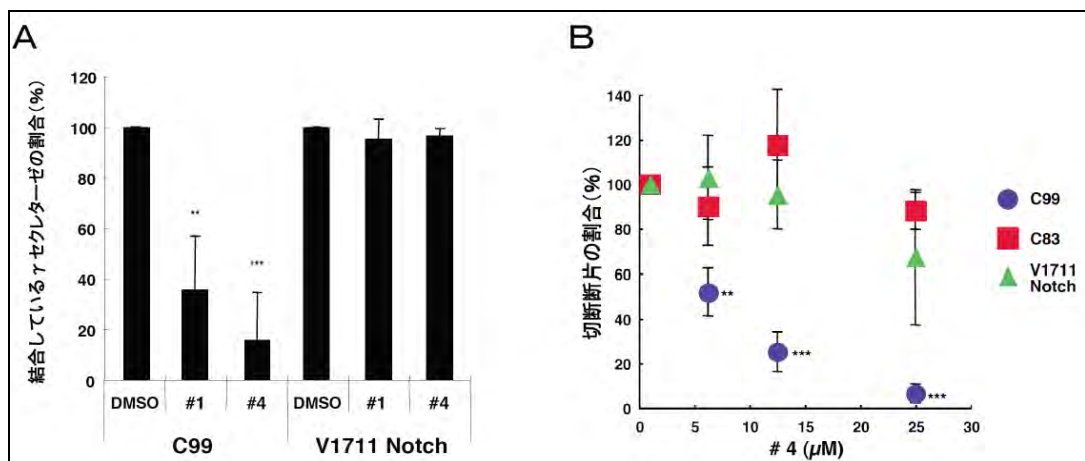


図2 C99 結合ペプチドによる基質特異的切断抑制

C99 結合ペプチド #1 と #4 は C99 と  $\gamma$  セクレターゼの相互作用を抑制するが、Notch と  $\gamma$  セクレターゼの相互作用には影響を与えない(A)。#4 ペプチドは濃度依存的に C99 の切断を抑制する(B)。

一方、C99 のアミノ末端は APP の  $\beta$  切断部位に位置する。したがって、#4 ペプチドは C99 の1-16領域に結合すると考えられたので、APP の  $\beta$  切断も抑制する可能性が考えられた。これを検証するために、in vitro  $\beta$  セクレターゼ活性評価系を確立し、APP とシアル酸転移酵素 (St6gal)

の切断抑制能を検討した。その結果、#4ペプチドは濃度依存的な APP  $\beta$  切断抑制を示したが、St6gal 切断には影響を与えなかった(図3)。このことから、今回得られたペプチドは  $\gamma$  切断のみならず、APP の  $\beta$  切断も抑制できると考えられる。

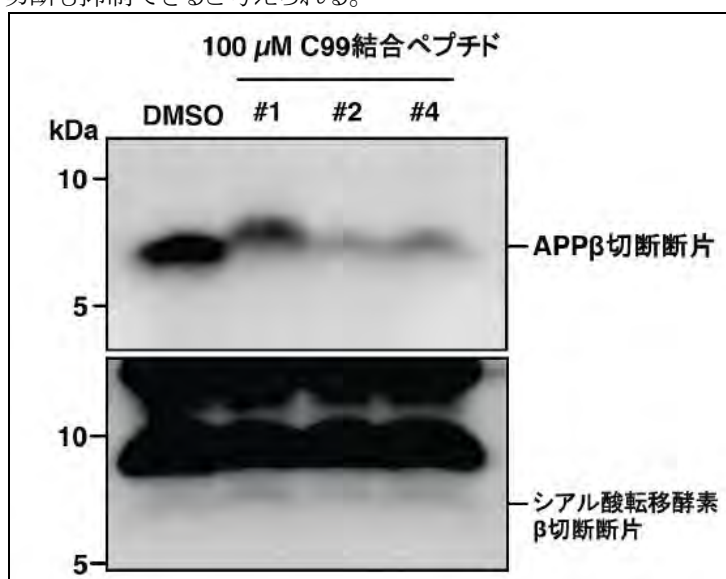


図3 C99 結合ペプチドによる APP 特異的  $\beta$  切断抑制  
C99 結合ペプチド #1、#2、#4は、St6gal の切断には影響を与えないが、APP  $\beta$  切断を抑制した。

得られたペプチドについて、培養細胞レベルでの基質特異的  $A\beta$  産生抑制について検討した。APP, Notch, St6gal を過剰発現する CHO 細胞を確立し、#1、#2、#4のペプチド存在下で二日間培養し、これらの分子切断を検討した(図4A)。一方、対照として上記ペプチドの逆配列をもつペプチドも調製して同様に検討した。その結果、順配列のペプチド存在下で培養した細胞では、sAPP $\beta$ , C99,  $A\beta$ の産生が顕著に低下していたが、sAPP $\alpha$ 産生や Notch 切断、St6gal 切断には一切影響がなかった(図4A)。これらの結果は、得られたペプチドが細胞レベルにおいても基質特異的な  $A\beta$  産生抑制能を発揮していることを示した。また、逆配列をもつペプチド存在下で培養した場合では、 $A\beta$ 産生や Notch 切断等には影響を示さなかったため、ペプチドによる阻害効果はペプチドの配列特異的であることがわかった。

$A\beta$ 産生抑制能が高い#4ペプチドについて、in vivo での  $A\beta$ 産生抑制能について検討した。野生型マウスに#4ペプチドを3日間腹腔投与(150 mg/kg/day)し、4日後を脳を摘出し大脳皮質を可溶化し、抗  $A\beta$ 抗体 4G8 で全  $A\beta$ を免疫沈降により回収した。抗マウス  $A\beta$ 抗体を用いたウエスタンブロットにより、 $A\beta$ 量を検討したところ、投与群において有意な  $A\beta$ 量の低下がみられた(図4B)。一方、腹腔投与したペプチドの脳への到達を検討するために、FITC 標識した#4ペプチドを同様にマウスに投与し、脳内のペプチド分布を調べた。その結果、個々の神経細胞への明確なペプチドの取り込みは確認できなかったが、非常にわずかであるが脳全体でFITC由来の蛍光を確認した。 $A\beta$ 免疫療法では、投与した0.1%の抗体が血液脳関門を突破して、脳内に入る報告があることから、抗体よりも低分子のペプチドもある頻度で脳内に到達し、結果的に  $A\beta$ 量を減少させたと考えられる。

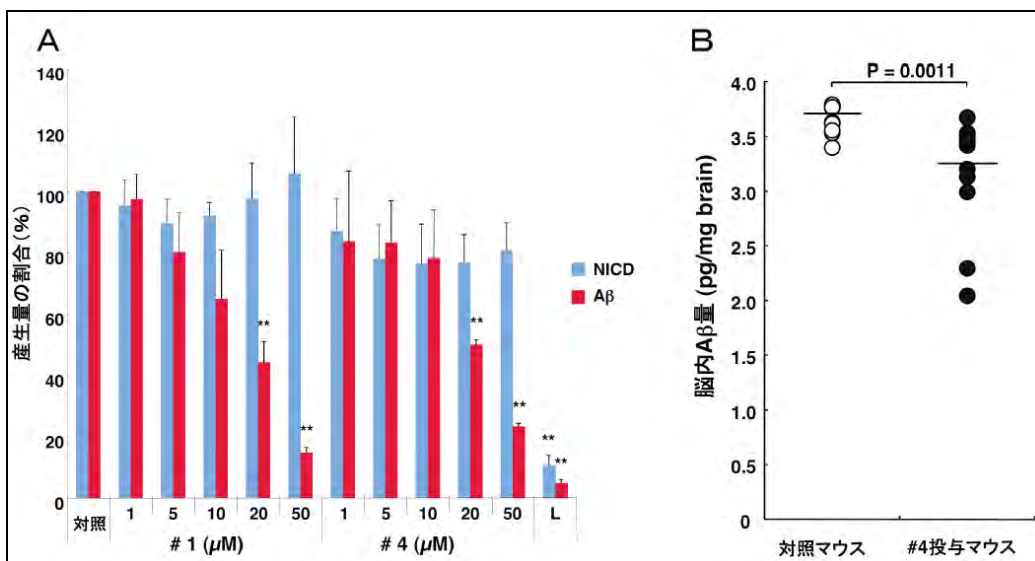


図4 C99 結合ペプチドによる Aβ 産生抑制  
 C99 結合ペプチド #1と #4を細胞に添加すると濃度依存的に Aβ産生を抑制したが、Notch 切断(NICD 産生)には影響を与えなかった(A)。#4ペプチドを野生型マウス腹腔に投与すると脳内 Aβ量が減少した(B)。

