

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：84503

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03457

研究課題名(和文)異常凝集体に対する体外診断法開発によるアルツハイマー病の早期診断と病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of Alzheimer's disease by the development of diagnostic methods for abnormal aggregates

研究代表者

星 美奈子 (HOSHI, Minako)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(副センター長・部長クラス)

研究者番号：30374010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、申請者が独自に獲得してきた知見と技術に立脚し、患者脳から見出した異常凝集体ASPDの立体構造を理解し、それに基づくASPD選択的な新たなPETプローブを開発すること、さらに抗ASPD抗体を組み合わせASPD選択的な血液・脳脊髄液に対する診断方法を確立することを目指した。抗ASPD抗体とASPD相互作用の構造基盤の一部を解明し、ASPD結合4残基ペプチド由来で血中安定性が高いPETプローブ候補を見出した、さらに、ASPD選択的高感度CLEIAを用いたヒト髄液と血漿測定法を確立し、一部でASPD陽性検体を検出した。上記のとおり概ね予定通りに順調に研究を進めることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、患者脳に実際に存在するA β 凝集体を脳で検出するためのPETプローブとなり得る候補を得て、さらに、体外診断法のプロトタイプも構築し、実際に一部の検体で検出に成功出来た。これによって、今まで殆ど不明である、神経毒性のあるA β 凝集体が脳のどこで最初に形成され、それがどう伝搬するのか、さらに、臨床的病態の進行とどう関連するのかをヒトで検証していくことが将来的に可能になると考えられ、アルツハイマー病の発症の正しい理解に繋がると期待される。これによって、より安全で有効な治療法開発も促進すると考えられる。

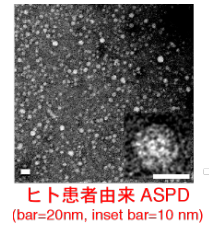
研究成果の概要(英文)：Based on the knowledge and technology that the applicants have independently acquired, this research aimed to understand the three-dimensional structure of ASPD, a highly toxic assembly derived from Alzheimer's disease patient brains, and to develop a new ASPD-selective PET probe based on this understanding. Furthermore, we aimed to establish an ASPD-selective diagnostic method for blood or cerebrospinal fluid by combining anti-ASPD antibodies. We elucidated part of the structural basis of the interaction between anti-ASPD antibodies and ASPD, and found a PET probe candidate derived from an ASPD-binding 4-residue peptide with high blood stability. CSF and plasma assays were established, and some ASPD-positive specimens were detected. As mentioned above, the research progressed smoothly as planned.

研究分野：病態医科学

キーワード：ナトリウムポンプ 神経変性疾患 神経細胞死 アルツハイマー病 コンパニオン診断薬

1. 研究開始当初の背景

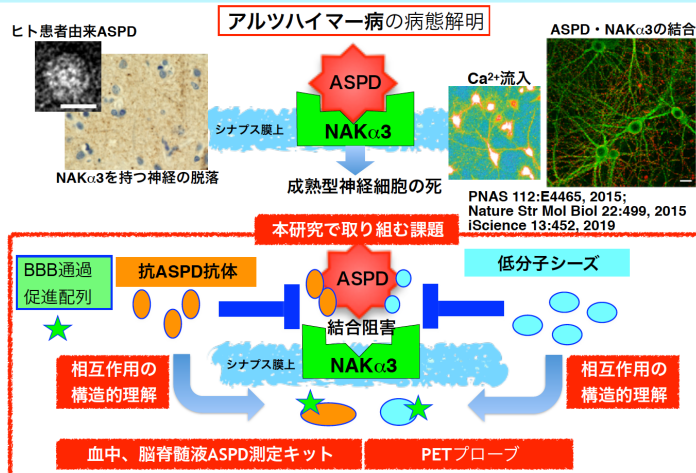
「アルツハイマー病(AD)のトリガーが患者脳内で形成されるアミロイドβ(Aβ)に由来する凝集体である」ということは治療薬開発が失敗に終わった当時でも引き続き支持されていた。しかし、2量体から数百量体に渡る様々な分子サイズの凝集体の中で、これまで治療対象とされてきたAβ凝集体は、シナプス結合は阻害するが神経細胞死を起こす毒性は持たないタイプのものであった(Shankar, Nat Med 2008)。さらに、我々が患者脳から見出し単離に成功したAβ凝集体「アミロスフェロイド(ASPD)」(右図:PNAS 100: 6370, 2003; CI=358; JBC 284: 32895, 2009; CI=106; PNAS 112: E4465, 2015; CI=43)以外は、実際に患者脳から単離され神経毒性が証明されたものはなかった。ASPDは、Aβが約30個集合することで特異的な立体構造を形成しており、これまで創薬開発に用いられてきた抗Aβ抗体やAβに対するPETプローブでは、ASPD毒性の阻害も出来ず、その検出も出来ない(JBC 284: 32895, 2009; CI=106)。そこで、本研究では、ASPDの立体構造を理解し、その理解に基づいてASPD選択的なPETプローブを開発すること、さらに抗ASPD抗体を組み合わせASPDに選択的な血液・脳脊髄液に対する診断方法を確立することで、神経細胞死活性を持つAβ異常凝集体がAD発症過程のいつ形成されるのか、発症あるいは進行と本当に相関するのかどうかという、今後の基礎応用両面に関わる問いに答えるための技術的基盤を整えることを目指した。



