

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07014

研究課題名（和文）小胞輸送障害の定量的・網羅的解析法の確立によるアルツハイマー病治療薬の探索

研究課題名（英文）Establishing quantitative and comprehensive methods for analyzing vesicular traffic impairment to identify the drug candidates for Alzheimer's disease

研究代表者

高杉 展正（TAKASUGI, NOBUMASA）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：60436590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、初期アルツハイマー病（AD）病態において小胞輸送障害が起こり、様々なAD病態の起因となることが明らかにされている。小胞輸送障害は、APPがセクレターゼで切断され産生される代謝物、 $\beta$ -secretase cleaved carboxyl terminal fragment（CTF）がエンドソームで蓄積することが引き金となっている。

本研究では、脂質輸送酵素であり、小胞輸送を制御するリピッドフリッパーゼ（LF）構成因子、TMEM30AとCTFが結合し、小胞輸送を障害するメカニズムを解明し、LF活性の効率的な測定系や小胞輸送障害解析法を樹立し、治療薬候補T-RAPを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AD発症の最有力な仮説であるアミロイド仮説においても、A $\beta$ 産生・凝集・毒性発揮などの多くの病態が含まれるが、現状多くの治療薬候補は単一標的であり、その治療効果も限定的である。

本研究は、アミロイド仮説を補完できる交通渋滞仮説の分子機構解明に迫っており、さらにAD病態に対し特異性・多機能的治療効果を持ち、複雑なAD病態に対応でき、副作用の少ない薬物創出の可能性を提示している。神経細胞はその長い構造上、輸送にコストがかかり、小胞輸送障害は筋萎縮性側索硬化症（ALS）やパーキンソン病発症においても発症リスクに寄与しており、本技術の開発によりこれらの神経変性疾患にも応用できる技術の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been shown that vesicular trafficking impairments occur as early Alzheimer's disease (AD) pathology and to trigger other AD pathologies. Vesicular trafficking impairments are triggered by endosomal accumulation of  $\beta$ -secretase cleaved carboxyl terminal fragment (CTF), a metabolite formed when APP is cleaved by AD associated enzyme,  $\beta$ -secretase. In this study, we elucidated the mechanism by which CTF binds to TMEM30A, a lipid flippase (LF) component that regulates vesicular transport, and impairs vesicular transport, established an efficient measurement system for LF activity and a method to analyze vesicular transport impairment, and identified T-RAP, a small peptide derived from the TMEM30A structure, as a therapeutic candidate. Because T-RAP targets AD pathology-specific disorders, it is expected to reduce side effects and may be a new category of drug with multifunctional properties.

研究分野：薬理学

キーワード：アルツハイマー病 小胞輸送障害 神経変性疾患 CTF A 脂質輸送酵素 リピッドフリッパーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は最も頻度の高い認知症であり、その根本治療の開発が切に望まれている。その発症メカニズムとしては、初期の病変である老人斑の主要構成成分、Amyloid (A $\beta$ ) ペプチドの産生・代謝の異常が原因とする「アミロイド仮説」が強く支持されている。一方で、アミロイド仮説に基づき A $\beta$  産生阻害薬、代謝促進薬が開発されたが、ほとんどが認知機能改善などの治療効果を示せず頓挫していた。

要因の一つとして、診断時 AD はより複雑で、複数の病態が存在することが挙げられる。アミロイド仮説では、細胞外に蓄積する A $\beta$  の毒性に着目しているが、A $\beta$  毒性と独立した細胞内の病態も存在することが予想されていた。

近年、A $\beta$  蓄積以前の初期病態として、小胞輸送異常の指標となる輸送小胞 (エンドソーム) の巨大化が観察されることから、小胞輸送障害を AD 発症の引き金とする交通渋滞 (Traffic jam) 仮説が提唱されていた。

興味深いことに、

- A $\beta$  の前駆的分子であり、AD 患者脳に蓄積する CTF (セクレターゼ切断性カルボキシ末端フラグメント) は小胞輸送障害を誘導する (Kim et al., Mol psychiatry, 2015)
- 小胞輸送を安定化する薬剤は A $\beta$  産生を抑制する (Mecozzi et al., Nat Chem Biol, 2014) ことが報告されており、アミロイド仮説の根幹となる A $\beta$  産生機構と Traffic jam 仮説には強い相関性が認められている (図1)。