今回得られたペプチドの切断阻害への作用機序を検討するために、 $\gamma$ セクレターゼの基質認識機構について検討した。その結果、 $\gamma$ セクレターゼは基質のアミノ末端を認識していることがわかった。これを確認するために、#1ペプチドや#4ペプチド存在下で、C99 と  $\gamma$ セクレターゼの相互作用への影響を調べた。その結果、これらのペプチド存在下ではC99と  $\gamma$ セクレターゼの相互作用が低下するが、Notch と  $\gamma$ セクレターゼの相互作用は影響を受けないこともわかった(図2 A)。このことから、今回得られたペプチドはC99のアミノ末端に結合することで、 $\gamma$ セクレターゼとの相互作用を抑制し、結果的に  $\gamma$ セクレターゼによる切断を抑制しているといえる(図5)。

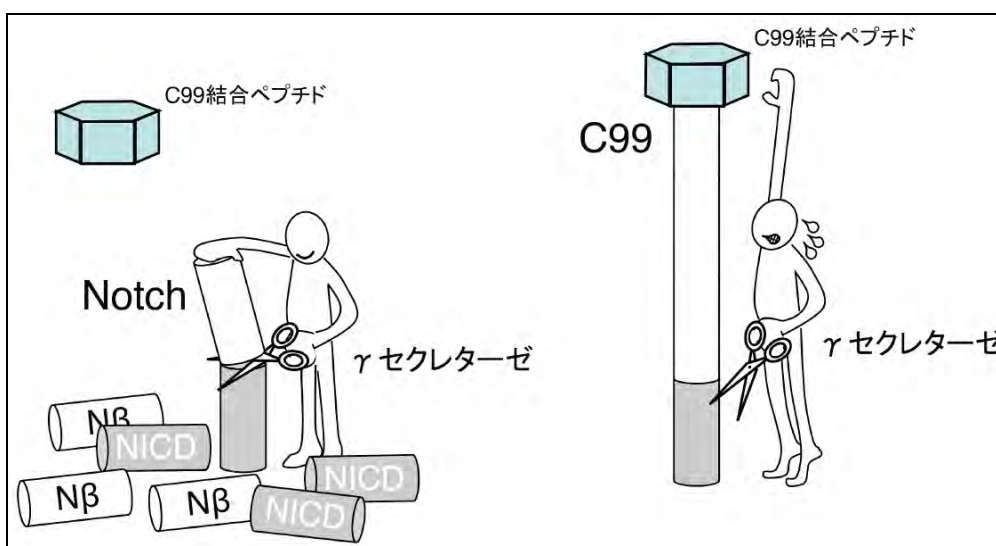


図5  $\gamma$ セクレターゼの基質認識モデルとC99 結合ペプチド抑制モデル

従来の抗 Aβ療法では、酵素を創薬の標的としていたが、本研究が提案するように基質を標的とすることで、基質特異性を高めることができ、副作用の少ない抗 Aβ療法を実現することができると考えられる。

### 3. 2 基質特異的 Aβ産生抑制剤の開発(ペプチドリーム 特殊ペプチド創製グループ)



### (1)研究実施内容及び成果

A $\beta$ 1-28 に結合するペプチドを得るために、23 アミノ酸骨格をもつランダムライブラリーの構築を行った。この方法はランダムな cDNA を無細胞系で転写・翻訳を行う。通常、翻訳後には mRNA とタンパク質が互いに遊離してしまうが、この方法ではピューロマイシンを含むリンカーをもちいることで、翻訳後でも mRNA とタンパク質が結合したままである。つまり、タンパク質は常に自身の遺伝情報を保持している状態にある。こうして A $\beta$ 1-28 への結合を試み、洗浄後に残ったタンパク質-mRNA を逆転写し、タンパク質-mRNA-cDNA 複合体を得て、PCR により増幅することで、結合したタンパク質の遺伝情報を増幅させる。その後、転写、翻訳、結合のサイクルを数回繰り返すことで、最終的に A $\beta$ 1-28 に結合性の高いペプチド配列を得ることができる。こうして得られたペプチドについて、同志社大学 特殊ペプチド評価グループが評価することで、MSIRVDCYCHGDLFCYSCINS (#1)、MDTVICDCYCDNYVCFYSCSHV (#2)、MHLVICDCYCTTDICYCYSTPN (#4)の3種類のペプチドを得ることができた(図1)。

### 3. 3 ヒト剖検脳を用いた $\gamma$ セクレターゼ活性の変化の検討(同志社大ヒト脳組織評価グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

孤発性アルツハイマー病患者剖検脳から脂質ラフト  $\gamma$  セクレターゼを分離し、 $\gamma$  セクレターゼ modulator の効果を検討したところ、健常者由来の脂質ラフト  $\gamma$  セクレターゼの場合と比較して、 $\gamma$  セクレターゼ modulator の効果が限定的であることがわかった。この結果は、 $\gamma$  セクレターゼ modulator が治療薬として効果が小さい可能性を暗示している。また、この脳内の  $\gamma$  セクレターゼ活性の変化は、A $\beta$ 蓄積初期(AD 発症以前)から起きていることがわかった。

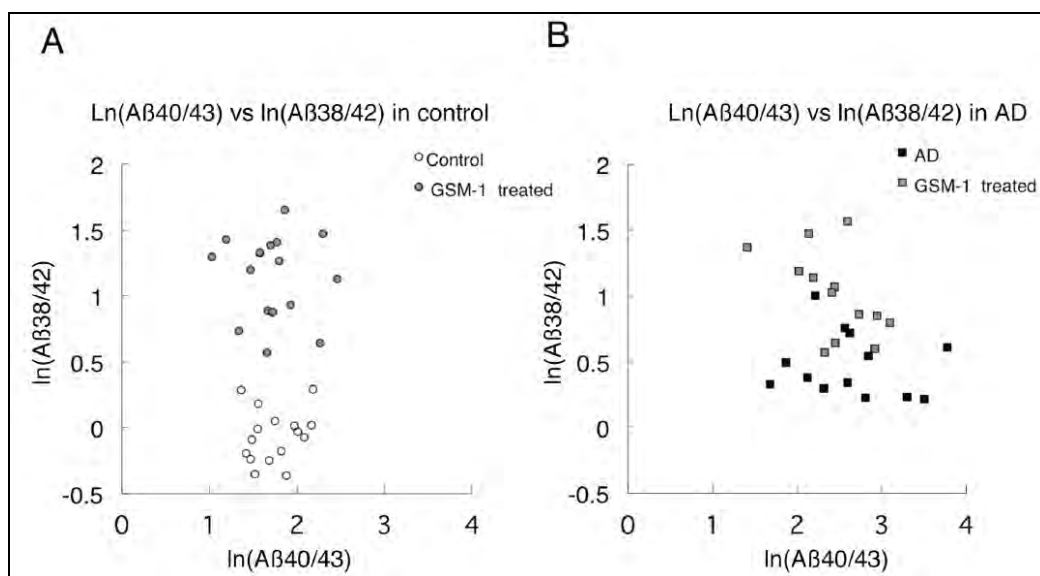


図6 脳から抽出したラフト  $\gamma$  セクレターゼの  $\gamma$  モジュレーターの効果の比較  
健常者では  $\gamma$  モジュレーターにより A $\beta$ 38/A $\beta$ 42 値が増加している(A)。AD 患者では A $\beta$ 38/A $\beta$ 42 値の増加が著しくない(B)。

### 3. 4 アミロイド・オリゴマーの総合的研究(大阪市立大学 アミロイド・オリゴマーグループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

本研究では、これらの研究知見を背景に、大阪変異発現マウスを作製し、認知症モデルとしての基準を満たしていることを確認した(図7)。さらに、この異常 A $\beta$  種であるオリゴマー A $\beta$  が細胞外に分泌放出され難い結果、細胞名での異常蓄積が生じることを明らかにした。つまり、病因異常 A $\beta$  種の作用機作が細胞外に加えて細胞内作用を指摘できたと考えている。さらに、[ $^{11}$ C]標識した PiB をリガンドとしたアミロイド PET では、通常の老人斑モデル動物では陽性シグナルであ

