

アルツハイマー病研究部

(1) 構成員

部長 道川 誠

室長

病因遺伝子研究室 鄭且均

発症機序解析研究室 内村健治

流動研究員

巖 景玉、山内玲奈

外来研究員(リサーチレジデント)

細野 崇、細野友美、西辻和親

研究補助員・事務補助員

日高潤子、高之瀬邦子、荒田えり

(2) 平成 22 年度研究活動の概要

部長研究グループは、ABCA1 のプロモーター活性を指標としたスクリーニング系を立ち上げ、10,000 種類の化合物ライブラリーならびに 118 種の天然化合物を用いてスクリーニングした。一次、二次スクリーニングによって ABCA1 蛋白発現を増加させたものを 3 種類を同定した。また、アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルの脳内 A β 沈着減少と認知障害発症予防が認められた(前臨床試験終了)。その分子機構として、脂肪酸摂取によって脳内膜脂質組成の変化が起き、その結果 A β 産生が低下して脳内 A β 沈着が抑制されたと考えられた。更に、脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A β 結合分子(リパーゼ)を発見した。この酵素は A β と結合し、その取り込みを促進させることで、脳内 A β の除去・分解に貢献していると考えられた。AD 治療薬開発のために、この酵素の発現・活性上昇薬の探索を開始した。本研究に関連して特許出願 1 件を行った。ApoE と

部長研究グループ：道川 誠、細野 崇、西辻和親、山内玲奈
脳内脂質代謝調節によるアルツハイマー病の予防・治療法開発

血液脳関門に関する研究では、ApoE4 ノックインマウスでは ApoE3 ノックインマウスに比べて BBB のバリアー機能が低下していた。ApoE4 発現アストロサイトを用いた系は ApoE3 発現アストロサイトを用いた系に比べて BBB のバリアー機能が低下しており、tight junction 形成に関与する分子のリン酸化の程度に違いがあった。これらの違いは、アストロサイトから分泌される ApoE-HDL に起因すると考えられた。

発症機序解析研究室では、ATBF1 分子上の APP 結合ドメインを決定するため 3 種類の ATBF1 ドメインの強制発現ベクター (① aa 1-892、② aa 893-3288、③ aa 3289-3703) を作成し、HEK293T 細胞に APP と共に過剰発現させると、893-3288 ドメインを持つ ATBF1 (ATF1 893-3288) のみが A β 40 および A β 42 の産生を促進した。その理由は、ATBF1 893-3288 が APP と結合し、APP を安定化させるためと考えられた。また、導入された ATBF1 893-3288 は核に局在するが、APP を過剰発現させると ATBF1 893-3288 は核に行かずに細胞質に留まっていることが分かった。しかし、1-892 と 3289-3703 ドメインを持つ ATBF1 は A β 40 および A β 42 の産生には影響しなかった。

発症機序解析研究室では、AD 病理を減弱または回復させる遺伝子を脳移行性細胞に発現させ、脳内搬送体として利用するシステム確立を目指した研究を行った。

研究目的

超高齢社会に突入した我が国では、高齢で発症率が増加する代表的な認知症疾患であるアルツハイマー病の予防・治療法開発が急務となっている。本研究は、アルツハイマー病発症機構を説明する仮説である「アミロイドカスケード」における複数の標的を攻略することで、真に有効なアルツハイマー病の予防・治療薬を開発することを目的とする。この目的達成のために、分担研究課題として、(1) HDL の産生増加を促進する薬剤探索を通じた治療薬開発、(2) 脂肪酸の経口摂取による A β 沈着、認知機能障害予防の検討を通じた予防法確立、(3) 新たに発見した A β 結合蛋白の機能解析 (A β 分解除去機能) を行い、治療標的として確立すること、(4) ApoE-HDL が、血液脳関門(BBB)形成に重要な役割を果たすこと、その作用に ApoE アイソフォーム依存性があるかどうかの検討を行った。

結果と考察

1) ABCA1 のプロモーター活性を指標としたスクリーニング系を立ち上げ、10,000 種類の化合物ライブラリーならびに 118 種の天然化合物を用いてスクリーニングした。一次、二次スクリーニングによって ABCA1 蛋白発現を増加させたものを3種類を同定した。今後、これらの候補化合物の構造機能解析を行い、リード化合物を決定する。またモデル動物への投与によるアルツハイマー病病理への作用や認

