

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) アルツハイマー病の改善を目的とした、リーリン分解酵素群阻害薬の開発  
(英語) Development of inhibitors against Reelin-cleaving enzymes for the treatment of Alzheimer's disease.

研究開発実施期間：2016年10月13日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 服部光治  
(英語) Mitsuharu Hattori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
(英語) Professor, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

## II 研究開発の概要

### 【研究の背景と目的】

リーリンは巨大な分泌タンパク質であり、その機能低下がアルツハイマー病の発症や増悪化に関与する。我々は、リーリンを分解・不活化する酵素として分泌型メタロプロテアーゼ ADAMTS-3 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 3) を同定した。さらに、そのファミリー分子である ADAMTS-2 もリーリン分解活性をもち、脳にも発現することを見いだした。これら酵素の阻害剤はリーリン機能を増強し、アルツハイマー病等精神神経疾患の画期的新薬になることが期待される。そこで本研究では、以下の2点を目的とした。

- (1) リーリン分解酵素の阻害によるアルツハイマー病改善効果を、動物レベルで明確にする。
- (2) ヒトアルツハイマー病病態におけるリーリンと ADAMTS-2/3 および関連分子の寄与を解明する。

### 【研究の成果】

(1) リーリン分解酵素の阻害によるアルツハイマー病改善効果を、動物レベルで明確にする。  
ADAMTS-3 欠損マウスでリーリン分解が減少していること、および、その下流分子の活性化が上昇していることを確認した。成体特異的 ADAMTS-3 欠損マウス (ADAMTS-3 flox/CreERT2) とアルツハイマー病モデルマウス (APP-NL-F および APP-NL-G-F; 理化学研究所・西道隆臣博士より供与) を交配し、成体特異的 ADAMTS-3 欠損/アルツハイマー病モデルマウスを得た。3ヶ月齢にてタモキシフェン投与を行い、ADAMTS-3 の遺伝子を欠損させた。これを老齢させ、いくつかの時期で、アミロイドβ蓄積あるいは神経細胞死の程度を定量的に解析した。その結果、APP-NL-F マウスの場合、アミロイドβの蓄積が ADAMTS-3 欠損で低下することが判明した。神経細胞死については、12ヶ月齢時点では明確な差はなかった。一方、APP-NL-G-F (凝集しやすい変異型アミロイドβが蓄積する) では ADAMTS-3

の欠損は大きな効果を及ぼさなかった。本結果は、ADAMTS-3 欠損 (すなわちリーリン分解の低下) が、(通常型の) アミロイドβ蓄積を減少させることを示す初めての結果であり、非常に意義ある成果である。

成体でのリーリン分解における ADAMTS-3 の寄与は、最大でも 50%程度であり、その大半は ADAMTS-2 によるものであることが示唆された。そこで、ADAMTS-2 欠損マウスを独自に作製し、これと神経細胞特異的 ADAMTS-3 欠損マウス (ADAMTS-3 flox/Emx1-Cre)、アルツハイマー病モデルマウスを交配することで、ADAMTS-2/3 二重欠損かつアルツハイマー病モデルマウスを作製した。現在、これらのマウスを老齢させており、今後解析を行う。

ADAMTS のようなプロテアーゼの欠損マウスを用いる実験では、何らかの結果が得られたとしても、リーリン以外の基質を介している可能性を排除できない。そこで、リーリンの分解部位に点変異を導入し、分解抵抗型リーリンを発現するマウスを作製した。このマウスでは、リーリンの分解は顕著に減少し、下流シグナルの活性化は上昇していた。このマウスとアルツハイマー病モデルマウスを交配して二重遺伝子改変マウスを作製した。これらを 6ヶ月齢まで老齢させ、アミロイドβの蓄積および神経細胞死の程度を定量的に解析した。その結果、リーリンが分解抵抗型に変わることによって、アミロイドβの蓄積が低下する傾向が観察された。しかし、サンプル数が十分ではないため、統計学的な解析は完遂できなかった。今後、さらに解析を続ける。

