

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500445

研究課題名(和文) アミロイド 前駆体C99をターゲットとしたアルツハイマー病治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy for Alzheimer's disease by targeting amyloid precursor protein C99

研究代表者

西村 正樹 (Nishimura, Masaki)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授

研究者番号：40322739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳へのアミロイド(A $\beta$ )蓄積はアルツハイマー病(AD)の分子基盤である。A $\beta$ は前駆体タンパク質APPの及びセクレターゼ切断により産生される。我々は、A $\beta$ 産生を負に制御する分泌タンパク質としてILEIを同定した。ILEIはセクレターゼ複合体に結合しそのシャペロン活性を阻害することにより、A $\beta$ 産生の直前の前駆体APP-C99を不安定化するが、その活性は阻害しなかった。ILEIは脳神経細胞が発現するが、AD症例の脳では発現レベルが有意に低下しており、一方ADモデルマウスにILEIを人為的に発現させるとA $\beta$ 沈着と記憶障害が改善した。以上、ILEIは新たな予防治療法の開発において有望な標的である。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of amyloid- $\beta$  (Ab) in the brain underlies the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Ab is produced by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase-mediated sequential proteolysis of Ab precursor protein (APP). Although  $\gamma$ -secretase is a major target of therapeutic intervention, non-selective inhibition of its activity causes serious adverse effects due to blockade of Notch signaling. We have identified a secretory protein named ILEI as a negative regulator of Ab production. ILEI destabilized the  $\beta$ -secretase-cleaved APP C-terminal fragment, APP-C99, by binding to the  $\gamma$ -secretase complex and interfering with its chaperone properties. Notch signaling and  $\gamma$ -secretase activity were not affected by ILEI. We also show neuronal expression of ILEI and its reduction in the brains of AD patients. Transgenic over expression of ILEI significantly reduced the brain Ab burden and ameliorates the memory deficit in AD model mice. ILEI may be a plausible target for the development of disease-modifying therapies.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド ILEI FAM3C セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、アルツハイマー病(AD)の医学的克服は急務とされる。ADの分子病態において、決定的な役割を果たすのはアミロイドβ(Aβ)ペプチドである。Aβは前駆体タンパク質(APP)がセクレターゼと呼ばれる酵素により加水分解されることによって産生されることが判明している。しかし、その阻害による治療法開発については現在まで種々の要因により困難を極めている。

2. 研究の目的

ADの原因ペプチドAβの産生を制御する治療戦略として、従来からセクレターゼが標的として注目されてきた。それに対し、本課題ではAβ産生の直前の前駆体であるAPP-C99をターゲットとするアプローチの開拓を目的とする。申請者らはAPP-C99の安定性制御に関わりAβ産生を抑制する分子として新たにACDP(論文発表において、ILEIの名称を用いたため、以下ILEI/ACDPとする)を同定している。ILEI/ACDPの作用メカニズム、マウス脳における機能、ILEI/ACDPトランスジェニック(Tg)マウスとADモデルマウスの掛け合わせによる病理所見・認知記憶機能に対する効果などの解析を通し、副作用のない治療法の実現を目指した研究を進める。

3. 研究の方法

ILEI/ACDPがAPP-C99の分解を促進しAβ産生を減少させる分子メカニズムを詳細に解明し、同時に個体レベルでの機能解析を行うことにより、ILEI/ACDPの発現誘導や類似活性を示す化合物の同定による治療法開拓の可能性を念頭に置いた検討を進める。具体的には、以下の項目を進めた。

④ILEI/ACDPの構造機能関連解析・受容体探索：培養細胞レベルにおいて、ILEI/ACDPによるAβ産生抑制の分子メカニズムを解析することからペプチド性薬剤の可能性の検討を深める。

⑤ILEI/ACDP発現調節メカニズムに関する検討：発現調節機序の解明から発現誘導による治療の可能性を検討する。

③マウス個体レベルの解析：ILEI/ACDP-Tgマウスの作出により個体レベルでの機能解析とAβ産生抑制活性の評価を行う。

④ILEI/ACDP-TgとAPP-Tgマウスの掛け合わせによるAD病態への効果の検討：ADモデルマウス(APP-Tg)とACDP-Tgマウスとの掛け合わせにより、AD病理や認知機能への効果を評価する。