2. 研究の目的

本研究では、申請者らが独自に獲得してきた知見と技術である、①抗ASPDヒト化抗体の樹立、②ASPD結合4残基ペプチドの発見、③ASPD選択的高感度CLEIA測定法の確立、④血液脳関門(BBB)通過促進配列の発見、などに立脚し(1)ADの病因物質に対するPETプローブ開発と(2)高感度CLEIA法による体外診断法の開発を行った(図1参照)。これにより、Aβ異常凝集体が本当にAD発症と関わるかどうか、いつどこで形成されるのか、という今後の基礎応用両面に関わる問いにヒトで答えることが出来る基盤を作ることが目的である。

図1：構造理解に基づく早期診断システムの開発



早期診断薬開発は発症初期過程解明と治療薬開発促進に繋がる

図1:本研究の概要

構造生物学・生化学・臨床の異分野融合研究を実施。アルツハイマー病の病態解明と独自に構築した技術的基盤に基づき、(1) ASPD に対する PET プローブ開発と(2) 血漿・脳脊髄液に最適化した高感度 ASPD 測定キットを開発し、早期診断システムに繋げる。NAKα3;神経特異的に発現するナトリウムポンプ Na, K-ATPase のα3 イソフォーム。

3. 研究の方法

ASPDの発見者としてこれまで研究を主導してきた星の統括の下に、ASPD結合4残基ペプチドの開発を星と共に進めてきた笹原智也研究員、構造研究の第一人者である豊島近教授(東京大学)、遺伝子治療の第一人者でありサルなどを用いた解析に造詣が深い村松慎一教授(自治医科大学)によるチームを構築し、倫理面に配慮し以下を推進した。

1: ASPDと抗体あるいはASPD結合4残基ペプチドの相互作用の構造生物学的な理解

ASPDと抗体あるいはペプチドの相互作用について、クライオ電子顕微鏡法などにより、どのアミノ酸残基が選択的相互作用に関与するかを理解し、PETプローブの性能向上にその情報を用いる。(豊島、星が担当)

2: ASPD結合4残基ペプチド-BBB通過促進配列キメラ分子のPETプローブへの展開

(2-1) 基本となる4残基ペプチド(PNAS 112: E4465, 2015; CI=43)の各アミノ酸残基を他の19種アミノ酸に各々変更したライブラリーを構築した。その中から、上記の構造的情報とASPDに対する結合能を指標に最適なアミノ酸配列を選ぶ。最適化したペプチドにBBB通過促進配列を付加したキメラ分子を化学合成し、ASPD結合能に影響を与えないことを確認する。次に、蛍光を付加し、キメラ分子が細胞膜を透過し、細胞内ASPDを検出出来るかどうかを解析する。(笹原、星が担当)

(2-2)肝ミクロソームを使った安定性試験を実施し、次に動物個体を使った血中安定性試験と脳内移行性の検証を行う。これについては外部に委託する予定である。この結果を踏まえて、次にASPDを蓄積するマウスモデルでの検証を進める。最近、4ヶ月齢より大脳皮質の深層などにASPDを蓄積し、その近傍に顕著な神経細胞脱落が認められる5xFADマウス個体を見出した(星ら、未発表データ)。このASPDモデルマウスを用いて、放射能ラベルした最適化4残基ペプチド-BBB通過促進配列キメラ分子の体内動態、脳への移行、半減期等を解析する。また、脳画像を解析し、PETプローブとしての可能性を検討する。PETプローブ製造企業とも連携し放射能ラベルを適切に入れる設計などは委託する予定である。(星、村松、一部企業に委託)