知機能障害の改善効果を検証し、臨床試験へ向けたデータの集積を行う。2) アラキドン酸含有食餌の経口摂取によって、マウスモデルの脳内 A β 沈着減少と認知障害発症予防が認められた(前臨床試験終了)。その分子機構として、脂肪酸摂取によって脳内膜脂質組成の変化が起き、その結果 A β 産生が低下して脳内 A β 沈着が抑制されると考えられた。今後は、臨床応用に向け、長期縦断疫研究との共同研究を行い、ヒトにおける認知症予防効果を検証する。3) 脳内脂質代謝に焦点を当てた研究から、新規 A β 結合分子(リーパーゼ)を発見した。この酵素は A β と結合し、その取り込みを促進させることで、脳内 A β の除去・分解に貢献していると考えられた。AD 治療薬開発のために、この酵素の発現・活性上昇薬の探索を開始した。本研究に関連して特許出願 1 件を行った。

4) ApoE4 ノックインマウスでは ApoE3 ノックインマウスに比べて BBB のバリアー機能が低下していた。(ii) ApoE4 発現アストロサイトを用いた系は ApoE3 発現アストロサイトを用いた系に比べて BBB のバリアー機能が低下しており、tight junction 形成に関与する分子のリン酸化の程度に違いがあった。これらの違いは、アストロサイトから分泌される ApoE-HDL に起因すると考えられた。

上記研究は、当該施設の実験動物倫理委員会および倫理委員会の承認を受けて行われた。

病因遺伝子研究室： 鄭 且均、嚴 景玉

APP 代謝及び A β 産生機構におけるホメオティック因子 ATBF1 の機能解析および脳内コレステロール代謝を司る ABCA1 遺伝子発現を増加させる分子の同定

プロジェクト 1) APP 代謝及び A β 産生機構におけるホメオティック因子 ATBF1 の機能解析：アルツハイマー病 (AD) 病態を促進させる鍵分子であるアミロイド β 蛋白 (A β) はアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から 2 つのプロテアーゼ (β 及び γ セクレターゼ) で順次切断されることにより産生され、細胞外に蓄積し、引き続き、神経原繊維変化を引き起こすことで神経細胞死や認知機能障害が起こると考えられている。従って、神経細胞内で APP の代謝機構を明らかにすることは AD の発症原因解明に重要である。前年度は APP 代謝および A β 産生における ATBF1 の機能解析のため実験を行った結果、細胞株に ATBF1 と APP を過剰発現させると ATBF1 が APP と結合し、APP を安定化させることにより A β 40 および A β 42 の産生が促進されることが分かった。本年度は ATBF1 分子上の APP 結合ドメインを決定するため 3 種類の ATBF1 ドメインの強制発現ベクター (① aa 1-892、② aa 893-3288、③ aa 3289-3703) を作成し、HEK293T 細胞に APP と共に過剰発現させると、893-3288 ドメインを持つ ATBF1 (ATF1 893-3288) のみが A β 40 および A β 42 の産生を促進した。その理由は、ATBF1 893-3288 が APP と結合し、APP を安定化させるためと考えられた。また、導入された ATBF1 893-3288 は

核に局在するが、APP を過剰発現させると ATBF1 893-3288 は核に行かずに細胞質に留まっていることが分かった。しかし、1-892 と 3289-3703 ドメインを持つ ATBF1 は A β 40 および A β 42 の産生には影響しなかった。今後、より詳しい ATBF1 分子上の APP 結合ドメインを決定する必要があると考えられる。AD 脳の神経細胞の細胞質で ATBF1 と APP は共局在していることから、ATBF1 と APP は細胞質で結合し、A β 産生や転写活性に相互に影響を与えていると考えられ、ATBF1 は AD 治療法の標的分子になり得ると考えられた。また、ATBF1 発現が AD 脳の細胞質で上昇することで APP が安定化され、A β の産生が促進されていると考えられる。プロジェクト 2) 脳内コレステロール代謝を司る ABCA1 遺伝子発現を増加させる分子の同定：脳内 HDL 産生に ABCA1 が重要な役割を果たしていることから、脳内 ABCA1 発現増加によって A β 沈着を抑制する化合物の同定するため、10,000 種の合成化合物を用いて薬剤スクリーニングを行った結果、5 種の合成化合物が ABCA1 の mRNA および蛋白の発現を増加させることを見いだした。今後、この合成化合物をマウスに経口投与し、脳内の ABCA1 発現を調べる。効果があるものに関しては AD モデルマウスに投与し、脳内の A β 沈着量を調べる。