これらのアミロイド仮説を補完する発症機序を明らかにし、より早期の病態を抑止し、さらに AD の複雑な病態を同時に予防・改善できる多機能性をもつ治療薬を創出することは、根治療法の確立に重要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

申請者らのグループは CTF に結合する因子として TMEM30A の単離同定に成功していた

(Takasugi et al., PLoS One 2018)。TMEM30A は、酵素活性サブユニットである P4-ATPase ファミリータンパク質と結合し、脂質輸送酵素リッパゼ (LF) を形成する。脂質二重膜において、通常ホスファチジルセリン (PS) は LF により細胞質側に偏った局在を示す。

このような PS の不均衡な局在は、膜構造の屈曲や、PS 結合分子の集積に繋がり、エンドソームでの形成と分離を促進するため、LF は小胞輸送制御に必須の酵素である (図2)。

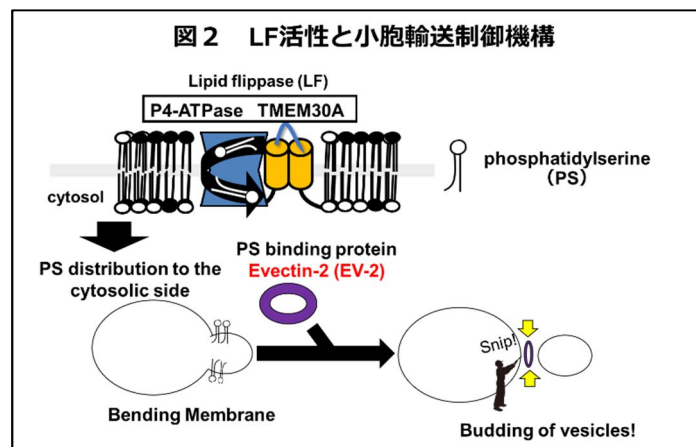
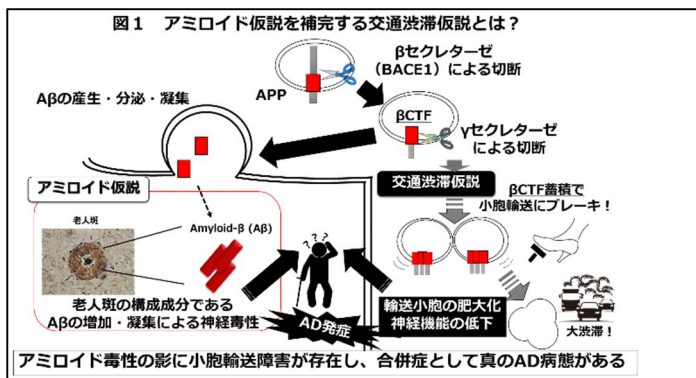
また、PS の細胞質側への不均衡な局在が AD で失われ、PS が細胞外に露出すること (Bader Lange, et al. Neurobiology Dis, 2008)、P4-ATPase の一つである ATP8B4 が AD 遺伝的危険因子であること (Li et al., Arch Neurol, 2008) が報告されていたことから、LF 活性の変化が小胞輸送障害を介して、AD 発症に関与することを想起した。

そこで、本課題では CTF 蓄積の LF 活性への影響に注目し、AD 発症機構との関わりを明らかにし、小胞輸送障害を改善可能な新規予防・治療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

主に以下の方法で研究を行った。

- CTF 蓄積のフリッパーゼ活性への影響についての解析  
LF 活性測定系・小胞輸送障害測定系を樹立し、CTF 蓄積が与える影響を細胞モデルで検証し、動物モデルを用い病態との関連性を検証した。また、TMEM30A の CTF 結合部分の探索し、フリッパーゼ活性・小胞輸送障害を改善できるペプチドの同定を試みた。



- AD 特異的輸送障害を改善するペプチドの同定と細胞モデルを用いた AD 治療効果の検証  
CTF 結合性ペプチド T-RAP を用い、小胞輸送障害・フリッパーゼ活性低下改善作用などの AD 治療効果を持つか検討した。
- T-RAP 様小分子化合物スクリーニング系の構築  
T-RAP と同様に CTF と結合する小分子化合物のスクリーニング系の構築と探索を行った。

#### 4. 研究成果

CTF 産生酵素である BACE1 は、孤発性 AD で活性が増加するなど AD 発症機構に深く関わっている。アフリカミドリザル腎由来細胞 COS-7 細胞、及びヒト神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞を用いて、BACE1 恒常発現による AD モデル細胞系を構築した。

