

解禁時間(テレビ、ラジオ、WEB):平成26年9月17日(水)午後5時(日本時間)  
(新聞) :平成26年9月18日(木)付 朝刊

## プレス通知資料 (研究成果)



国立大学法人  
東京医科歯科大学



文部科学省 “社会に貢献する脳科学”の実現を目指して  
脳科学研究戦略推進プログラム  
Strategic Research Program for Brain Science  
Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology - Japa

報道関係各位

平成26年9月16日  
国立大学法人 東京医科歯科大学

### 「アルツハイマー病の発症前・超早期病態を部分的に解明」 — アルツハイマー病の治療に道筋 —

#### 【ポイント】

- アルツハイマー病を発症する超早期におけるタンパク質のリン酸化シグナルの変化を捉えました。
- これらのタンパク質は主に神経細胞間のシナプス機能に関与していました。
- これらのタンパク質の機能を制御することによる新しいアルツハイマー病治療法に繋がる可能性があります。

アルツハイマー病の治療開発においては、発症前の早期病態を解明することが現在の最重要課題とされています。東京医科歯科大学・難治疾患研究所/脳統合機能研究センター・神経病理学分野の岡澤 均教授の研究グループは、最新の質量分析技術とスーパーコンピュータを用いたシステムズバイオロジーを駆使して、アルツハイマー病モデルマウスおよびアルツハイマー病患者脳のタンパク質を網羅的に解析し、発症前さらには老人班と呼ばれる異常タンパク質凝集が開始する前に、タンパク質リン酸化シグナルの異常が超早期病態として存在することを発見しました。この研究は文部科学省の新学術領域研究の支援のもと、また脳科学研究戦略推進プログラムの一環として行われたもので、その研究成果は、国際科学誌 Human Molecular Genetics (ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス)に、2014年9月17日午前9時(英国夏時間)にオンライン版で発表されます。

#### 【研究の背景】

アルツハイマー病は1902年にドイツの病理学者アルツハイマーが初めて報告した進行性脳疾患であり、病理学的には脳組織の細胞外に老人班(Senile plaque)、細胞内に神経原線維変化(neurofibrillary tangleあるいは電子顕微鏡的にpaired helical filament) という2つの特徴的な異常構造物が存在することが特徴です。前者はアミロイドベータ、後者はリン酸化タウというタンパク質の異常沈着であることが1980年代の研究から明らかにされています。2000年代以後、アミロイドベータの脳内凝集メカニズムをターゲットとする主として2つの治療法が考案され、アルツハイマー病患者への臨床試験に至っています。その一つは、アミロイドベータに対する抗体を体内に投与して、アミロイドベータが脳内に凝集して老人班を形成することを抑制するものです。しかし、欧米の複数の巨大製薬会社がヒト臨床試験を行いました。いずれも有効性を立証できませんでした(例えば

バピニューツマブの臨床試験に関する報道は以下のサイトで見ることができます。

<http://www.cbsnews.com/news/anticipated-alzheimers-drug-bapineuzumab-shows-no-patient-benefits-in-trial/>。特に重要なことは、死亡時まで追跡した患者の剖検脳において、抗体により老人斑は消失していたにも関わらず、これらの患者の症状は改善していなかったという点です(Holmes *et al.*, Lancet 2008)。また第2の方法として、アミロイドベータを産生する酵素であるガンマセクレターゼの阻害剤のヒト臨床試験も巨大製薬会社によって行われましたが、副作用によって開発中止に至っています(Doody *et al.*, N Engl J Med. 2013)。

これら既存のターゲットでは特効薬に至らなかった経緯を踏まえ、2014年時点でのアルツハイマー病研究の最重要課題は、発症前あるいはアミロイドベータの凝集前の超早期病態を明らかにすること、さらには、そのような超早期病態に介入することで治療が可能であることを示すことにあります。岡澤教授らは14年前にアミロイドベータが細胞外のみならず細胞内にも沈着すること、そのような沈着細胞ではc-Jun N-terminal kinase (JNK)というリン酸化酵素が活性化していることを報告しました(Shoji *et al.*, Molecular Brain Research 2000)。その後、アルツハイマー病以外の神経変性疾患を中心に網羅的質量分析(プロテオーム解析)を用いて、主要な病態分子を探索してきました(Qi *et al.*, Nature Cell Biology 2007)。今回は最新の質量分析技術とスーパーコンピュータを用いたシステムズバイオロジーを駆使して、このようなアルツハイマー病における最重要課題の解決に取り組みました。