るが、大阪変異マウスでは陰性シグナルであった。このアミロイド PET 陰性は、大阪変異を持つ患者でも同様の結果であることを観察している(図7)。つまり、認知症状に老人斑は、必須ではないことが結論できたわけである。この大阪変異マウスは、アルツハイマー病上流に位置する病態の再現をしている点で、従来の老人斑を含む混合型モデルよりも、より単純で有ることがわかる。たとえば、生活習慣病のリスクである糖尿病、脂質異常症、高血圧がアルツハイマー病発症頻度に影響することが報告されているが、このマウスに高脂質を含む食餌を投与すると病態が進行することを確認している。

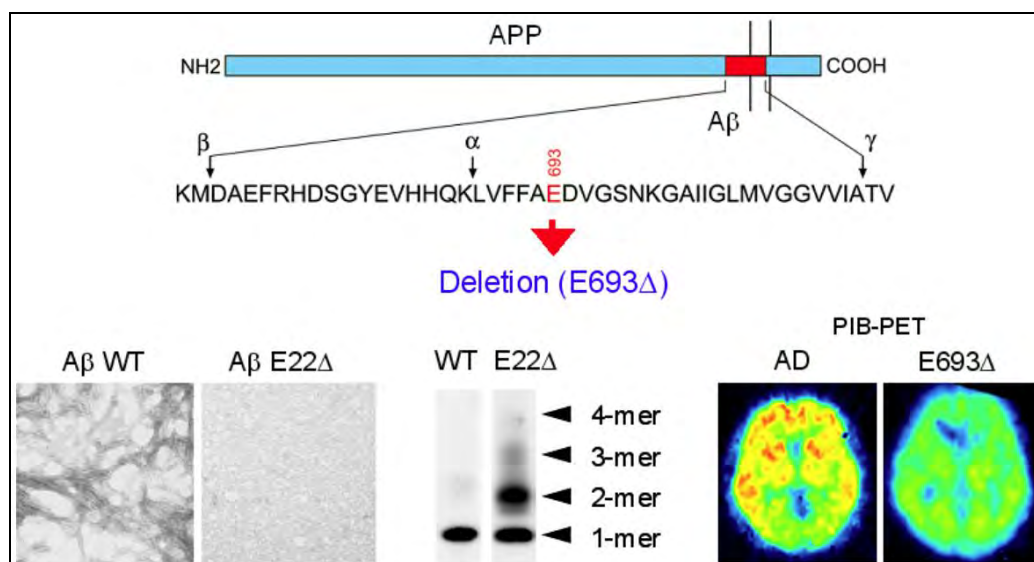


図7 家族性認知症における APP E693Δ変異の同定

異常 Aβ 種の検出は、世界中で渴望されている最重要課題である。従来の報告によると、Aβ ダイマー、12量体、さらなる高分子量体であるが、いずれもアミロイド状線維を形成していないことが条件として求められている。現在、大阪市立大学研究グループでは Aβ ダイマーおよび12量体を検出することができているが、再現性が低く、実験結果を制御する因子が特定できていない。

次に、オリゴマーAβである異常 Aβ 種の下流に位置すると想定されているタウ病態像への影響について検討するプロジェクトを立ち上げた。従来のタウモデルマウスと異なる新規性を打ち出す為に、タウタンパク質のアミノ酸変異をもたないモデルマウスを作製した。エクソン 10 周辺のイントロン 9、エクソン 10 とイントロン 10 の約 6kb のヒトミニゲノム構造により、エクソン 10 を含むタウアイソフォーム(4R 型)と含まないタウアイソフォーム(3R 型)を発現することを観察した。このモデルマウスは、3R/(3R+4R)比が1から0.5になる生理的月齢変化を再現できたことから転写機構の正常性が確認される。イントロン 10 内の+16(C→T)変異を導入したマウスも同時に作製したが、このマウスは、FTDP-17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked with chromosome 17)として知られている前頭側頭葉型認知症モデルとしての意義もある。これら2種類のゲノム型モデルマウスでは、イントロン変異があると月齢依存性に異常リン酸化が出現し、神経原線維変化形成も免疫電子顕微鏡学的手法にて確認した。さらに、シナプス異常を免疫染色と電気生理学的手法による LTP 異常で家訓している。もっとも基本的な調査として水迷路による空間認知機能の異常だけ神経脱落も見いだすことが出来た。異常 Aβ 種とタウの病態間相互作用の解析をするために、このマウスと大阪変異マウスの交配実験が現在進行中であり、予備的な結果で、病態間相互作用を捉えることができたので、現在論文作成を目指して精査しているところである。大阪市立大学研究グループによって構築されたモデルマウスは、同志社大学研究グループによって利用され、同志社大学で開発された治療薬ペプチドの有効性を検証される計画である。

### 3. 5 抗タウ治療戦略の検討(同志社大学 タウ仮説検証グループ)

(1)研究実施内容及び成果

タウ研究については「微小管変性を初期病変としたタウオパチー神経変性経路の解明」という課題のもと、チューブリンとタウ発現比の異常がタウオパチーを惹起するとの仮説に基づいて研究を進めた。研究計画当初、タウオパチー変性神経細胞ではタウの蓄積と共に微小管(チューブリン)の消失が起きている事、マウス等のモデル生物においてタウの過剰発現により神経機能障害が惹起される事が知られていた。さらに我々の先行研究により、タウの過剰発現のみならずチューブリンの発現抑制でもタウによる神経障害が惹起される事を見出していた。本研究では、モデル生物として線虫を用い、タウとチューブリン発現比の適切なコントロールによる神経障害の制御に挑んだ。タウ発現線虫にチューブリンまたはチューブリン C-末端配列と蛍光タンパク質とのキメラタンパク質などの線虫神経細胞への過剰発現を試みた。しかし、いかなるコンストラクトであってもターゲットとした配列の過剰発現系が確立されなかった。チューブリンはその発現量が極めて厳密にコントロールされている。チューブリンフラグメントであっても生体での発現コントロールシステムが健全である場合は、その発現量の自在なコントロールさらにはタウオパチー制御といった目的の検証までは至らなかった。現実的には、タウオパチー変性神経細胞ではこの発現に大きな変動が起きている事から、変性期の神経細胞ではかなり壮大な細胞骨格系の崩壊が起きていると予想された。同時に薬物による微小管安定化の試みも行った。Trimethylamine N-Oxide (TMAO) は高リン酸化されたタウとチューブリンの会合を促進し、タウの微小管安定可能を増大させる作用がある(図8)。この化合物の効果を検証した結果、タウオパチーモデル線虫の行動障害を改善した。これより、微小管の安定化はタウオパチー症状の軽減に有効であると考えている。

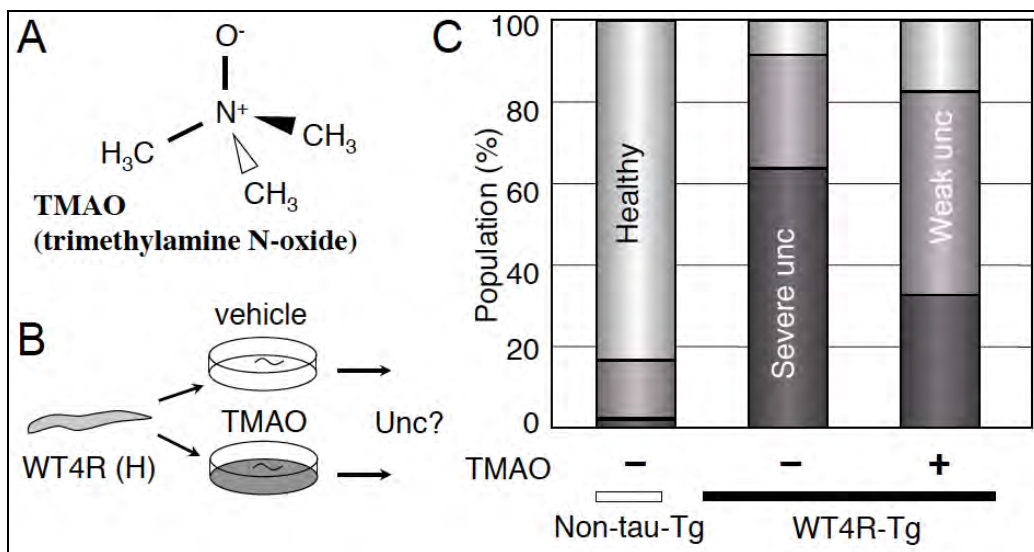


図8 タウ発現線虫への TMAO の効果  
TMAO は化学的分子シャペロンとして知られている(A)。TMAO 添加(B)。TMAO はタウ線虫の行動異常を改善した(C)。