本モデル細胞系を用い、エンドソームタンパク質 Rab5 の局在を指標としたエンドソームの形状変化の観察系を構築し、モデル細胞系では有意にエンドソームの肥大が起こることを明らかにした(図 3A)。

さらに、スプリットルシフェラーゼ法(NanoBit 法)を利用し、細胞質側の PS 依存的に輸送小胞に結合する Ectectin-2 (EV-2)、及び Rab5 にそれぞれルシフェラーゼ部分を融合し、融合タンパク質の近接により発光する、半定量的な LF 評価系を構築した(Kaneshiro et al., *iScience* 2022)。本測定系を適応し、LF 活性がモデル細胞系で有意に低下することを明らかにした(図 3B)。

エンドソームの肥大化・LF 活性低下は、後述する CTF 結合性を示す新規小胞輸送障害改善ペプチド T-RAP 処理や、BACE1 阻害により改善することから、CTF 蓄積と LF 活性低下が関連しており、小胞輸送障害を誘引する可能性が示唆された。

LF の安定化と活性化には P4-ATPase と TMEM30A の複合体形成が必要のため、CTF が TMEM30A と結合し競合することにより、P4-ATPase との複合体形成・LF 活性が低下すると予想した。

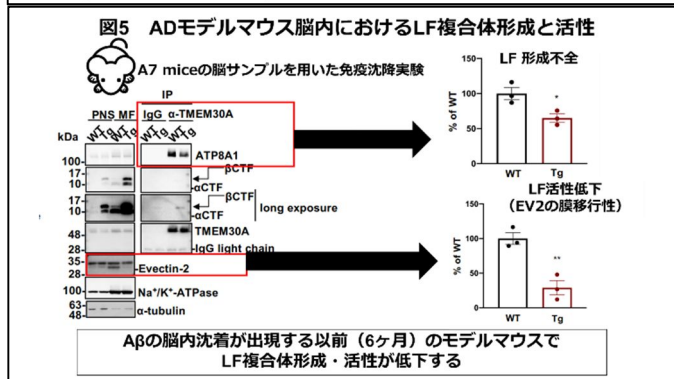
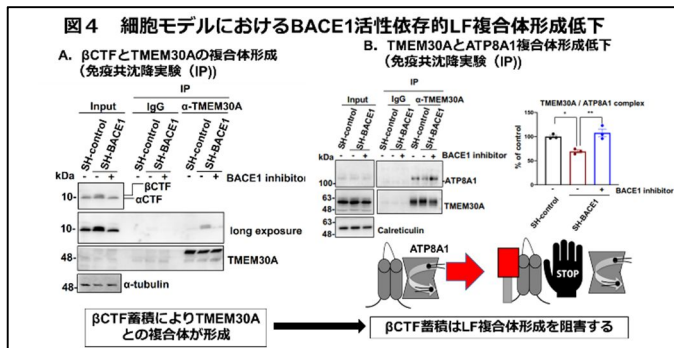
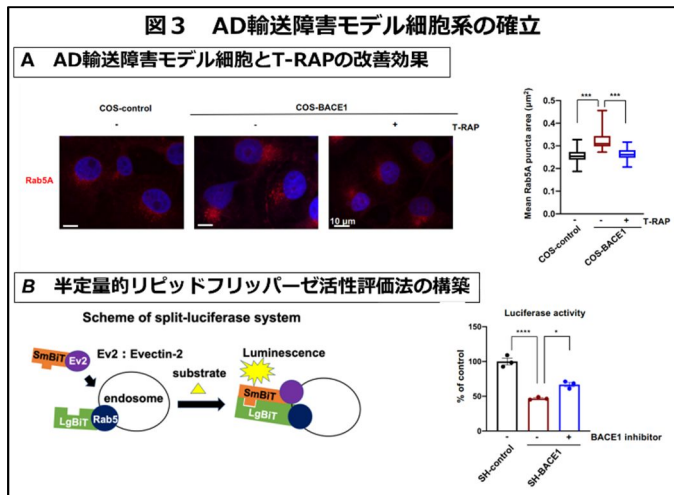
そこで、エンドソーム局在 P4-ATPase である ATP8A1 を用い、内因性の LF 複合体形成効率を検証した。その結果、モデル細胞系では TMEM30A と CTF が複合体を形成し、LF 複合体形成が有意に低下すること(図 4)、そして図 3 と同様に BACE1 阻害薬で LF 複合体形成が回復するなど、BACE1 活性依存的である事を明らかにした。

