

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

研究開発課題名： (日本語) 新機軸アミロイド仮説に基づくアルツハイマー病の包括的治療開発
(英語) Comprehensive development of therapeutics for Alzheimer's disease based on the revised amyloid hypothesis.

研究開発担当者 (日本語) 大学院医学系研究科神経病理学分野 教授 岩坪 威
所属 役職 氏名： (英語) Department of Neuropathology, Graduate School of Medicine,
Professor, Takeshi Iwatsubo

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

アルツハイマー病(AD)のアミロイド病態を修飾、増強する諸因子として代謝ストレス、炎症性ストレス、HMGB-1などの細胞障害因子に着目し、分子病態の解析、障害因子の中和による治療法開発を行うとともに、アミロイド病態を反映する血液バイオマーカーの樹立を行った。

岩坪らはADモデルマウス脳のインスリンシグナル応答性を継時的に解析し、高脂肪食負荷開始2ヶ月後の5ヶ月齢でAβレベルの変化に先行して脳インスリン応答性の低下が生じ、Aβレベルの上昇が認められる9ヶ月齢でも応答性低下は持続することを見出した。このとき5ヶ月齢の早期からXBP1sの亢進を認め、小胞体ストレスの関与が示唆された。IRS-2欠損ADモデルマウスにおいて、アミロイド蓄積開始前の9か月齢からAβの有意な減少が見られたが、急性脳スライスからのAβ産生ならびに*in vivo*マイクロダイアリシスから算出したAβ半減期にも変化は見出されなかったことから、Aβの凝集・蓄積過程に抑制が生じたことが示唆された。さらにIRS-2欠損マウスに長期間代謝ストレスを加えると、脳アミロイド蓄積は有意に増加したことから、代謝負荷に伴うストレス、炎症は、脳インスリン抵抗性とは独立に、アミロイド蓄積促進に関与することが示唆された。富田らは脳におけるアストロサイト由来新規

Aβ分解酵素として単量体、多量体そして線維型Aβのいずれも分解する分泌型プロテアーゼである KLK7 を見出した。AD モデルマウスと KLK7 ノックアウトマウスを交配することにより、アミロイド蓄積および神経変性病態が顕著に亢進した。また Aβ により惹起される炎症性応答が KLK7 発現を促進すること、一方で AD 脳において KLK7 レベルが抑制されていることを見出した。

田川らは、既に確立した前臨床レベルの POC に基づいて、『アルツハイマー病の HMGB1 抗体治療』に関する特許申請を行い、抗体医薬開発企業（Precision Antibody 社）と、抗 HMGB1 モノクローナル抗体のヒト化に関する共同研究契約および委託契約を締結し、委託経費による GMP 基準ヒト化 HMGB1 抗体作製を開始した。抗 HMGB1 抗体産生ハイブリドーマ 2000 クローンをスクリーニングし、高産生株 3 クローンを取得し、抗体のヒト化が完了した。またコンパニオン診断法となりうる髄液中 HMGB1 の ELISA による測定法の開発と AD モデルマウスを用いた病態進展と髄液 HMGB1 の相関の検討を進めた。AD モデルマウス(5xFAD)の髄液を採取し、市販の ELISA（シノテスト）を用いて測定したが、信頼に足る測定値は得られなかったため、当初計画通り HMGB1 の高感度 ELISA の開発を行った。シノテストに対して約 10 倍感度を上昇させ、5xFAD マウス髄液を測定したが、さらなる感度向上を進めている。

大河内らは血漿中 APL18 値の安定性を検討し、血漿中 APL18 値は日差・日間変動、採血後の条件、凍結融解の影響を殆ど受けず、唯一食事の影響を受けることを見出し、食前採血か食後 2 時間後採血を行えば、測定値は変動しないことを明確にした。次いで、血漿中 APL18 の AD バイオマーカー（髄液中 Aβ42 減少とタウ上昇）陽性群との関連について検討を行った。前年度に測定を終えた 44 症例の血漿と CSF のペアサンプルに加えて、今年度はさらに 80 症例の血漿と髄液のペアサンプルを測定し、血漿 APL18 総量は AD バイオマーカー陽性群において有意に低いとの結果を得た。

Our group focused on the modifier or accelerating factors of the amyloid pathology of Alzheimer's disease (AD), i.e., metabolic stress, inflammatory stress and cell-damaging factors, especially HMGB-1. We analyzed the molecular pathophysiology and developed therapeutic strategies neutralizing the damaging factors. We also aimed at establishing blood biomarkers reflecting the amyloid pathology.