(2-3) 次に、ASPDを蓄積する老齢サル(筑波霊長類センターなど)に投与し、マウスと同様にPETプローブとしての妥当性を検討する。実験終了後に剖検脳を抗ASPD抗体で染色し、PETで得られた量及び分布と比較することで、プローブとしての信頼性について評価する。上記の結果に基づき、ペプチド配列を用いた上記プロトタイプを低分子化合物に展開するなど開発企業での産業化を検討していく。(星、村松、一部企業に委託)

3: ASPD選択的高感度CLEIAを用いたASPDの体外診断法の開発

(3-1)過去の研究により、0.3 pMから定量的にASPDを検出出来る極めて高感度なCLEIAシステムの構築に成功した(*iScience* 13: 452-477, 2019)。この系はS/N比が高く、AD患者剖検脳に蓄積するASPD量を定量出来ることが解っており、死後脳の診断には既に活用できる。上述のとおり血液、脳脊髄液にASPDが存在する可能性があるため、次の課題は脳脊髄液、あるいは血液中のASPD量の測定である。上記CLEIAシステムは充分高感度化されているので、血漿成分によるCLEIA反応への阻害効果の有無、Fab-HRPによるバックグラウンドの低減、血液用希釈液や使用バッファーの最適化などを検討し、脳脊髄液や血液に最適化したプロトコルを確立する。また治療効果の判定には血中の抗ASPD抗体価の測定が必要であり、測定系を構築する。(星が担当、一部企業委託)

(3-2)次の課題は脳脊髄液、あるいは血液中のASPD量の実際の測定であり、AD患者の血液、脳脊髄液を用いて、ASPD量と重症度の相関を解析する。患者由来検体については新潟大学と鳥取大学より一部既に供与されているが、新たに東北大学、欧州では検体の質と量で定評があるUniversity of Göteborgから検体の供与を受ける。

4. 研究成果

上記それぞれの課題について、以下の成果を得た。

1: ASPDと抗体あるいはASPD結合4残基ペプチドの相互作用の構造生物学的な理解

抗体のCDR部分についてX線結晶構造解析を実施し解析を行った。その結果、抗ASPD抗体の強い相互作用についての構造基盤の一部を理解するに至った。(豊島、星が担当)

2: ASPD結合4残基ペプチド-BBB通過促進配列キメラ分子のPETプローブへの展開

(2-1) 基本となる4残基ペプチド(PNAS 112: E4465, 2015; CI=43)の各アミノ酸残基を他の19種アミノ酸に各々変更したライブラリーを構築した。その中から、上記の構造的情報とASPDに対する結合能を指標に最適なアミノ酸配列を選んだ。最適化したペプチドにBBB通過促進配列を付加したキメラ分子を化学合成し、ASPD結合能に影響を与えないことをELISAにより確認した。また、4残基ペプチドを構造展開することで、より代謝安定性が高い物質を得ることが出来た。(笹原、星が担当)

(2-2)上記について、肝ミクロソームを使った安定性試験を実施し、次に動物個体を使った血中安定性

試験と脳内移行性の検証を行った。予想されたことだが、やはり4残基ペプチドそのものは血中安定性が悪いことがわかった。そこで、新たに得られた4残基ペプチド由来物質について安定性試験を行ったところ、こちらは安定性が高いことがわかった。この結果を踏まえて、次にASPDを蓄積するマウスモデルでの検証を進めた。最近、4ヶ月齢より大脳皮質の深層などにASPDを蓄積し、その近傍に顕著な神経細胞脱落が認められる5xFADマウス個体を見出した(星ら、未発表データ)。このASPDモデルマウスを用いて、まず脳実質内に投与し、実際に病態に影響を与えるかどうかの検証を進めた。有望な手応えを得たため、今、再現性の試験を実施している。(星、村松、一部企業に委託)

(2-3) PETプローブのプロトタイプとなる上記物質について、安全性の検証を進め、安全性は問題ないことを確認した。プローブとしての信頼性については、脳透過型に変える必要があり、現在、開発企業との協議を進めているところである。(星、村松、一部企業に委託)

3: ASPD選択的高感度CLEIAを用いたASPDの体外診断法の開発

(3-1) 確立した系を用いて、ヒト由来脳脊髄液及び血漿を用いて測定するために、血漿成分によるCLEIA反応への阻害効果の有無、Fab-HRPによるバックグラウンドの低減、血液用希釈液や使用バッファの最適化などを検討し、脳脊髄液や血液に最適化したプロトコルを確立した。(星が担当、一部企業委託)