モデル細胞系における LF 複合体形成・活性化の低下が、*in vivo* で再現されるかについて、モデル動物 A7 モデルマウス(図 5)、APP-NL-G-F ノックインマウス)の脳サンプルの膜画分(MF)を用いて解析した。

小胞輸送障害は AD の最初期病態であり、細胞外 A 毒性とは独立していることから、本検討では A の細胞外沈着が起こる以前の若いマウスを使用して解析した。また脳内の LF 活性を評価するため、LF 活性依存的に細胞膜に結合する EV-2 の細胞膜移行性を解析した。

その結果、モデル動物では CTF と TMEM30A の異常な複合体形成、LF 複合体形成低下、LF 活性低下など、モデル細胞系で観察された結果が再現されることが明らかになった。

以上の結果から、異常な CTF と TMEM30A の複合体形成が阻害できれば、小胞輸送障害を改善できると予想し、TMEM30A 構造から CTF と結合するドメインを探索した。TMEM30A の細胞外ドメインを GST タンパク質と融合し、細胞に発現させた CTF との結合性を Pull-down 法により確認した。そして段階的に TMEM30A 由来部分を短縮していき、最終的に 24 アミノ酸で構成される T-RAP (TMEM30A related amyloid b binding peptide) 配列を見出した(図 6)。



興味深いことに、T-RAP は CTF と A の共通部分である A のアミノ酸末端部分 (A N) と強く結合し、A や、A や CTF の前駆体となる APP (A 前駆体タンパク質) とも結合することを明らかにしている。

T-RAP は A N 配列以外では APP と相同性が高いファミリータンパク質である APLP1, 2 とは結合しないなど、APP 特異性が高く、他の A N 結合性のペプチドと比較して、親水性が高く、精製も容易であるなど、応用性も高いと予測された。

T-RAP 処理はモデル細胞系において、小胞輸送障害の指標と考えられるエンドソームの肥大化を改善し(図 3A 参照)、さらに LF の活性低下の改善傾向を示した(図 6)。また、細胞内の CTF レベルを低下させる効果も示された。

以上の結果は、AD 初期病態である小胞輸送障害のメカニズムとして、CTF 蓄積による LF 活性低下があり、T-RAP のような CTF 結合性のペプチドや化合物が AD 予防・治療薬の候補となることを示しており、科学雑誌に論文として発表した (Kaneshiro et al., *iScience* 2022)。

さらに、T-RAP は下記の機能を持ち、多機能性薬物候補として有望と考えられた(図 7)。

- APP に結合することにより A・CTF などの AD 病因因子の産生を阻害する
- A に結合することによりその凝集を阻害する

これまでに、T-RAP を利用した、T-RAP 様の性質を持つ化合物の効率的なスクリーニングシステムを樹立し、初期的な候補薬物を同定している。今後スクリーニング系の自動化を進め、大規模化合物ライブラリから候補化合物を探索していく予定である。

また海馬切片培養系は組織構造を保ち、長期培養が可能な薬物評価系であり (Kamikubo et al., *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2023)、二次的なスクリーニング系としての構築を共同研究者である順天堂大学 上窪 裕二 准教授と進めている。

T-RAP については分子的に扱いやすく、プローブとしても使用可能であり、現在近接因子をピオチン化するピオチンリガーゼである TurboID との融合発現系を樹立しており、CTF に近接する小胞輸送障害関連因子を網羅的に解析する予定である。

