

アミロイドβの毒性配座理論を基盤とした
アルツハイマー病の新しい予防戦略

Novel Preventive Strategy for Alzheimer's Disease
Based on the "Toxic Conformation Theory" of Amyloid β

課題番号：26221202

入江 一浩 (IRIE Kazuhiro)

京都大学・大学院農学研究科・教授



研究の概要

アルツハイマー病 (AD) の原因物質の一つである42残基のアミロイドβタンパク質 (Aβ42) は、オリゴマーを形成することにより、神経細胞毒性を示す。本代表者らが明らかにしたAβ42の毒性コンホマーに特徴的なターン構造 (毒性ターン) を、特異的に認識する抗体を作成し、AD患者の脳脊髄液を分析したところ、毒性ターンを含むAβが有意に高いことが判明した。

研究分野：農芸化学・生物有機化学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイドβオリゴマー、抗体、機能性食品成分

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の病理学的特徴として、老人斑が知られている。老人斑の構成成分である42及び40残基のアミロイドβ (Aβ42, Aβ40) は、凝集 (オリゴマー化: 2~24量体) することによって神経細胞毒性を示す。これまで、凝集性の高いAβ42を標的とした臨床試験が行われてきているが、良い結果が得られていない。本事実、これらの臨床試験が、神経細胞死が進行した中期及び末期のAD患者に対して行われたためと考えられる。これより、ADの正確な早期診断と生活習慣の改善等による予防が強く望まれている。

ADを早期診断する上で重要な点は、Aβ42の立体構造の多様性である。本研究代表者らは、Aβ42凝集体においてGlu22、Asp23残基でのターン構造を特徴とした毒性コンホマーの存在を明らかにし、これがオリゴマー化して神経細胞毒性を示すという、独自の「毒性配座理論」を提唱した (図1)。

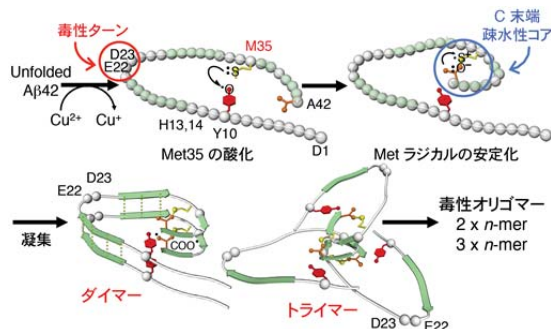


図1 毒性オリゴマーの推定構造と形成機構

2. 研究の目的

本研究は、Aβ42の毒性配座理論に基づいた新しいAD診断・予防法を確立することを目的としている。「毒性オリゴマー」の形成には、2、3量体を最小基本単位とした2種類の経路が考えられることから、それぞれを特異的に認識する薬剤がADの迅速診断には不可欠である。本研究代表者らは既に、毒性ターン構造をハプテンとして、3量体を認識する11A1抗体ならびに24B3抗体の開発に成功している。本研究ではまず、Aβの2量体を模したモデルペプチドを合成し、これをハプテンとして2量体を特異的に認識する抗体ならびに核酸アプタマーを開発する (1、2年目)。次に、24B3あるいはこれらの抗2量体抗体と、AβのN末抗体を用いてサンドイッチELISAを構築し、AD患者の脳脊髄液を用いた新規AD診断法を確立する (3~5年目)。

一方、ワクチン療法は、最も有望視されているAD治療法の一つであり、進行中の臨床試験のほぼ半分を占めている。方法論として期待されているにもかかわらず、成功に至っていない原因の一つとして、抗体評価のための動物実験で、ヒト型Aβ42を過剰産生させたトランスジェニックマウスを使用している点が挙げられる。本研究では、Aβ42の毒性配座を形成しやすいヒト型E22P-Aβ42のノックインマウスを作出し (1、2年目)、この新規ADモデルマウスを用いて、抗体によるワクチン予防及び食品中の機能性成分によるAD予防効果を検証する (3~5年目)。

3. 研究の方法

- 1) A β の 2 量体の各種モデルペプチドを合成した。これらの中で神経細胞毒性を示したモデルの立体構造特異抗体を作成した。
- 2) A β の抗毒性オリゴマー特異抗体・24B3 と N 末端抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA を構築し、ヒト脳脊髄液を解析した。
- 3) 毒性ターン構造を模したヒト型 E22P-A β 42 配列を含む A β 前駆タンパク質ノックインベクターを設計し、新規 AD ノックインマウスの作出を進めた。
- 4) 各種天然ポリフェノール類の A β 42 凝集抑制メカニズムを、核磁気共鳴法 (NMR) と質量分析 (MS) により解析した。