4. 研究成果

④ILEI/ACDPの構造機能関連解析・受容体探索：ILEI/ACDPはγセクレターゼ活性は阻害せず、Aβ産生を抑制する。

(1) ILEI/ACDPはN末端切断を受け分泌される。アミノ酸配列上、Aβ産生抑制活性を示す

ために必要最小限の領域を同定するため、部分欠失変異体を作成して検討した。結果、あらゆる欠失はタンパク質としての安定性を失い、その活性を喪失させた。従って、活性には分泌型全長タンパク質が必要であると考えられた。

(2) ILEI/ACDPは細胞膜表面において、γセクレターゼ複合体と結合する。一方、Presenilinノックアウト細胞ではAPP-C99増加活性は示さず、γセクレターゼ阻害剤存在下ではAPP-C99が増加したことから、セクレターゼ活性の有無に拘わらず、γセクレターゼ複合体の存在が必要と考えられた。なお、ILEI/ACDPは細胞外から結合してAPP-C99を不安定化することが示唆された。

⑤ILEI/ACDP発現調節メカニズムに関する検討：免疫組織化学により、ACDPは広範囲のニューロンにおいて発現が認められた一方、グリア細胞には発現がみられなかった。細胞内局在としては、トランスGolgiネットワークおよびエンドゾーム系に陽性所見がみられた。ILEI/ACDPは翻訳段階において発現誘導を受けることが報告された。すなわち、TGF-β刺激はhnRNP-E1リン酸化を促進し、ACDP mRNAの3'末端にあるコンセンサス・モチーフを介して翻訳を促進する。TGF-β受容体活性化はAβ産生を抑制すると報告されており、ACDPはこれを仲介する可能性がある。ラットスライス脳培養を用いた検討において、TGF-β刺激は大脳皮質組織におけるILEI/ACDP発現を誘導し、Aβ産生を抑制したが、ILEI/ACDPノックダウン処理後では、このAβ産生抑制効果が認められなかった。この結果から、ILEI/ACDPはTGF-βによるAβ産生抑制活性を仲介することが判明した。

③マウス個体レベルの解析：、ACDPトランスジェニック(Tg)・マウスの作出と解析を予定する。神経細胞優位に発現するマウスprionプロモーターを用いたACDP-Tgマウスを作出した。