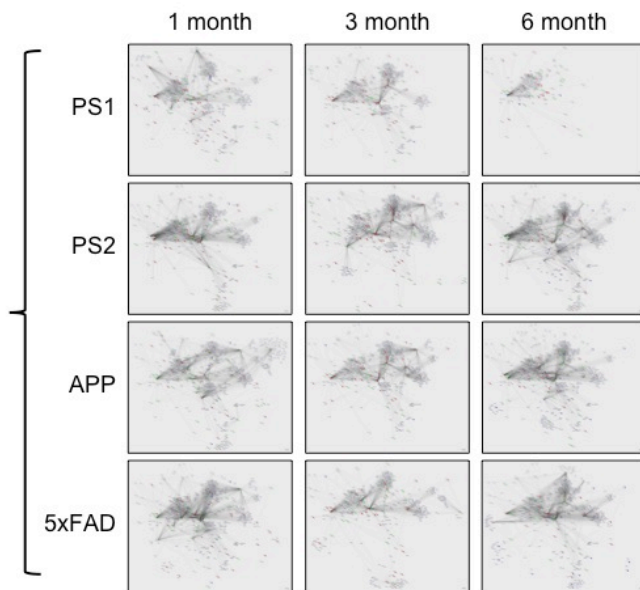
## 【研究成果の概要】

今回の研究では、アルツハイマー病モデルマウス4種類とアルツハイマー病患者の死後脳を対象に最新型の質量分析機を用いてプロテオーム解析を行いました。さらに、東京大学ゲノム解析センターの宮野悟教授と共同研究を行い、プロテオーム解析で得られた膨大なデータをスーパーコンピュータで解析しました。さらに、これらのビッグデータ解析から最終的に得られたコア分子を標的として、モデルマウスを用いた治療実験を行い、シナプスレベルの改善を認めました。

ヒト死後脳では死後の保存条件によりタンパク質リン酸化が様々に変化することが知られています(Oka *et al.*, PLoS ONE 2011)。そこで、今回の研究では、まずモデルマウス脳の質量分析とシステムズバイオロジー解析を始めに行き、中心的なリン酸化シグナルネットワーク異常を明らかにした後に、ヒト死後脳を用いて、コア病態ネットワークを確認するという戦略を採用しました。モデルマウスは1種類ではなく4種類を用いることで、個々の病態モデル特異的なバイアスを減らすことにしました。

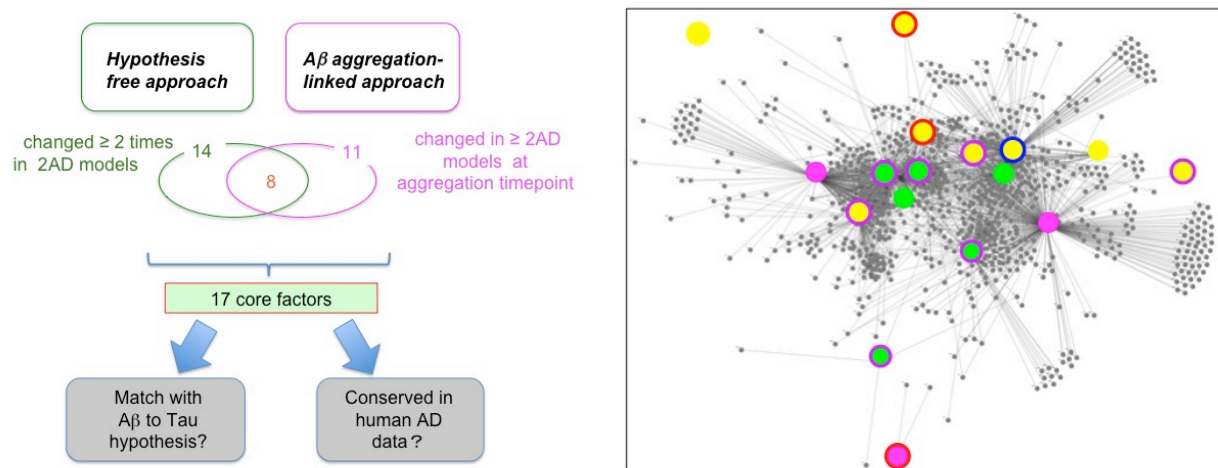
対象としたのは、以下に示す家族性アルツハイマー病原因遺伝子の各変異を持つ4種類のトランスジェニックマウスです。1)ヒトプレセニリン(PS)1のエクソン9欠損:PS1マウス、2)ヒトPS2のN141I変異:PS2マウス、3)ヒトアミロイド前駆体タンパク質(APP)のKM670/671NL(スウェーデン型点変異):APPマウス、4)PS1(M146L, L285V変異)とAPP(KM670/671NLスウェーデン型変異、I716Vフロリダ型変異、V717Iロンドン型変異)の5種類の変異:5XFADマウス。これらのマウスの1ヶ月齢、3ヶ月齢、6ヶ月齢の脳サンプルから信頼度95%で同定したリン酸化タンパク質のうち、コントロールマウスの値から変化が確認されたリン酸化タンパク質をリスト化した後に、これらを国立遺伝学研究所で公開しているタンパク質間結合データベース(PPIデータベース)に重ね