次にタウの神経毒性領域の同定を試みた(図9)。タウの分子構造は大きく N-末端側の proline rich 領域を含む部分と C-末端側の微小管結合領域からなる部分からなる。これまでの知見で、タウの重合についてはその C-末端領域がかかわっている事、多くのタウ遺伝子変異がやはり C-末端領域に集中している事が知られている。しかし、実際の神経機能障害に関係する領域については諸説あり、これまで決定的ではなかった。本研究ではモデル生物として線虫をもちいて、タウの神経機能障害責任領域の同定を試みた。線虫の全神経細胞に発現をもたらす unc-119 プロモータの下流に各種コンストラクトを組み込み、安定発現線虫を得た。行動解析、神経形態学的解析の結果、全長タウと同様にタウ C-末端側のフラグメントを発現することで協調運動障害、形態異常などの神経障害が認められた。一方、タウ N-末端側フラグメントを発現させ

た線虫では異常は認められなかった。これより、タウの神経毒性の責任領域は C-末端側にあると結論付けた。

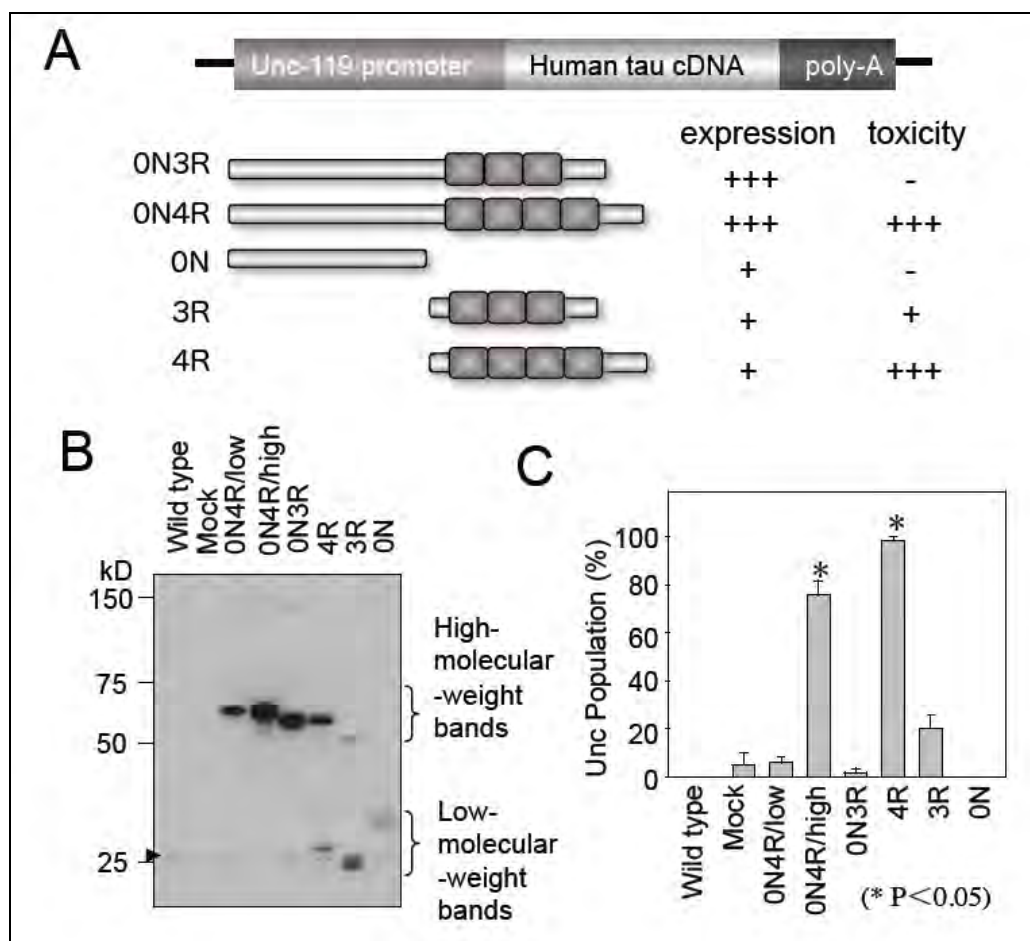


図9 タウ毒性領域の検討

全長タウ、N 末端、C 末端の断片をそれぞれ線虫の全神経細胞に発現した(A)。各線虫に発現するタウタンパク質量を比較した(B)。タウ C 末端発現線虫では協調運動障害(Unc)が観察された(C)。

同定されたタウの神経毒性を引き起こす C-末端側のアミノ酸配列と極めて高い配列が、タウのパラログである MAP2 に存在する。MAP2 はタウと構造上高い類似性を持つ微小管結合タンパク質であり、タウと同様に微小管の安定化に寄与するとされている。しかし、これまでにアルツハイマー病をはじめとするタウオパチー脳において明確な関与は認められず、解析対象ともされてこなかった。タウと同様に線虫の全神経細胞に全長 MAP2 発現させた結果、タウと同様の神経変性を呈した(図10)。また、そのフラグメントの発現により、その責任配列も C-末端側であるとの結論を得た。以上より、タウと同様に MAP2 の C-末端側にも神経障害性がある事を見出した。

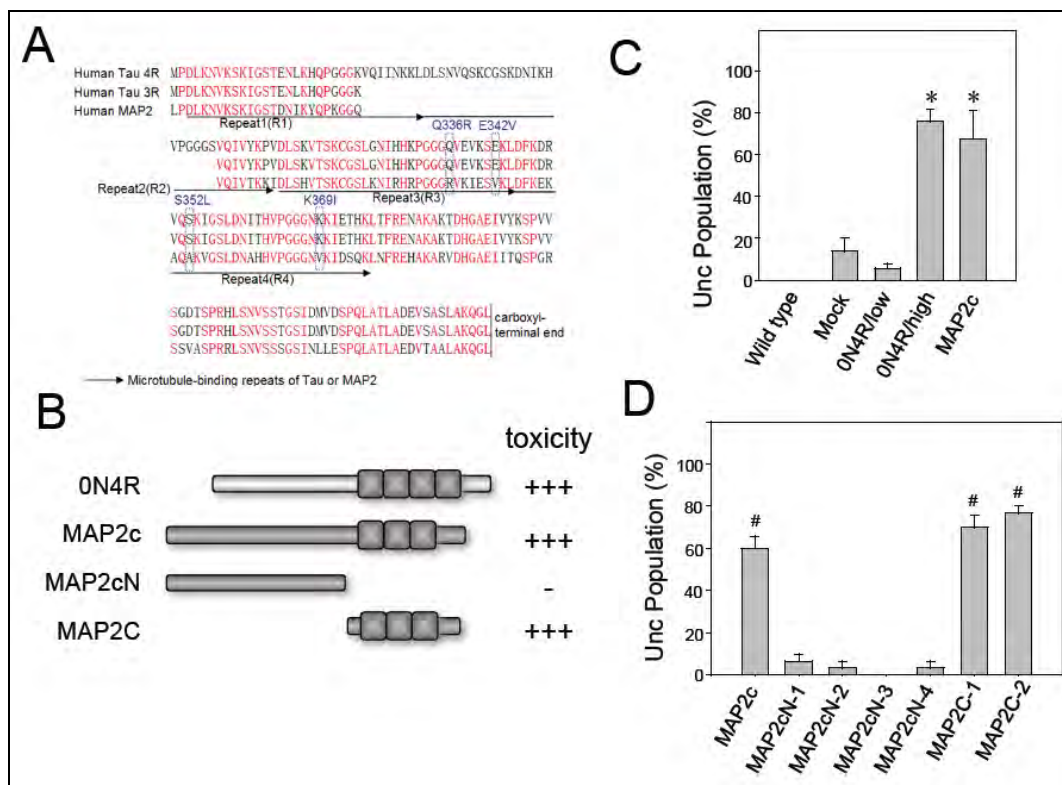


図10 MAP2 毒性領域の検討

MAP2 の C 末端領域はタウのそれと極めて相同性が高い(A)。全長 MAP2、N 末端、C 末端の断片をそれぞれ線虫の全神経細胞に発現した(B)。MAP2 全長、MAP2 C 末端発現線虫では協調運動障害(Unc)が観察された(CとD)。