Iwatsubo group analyzed the responsiveness of insulin signaling in a longitudinal cohort of AD model mice, and found that insulin response of the brain is decreased at 5 months age (2 months after challenge of high fat diet) prior to an increase in A β levels, which is maintained until 9 months of age when A β levels was increased. Brain XBP1s levels were upregulated as early as 5 months of age, implicating ER stress in this process. IRS-2 deficient AD model mice showed significant reduction in A β levels at 9 months age prior to A β deposition, whereas A β production from acute brain slice preparations, as well as the half-life of A β calculated by *in vivo* microdialysis were altogether unaltered, suggesting inhibition in the aggregation and deposition of A β . Prolonged exposure to metabolic stress in IRS-2 deficient mice elicited a significant increase in brain amyloid deposition, supporting the notion that stress and inflammation caused by metabolic overload accelerates amyloid deposition independent of brain insulin resistance. Tomita subgroup identified KLK7 as a novel A β degrading enzyme derived from astrocytes, which degrades monomeric, multimeric and fibrillar forms of A β . Crossing AD model mice with KLK7 KO mice resulted in marked increase in amyloid deposition and degenerative changes. Inflammatory response caused by A β upregulated expression of KLK7, whereas KLK7 levels were downregulated in AD brains.

Tagawa group applied for patents on "anti-HMGB1 antibody therapy of AD" based on the preclinical POC, and contracted with Precision Antibody inc., an immunopharma company, regarding humanization of anti-HMGB1 antibody, and started the production humanized anti-HMGB1 antibodies of GMP grade. Humanization of the antibody was completed by obtaining three high-titer clones by screening ~2000 clones. Quantitation of CSF HMGB1 by ELISA as a candidate companion diagnostics, as well as correlation analysis of pathological progression and CSF HMGB1 was performed. Quantitation by commercially available ELISA (Sino-test) of CSF from 5xFAD AD model mice did not provide reliable results, prompting us to further develop highly sensitive ELISAs, yielding ~x10 higher sensitivity compared with Sino-test, still requiring higher sensitivities.

Okochi group examined the stability of plasma APL1 β levels, and confirmed its consistency over time, condition after blood sampling and freeze-thaw; the only confounding factor was the effect of meals, leading them to conclude that blood sampling should be conducted prior to or >2 hours after the breakfast, to ensure the stability of quantitation. Correlation between plasma APL1 β and positivity in AD biomarkers (reduction in CSF A β 42 and increase in tau) also was examined in paired samples of plasma and CSF (44 existing data and 80 novel additional samples), yielding preliminary results suggesting that plasma total APL1 β levels were decreased in AD biomarker-positive individuals.

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Kazunori Kikuchi, Kiwami Kidana, Takuya Tatebe, Taisuke Tomita: Dysregulated metabolism of the amyloid- β protein and therapeutic approaches in Alzheimer disease. *J Cell Biochem.* in press. DOI: 10.1002/jcb.26129. PMID: 28488760
2. Taisuke Tomita: Aberrant proteolytic processing and therapeutic strategies in Alzheimer disease. *Adv Biol Regul.* 2017, 64, 33-38. doi: 10.1016/j.jbior.2017.01.001. PMID: 28082052
3. Fujita, K., Motoki, K., Tagawa, K., Chen, X., Hama, H., Nakajima, K., Homma, H., Tamura, T., Watanabe, H., Katsuno, M., Matsumi, C., Kajikawa, M., Saito, T., Saido, T., Sobue, G., Miyawaki, A., Okazawa, H. (2016) HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific Reports.* 6:31895. Published online 25 Aug 2016. doi: 10.1038/srep31895.
4. Mao, Y., Tamura, T., Yuki, Y., Abe, D., Tamada, Y., Imoto, S., Tanaka, H., Homma, H., Tagawa, K., Miyano, S., Okazawa, H. (2016) The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing. *Cell Death and Disease.* Vol.7: e2207. Published online 28 April 2016. doi:10.1038/cddis.2016.101.
5. Mao, Y., Chen, X., Xu, M., Fujita, K., Sasabe, K., Homma, H., Murata, M., Tagawa, K., Tamura, T., Kaye, J., Finkbeiner, S., Blandino, G., Sudol, M., Okazawa, H. (2016) Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology. *Hum Mol Genet.* pii: ddw303. Published online 12 Sep 2016. [Epub ahead of print] doi: 10.1093/hmg/ddw303.
6. Imamura, T., Fujita, K., Tagawa, K., Ikura, T., Chen, X., Homma, H., Tamura, T., Mao, Y., Taniguchi, JB., Motoki, K., Nakabayashi, M., Ito, N., Yamada, K., Tomii, K., Okano, H., Kaye, J., Finkbeiner, S., Okazawa, H. (2016) Identification of hepta-histidine as a candidate drug for Huntington's disease by in silico-in vitro-in vivo-integrated screens of chemical libraries. *Scientific Reports* 6:33861. Published online 22 Sep 2016. doi: 10.1038/srep33861.
7. Identification of Small Peptides in Human Cerebrospinal Fluid upon Amyloid- β Degradation. Naoki Mizuta Kanta Yanagida Takashi Kodama Takeshi Tomonaga Mako Takami Hiroshi Oyama Takashi Kudo Manabu Ikeda Masatoshi Takeda Shinji Tagami Masayasu Okochi. *Neurodegener Dis* 2017;17:103-109
8. 田上 真次 大河内 正康 認知症のバイオマーカー —髄液ならびに血液— 臨床精神医学 45(4):p405-410, 2016
9. 田上 真次 大河内 正康 最新のアルツハイマー病の血液バイオマーカー開発 医学のあゆみ 257 巻 5 号 p519-524