合わせることで、それぞれのモデルマウスで成長・加齢とともに変化する異常リン酸化シグナルネットワークを描出しました(図 1)。



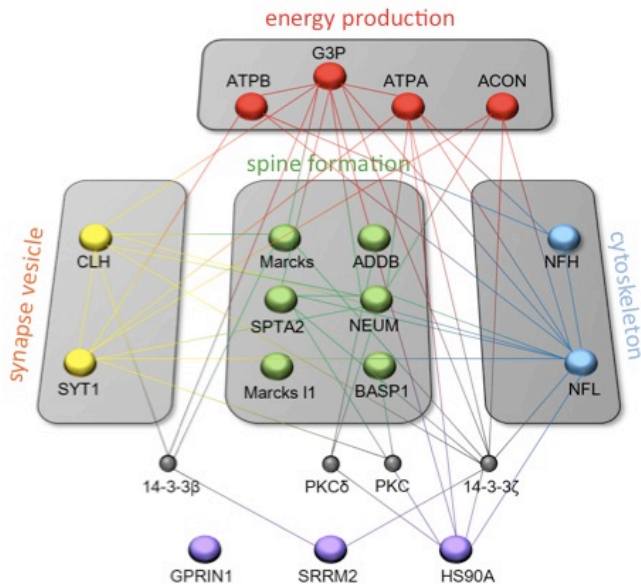
【図1】 4種類のアルツハイマー病モデルマウスにおける病態ネットワークの時間経過による変化

さらに、アルツハイマー病のモデルマウスの種類を超えて共通する異常リン酸化シグナルネットワーク(コア病態ネットワーク)あるいはネットワーク構成タンパク質(コア病態タンパク質)は重要であるとの仮定(図2、左図)のもとに、これらを抽出した結果、コア病態タンパク質はわずか17個に集約しており、しかも、これらのタンパク質の大半が直接的に結合していることが明らかになりました(図2、右図)。さらに、コア病態タンパク質の大半はアルツハイマー病患者の死後脳でも変化が認められたこと、アミロイド病態の下流に位置づけられるタウ病態を反映すると考えられる変異型タウタンパク質を持つトランスジェニックマウスでの解析においても同様の変化が認められたことから、超早期から晩期に至るまでの持続的な異常シグナルであること、モデルマウスのみならずヒト病態にもトランスレータブルな変化であること、アミロイド病態とタウ病態をつなぐ変化であること、等の可能性が示唆されました。