脳実質内細胞動員のアルツハイマー病治療への応用およびその発症に伴う糖鎖生物機能に関する研究

アルツハイマー病態において骨髄単球由来ミクログリアが血行性に脳内へ動員されアミロイド沈着体の貪食作用に積極的に関わる事がアルツハイマー病モデルマウスの使用により明らかとなっている。我々はこの脳内細胞浸潤分子メカニズムをセレクチン分子に注目し解析を行っている。マウスミクログリア細胞 BV2 が E-セレクチンのリガンド糖鎖であるシアリルルイス X を発現し、また、アルツハイマー病モデルマウス脳血管で E-セレクチンが発現される事を確認した。さらに、生体内ビデオ蛍光顕微鏡法により解析した結果、末梢投与 BV2 細胞の血管内ローリングがアルツハイマー病モデルマウス脳内では顕著に観察された。これらの結果からマウスミクログリア細胞表面のシアリルルイス X 糖鎖と新たに血管内皮細胞で発現される E-セレクチンとの間の分子相互作用により、組織内浸潤の最初のステップである細胞ローリングが起こるのではないかと強く示唆された。脳

移行性細胞にアルツハイマー病理変化を減弱または回復させるような遺伝子を脳内搬送体として利用する細胞医薬の確立を見据えて、私たちはマウスミクログリア細胞に効率良く外来遺伝子を発現させるシステムの構築を行った。レンチウイルスを使った外来遺伝子発現システムを GFP 遺伝子およびフローサイトメーターアッセイにより確立した。アルツハイマー病アミロイド斑沈着部位にはヘパラン硫酸糖鎖多硫酸化ドメインが特異的に発現することを我々はいままでに発見している。この特殊な糖鎖ドメインは A β 重合に関わっている。当該糖鎖ドメインを分解する細胞外スルファターゼは神経毒性の原因と予想される重合 A β の形成を減弱／阻止する可能性が高い。細胞外スルファターゼの遺伝子を BV2 脳移行性細胞に発現させるシステムをレンチウイルスの使用により確立した。脳内 A β 沈着を減少させる細胞医薬の開発基盤につながる成果が得られた。

研究業績（アルツハイマー病研究部）

I. 論文発表

1. 原著

1. 論文発表

Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E. Extracellular and intraneuronal HMW-A β oligomers represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. **Mol. Neurodegener.**, 6: 20, 2011.

Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E. The dissociation of A β from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A β 42 assembly. **J Neurosci Res**, in press, 2011.

Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, and Michikawa M. Lipoprotein lipase is a novel A β -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes. **J. Biol. Chem.**, 286: 6393-6401, 2011.

Akatsu H, Ogawa N, Kanesaka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, Michikawa M. Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease. **J. Neurol. Sci.** 300: 67-73, 2011.

Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung C-G, Komano H, and Michikawa M. Homocysteine, another risk factor for Alzheimer's disease, impairs apolipoprotein E3 function. **J. Biol. Chem.**, 285:38382-38388, 2010.

Kim TS, Kawaguchi M, Suzuki M, Jung CG, Asai K, Shibamoto Y, Lavin MF, Khanna KK, Miura Y. The ZFH3 (ATBF1) transcription factor induces PDGFRB, which activates ATM in the cytoplasm to protect cerebellar neurons from oxidative stress. **Dis Model Mech.**, 3(11-12): 752-62, 2010.

Takamatsu Y, Ishida A, Hamakawa M, Tamakoshi K, Jung CG, Ishida K. Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Res.**, 8(1355); 165-73, 2010.

道川 誠 アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病 Clinical Neuroscience (月刊臨床

神経科学) , 28: 992-995, 2010

道川 誠 アルツハイマー病分子病態とアポリポ蛋白 E 医療の広場、第 50 巻 (10 号):4-5, 2010

道川 誠
アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病
Clinical Neuroscience, 28(9): 992-995, 2010

ゾウケン、道川 誠、駒野宏人（アルツハイマー病研究部）
アンギオテンシン変換酵素の新しい顔：A β 変換酵素
ミニレビュー 生化学 82 巻、1120-1124, 2010

2. 学会発表：

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H, Michikawa M, Jung CG ATBF1 interacts with amyloid precursor protein and enhances amyloid β -protein production. The First International Conference on Neural Cell Culture (ICNCC 2010), June 25, 2010, Seoul, Korea.

Michikawa M. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease
Hallym University, The 12th Ilson International Symposium, Hallym-Nagoya Academic Joint Meeting
June 24, 2010. Anyang, Gyeonggi-do, Korea

Kazuchika N, Hosono T, Nakamura T, and Michikawa M. Effect of apolipoprotein E isoform on formation and maintenance of blood-brain-barrier function. June 7, 2010. Washington University, St. Louis, USA

Zou K, Liu S, Liu J, Tanabe C, Maeda T, Michikawa M, Komano H.
Potent inhibition of ACE leads to Alzheimer-like pathology in APP transgenic mouse brain.
International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 11, 2010, Honolulu, Hawaii