次にタウと MAP2 の病理学的封入体形成機構の違いについて検討した(図11)。これまで MAP2 の神経原線維変化(NFT)をはじめとするタウ封入体への MAP2 局在については諸説あったが、その原因は用いる抗体の特異性によるものと考えた。タウと MAP2 の相同性から両者を組織学上完全識別出来る抗体が少なく、MAP2 の特に C-末端側の神経原線維変化への局在は不明であった。本研究では、はじめに MAP2 とタウの僅かな配列の違いを利用し、タウには交叉しない抗 MAP2-C 末抗体を作成した。この抗体を用いてアルツハイマー病脳切片を染色した結果、NFT への MAP2 の局在は検出出来なかった。同様の結果は生化学的解析においても確認され、神経原線維変化への MAP2 の共存は認められないと結論付けた。

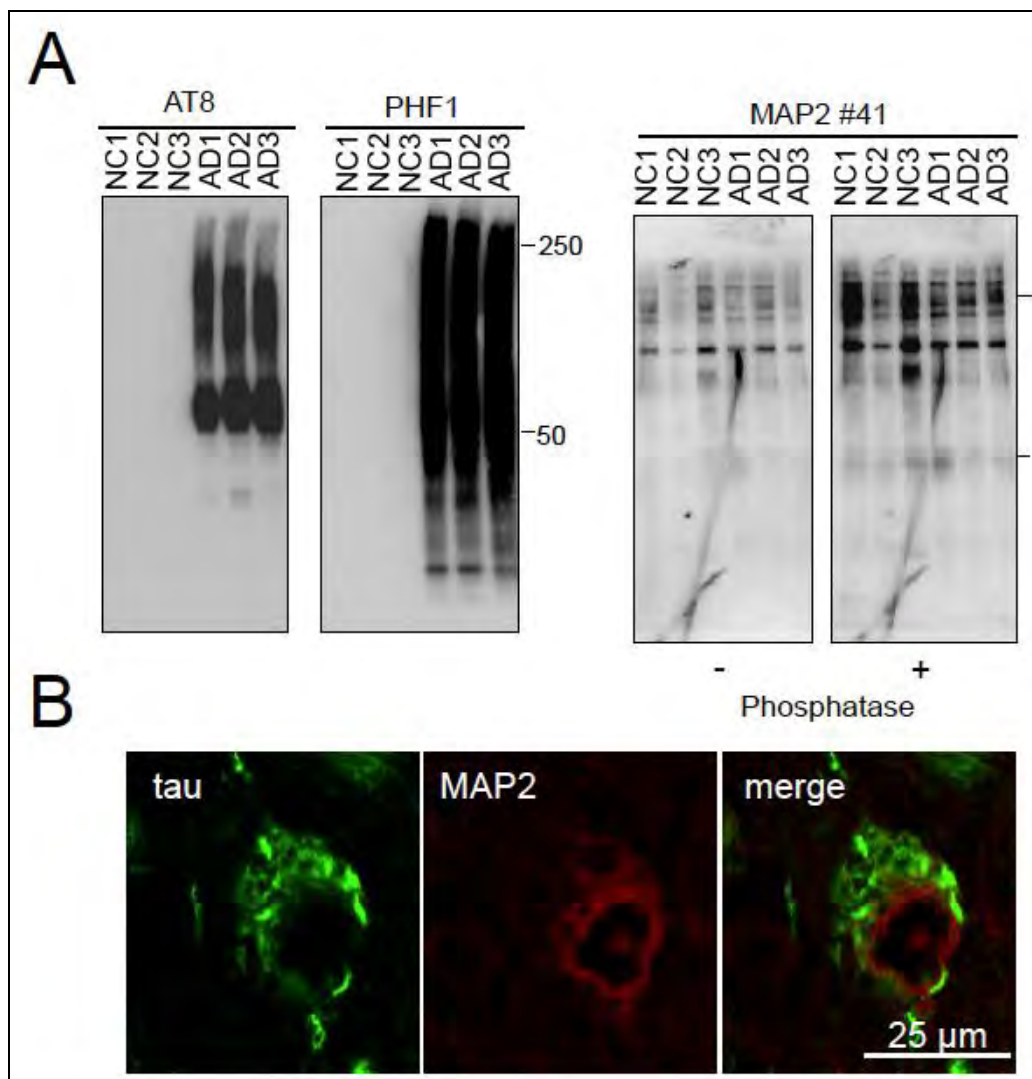


図11 脳におけるMAP2

Normal control3例、AD3例の脳サルコシル不溶性画分のウエスタンブロット(A)。AD 海馬 NFT の抗タウ (PHF-1)と抗MAP2抗体による二重染色(B)。抗MAP2抗体ではNFTは染色されない。

タウとMAP2は同様の神経障害性を有し、相同性も高いにもかかわらず、封入体形成への寄与は全く異なる。この理由として、両タンパク質の重合活性の違いを想定し、*in vitro*の線維形成実験を行った。タウ、MAP2c、さらにはそれらの改変体のリコンビナントタンパク質を作成、精製し、ヘパリンによる重合、線維形成を調べた(図12)。タウはこれまでの報告の通り、ヘパリンの添加により重合、不要化し、線維を形成した。一方、MAP2はヘパリン添加後僅かにチオフラビンT値の上昇が見られるものの、タウのような重合は起こらなかった。このMAP2の特性はタウとMAP2のキメラタンパク質においても保存されており、MAP2 C-末端の特殊な性質である事が分かった。さらにこの性質の差異を産む要因として、微小管結合領域中の配列の違いに注目した。その結果、この重合、線維化に関するタウとMAP2の性質の違いは、僅か3アミノ酸残基の違いで決定していることを明らかとした。以上より、MAP2とタウは同様の神経障害活性を有するにも拘らず、その僅かなアミノ酸配列の相違によりタウは変性神経細胞内で重合、線維化し封入体を形成するのに対し、MAP2は重合せず消失してゆくと考えている。今後、病理像としての痕跡を残さないMAP2の神経変性への関与についてより詳細な解析が必要と考えている。

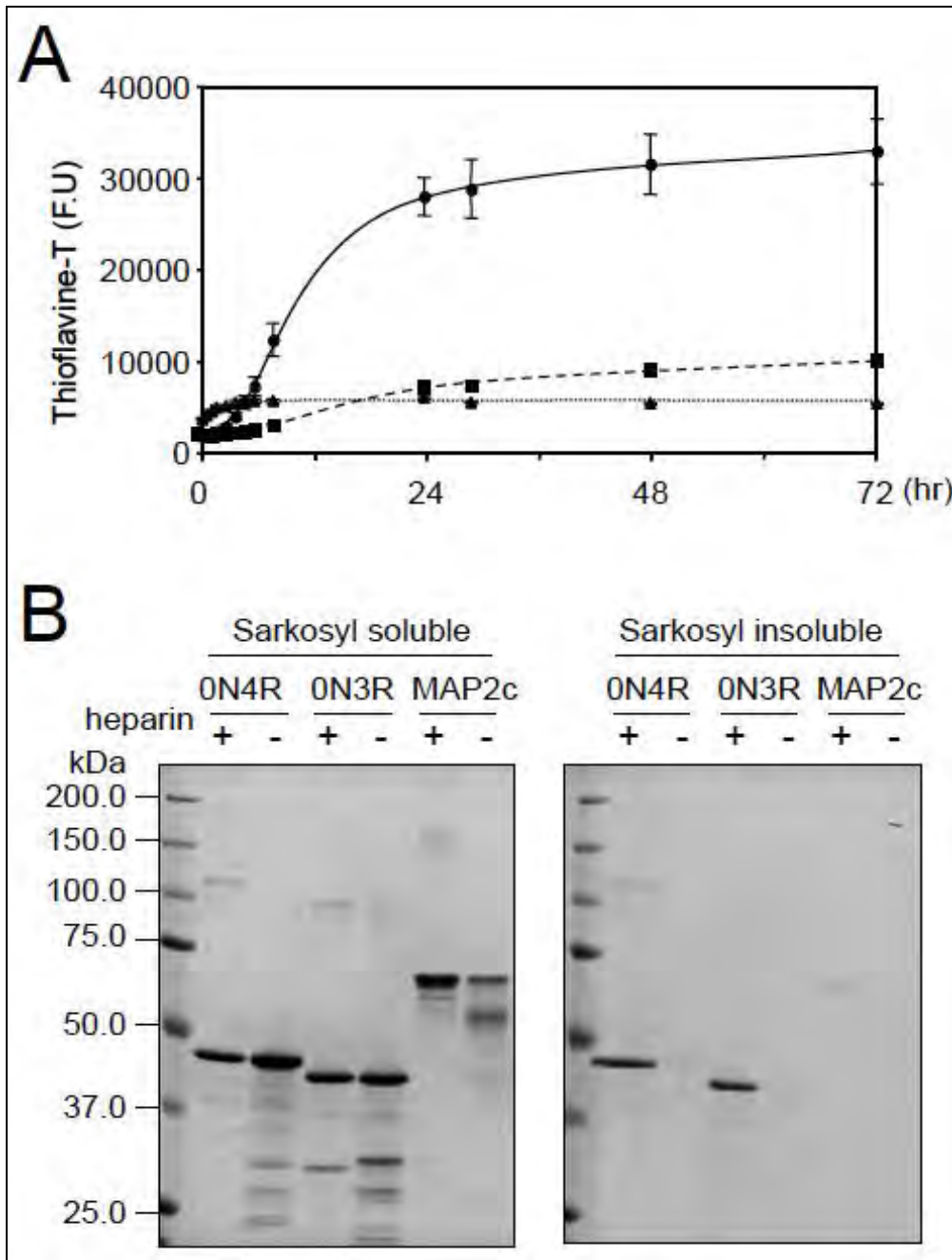


図12 精製タウ、精製 MAP2 による線維形成  
 チオフラビン T 蛍光値の時間変化(A)。タウは時間と共にチオフラビン蛍光値(線維形成)が進むのに対して、MAP2 はほとんど線維形成しない。168 時間インキュベーション後のサルコシル可溶性、不溶性タンパク質 (B)。