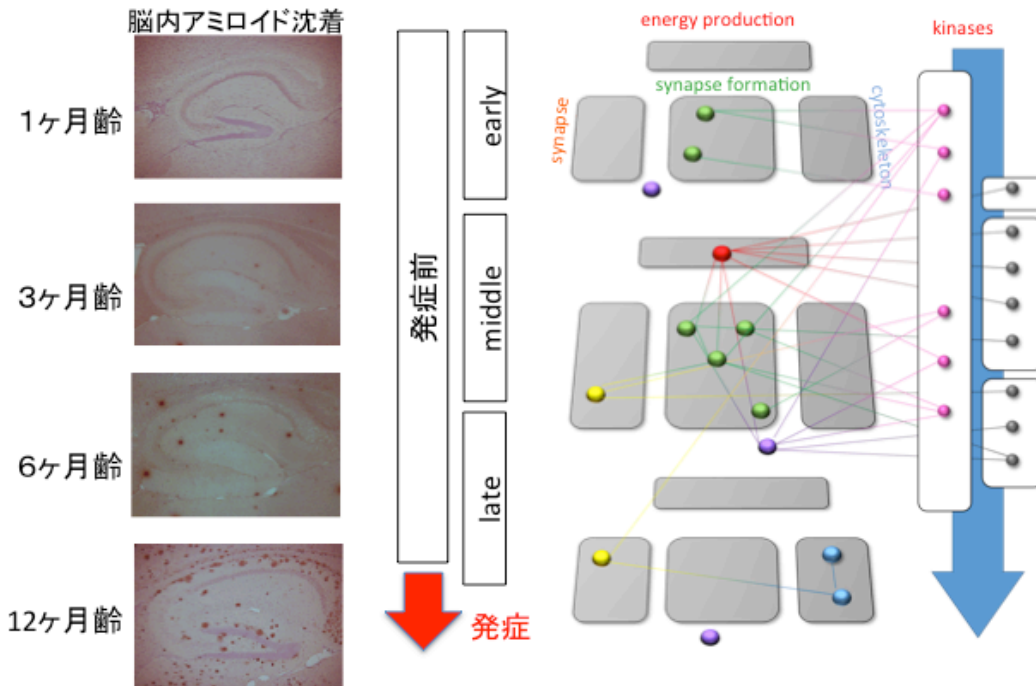


【図2】 本研究におけるコア病態分子抽出のストラテジー(左)と抽出されたコア病態ネットワーク(右)。コア病態分子(色付き)は、ほぼ全てが直接的に結合している

分子機能面からコア病態ネットワークを眺めると、これらのタンパク質はシナプス(神経細胞同士をつなぐ構造)に深く関与することが推測されました(図3)。そこで最後に、4種類のマウスのうち、最も症状の重篤な5XFADマウスを用いて、治療実験を行うことにしました。近年、アルツハイマー病態においてシナプス異常が生じることが注目されています。岡澤教授らの2光子顕微鏡を用いた観察においても、5XFADマウスの大脳皮質において興奮性シナプス後部の構造であるスパインが減少していることを確認しました。