(2) ヒトアルツハイマー病病態におけるリーリンと ADAMTS-2/3 および関連分子の寄与を解明する。

アルツハイマー病患者の脳脊髄液や死後脳でリーリン量が減少しているという報告はいくつかあるが、その数やクオリティは十分とは言いがたい。また、日本人を対象とした報告は今までなかった。そこで、豊橋福祉村病院から、病理診断によって確定済みのアルツハイマー病患者、および年齢がほぼ同じ健常者 (非アルツハイマー病者) の死後脳 (固定切片および未固定ブロック) を提供頂き、全長リーリン、リーリン分解産物、細胞内タンパク質 Dab1 (リーリンによる情報伝達経路活性化により分解されるので、その量はリーリンの総活性と逆相関する) の量をウエスタンブロッティングにより定量した。その結果、アルツハイマー病患者死後脳では、Dab1 量が上昇していることを見出した。また、全長リーリンの量は低下傾向、リーリン分解産物は上昇傾向にあった。以上を考えあわせると、アルツハイマー病患者脳では、リーリンの分解が増えた結果、細胞内下流シグナル経路が弱まるとともに、アミロイドβ蓄積が上昇していることが示唆された。

また、リーリンとアミロイドβの局在を、免疫染色により検討した。その結果、アルツハイマー病患者脳 (特に海馬) では、リーリンとアミロイドβが同時に局在する場所はほとんどないことがわかった。むしろ、アミロイドβはリーリンが多い場所を避けて沈着するような像が観察された。このことは、リーリンが直接、アミロイドβの沈着を阻害している可能性を示唆している。

## 【まとめ】

遺伝子改変マウスを用いた結果から、ADAMTS を阻害してリーリンの分解を抑えることが、アルツハイマー病の進行を遅らせることが強く示唆された。また、ヒト死後脳の解析から、リーリン分解の亢進による機能低下が、アルツハイマー病増悪化メカニズムの一つであることが示唆された。現在、田辺三菱製薬において、ADAMTS-2/3 阻害剤の開発が行われており、阻害活性を有する化合物は取得されたが、ADAMTS-2/3 の立体構造が解かれていないためにその構造展開が妨げされている。今後、創薬につなげるためには、動物レベルでのさらなる検証とともに、ADAMTS-2/3 の立体構造解析が必要となる。

## BACKGROUND

Reelin is a large secreted protein that is important for brain development and function. Reelin also has been suggested to ameliorate Alzheimer's disease (AD) but there has been no method to upregulate the Reelin activity. We recently identified a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 3 (ADAMTS-3) as the major protease that cleaves and inactivates Reelin in the embryonic cerebral cortex. We also found that ADAMTS-2 also cleaves and inactivates Reelin. As upregulation of Reelin activity may ameliorate AD, inhibiting ADAMTS-2 and ADAMTS-3 are expected to be beneficial for the treatment AD. In this study, we investigated the effect of Reelin signaling augmentation on the A $\beta$  deposition by crossing the APP knock-in mice with the conditional knock-out mice of ADAMTS-3. We also investigated the Reelin cleavage and its downstream signaling in the postmortem human brain.

## RESULTS

We established adult-specific ADAMTS-3 knockout (KO) mice and crossed them with AD model mice. The decrease of ADAMTS-3 significantly inhibits the A $\beta$  deposition in the APP<sup>NL-F</sup> mice, but not in the APP<sup>NL-G-F</sup> mice. We also established the knock-in mice that express a cleavage-resistant Reelin mutant. By crossing these mice with AD model mice, we found the tendency of decrease of A $\beta$  deposition in the APP<sup>NL-F</sup> mice, although the numbers of the mice were not enough for statistical analyses.

We found that the cleavage of Reelin and the amount of Dab1 were greater in the brain of human AD patients than in control subjects, indicating that Reelin signaling is attenuated in the AD patients. Immunohistochemical analyses indicated that Reelin and the A $\beta$  deposition did not colocalize, suggesting that Reelin directly inhibits the A $\beta$  deposition in the human brain.

Altogether, our results indicated that an inhibitor against ADAMTS-2 and -3 would be a novel drug against AD.