道川 誠
アルツハイマー病
名古屋市立大学大学院医学研究科講義、2010 年 5 月 24 日、名古屋

道川 誠
アルツハイマー病の臨床、分子病態と治療戦略 名古屋市立大学大学院薬学研究科講義、2010 年 5 月 27 日、名古屋

道川 誠
アルツハイマー病とスタチン
脳を護るー認知症を防ぐー興和創薬・名古屋医師会共催シンポジウム

2010 年 6 月 17 日,名古屋

西辻和親、細野 崇、中村俊行、道川 誠
血液脳関門機能に対するアポリポタンパク質Eアイソフォームの影響
Neuro2010, 2010 年 9 月 4 日、神戸

鄭 且均、巖 景玉、三浦 裕、赤津裕康、道川 誠
APP 代謝及び Ab 産生機構におけるホメオティック因子 ATBF1 の機能解析
Neuro2010, 2010 年 9 月 3 日、神戸

ゾウクン、劉 俊俊、劉 しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人
ACE 阻害によるアルツハイマー病モデルマウス脳内変化の解析
Neuro2010, 2010 年 9 月 2 日、神戸

道川 誠
炎症とアルツハイマー病
日本歯周病学会シンポジウム、2010 年 9 月 19 日、高松

道川 誠
Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease
招待講演（客員教授授与講演）、中国瀋陽医学院・何氏視覚科学学院、2010 年 9 月 27 日、瀋陽

道川 誠
アポリポ蛋白 E とアルツハイマー病
教育講演：第 18 回中部老年期認知症研究会
平成 22 年 10 月 30 日、名古屋

巖 景玉、赤津裕康、三浦 裕、道川 誠
、鄭 且均
APP 代謝及び Ab 産生における ATBF1 の機能解析
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

西辻和親、細野 崇、内村健治、道川 誠
リポ蛋白質リパーゼは初代培養アストロサイトによるアミロイド b の取り込みを促進する 日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

細野 崇、山内玲奈、紺谷昌仙、西辻和親、鄭 且均、河島 洋、木曾良信、道川 誠
多価不飽和脂肪酸餌は LPS で誘導される脳内炎症を抑制する
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

ゾウクン、劉俊俊、劉しゅ余、田邊千晶、前田智司、道川 誠、駒野宏人
Enhanced Alzheimer's-like pathology by ACE inhibition in APP transgenic mouse brain
日本認知症学会、平成 22 年 11 月 5 日、名古屋

道川 誠（アルツハイマー病研究部）

脳内脂質代謝は、アルツハイマー病発症に関わりうるか

第8回アルツハイマー病の早期診断・治療・予防法の開発研究会、2011年2月18日、名古屋

道川 誠（アルツハイマー病研究部）

脳内脂質代謝変動とアルツハイマー病分子病態

第5回関西・中部認知症学会、2011年2月19日、ウインクあいち、名古屋

4.その他、セミナー

Uhm KO, Horike H, Miura Y, Akatsu H, Michikawa M, Jung CG.

ATBF1 interacts with amyloid precursor protein and enhances amyloid β protein production.

The First International Conference on Neural Cell Culture (ICNCC 2010), June 25, 2010, Seoul, Korea.

鄭 且均

神経細胞発生と分化

名古屋市立大学医学部講義「生理学総論」、2010年6月14日、名古屋

H. 特許申請

なし

I. 公的研究費

1. 厚生労働省

道川 誠, (代表) 1,400 万円 (総額 3,000 万円)

認知症対策総合研究事業

アルツハイマー病の根本的治療法開発に関する研究

道川 誠 (代表) 1,800 万円 (総額 2,000 万円)

政策創薬総合研究事業

経口脂肪酸摂取によるアルツハイマー病の予防法開発に関する研究

鄭 且均, (分担) 50 万円

認知症対策総合研究事業

血液、尿等、生体への侵襲が少ないバイオマーカーを用いた診断方法に関する研究.

内村 健治, (代表) 420 万円 (総額 420 万円)

認知症対策総合研究事業

細胞を血行性脳実質内動員する機序の解析およびそのアルツハイマー病治療への応用

2. 文部科学省

道川 誠 (代表) 780 万円 (総額 780 万円)

基盤研究(B)

アルツハイマー病発症機構におけるレニン・アンギオテンシン系の役割の検討

鄭 且均, (代表) 130 万円 (総額 130 万円)

基盤研究(C).

ホメオティック因子 ATBF1 のアルツハイマー病脳における発現上昇機序と意義の解明.

内村 健治, (分担) 65 万円

基盤研究(A)

精神免疫内分泌系の統合的制御へストレス特異的サイトカインカスケードの解明

3. 財団、その他、 なし