

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 脳科学研究戦略推進プログラム
(英語) Strategic Research Program for Brain Sciences (SRPBS)

研究開発課題名： (日本語) 孤発性アルツハイマー病アミロイド蓄積の原因に即した治療薬と診断用バイオマーカーの開発
(英語) Development of a new disease-modifying therapy and early diagnostic method of Alzheimer's disease based on a cause of amyloid deposition observed in sporadic type.

研究開発担当者 (日本語) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 ゲノム創薬学研究室 教授 岩田修永
所属 役職 氏名： (英語) Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences,
Department of Genome-based Drug Discovery, Professor, Nobuhisa
Iwata

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

孤発性アルツハイマー病では、 $A\beta$ を分解する主要酵素ネプリライシン (NEP) の脳内発現レベルが発症早期から低下するため $A\beta$ 蓄積を招く原因の一つになる。本研究プロジェクトでは、創薬の新規作用点である NEP の機能低下を補完するアルツハイマー病予防・治療薬の開発を進めている。培養細胞を用いた一次スクリーニングでヒットした NEP 増強化合物である脂溶性カテキン誘導体の中から、マウスへの脳内単回注入で NEP の発現増強効果を示す化合物の絞り込みを行い、有効なシード化合物を一つ得ることに成功した。この化合物は歯状回分子層で選択的に NEP の発現を増強する能力がある。今後は、血液脳関門の透過性や全身投与による有効性を確認していくと共に、これをシード化合物としてより物理的に安定で強い増強効果をもつリード化合物の創製を行う。さらに、これらのカテキン誘導体による NEP 発現制御メカニズムを明らかにする目的で、カテキン結合磁気ビーズによる精製と LC/MSMS 法により、神経系培養細胞の抽出液中から二種類のカテキン結合タンパク質を同定した。これらのタンパク質を過

剰発現する細胞をカテキン誘導体で処理すると、mock 細胞に処理をした場合よりもさらに NEP 活性を増強することが明らかになった。次年度は、これらのタンパク質の発現をノックダウンした細胞で、整合性のある結果が得れるかを明らかにする予定である。

さらに、NEP の発現・活性制御を担う新規創薬標的としてソマトスタチン(SST)受容体のサブタイプとリン酸化酵素 DYRK1A を見出した。SST 受容体には 5 つのサブタイプがあるが、そのうち 2 つの受容体を同時にノックアウトしたマウス海馬網状分子層において NEP の発現低下と共に A β 量が増加することを明らかにした。また、初代培養神経細胞にどちらか片方の受容体サブタイプアゴニストもしくは両サブタイプ共通のアゴニストで処置すると、NEP 活性が増強されることも見出した。このように、カテキン誘導体と SSTR アゴニストはそれぞれ歯状回分子層と海馬網状分子層で相補的に NEP の発現増強効果を示すと言える。一方、DYRK1A は NEP を直接リン酸化して酵素活性を下方制御するため、DYRK1A 阻害剤を用いれば脳内の広い範囲で NEP 活性を増強できる可能性がある。従って、これらの標的を単独で研究開発するよりも三者を同時に開発の方が合目的であり、全研究開発実施予定期間内に目標を達成するために本研究項目に注力していく。DYRK1A は NEP の活性増強に加えて、タウのリン酸化にも関与することから、DYRK1A 阻害剤はダブルモジュレーター的作用を果たすかもしれない。DYRK1A の NEP 活性制御に関わるリン酸化部位のアミノ酸残基も既に同定している。一方、NEP の発現制御を意図した創薬において、AD 脳で NEP 遺伝子がエピジェネティック制御を受けている場合、上記薬剤による効果的な発現増強は難しい。そこで、AD 脳での NEP 遺伝子のメチル化またはヒストンアセチル化の状態を明らかにする研究も進めた。今年度は解析系の細かいプロトコールの作製まで終了した。