【図3】 コア病態ネットワークと神経細胞機能との関係

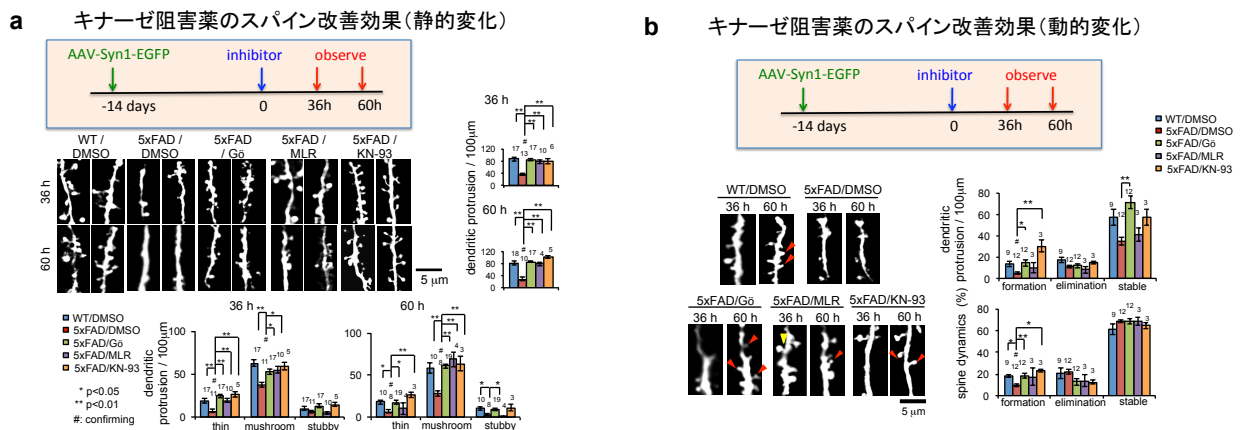


【図4】 アミロイドベータの脳内沈着とコア病態ネットワーク変化の時間的対応

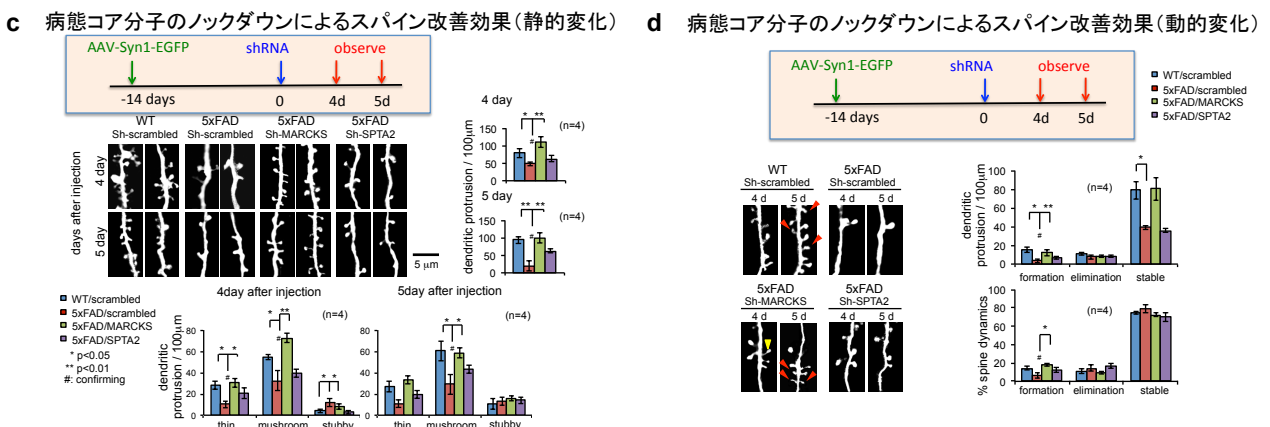
これまでに、同一研究室における4種類のモデルマウスに対しての同一手法による病理解析と行動解析の研究は行われていませんでした。その実験を行った結果、もっとも重篤な5XFADマウスでもアミロイド凝集(老人班)が認められるのは3ヶ月齢からであること、記憶力低下などの行動解析上の異常が検出されるのは6ヶ月

月齢以後であることが分かりました。したがって、コア病態ネットワークの変化は、発症前かつアミロイド凝集前であることが証明されました(図4)。

コア病態ネットワークの中で最も早期からリン酸化が変化するコア病態分子は、MARCKSというリン酸化酵素 protein kinase C (PKC)の基質でした。そこで、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてスパインを蛍光標識し、PKC阻害剤を5XFADマウスに投与した後に2光子顕微鏡で観察すると、スパイン減少が回復していることが明らかになりました(図5)。またshRNAという手法を使って、MARCKS産生を減少させると、やはりスパイン減少が回復していることが示されました(図6)。以上の結果から、コア病態ネットワークの正しさが概ね証明されるとともに、コア病態タンパク質をターゲットとした治療開発が可能であることが示されました。



【図5】 静的変化(スパイン密度の減少、左図)と動的変化(スパイン形成の減少、右図)へのキナーゼ阻害剤による治療効果



【図6】 静的変化(スパイン密度の減少、左図)と動的変化(スパイン形成の減少、右図)へのMARCKSノックダウンによる治療効果

## 【研究成果の意義】

本研究成果は、アルツハイマー病の発症前、凝集前の超早期病態の一端を捉えた成果と言えます。明らかになった超早期のコア病態シグナルネットワークあるいはコア病態分子をターゲットとする治療法を本格的に開発することによってアルツハイマー病の進行を抑制し、治癒に導く治療法を開発できる可能性があります。

## 【用語説明】

### <シナプス>

神経細胞と神経細胞は互いの一部が接してシナプスという構造を取っています。シナプス前部は軸索(axon)という通常1本だけの神経突起の終末であり、シナプス後部は神経細胞が複数持っている樹状突起の上にあります。興奮性シナプスの場合、樹状突起からわずかに突出したスパインと呼ばれる場所が軸索終末と接しています。抑制性シナプスの場合は、樹上突起のシャフト上の微小な平滑部分が軸索突起と接しています。この間には電氣的興奮がシナプス前部で伝達物質の放出につながり、伝達物質を受けた受容体がシナプス後部の膜電位を脱分極させることで、再び電氣的興奮に変換するという仕組みが働いています。興奮性シナプスでは、スパイン構造が作られたり消えたりしていますが、その構造が安定化することで、神経回路が形成されて記憶などの情報が安定的に保持されると考えられます。スパイン構造の安定化には、アクチン、スペクトリンなどの細胞骨格タンパク質や膜裏打ちタンパク質の他、リン酸化酵素を含む多くのタンパク質がダイナミックに関与しています。