以上これまでの病理学的知見、および本研究によるモデル線虫を用いた解析から、アルツハイマー病における神経変性は単にタウの蓄積が起こる神経細胞死でなく、広く神経細骨格系の異常であると推察された。このような視点における患者脳由来組織を用いた病理解析例はなく、詳細な解析が必須であると考えた。しかし現在の病理解析における問題は、異常に蓄積したタウは容易に検出出来るのに対し、正常なタウがほとんど検出されない事であった。これにより、タウの正常局在から異常蓄積蓄積への局在解析、あるいは MAP2, チューブリンなど他の関連タンパク質の挙動と組み合わせた組織解析は困難であった。我々はビブラトーム切片と独自で作成した抗体、新たに導入した共焦点顕微鏡の組み合わせにより、正常タウの高感度な解析を可能にし、

神経細胞の微細構造であるシナプス、スパインレベルでのタウの局在を可視化した(図13)。さらにヒト型タウとマウスタウをそれぞれ特異的に検出する抗体を作成し、タウトランスジェニックマウスの脳について解析した。その結果、神経障害が起こるよりも遥かに早期から外来性ヒト変異型タウは内在性マウスタウとは異なる局在を呈している事を確認した。さらにタウノックインマウスなど多彩なモデル系を駆使し、タウの局在決定機構、およびタウオパチー神経障害機構の解明につなげて行く予定である。また、マウスを用いた解析で、タウオパチーに関係する多くの骨格タンパク質について同手法で高感度に解析が可能である事を確認しており、早急に疾患脳を用いた解析に応用してゆく予定である。

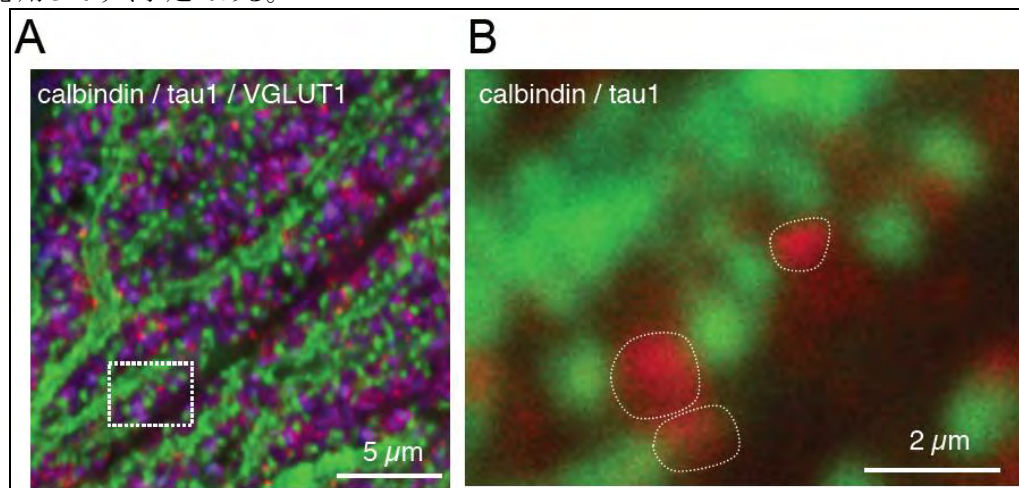


図13 内在性タウの可視化

小脳分子層におけるカルビンジン抗体、タウ、VGLUT の三重染色(A)。拡大像(B)。タウはスパインにはなく、スパイン間にドット状に染色される。



## § 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 22件)

1. Villemagne VL, Ataka S, Mizuno T, Brooks WS, Wada Y, Kondo M, Jones G, Watanabe Y, Mulligan R, Nakagawa M, Miki T, Shimada H, O'Keefe GJ, Masters CL, Mori H, Rowe CC: High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. *Arch Neurol* 66(12):1537-1544, 2009
2. Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Lambert M, Klein W, and Mori H: A mouse model of amyloid beta oligomers: Their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo". *J Neurosci* 30 (14) : 4845-4856, 2010
3. Nagata T, Tomiyama T, Mori H, Yaguchi T, Nishizaki T: DCP-LA neutralizes mutant amyloid beta peptide-induced impairment of long-term potentiation and spatial learning. *Behav Brain Res* 206(1): 151-154, 2010
4. Mori H, Tomiyama T, Ishibashi K, Ohnishi K, Teraoka R, Fukushima A, Takuma H, Shimada H, Ataka S, Umeda T, Kitajima E, Fujita Y, Yamashita Y, Yamamoto K, Miki T, Matsuyama S, Iso H, Nagata T, Nishizaki T, Wada Y, Yoshioka E, Watanabe Y. Oligomeric A $\beta$  is the sole culprit molecule to cause Alzheimer 's disease? *Hiroaki Med Journal*. 60(Suppl.): S105—S110, 2010
5. Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid  $\beta$  secretion. *J. Neurosci. Res.* 88: 1985-1994, 2010
6. Suzuki T, Murakami K, Izuo N, Kume T, Akaike A, Nagata T, Nishizaki T, Tomiyama T, Takuma T, Mori H, Irie K. E22delta Mutation in amyloid *beta*-protein promotes *beta*-sheet transformation, radical production, and synaptotoxicity, but not neurotoxicity. *International Journal of Alzheimers Disease*. 2011:431320, 2011
7. Maeda J, M-R Zhang, Okauchi T, Bin Ji, Ono M, Hattori H, Kumata K, Iwata N, Saido T, Trojanowski J, Lee V, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Sahara T, Higuchi M. In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid- $\beta$  and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *Journal of Neuroscience*. 31(12):4720-4730, 2011
8. Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, L. Klein W, Mori H. Intraneuronal amyloid  $\beta$  oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *Journal of Neuroscience Research* .89:1031-1042, 2011
9. Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Naomi Mihirai, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC: Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A $\beta$  43. *Nat. Neurosci.* 14(8):1023-1032, 2011 (DOI: 10.1038/nn.2858)
10. Shimada H, Ataka S, Takeuchi J, Mori H, Wada Y, Watanabe Y, Miki T: Pittsburgh compound B-negative dementia—A possibility of misdiagnosis of patients with non-Alzheimer disease-type dementia as having AD. *J. Geriatr. Psychiat. Neurol.* 24(3):123-126, 2011 (DOI:10.1177/0891988711409410)
11. Shimada H, Ataka S, Tomiyama T, Takeuchi H, Mori H, Miki T: Clinical course of patients with familial early-onset Alzheimer's disease potentially lacking senile plaques bearing the E693 $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein. *Dement Geriatr Cogn Disord* 32:45-54, 2011 (DOI:10.1159/000330017)
12. Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H: Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A $\beta$  oligomers

- resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* 91: 1169–1176, 2012 (DOI:10.1016/j.lfs.2011.12.022)
13. Kakuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Ikeuchi T, Akazawa K, Takami M, Hatsuta H, Murayama S, Hashimoto Y, Miyajima M, Arai H, Nagashima Y, Yamaguchi H, Kuwano R, Nagaike K, Ihara Y, J-ADNI: Altered  $\gamma$ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 4(4):344–352, 2012. (doi: 10.1002/emmm.201200214)
  14. Takano M, Maekura K, Otani M, Sano K, Nakamura-Hirota T, Tokuyama S, Min KS, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S. Proteomic analysis of the brain tissues from a transgenic mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers. *Neurochem Int.* 61: 347–355, 2012 (DOI:org/10.1016/j.neuint.2012.05.018)
  15. Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci. Lett.* 534:85–89, 2013 (DOI:org/10.1016/j.neulet.2012.11.010)
  16. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y; The Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiatives. Suspected limited efficacy of  $\gamma$ -secretase modulators. *Neurobiol. Aging* 34: 1101–1104, 2013 (DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.017)
  17. Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. *Am J Pathol.* 183:211–225, 2013. (doi: 10.1016/j.ajpath.2013.03.015)
  18. Kang MS, Baek SH, Chun YS, Moore AZ, Landman N, Berman D, Yang HO, Morishima-Kawashima M, Osawa S, Funamoto S, Ihara Y, Di Paolo G, Park JH, Chung S, Kim TW. Modulation of lipid kinase PI4KII  $\alpha$  activity and lipid raft association of presenilin 1 underlies  $\gamma$ -secretase inhibition by ginsenoside (20S)-Rg3. *J Biol Chem.* 2013 Jul 19;288(29):20868–82. doi: 10.1074/jbc.M112.445734.
  19. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell.* 12:487–496, 2013
  20. Funamoto S, Sasaki T, Ishihara S, Nobuhara M, Nakano M, Watanabe-Takahashi M, Saito T, Kakuda N, Miyasaka T, Nishikawa K, Saido TC, Ihara Y. Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of  $\gamma$ -secretase. *Nat Commun.* 2013 Oct 9;4:2529. doi: 10.1038/ncomms3529.
  21. Matsumura N, Takami M, Okochi M, Wada-Kakuda Satoko, Fujiwara H, Tagami S, Funamoto S, Ihara Y, Morishima-Kawashima M. (2013)  $\gamma$ -Secretase associated with lipid rafts: Multiple interactive pathways in the stepwise processing of  $\beta$ -carboxyl terminal fragment. *J. Biol. Chem.* **289**:5109–5121, 2013
  22. Xie C, Miyasaka T, Yoshimura S, Hatsuta H, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, Murayama S, Ihara Y. The Homologous Carboxyl-Terminal Domains of Microtubule-Associated Protein 2 and TAU Induce Neuronal Dysfunction and Have Differential Fates in the Evolution of Neurofibrillary Tangles. *PLoS One.* 2014

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

①査読審査の入る proceedings 等

1. Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R: The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. In “The Biology of Alzheimer Disease” (edited by DJ Selkoe, E Mandelkow, DM Holtzman), pp359-385, Cold Spring Harbor Lab Press, New York, 2012
2. Takami M, Funamoto S.  $\gamma$ -Secretase-dependent proteolysis of transmembrane domain of amyloid precursor protein: Successive tri- and tetrapeptide release in amyloid  $\beta$ -protein production. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:591392. doi: 10.1155/2012/591392.

②その他

1. 梅田知宙、富山貴美、森啓. 新しい APP 変異の同定による A $\cdot$ オリゴマー仮説の検証. *神経内科*, 72 (Supple. 6): 248-52(2010)
2. 森啓. ディベート: アミロイド $\beta$  蛋白はアルツハイマー病の原因か? 「原因でない」. *Clinical Neuroscience*, 28 (12): 1438-9(2010)
3. 森啓. 認知症研究の現状と展望. *MEDIOCO 特集「認知症医療 Up to Date」*, 41 (8): 249-251(2010)
4. 森啓. 認知症を展望する *Science of Kampo Medicine*, 34(2): 2-3(2010)
5. 梅田知宙、森啓. アミロイド $\cdot$  研究の新しい展開. *Clinical Neuroscience*, 28:983-7(2010)
6. 森啓. アルツハイマー病. *新潮* 45, 2月号 78-86(2011)
7. 富山貴美. 細胞内 A $\beta$  オリゴマーによるアルツハイマー病発症機構. *Dementia Japan*, 26: 225-241(2012)
8. 富山貴美. A $\beta$  オリゴマーを標的とするアルツハイマー病治療薬の展望. *Dementia Japan* 26: 300-310(2012)
9. 富山貴美. 認知症の神経病理学 $\cdot$  発症機序/認知症の分子病態. 認知症 $-$ 神経心理学的アプローチ アクチュアル 脳 $\cdot$  神経疾患の臨床:139-143(2012)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

①招待講演 (国内会議 4 件、国際会議 2 件)

1. Mori H (Osaka City University)、Abeta monomer, oligomer and fibril in Alzheimer's disease. The International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia (DRD2009), Okayama, 2009.12.11-12
2. 舟本 聡、Profinity eXact Fusion-Tag による $\gamma$ セクレターゼ基質の調製、第10回蛋白質科学会年会 (バイオラッド主催ランチョンセミナー)、札幌、2010年6月16日
3. 森啓 (大阪市立大学). アルツハイマー型認知症の根本治療薬開発の現状と展望 (特別講演). 2010年度 認知症ケア学会中国四国地方会、米子コンベンションセンター $\cdot$  鳥取、2010年12月5日
4. 森啓 (大阪市立大学)、アルツハイマー病再考: 新たな到達点と治療の展望 (特別講演). 第12回日本早期認知症学会、東京 $\cdot$  練馬文化センター、練馬文化センター $\cdot$  東京、2011年1月30日
5. Mori H (Osaka City University)、Perspective on the role of oligomer in Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2011,

**Paris, France, 2011.7.16-21**

6. 宮坂 知宏 (同志社大学)、2. 神経原線維変化の解析から学ぶべきもの、第32回日本認知症学会学術集会、長野県松本文化会館、松本、2013年11月10日

②口頭発表 (国内会議 6件、国際会議 4件)

1. 富山貴美 (大阪市立大学)、A transgenic mouse model of amyloid  $\beta$  oligomers. 第28回日本認知症学会、仙台、2009.11.19-22
2. Tomiyama T (Osaka City University)、Intraneuronal accumulation of Abeta oligomers causes abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in transgenic mice with APP E693delta mutation. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010, Honolulu, USA, 2010.7.10-15
3. 舟本 聡、 $\beta$ CTF is an inefficient substrate for proteolysis by  $\gamma$ -secretase、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸 (兵庫県)、2010年12月7日
4. Funamoto S, Kakuda N, Ishihara S, Nobuhara M and Ihara Y, Amino-terminus of amyloid  $\beta$  protein is a potential target for substrate-specific dual inhibition of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, 42th Annual meeting, Society for Neuroscience, Washington DC USA, 2011年11月16日
5. 舟本 聡. Semagacestat の in vitro データ. 第31回日本認知症学会シンポジウム「アルツハイマー病の根本治療：臨床試験の現状と展望」、茨城県つくば市、2012年10月26日.
6. 富山貴美. 細胞内  $A\beta$ オリゴマーによるシナプス障害と神経細胞死. 第31回日本認知症学会学術集会、茨城県つくば市、2012年10月26日~28日.
7. 梅田知宙、山下雄也、富山貴美、詫間浩、大西紀陽久、森啓. Intron 変異を有する新規 FTDP-17 モデルマウスの作製と解析. 第31回日本認知症学会、茨城県つくば市、2012年10月26日.
8. Umeda T, Yamashita T, Tomiyama T, Takuma H, Ohnishi K, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 17th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka Center for Learning and Innovation, Takeda Pharmaceutical Company Limited. 2012.12.6~7
9. 舟本 聡. Ectodomain of APP carboxyl-terminal fragment is a novel target for substrate-specific dual inhibition of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. 第35回日本分子生物学会 ワークショップ 2W11III、福岡市、2012年12月12日.
10. Funamoto S. The ectodomain of substrate is critical for substrate-specificity of  $\gamma$ -secretase and for substrate-specific inhibition of  $A\beta$  production. The 11<sup>th</sup> International Conference On Alzheimer's Diseases AD/PD2013, Florence, Italy, 2013.3.6-10

③ポスター発表 (国内会議 8件、国際会議 8件)

1. 藤田有紀 (大阪市立大学)、高齢ホッキョクグマの脳神経病理学的剖検報告. 第28回日本認知症学会、仙台、2009.11.19-22
2. 梅田知宙 (大阪市立大学)、Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. 第28回日本認知症学会、仙台、2009.11.19-22
3. 梅田知宙 (大阪市立大学)、Subcellular localization and toxicity of intracellular  $A\beta$  oligomers in APP transgenic mice with the E693D (Osaka) mutation. 第29回日本認知症学会学術集会、愛知県名古屋市ウインクあいち、平成22年11月5日~7日
4. 富山貴美 (大阪市立大学)、Intracellular  $A\beta$  oligomers cause cell death via ER stress, lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in cultured cells. 第29回日本認知症学会学術集会、愛知県名古屋市ウインクあいち、平成22年11月5日