英文

Down-regulation of the major A β -degrading enzyme neprilysin (NEP) in the brain is one of the causes of amyloid deposition in sporadic Alzheimer's disease. In this research project, we aimed at the development of a seed compound to up-regulate NEP activity as a disease-modifying drug for Alzheimer's disease. We successfully obtained a compound that showed overt NEP-upregulating activity in a cell-based screening assay of aliphatic catechin derivatives that were designed and synthesized in Nagasaki University, and confirmed that it is capable of upregulating NEP in mouse brain *in vivo* after single intracerebroventricular injection. Interestingly, the effect of the compound was restricted to a specific region, the molecular layer of the dentate gyrus; this is the region where NEP is downregulated in an aging-dependent manner in mice, and is the terminal of a neuronal circuit, the performant path, that is highly vulnerable to Alzheimer's disease. In further studies, we will confirm the permeability of this compound across the blood-brain barrier and examine its effectiveness upon systemic administration to mice, and we will also set out to create further lead compounds with higher activity and sufficient physiological stability. To clarify the mechanism of NEP upregulation by aliphatic catechins, we isolated two kinds of catechin-binding proteins from neuronal cell extracts using catechin-coupled magnetic beads and identified them by LC/MSMS. We found that when cells overexpressing each binding protein were treated with aliphatic catechins, the NEP activity was increased compared with that of similarly treated mock cells. In the next fiscal year, we will confirm these findings by using binding-protein-knockdown cells.

As new targets to upregulate and activate NEP in the brains, we identified somatostatin receptor (SSTR) subtypes and dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), respectively. We clarified that NEP expression level was decreased and A β amount was increased in the stratum lacunosum-moleculare of the hippocampus of mice with double-knockout of two SSTR subtype genes. In accordance with this, NEP activity was

enhanced in cultured mouse primary neurons treated with agonists specific to either SSTR subtype or common to the two subtypes. Thus, the aliphatic catechin derivative and SSTR subtype-specific agonist appear to regulate NEP expression in the molecular layer of the dentate gyrus and the stratum lacunosum-moleculare of the hippocampus, respectively, and exhibit complementary effects in the two brain regions.

Because DYRK1A downregulates NEP activity via direct phosphorylation of its intracellular domain, a DYRK1A inhibitor may upregulate NEP activity in a wide region of the brain. It would fit our purpose to develop drugs for the three targets rather than to develop each one individually, and we will focus on this point in the implementation period of this research project. Since DYRK1A is also involved in phosphorylation of tau, in addition to that of NEP, a DYRK1A inhibitor may play a role as a dual modulator for disease-modifying therapy of AD. We have already identified an amino acid residue at the DYRK1A-mediated phosphorylation site that is critical for regulation of NEP activity.

On the other hand, if gene expression of NEP is suppressed epigenetically in AD brains, drug development aimed at upregulation of NEP as above may be ineffective. We have analyzed the epigenetics of the NEP gene, DNA methylation and histone acetylation in AD brains, and we have completed preparation of a detailed protocol to examine this issue.

Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Shirotani K, Asai M, Iwata N. Paradigm shift from diagnosing patients based on common symptoms to categorizing patients into subtypes with different pathogenic mechanisms to guide treatment for Alzheimer's disease. *Journal of Biochemistry*. 2017, doi: 10.1093/jb/mvx015. [Epub ahead of print]

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

招待講演

1. アルツハイマー病の創薬研究の新機軸、口頭、岩田修永、第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2016/8/26、国内.
2. 孤発性アルツハイマー病アミロイド蓄積の原因に則した治療薬と診断用バイオマーカーの開発、口頭、岩田修永、第 18 回感情・行動・認知(ABC)研究会、2016/10/22、国内.