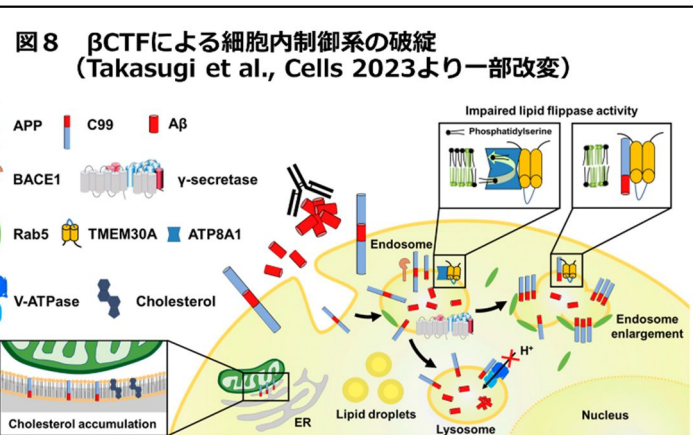
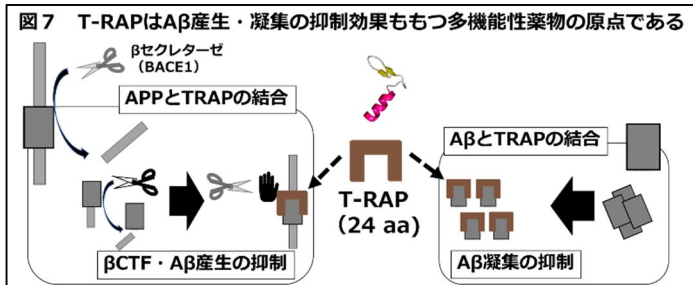
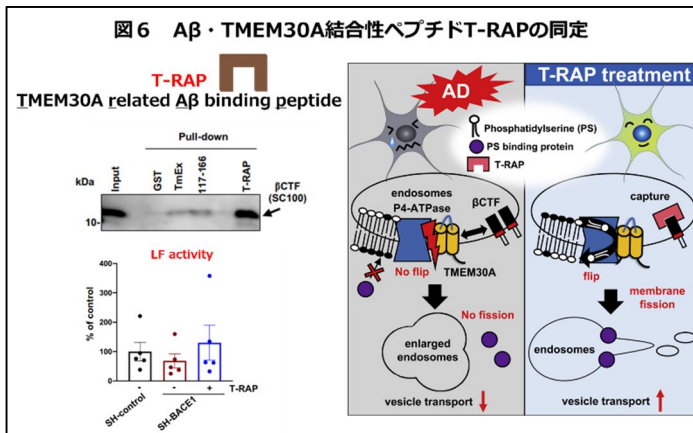
本研究計画を遂行中に、凝集 A の抗体であるアデュカヌマブやレカネマブが米国で承認を受け、後継 A 抗体の開発も進んでいる。アミロイド仮説に基づいた初めての治療薬の出現により、AD 創薬は大きな転換点を迎えている。一方で、抗体療法による治療効果は未だ限定的である。

本研究でも示されているように、アミロイド仮説に関する病態においても、細胞内・外の障害は独立しているが、抗体の細胞内移行性の低さを考慮すると、その効果は細胞外の A 毒性の改善に限定されると考えられる。現状、多くのアミロイド仮説に関する治療薬候補は単一標的であり、細胞内毒性に対応できていないのは大きな課題である。

CTF 蓄積は細胞内制御系の破綻につながることで、我々を含め多くのグループから報告されており、その多機能性の薬物標的としての重要性が再確認されている。

さらに、CTF 蓄積と関連する細胞内のリソソーム障害により PANTHOS (毒の花) と呼ばれる異常構造物が形成され、細胞死によって PANTHOS が露出することにより A の細胞外沈着が起こるとする大胆な仮説が提唱されるなど (Lee et al., *Nature Neurosci* 2022)、様々な AD 病態が細胞内の異常から起こることが示されつつある(図 8)。

T-RAP は、TMEM30A と CTF の複合体形成という AD 特異的な細胞内病変を標的にしており、副作用が少ないことも予想され、A 産生・凝集などの細胞外毒性にも一葉で対処できる多機能性



が期待できる。また ATP8A1, TMEM30A の機能欠失が、海馬に依存した記憶形成を低下させ( Levano et al., *J Neurochem* 2011), AD 病態を亢進する (Tamboli et al., *BioRxiv* 2020) などの報告がなされており、大規模解析から、LF の酵素活性ドメインの一つでありミクログリアに発現する ATP8B4 が AD 遺伝的リスク因子として再確認されるなど (Holstege et al., *Nature Genetics* 2022), LF 活性と AD 発症機構の密接な関連性も明らかになりつつある。

AD 病態は、診断時にはアミロイド仮説病態、タウタンパク質凝集病態、神経細胞死、慢性炎症など複雑な病態が絡み合う合併症であり、今後これらの病態の治療薬の併用も考えられていくと予想され、少なくともアミロイド仮説内の病態に完全に対処できる薬物の創出は、AD 根治療法開発においてブレーク・スルーとなりうる。

現状の AD 創薬環境をまとめ、その中での我々の研究の立ち位置の紹介を目的として、レビュー論文を科学雑誌に発表している (Takasugi et al., *Cells* 2023)。