～7日

5. Kitajima E (Osaka City University), Umeda T, Idomoto T, Lambert MP, Klein WL, Tomiyama T, Mori H. Hypercholesterolemia accelerates memory impairment in a transgenic mouse model of Abeta oligomers. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010, Honolulu, USA, 2010.7.10-15.
6. Tomohiro Umeda (Osaka City University), Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010, Honolulu, USA, 2010.7.10-15.
7. Funamoto S, Nobuhara M, Ishihara S and Ihara Y,  $\beta$ CTF is an inefficient substrate for proteolysis by  $\gamma$ -secretase, International conference on Alzheimer's disease and related disorders, Honolulu USA, 2010年7月12日
8. Ce Xie, Tomohiro Miyasaka, Shohei Mitani, Yasuo Ihara. Phosphorylated tau and microtubule-associated protein 2 induce neuronal toxicity in *C. elegans*. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (2012年10月1日), 神戸
9. Funamoto S, Sasaki T, Ishihara S, Nobuhara M, Takahashi M, Kakuda N, Nishikawa K, Ihara Y. Substrate-specific dual inhibition of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases by peptides binding to C99. 42th Annual meeting, Society for Neuroscience, NewOrleans USA 2012年10月17日
10. Kakuda N, Akazawa K, Hatsuta H, Murayama S, Ihara Y. Suspected limited efficacy of  $\gamma$ -secretase modulators. 42th Annual meeting, Society for Neuroscience, NewOrleans 2012年10月17日
11. Ce Xie, Tomohiro Miyasaka, Shohei Mitani, Yasuo Ihara. The pathological relationship between microtubule-associated protein 2 and Alzheimer's disease. 42th Annual meeting, Society for Neuroscience (2012年10月14日), NewOrleans
12. 舟本 聡、佐々木亨、石原聖子、延原美香、高橋美帆、角田伸人、宮坂知宏、西川清孝、井原康夫.  $\gamma$ セクレターゼの基質認識機構に基づく基質特異的 A $\beta$ 産生阻害. 第31回日本認知症学会学術集会, 茨城県つくば市, 2012年10月26日～28日.
13. 角田伸人、赤澤宏平、初田裕幸、村山繁雄、井原康夫.  $\gamma$ -Secretase modulator はきわめて限定的な効果しか示さない?! . 第31回日本認知症学会学術集会, 茨城県つくば市, 2012年10月26日～28日.
14. 野村幸子、梅田知宙、富山貴美、森啓. APP Osaka (E693 $\Delta$ ) 変異は A $\beta$  による細胞内コレステロールの輸送・排出を阻害する. 第31回日本認知症学会学術集会, 茨城県つくば市, 2012年10月26日～28日.
15. 謝策、宮坂知宏、川崎智美、吉名佐和子、中台枝里子、三谷昌平、井原康夫. タウオパチー発症機構における MAP2 の関与. 第31回日本認知症学会. (2012年10月26日), 筑波
16. Takami Tomiyama, Tomohiro Umeda, Takenari Yamashita, Kiyuhisa Ohnishi, Hiroshi Takuma, Hiroshi Mori. FTDP-17 related tau intron 10 +16C $\rightarrow$ T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 11<sup>th</sup> International Conference On Alzheimer's Diseases AD/PD2013, Florence, Italy, 2013.3.6-10

(4)知財出願

①国内出願 (3件)

1. アミロイド $\beta$ タンパク質特異的産生抑制ポリペプチド、井原康夫、舟本聡、佐々木亨、2012年9月21日、特願2012-208277
2. 認知症治療剤、森啓、富山 貴美、松本 洋一、江口 広志、九里 祐一、2012年5月31日、特願2012-0124336
3. アルツハイマー病モデルマウス、森啓、森田隆、吉田佳世、2013年2月14日、特願2013-0126838

②海外出願（1件）

1. アミロイドβタンパク質特異的産生抑制ポリペプチド、井原康夫、舟本聡、佐々木享、  
2013年1月16日、PCT/JP2013/50663、欧州、米国

(5)受賞・報道等

マスコミ(新聞・TV等)報道

基質特異的Aβ産生抑制剤の開発について:

- 平成25年10月9日 共同通信(アルツハイマー抑える物質開発 同志社大、治療に期待)
- 平成25年10月9日 時事通信(副作用少ない治療薬へ全身=アルツハイマー病で新技術-同志社大)
- 平成25年10月10日 日本経済新聞(アルツハイマー原因物質抑える 同志社大が開発)
- 平成25年10月10日 徳島新聞(アルツハイマー抑える物質開発 同志社大、治療に期待)
- 平成25年10月10日 北海道新聞(アルツハイマー抑える物質開発 同志社大、治療に期待)
- 平成25年10月10日 佐賀新聞(アルツハイマー抑える物質開発 同志社大、治療に期待)
- 平成25年10月10日 朝日新聞(アルツハイマー抑える物質)
- 平成25年10月10日 産経新聞(アルツハイマー抑制物質開発 同大、治療への応用期待)
- 平成25年10月10日 毎日新聞(アルツハイマー治療に光 同大チーム副作用減らし原因物質抑制)
- 平成25年10月10日 京都新聞(アルツハイマー病 原因物質だけ抑制)
- 平成25年10月12日 NHK 京都放送局ニュース  
[プレスリリース概要]  
アルツハイマー病原因物質アミロイドβの産生機序を解明し、それに基づいた副作用の少ない新しい治療・予防戦略を確立した。

アミロイド・オリゴマーに関する総合研究について:

新聞報道:

- 平成22年4月8日 朝日新聞(朝刊)
- 平成22年4月8日 読売新聞(朝刊)
- 平成22年4月8日 日本経済新聞(朝刊)
- 平成22年4月8日 日経産業新聞(朝刊)
- 平成22年4月13日 毎日新聞(夕刊)
- 平成22年4月16日 神戸新聞(朝刊)
- [プレスリリース概要]

アルツハイマー病モデルとして数種類のマウスモデルが開発されてきた。今回、本研究で、アルツハイマー病病因カスケードの回目ばかりではなく、治療ターゲットとしてのモデルとしての価値あるモデル動物を開発することができた。

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

同志社大学(特殊ペプチド評価)グループ:JST「A-STEP」事業に採択され、現在実施中 課題名「ペプチドアダプターを用いた基質特異的Aβ産生抑制方法の開発」(H25)

②社会還元的な展開活動

仏国パリで開催されたアルツハイマー病国際会議(AA-ICAD)での基調講演に招聘され、本研究成果の一部を発表し、今後の治療戦略についての慎重な検討を提言した。

## § 5 研究期間中の活動

### 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 22 年 12 月 14 日	科学技術振興シンポジウム	大阪市立大学医学部セミナー室	30 人	タウ研究における新潮流
平成 23 年 8 月 11 日	新規モデル動物に関するセミナー	大阪市立大学医学部セミナー室	30 人	病因アミロイド蛋白分子に関する新知見

## §6 最後に

基質特異的 A $\beta$  産生抑制剤の開発において、ほぼ当初の計画通りに研究を遂行することができ、期待通りの研究成果をあげることができた。さらに阻害効果の機序の解明も進むなど、アルツハイマー病の予防・治療へ向けた新技術を創出することができたと考えている。今後は、一刻も早く新規の抗アミロイド療法の実現に励みたい。CREST 支援中では、予期せぬ光学機器の故障があり、研究の進展に不安があったが、加速資金等の支援もあり、無事研究を遂行できた。

また、A $\beta$  オリゴマーに関する研究では、安定的な A $\beta$  オリゴマー、特に A $\beta$ \*56 に相当する分子量をもつ A $\beta$  分子種をアルツハイマー病凍結脳組織から抽出する研究は未だ成功していない。合成ペプチドについては、やや問題が少ないようであるが、この課題をクリアされていない現状は、そのままアルツハイマー病新薬開発の展望が開けないことと関係すると考えているが、その重要性は不変であり引き続き挑戦していきたい。

本研究ではタウや MAP2 等の微小管結合タンパク質が引き起こす障害について取組んできたが、一方で、正常なタウの可視化に挑戦するなど、タウ生物学の新しい展開にも取組んだ。今後、これを進めることで、正常タウと異常タウの理解が進み、神経変性疾患について新しい知見を加えることができると考えている。