シンポジウム

3. A β の産生阻害と分解促進を作用点とする薬剤の開発、口頭、岩田修永、堀 祐真、木下ももか、渡辺かおり、八田大典、河野佑紀、浅井 将、城谷圭朗、田中 隆、第 4 回日本アミロイドーシス研究会、2016/8/19、国内.

一般演題

4. 脂溶性カテキン誘導体によるネプリライシン活性増強メカニズムの解析、口頭、河野佑紀、本多美佳子、堀 祐真、八田大典、渡辺かおり、木下ももか、浅井 将、城谷圭朗、大山 要、黒田直敬、田中 隆、岩田修永、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016/5/14~15、国内。
5. 脂溶性カテキン誘導体による脳内ネプリライシン活性増強作用の *in vivo* 解析、口頭、堀 祐真、渡辺かおり、木下ももか、河野佑紀、八田大典、浅井 将、城谷圭朗、田中 隆、岩田修永、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016/5/14~15、国内。
6. 新規アルツハイマー病危険因子 TREM2 からのシグナル伝達機構の解析、口頭、城谷圭朗、樋口恵理、吉崎涼平、浅井 将、齊藤 隆、岩田修永、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016/5/14~15、国内。
7. DYRK1A と RCAN1 によるネプリライシン活性調節機構の解析、口頭とポスター、川久保 昂、森 亮太郎、木村祥子、高島志風、宮田愛彦、池内 健、丸山 敬、浅井 将、城谷 圭朗、岩田修永、第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2016/8/5~6、国内。
8. アルツハイマー病の危険因子 TREM2 のシグナル伝達機構の解析、ポスター、樋口恵理、吉崎涼平、浅井 将、齊藤 隆、城谷圭朗、岩田修永、長崎大学薬学部育薬研究教育センターキックオフシンポジウム、2016/9/24、国内。
9. カテキンによる β セクレターゼ活性調節作用のメカニズムの解析、口頭およびポスター、河野佑紀、本多美佳子、藤本康平、堀 祐真、八田大典、渡辺かおり、木下ももか、浅井 将、城谷圭朗、大山 要、黒田直敬、田中 隆、岩田修永、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25~27、国内。
10. A β 分解酵素ネプリライシン活性増強化合物の *in vivo* 評価、口頭およびポスター、堀 祐真、渡辺かおり、木下ももか、河野佑紀、八田大典、浅井 将、城谷圭朗、田中 隆、岩田修永、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25~27、国内。
11. アルツハイマー病新規リスク因子 TREM2 の機能解析、ポスター、吉崎涼平、樋口恵理、マルココロナ、齊藤 隆、浅井 将、城谷圭朗、岩田修永、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25~27、国内。
12. アルツハイマー病サブグループのバイオマーカーの探索、ポスター、松尾和哉、吉崎涼平、大槻純男、浅井 将、城谷圭朗、近藤孝之、井上治久、岩田修永、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25~27、国内。
13. ダウン症関連遺伝子 DYRK1A と RCAN1 がもたらすアルツハイマー病神経病理における機能的役割に関する研究、口頭およびポスター、川久保 昂、森 亮太郎、木村祥子、高島志風、宮田愛彦、垣矢直雅、津吹 聡、西道隆臣、浅井 将、城谷圭朗、岩田修永、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/25~27、国内。
14. ダウン症患者で見られる転写調節異常とアルツハイマー病の病態、ポスター、浅井 将、金城 亜衣美、木村 祥子、森 亮太郎、川久保 昂、高島 志風、城谷圭朗、柳下聡介、丸山 敬、岩田修永、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/1~3、国内。
15. TREM2 のリガンドおよびシグナル伝達機構の解析、ポスター、城谷圭朗、樋口恵理、吉崎涼平、松尾和哉、浅井 将、齊藤 隆、岩田修永、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/1~3、国内。