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Tomoko Wakabayashi, Kazuki Yamaguchi, Kentaro Matsui, Tadafumi Hashimoto, Tetsuya Kubota, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Takeshi Iwatsubo. Effects of diet-induced obesity and diet control on insulin response and amyloid pathology in the brains of Alzheimer model mice. Poster, Gordon Research Conference - Neurobiology of Brain Disorders, 2016/8/7-12, Girona, Spain, 国外
2. 富田泰輔 : アストロサイト由来プロテアーゼ **KLK7** によって制御される脳内 A β 分解メカニズムの解明 2016年7月20日 第39回日本神経科学大会 国内
3. Takuya Tatebe, Kiwami Kidana, Yukiko Hori, Taisuke Tomita: Identification of KLK7 as a novel amyloid- β peptide-degrading protease secreted from astrocytes. 2016年9月26日 第88回日本生化学会大会 国内
4. Taisuke Tomita: Pathological impact of astrocyte-mediated proteolytic processing on amyloid- β deposition. Neuroscience 2016, November 13, 2016. 国外
5. 建部卓也、木棚究、堀由起子、富田泰輔 : アストロサイト由来 A β 分解酵素 KLK7 の発現制御・活性化機構の解明 2016年12月1-3日 第35回日本認知症学会学術集会 国外
6. Taisuke Tomita: Novel A β degrading enzyme and astrocytes. The 26th Adler Symposium will focus on four major themes: potential role of lifestyle in neurodegeneration. February 6-8, 2017. 国外
7. 岩坪威 アルツハイマー病への挑戦：基礎研究から予防・治療へ 第27回東京大学科学技術交流フォーラム 基礎生物学の極み 平成29年2月17日 国内
8. 網羅的リン酸化プロテオーム解析による早期 AD 病態の解明、口頭（招待講演）、田川一彦、第46回日本神経精神薬理学会年会、2016/07/02、国外
9. Fasting activates macroautophagy in neurons of AD mice but is insufficient to degrade amyloid-beta, ポスター、Xigui Chen, Kanoh Kondo, Kazumi Motoki, Hidenori Homma, Hitoshi Okazawa. 第57回日本神経学会学術大会、2016/05/19、国内
10. Fasting activates macroautophagy in neurons of Alzheimer's disease mice but is insufficient to degrade amyloid-beta, ポスター、Xigui Chen, Kanoh Kondo, Kazumi Motoki, Hidenori Homma, Hitoshi Okazawa. 第39回日本神経科学大会、2016/7/21、国内
11. アルツハイマー病の発症前・超早期病態の解明と治療への応用、田川一彦、岡澤均、脳とこころの研究 第二回シンポジウム、ポスター、2017/3/11、国内
12. 真の変性疾患治療ターゲットをオミックス統合から捉える、口演（招待講演）、岡澤均、公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団 新適塾「難病への挑戦」第27回、2016/09/08、国内
13. 脳という名のミニコスモスとその破綻、口演（招待講演）、岡澤均、名古屋市立大学 22世紀研究所 講演会、2016/09/29、国内
14. Therapeutics development of Alzheimer's disease targeting on Phase 0. 口演、Hitoshi Okazawa、15th Surugadai International Symposium : Current Status and Future of Drug Discovery (和名：第15回駿河台シンポジウム)、2016/11/29、国内
15. 変性型認知症の分子メカニズムの共通性と特異性、口演（プレナリ講演）、岡澤均、第35回日本認知症学会学術集会、2016/12/01、国内
16. Disease Modifying therapy of Alzheimer's disease in the near future – from the aspect

of psychological frailty – Shinji Tagami The 18th International Congress of Oriental Medicine 2016, Okinawa Convention Center Room B1, April 17, 2016

17. A brain-derived A β 42 surrogate marker in peripheral blood Shinji Tagami, Kanta Yanagida, Takeshi Tomonaga, Takeshi Ikeuchi, Masaaki Waragai, Masatoshi Takeda, Manabu Ikeda, Masayasu Okochi. Neuroscience meeting 2016, Nov.14 2016, San Diego USA

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. アルツハイマー病:超早期の診断と治療をめざして 日本公認会計士協会近畿会 平成 28 年 7 月 15 日 大阪
2. アルツハイマー病の原因、症状、予防そして今後の研究 経済同友会 会員懇談会 平成 28 年 9 月 30 日 東京
3. アルツハイマー病の分子病態と超早期治療に向けての研究開発 第 10 回健康医療開発機構シンポジウム 認知症と向き合う 平成 29 年 3 月 4 日 東京
4. アルツハイマー病の発症前・超早期病態の解明と治療への応用、田川一彦、岡澤均、脳とこころの研究 第二回シンポジウム、2017/3/11、国内
5. 脳という名のミニコスモスとその破綻、口演（招待講演）、岡澤均、名古屋市立大学 22 世紀研究所 講演会、2016/09/29、国内
6. 変性型認知症の分子メカニズムの共通性と特異性、口演（プレナリ講演）、岡澤均、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016/12/01、国内

(4) 特許出願

なし