4. これまでの成果

- 1) A β の 2 量体モデルの合成と活性評価
毒性配座理論に基づいて、A β 42 及び A β 40 の各種 2 量体のモデルペプチドを合成したところ、特に C 末端で架橋した 2 量体が高い毒性を示し、12 ~ 24 量体の準安定なオリゴマーを形成することがイオンモビリティ質量分析法 (IM-MS) で明らかになった (論文 1)。そこで、C 末端で架橋した A β 42 の 2 量体モデルを大量合成し、これをハプテンとして、A β 42 の 2 量体の C 末端構造を特異的に認識するラット抗体の作製に成功した。
- 2) 抗毒性オリゴマー特異抗体を用いた ELISA による脳脊髄液診断
新たに開発した抗毒性ターン特異抗体・24B3 の毒性コンホマーに対する認識能が、11A1 より約 10 倍優れていること、一方で毒性コンホマーをあまり形成しない野生型 A β 42 にはほとんど反応しないことが明らかになった。また 24B3 は、A β 42 の神経細胞毒性を、数種の市販抗体よりも強く抑制した。そこで、24B3 と市販の A β N 末抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA を構築し、脳脊髄液を解析した。その結果、AD 患者において、毒性コンホマーをもつ A β 量の全 A β 42 量に対する割合が、AD でない人と比べて有意に高いことを明らかにした (図 2: 論文 2, 4)。
- 3) 毒性配座理論に基づいた新規ノックイン型 AD マウスの作出

E22P-A β 42 配列をノックインしたキメラマウスが複数匹誕生し、更なる交配によって数匹のヘテロノックインマウスを得た。

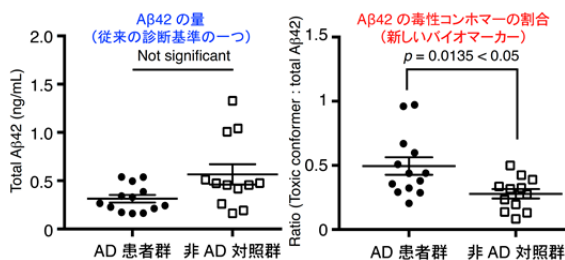


図 2 24B3 抗体(右)によるヒト脳脊髄液の解析

- 4) 新規 AD モデルマウスを用いた機能性食品成分による予防効果の検証

本実験の準備として、各種天然ポリフェノール類の A β 42 凝集抑制メカニズムを、NMR 及び MS により明らかにした (論文 3, 5)。メカニズムの異なる複数のポリフェノール類について、マウスを用いて脳への移行性を検討し、移行性の高い化合物の特徴を解明した。

5. 今後の計画

- 1) 24B3 抗体を超える次世代抗体と高感度なデジタル ELISA システムを用いた新規 AD 診断法を確立する。さらに、脳脊髄液に比べて侵襲性の低い血液において毒性オリゴマーの検出を試みる。
- 2) A β 42 の毒性オリゴマーに対する核酸アプタマーを抗体と同様の手法で開発し、ELISA 様の診断応用を試みる。
- 3) 既に得られているキメラマウスの更なる交配によって、ヒト型 E22P-A β 42 配列を含む A β 前駆タンパク質ノックインマウス (ヘテロとホモ) を作出し、6 ~ 12 か月齢の時点で AD 病態解析を行う。
- 4) この新規ノックインマウスを用いて、機能性食品成分による AD 予防効果を検証する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- 1) Irie, Y., Murakami, K., (他 8 名, 3-10 番目), *Irie, K.: Synthetic models of quasi-stable amyloid β 40 oligomers with significant neurotoxicity. *ACS Chem. Neurosci.*, in press.
- 2) *入江一浩: アルツハイマー病の正確な早期診断の実現に向けて. *化学*, **71**, 41-44 (2016).
- 3) Yoshioka, T., Murakami, K., (他 6 名, 3-8 番目), *Irie, K.: Semisynthesis and structure-activity studies of uncarinic acid C isolated from *Uncaria rhynchophylla* as a specific inhibitor of the nucleation phase in amyloid β 42 aggregation. *J. Nat. Prod.*, **79**, 2521-2529 (2016).
- 4) Murakami, K., (他 9 名, 2-10 番目), Tokuda, T., Maeda, M., Kume, T., Shimizu, T., *Irie, K.: Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. *Sci. Rep.*, **6**, 29038 (2016).
- 5) Hanaki, M., Murakami, K., Akagi, K., *Irie, K.: Structural insights into mechanisms for inhibiting amyloid β 42 aggregation by non-catechol-type flavonoids. *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 304-313 (2016).

- 6) 平成 28 年度科研費 審査委員表彰
ホームページ等

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>