④ILEI/ACDP-TgとAPP-Tgマウスの掛け合わせによるAD病態への効果の検討：

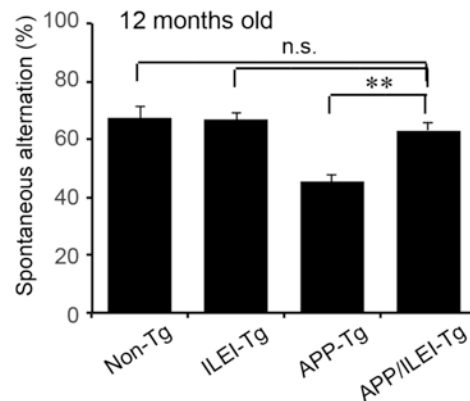


図1. Y迷路テストの結果。縦軸は新たな迷路を選択した割合を示す。

Double-Tgマウスでは、APP-Tgマウスに比べて、Y迷路テスト上、海馬依存性短期記憶障

害が改善していることが明らかとなった（図1）。また、脳内A $\beta$ 沈着についても、Double-Tgマウスでは有意に減少していた。

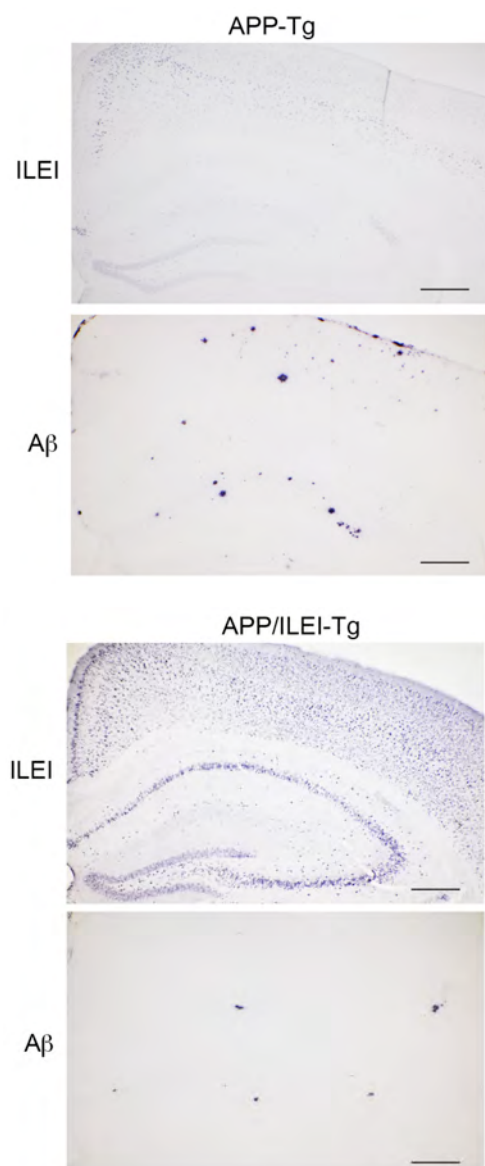


図2. 大脳皮質及び海馬の免疫組織化学所見。Double-TgではAPP-Tgに比して、ILEI/ACDP発現レベルが高く、A $\beta$ 斑は少ない。

本研究課題を通しての成果：ACDPは分泌タンパク質であるが、細胞外から $\gamma$ セクレターゼ複合体に結合し、そのシャペロン機能を妨害する。ACDPはヒト及びマウス脳において広くニューロンに発現が認められ、細胞内局在はA $\beta$ 産生部位に一致することが明らかとなった。その発現メカニズムについては、TGF- $\beta$ に転写誘導されることが示唆された。アルツハイマー病症例の剖検脳ではACDP発現レベルが有意に低下していたのに対し、ACDPを高レベルで発現するマウスとアルツハイマー病モデルマウスとの掛け合わせ実験により、ACDPが脳内A $\beta$ 沈着を減少させ短期記憶障害を有意に改善させることが明らかとなった。

以上の結果は、ACDPが本症の治療法開発における有効なターゲット分子であることを示唆しており、今後治療法開発を進めることが有望と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計10件）

- ① Hasegawa H, Liu L, Tooyama I, Murayama S, Nishimura M. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid- $\beta$  precursor. *Nat Commun*, in press, doi:10.1038/ncomms4917 査読有
- ② Han J, Jung S, Jang J, Kam TI, Choi H, Kim BJ, Nah J, Jo DG, Nakagawa T, Nishimura M, Jung YK. OCIAD2 activates  $\gamma$ -secretase to enhance amyloid  $\beta$  production by interacting with nicastrin. *Cell Mol Life Sci*, in press (online 2013) doi:10.1007/s00018-013-1515-x 査読有
- ③ Saito Y, Inoue T, Zhu G, Kimura N, Okada M, Nishimura M, Kimura N, Murayama S, Kaneko S, Shigemoto R, Imoto K, Suzuki T. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels: a potential molecular link between epileptic seizures and A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7: 50, 2012 査読有
- ④ Nishimura M, Nakamura S, Kimura N, Liu L, Suzuki T, Tooyama I. Age-related modulation of  $\gamma$ -secretase activity in non-human primate brains. *J Neurochem* 123(1): 21-28, 2012 査読有
- ⑤ Matsushima T, Saito Y, Elliott JI, Iijima-Ando K, Nishimura M, Kimura N, Hata S, Yamamoto T, Nakaya T, Suzuki T. Membrane-microdomain localization of amyloid  $\beta$ -precursor protein (APP) C-terminal fragments is regulated by phosphorylation of the cytoplasmic Thr<sup>668</sup> residue. *J Biol Chem* 287(23): 19715-19724, 2012 査読有
- ⑥ 西村正樹.  $\gamma$ セクレターゼ複合体に作用しA $\beta$ 産生を制御する内在性タンパク質. *Dementia Japan* 26(1): 44-50, 2012 査読無
- ⑦ Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Slegers K, Funamoto S, Mihira N, 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 査読有
- ⑧ Hata S, Fujishige S, Araki Y, Taniguchi M, Urakami K, Peskind E, Akatsu H, Araseki M, Yamamoto K, Martins RN, Maeda M, Nishimura M, Levey A, Chung KA, Montine T, Leverenz J, Fagan A, Goate A, Bateman R, Holtzman DM, Yamamoto T, Nakaya N, Gandy S, Suzuki T. Alternative processing of  $\gamma$ -secretase substrates in common forms of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Evidence for  $\gamma$ -secretase dysfunction. *Ann Neurol* 69(6): 1026-1031, 2011 査読有
- ⑨ Matsuo A, Bellier JP, Nishimura M, Yasuhara O, Saito N, Kimura H. Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. *J Biol Chem* 286(7): 5836-5845, 2011 査読有
- ⑩ 西村正樹. アルツハイマー病に対するメマンチン治療. *医事新報* 4537: 62-63, 2011 査読無