16. 患者由来 iPS 細胞を利用したアルツハイマー病のバイオマーカーの探索、ポスター、岩田修永、松尾和哉、大槻純男、浅井 将、近藤孝之、井上治久、城谷圭朗、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/1~3、国内。
17. DYRK1A と RCAN1 がもたらすアルツハイマー病神経病理における機能的役割に関する研究、ポスター、川久保 昂、森 亮太郎、木村祥子、高島志風、垣矢直雅、津吹 聡、西道隆臣、浅井 将、城谷圭朗、岩田修永、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/1~3、国内。
18. A β 分解酵素ネプリライシン活性増強化合物の *in vivo* 評価、ポスター、堀 祐真、渡辺かおり、木下ももか、河野佑紀、八田大典、浅井 将、城谷圭朗、田中 隆、岩田修永、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/1~3、国内。
19. カルシニューリン-NFAT シグナルの調節異常がアルツハイマー病関連遺伝子に与える影響、口頭、浅井 将、金城 亜衣美、木村祥子、森 亮太郎、川久保 昂、高島志風、城谷圭朗、岩田修永、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016/12/3~4、国内。
20. アルツハイマー病サブグループのバイオマーカーの探索、口頭、松尾和哉、大槻純男、浅井 将、城谷圭朗、近藤孝之、井上治久、岩田修永、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016/12/3~4、国内。
21. アルツハイマー病新規危険因子 TREM2 の機能解析、口頭、吉崎涼平、樋口恵理、Marco Colonna、斉藤 隆、浅井 将、岩田修永、城谷圭朗、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016/12/3~4、国内。
22. 患者由来 iPS 細胞を利用したアルツハイマー病のサブタイプ特異的バイオマーカーの探索、ポスター、岩田修永、松尾和哉、大槻純男、浅井 将、近藤孝之、井上治久、城谷圭朗、第 90 回日本薬理学会年会、2017/3/15~17、国内。
23. ダウン症患者におけるネプリライシンおよびタウの発現変化、ポスター、浅井 将、金城亜衣美、木村祥子、森 亮太郎、川久保 昂、高島志風、城谷圭朗、柳下聡介、丸山 敬、岩田 修永、第 90 回日本薬理学会年会、2017/3/15~17、国内。
24. Disease-modifying therapy through enhancement of neuronal A β -degrading enzyme neprilysin activity for Alzheimer's disease、Poster、Iwata N, Hori Y, Watanabe K, Kinoshita M, Kawano Y, Hatta D, Honda M, Asai M, Shirotani K, Ohyama K, Kuroda N, Tanaka T、The 30th International College of Neuropsychopharmacology World Congress, 2016/7/3~5, 国外 (Seoul, Republic of Korea)
25. Study on signal transduction from microglial receptor TREM2, a new risk factor of Alzheimer's disease、Poster、Shirotani K, Higuchi E, Yoshizaki R, Matsuo K, Asai M, Saito T, Iwata N、The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, 2017/1/20~21, 国外 (Osaka, Japan)
26. エピゲノム解析からせまるアルツハイマー病の新規病態、岩田 淳、第 35 回日本認知症学会、2016 国内
27. 間野達雄、永田健一、村山繁雄、西道隆臣、辻省次、岩田淳、神経細胞特異的 DNA メチル化解析から示された Alzheimer 病における DNA 傷害の重要性、第 35 回日本認知症学会、2016
28. 神経細胞特異的 DNA メチル化解析によるアルツハイマー病の病態分子探索とその機能的意義、間野達雄、永田 健一、村山 繁雄、西道 隆臣、辻 省次、岩田 淳、第 10 回日本エピジェネティクス研究会、2016 国内

29. Genome-wide analysis of neuron specific DNA methylation in Alzheimer's disease., Tatsuo Mano, Kenichi Nagata, Shigeo Murayama, Takaomi C. Saido, Shoji Tsuji, Atsushi Iwata, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016 国内
30. 「Somatostatin receptors regulate brain A β levels via the modulation of neprilysin activity」口頭, Takashi Saito (Organizer), Per Nilsson, Naomasa Kakiya and Takaomi C. Saido: Annual meeting of the Japan Neuroscience Society (Yokohama: 2016/7/20)、国内
31. 「アミロイドをターゲットとした認知症予防の試み」口頭、斉藤貴志、第 6 回日本認知症予防学会学術集会 (東北大学百周年記念会館、2016/9/24)、国内
32. 「次世代型アルツハイマー病モデルマウスの開発」口頭、斉藤貴志、第 31 回日本薬物動態学会年会 (松本キッセイ文化ホール、2016/10/13)、国内
33. 「Biology of Time: Humanization of entire murine tau gene for a better model of AD」口頭、Takashi Saito and Takaomi C. Saido : Society for Neuroscience (SanDiego, USA: 2016/11/13) 、国外
34. 「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」口頭、斉藤貴志、日本認知症学会 (国際フォーラム・東京、2016/12/1)、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 平成 28 年度高大連携事業「アルツハイマー病研究の最前線」、城谷圭朗、長崎県立大村高等学校 (長崎県大村市)、2016/7/12、国内
2. アルツハイマー病克服への挑戦と希望, 脳腫瘍の外科学会, 岩田 淳, 2016, 東京, 市民公開講座, 2016/11/13、国内
3. アルツハイマー病克服への挑戦と希望, 岩田 淳, 第 57 回日本神経学会学術大会こうべ神経内科ウィーク, 2016, 神戸, 市民公開講座, 2016/5/18、国内
4. 理化学研究所一般公開「アルツハイマー病研究の新展開」、斉藤貴志および研究室諸氏、理化学研究所 (埼玉県和光市)、2016/4/23、国内
5. 熊本県立宇土高等学校・創立記念講演「異分野融合：繋ぐことの大切さ」斉藤貴志、熊本県立宇土高等学校 (熊本県宇土市)、2016/10/21、国内
6. 理研 Days 研究者と話そう「アルツハイマー病ってなに？」斉藤貴志、科学技術館 (東京)、2016/12/18、国内

(4) 特許出願

なし