(3-2) 上記の系を用いて各種患者由来検体を用いた測定を行い、一部の検体において ASPD 陽性となることを見出した。ヒト検体由来のノイズが問題となると考え、現在、その点をカバーできる企業との共同研究を開始したところである。

上記のとおり、順調に研究を進め、目的通りの成果を得た。

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 5件）

1. 著者名 Sasahara, T., and Hoshi, M.	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 High-throughput screening for agonists of ROS production in live human vascular endothelial cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 10153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.101053.	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 Sasahara, T., Satomura, K., Tada, M., Kakita, A., and Hoshi, M.	4. 巻 24(9)
2. 論文標題 Alzheimer's A assembly binds sodium pump and blocks endothelial NOS activity via ROS-PKC pathway in brain vascular endothelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102936.	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 Xiao, Y., Matsuda, I., Inoue, M., Sasahara, T., Hoshi, M., and *Ishii, Y.	4. 巻 295
2. 論文標題 NMR-based site-resolved profiling of β -amyloid misfolding reveals structural transitions from pathologically relevant spherical oligomer to fibril.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 458-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.008522	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 *Murata, K., Kinoshita, T., Ishikawa, T., Kuroda, K., Hoshi, M., and *Fukazawa, Y.	4. 巻 528
2. 論文標題 Region- and neuronal- subtype-specific expression of Na, K-ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Comp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 2654-2678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24924	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 Iwaya, N., Goda, N., Matsuzaki, M., Narita, A., Shigenitsu, Y., Tenno, T., Abe, Y., Hoshi, M., and Hiroaki, H.	4. 巻 690
2. 論文標題 Principal Component Analysis of Data from NMR Titration Experiment of Uniformly 15N Labelled Amyloid beta 1-42 Peptide with Osmolytes and Phenolic Compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch. Biochem. Biophys.	6. 最初と最後の頁 108446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108446	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 Hoshi, M.,	4. 巻 178
2. 論文標題 Multi-angle development of therapeutic methods for Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br. J. Pharmacol. (Cover)	6. 最初と最後の頁 770-783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15174.	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笹原 智也、星美奈子
2. 発表標題 アルツハイマー病アミロイド凝集体“アミロスフェロイド”による血管内皮細胞障害はアンジオテンシンIIの遊離を介して神経細胞のBACE発現量を増加する
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 星美奈子
2. 発表標題 アルツハイマー病とナトリウムポンプ、タンパク質間相互作用を標的とする低分子医薬品の開発
3. 学会等名 第29回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会(神戸)(2020年3月1日)(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹原 智也、里村香織、他田真理、柿田明美、星美奈子
2. 発表標題 アルツハイマー病患者脳由来アミロイド アセンブリー「アミロスフェロイド」はヒト由来脳微小血管内皮のNa ⁺ , K ⁺ -ATPase 3を介してeNOSを不活性化する(Highly neurotoxic amyloid- assemblies from Alzheimer's disease brain, amylospheroids, inhibit endothelial NAK 3 activity, resulting in the inhibition of eNOS activity in human brain microvascular endothelial cells)
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会(神奈川)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹原智也、星美奈子
2. 発表標題 Establishment of a new tri-culture system for elucidating crosstalk mechanisms between central nervous system and brain microvascular endothelial system in Alzheimer 's disease brains
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 細胞分泌型ASPD様構造体それを用いるワクチン	発明者 星、荒井	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7161401	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>アルツハイマー病の脳血管障害を起こす分子メカニズム解明に初めて成功！ https://www.facebook.com/kobeiryosangyotoshi/posts/pfbid0pwf3SfWBFXMEprLLmPUHMFtyQq8AeBPUoQnS9uESYqxrHT1DQsuZbTBsbZrZPs2aI 星博士の #アルツハイマー病 に関する研究が英国薬理学会誌の表紙を飾りました！ https://www.facebook.com/kobeiryosangyotoshi/posts/pfbid07akJkhfnxhYn8c8btGgCoVYCRKL8wsfvPJwW6pxWErZD1HGfvTAQ7d6b4LjWTKjzI https://www.fbri-kobe.org/laboratory/research3/</p>

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	村松 慎一 (MURAMATSU Shin-ichi) (10239543)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	笹原 智也 (SASAHARA Tomoya) (30735345)	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(上席・主任研究員クラス) (84503)	
研究分担者	豊島 近 (TOYOSHIMA Chikashi) (70172210)	東京大学・定量生命科学研究所・特任教授 (12601)	
研究分担者	久保 厚子 (KUBO Atsuko) (70647792)	公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員(研究員・PDクラス) (84503)	モデル解析 削除：2020年11月18日

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