[学会発表] (計 10 件)

- ① Nishimura M, Liu L, Fujino K. p24 $\alpha$ 2 interacts with  $\gamma$ -secretase complex at presynaptic terminals. Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen, July 12-17, 2014
- ② Nishimura M, Liu L. Expression of p24 $\alpha$ 2 in mammalian brain. Experimental Biology 2014, San Diego, April 26-30, 2014
- ③ 劉 磊、長谷川浩史、遠山育夫、村山繁雄、西村正樹. ILEI はアルツハイマー病モデルマウスのアミロイド沈着と記憶障害を軽減させる. 第 33 回日本認知症学会、横浜、Nov 29-Dec 1, 2014
- ④ 劉 磊、長谷川浩史、遠山育夫、村山繁雄、西村正樹. ILEI は APP-C99 を不安定化することによりアミロイド $\beta$ 産生を減少させる. 第 37 回日本神経科学会、横浜、Sep 11-13, 2014
- ⑤ Nishimura M. Modulation of A $\beta$ 42 production. 11th World Congress of

Biological Psychiatry. Kyoto, June 23-27, 2013.

- ⑥ Nishimura M, Nakamura S, Kimura N, Liu L, Suzuki T, Tooyama I. Age-related modulation of  $\gamma$ -secretase activity in monkey brains. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, July 15-19, 2012
- ⑦ Matsushima T, Saito Y, Nishimura M, Kimura N, Hata S, Suzuki T. Membrane microdomain localization of APP C-terminal fragments regulated by phosphorylation at cytoplasmic Thr668 residue. Alzheimer's Association International Conference 2012, Vancouver, July 15-19, 2012
- ⑧ 西村正樹、劉 磊、中村紳一郎、木村展之、鈴木利治、遠山育夫. 加齢に伴うカニクイザル脳 $\gamma$ セクレターゼ活性の修飾: A $\beta$ 42 産生比の増加. 第 31 回日本認知症学会、つくば、Oct 26-28, 2012
- ⑨ Nishimura M, Liu L, Hasegawa H. Interaction of p24 $\alpha$ 2 with  $\gamma$ -secretase complex attenuates  $\gamma$ -cleavage of APP. Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris, July 16-21, 2011
- ⑩ Matsuo A, Bellier JP, Nishimura M, Yasuhara O, Saito N, Kimura H. Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter. The 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, July 14-18, 2011

[図書] (計 2 件)

- ① 西村正樹. タンパク質発現解析—免疫組織化学法に法補的な手法—. 「**組織細胞化学 2014**」日本組織細胞化学会、印刷中、2014
- ② 西村正樹. Nicastrin. 「**日本臨床増刊号 認知症学 (上) —その解明と治療の最新知見—**」日本臨床社、p115-118, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 「アミロイド $\beta$ タンパク質が異常に蓄積する疾患の治療及び/又は予防用の医薬組成物」

発明者: 西村正樹

権利者: 滋賀医科大学

種類:

番号: PCT/JP2013/83435

出願年月日：12, 13, 2013  
国内外の別：国際

名称：「アミロイドβタンパク質が異常に蓄積する疾患の治療及び／又は予防用の医薬組成物」

発明者：西村正樹

権利者：滋賀医科大学

種類：

番号：特願 2012-277068

出願年月日：12, 19, 2012

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ：

[http://ben.shiga-med.ac.jp/~hqmnran/index\\_1.html](http://ben.shiga-med.ac.jp/~hqmnran/index_1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 正樹 (NISHIMURA, Masaki)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター

一・准教授

研究者番号：40322739

### (2) 研究分担者

松尾 明典 (MATSUO, Akinori)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター

一・助教

研究者番号：20324585