一部、手法の変更等を行った部分はあるが、計画時の目標は概ね達成できており、本研究成果をさらに発展させ、LF の活性変化と神経・ミクログリア機能障害を明らかにし、独自の治療薬候補を提示していくことが期待できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takasugi Nobumasa, Komai Masato, Kaneshiro Nanaka, Ikeda Atsuya, Kamikubo Yuji, Uehara Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 The Pursuit of the “ Inside ” of the Amyloid Hypothesis? Is C99 a Promising Therapeutic Target for Alzheimer ’ s Disease?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 454 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12030454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kamikubo Yuji, Jin Hao, Zhou Yiyao, Niisato Kazue, Hashimoto Yoshie, Takasugi Nobumasa, Sakurai Takashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Ex vivo analysis platforms for monitoring amyloid precursor protein cleavage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1068990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.1068990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Ryosuke, Takasugi Nobumasa, Hiraoka Hideki, Iijima Yuta, Iwawaki Takao, Kumagai Yoshito, Fujimura Masatake, Uehara Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Alterations in UPR Signaling by Methylmercury Trigger Neuronal Cell Death in the Mouse Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15412 ~ 15412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232315412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaneshiro Nanaka, Komai Masato, Imaoka Ryosuke, Ikeda Atsuya, Kamikubo Yuji, Saito Takashi, Saido Takaomi C., Tomita Taisuke, Hashimoto Tadafumi, Iwatsubo Takeshi, Sakurai Takashi, Uehara Takashi, Takasugi Nobumasa	4. 巻 25
2. 論文標題 Lipid flippase dysfunction as a therapeutic target for endosomal anomalies in Alzheimer ’ s disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103869 ~ 103869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.103869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiraoka Hideki, Nomura Ryosuke, Takasugi Nobumasa, Akai Ryoko, Iwawaki Takao, Kumagai Yoshito, Fujimura Masatake, Uehara Takashi	4. 巻 95
2. 論文標題 Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1241 ~ 1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-021-02982-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakahara Kengo, Hamada Kyohei, Tsuchida Tomoki, Takasugi Nobumasa, Abiko Yumi, Shien Kazuhiko, Toyooka Shinichi, Kumagai Yoshito, Uehara Takashi	4. 巻 296
2. 論文標題 Covalent N-arylation by the pollutant 1,2-naphthoquinone activates the EGF receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100524 ~ 100524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 駒井真人, 野田祐佳, 上原孝, 高杉展正
2. 発表標題 SphK2/S1PシグナルによるApoE発現制御機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nanaka Kaneshiro, Tadafumi Hashimoto, Takashi Sakurai, Takashi Uehara, Nobumasa Takasugi
2. 発表標題 The analysis for APP- CTF mediated traffic impairment in AD
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 駒井真人, 野田祐佳, 上原孝, 高杉展正
2. 発表標題 SphK2/S1P シグナルによる ApoE 発現調節機構の解明
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 駒井真人, 野田祐佳, 上原孝, 高杉展正
2. 発表標題 SphK2/S1P シグナルによる ApoE 発現調節機構の解明
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 駒井真人, 野田祐佳, 上原孝, 高杉展正
2. 発表標題 SphK2/S1P シグナルによる ApoE 発現調節機構の解明
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高杉展正, 金城那香, 駒井真人, 上原孝
2. 発表標題 交通渋滞仮説に基づいたアルツハイマー病治療薬の開発
3. 学会等名 第142回日本薬学会年会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 高杉展正, 金城那香, 駒井真人, 上原孝
2. 発表標題 交通渋滞仮説に基づいたアルツハイマー病治療薬の開発
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nanaka Kaneshiro, Tadafumi Hashimoto, Takashi Sakurai, Takashi Uehara, Nobumasa Takasugi
2. 発表標題 The analysis for APP- CTF mediated traffic impairment in AD
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 駒井真人, 野田祐佳, 上原孝, 高杉展正
2. 発表標題 SphK2/S1P シグナルによる ApoE 発現調節機構の解明
3. 学会等名 第39回 日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アルツハイマー病における「交通渋滞」解消の可能性 ~  
[https://www.okayama-u.ac.jp/up\\_load\\_files/press\\_r3/press20220317-8.pdf](https://www.okayama-u.ac.jp/up_load_files/press_r3/press20220317-8.pdf)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	橋本 唯史  (Hashimoto Tadafumi)  (30334337)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研 究所 疾病研究第四部・部長     (82611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関