### <質量分析>

質量分析とは分子(イオン)の電荷当たりの質量を正確に求めることができる装置です。高電圧をかけた真空中に測定したい分子をイオン化すると、静電力によりそのイオンが飛行し、電氣的、磁氣的に分離し検出することで、質量電荷比と検出強度からなるマススペクトルが得られる。プロテオーム解析においては、タンパク質を消化して得られたペプチドの質量分析と、タンパク質のアミノ酸配列データベースとの照合によりペプチドを同定し、その情報を元にタンパク質を同定することができる。

### <2光子顕微鏡>

2光子顕微鏡は生きた動物の脳の神経細胞を観察することを可能にしました。これまでは1つの光子を蛍光物質に吸収させ蛍光を観察していましたが、50 $\mu$ m程の深さまでしかレーザーが届かず、また強いエネルギーのレーザーは脳組織を傷つけてしまいました。2光子顕微鏡は特殊な技術により2つの光子を同時に蛍光物質に与えて蛍光を起こさせるため、長い波長のレーザーを用いることで高い細胞透過性が得られ、しかも弱いレーザーでの観察が可能であるため脳組織へのダメージを抑えることができます。このように透過性が優れているため、マウスの頭骨を薄く削るなどすれば生きたままの脳の細胞を観察できます。

### <家族性アルツハイマー病>

遺伝性のアルツハイマー病であり、原因遺伝子としてアミロイド前駆体タンパク質(APP)とプレセニリン1、プレセニリン2が報告されています。アルツハイマー病の病理的な特徴である老人斑を構成するアミロイドベータの

アミノ酸配列が同定された後、その前駆体である APP に家族性アルツハイマー病の家系で変異があることが報告されました。さらにその後、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見された新規遺伝子プレセニリン1、プレセニリン2は、後にアミロイドベータを APP から切り出す膜内酵素複合体の主要な構成要素であることが解明されました。

#### <アミロイド抗体療法>

アルツハイマー病モデルマウスにアミロイドベータを免疫抗原として注射するとアミロイドベータに対する抗体が産生され(能動免疫)、さらに病理的な特徴である老人斑が消失することが報告されました(Bard *et al.*, Nat Med 2000)。同じ方法を用いて、アルツハイマー病患者による臨床試験が行われましたが、副作用として重篤な脳炎が発生したため、臨床試験は中止になりました。しかし、一部の副作用のなかった患者は長期的にフォローされることとなり、最終的な結果が本文中に引用した Lancet 誌の論文として報告されました。老人班は減少しているのに、認知症が改善されないという衝撃的な結果もこの中で報告されました。その後、副作用を回避するために、抗体を体外で人工的に産生し、出来上がった抗体を静脈注射する受動免疫療法による臨床試験が行われました。それらの結果、パピニューツマブは無効、ソラネツマブは中間報告では軽度認知症に小さな有効性が認められましたが、最終結果として有効性は認められませんでした(Doody *et al.*, NEJM 2014)。現在、米国を中心に発症前の家族性アルツハイマー病に対する臨床試験を行い、早期病態に抗体療法を行った場合に有効かどうかを調査しています。

#### 【問い合わせ先】

##### <研究に関すること>

東京医科歯科大学 難治疾患研究所・脳統合機能研究センター  
神経病理学分野 岡澤 均(オカザワ ヒトシ)  
TEL:03-5803-5847 FAX:03-5803-5847  
E-mail: okazawa.npat@mri.tmd.ac.jp

##### <報道に関すること>

東京医科歯科大学 広報部広報課  
〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45  
TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272  
E-mail:kouhou.adm@tmd.ac.jp

##### <文部科学省「脳科学研究戦略推進プログラム」に関すること>

脳科学研究戦略推進プログラム 事務局 (担当:矢口、本木)  
TEL:03- 5282-5145 FAX:03- 5282-5146  
E-mail:srpbs@nips.ac.jp