

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) 新たな作用機序を介する分子を標的としたアルツハイマー病の予防的治療法の実証的研究  
(英語) Development of preventive therapies for Alzheimer's disease by targeting endogenous molecules showing unsuspected disease-modifying activities

研究開発担当者 (日本語) 滋賀医科大学 教授 西村 正樹  
所属 役職 氏名： (英語) Shiga University of Medical Science, Professor, Masaki Nishimura

実施期間： 平成28年11月 1日 ~ 平成33年 3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

滋賀医科大学 (代表者) では、(1) 基質の不安定化により A $\beta$  産生を抑制する分泌型タンパク質 ILEI (別名 FAM3C) を介した抗 A $\beta$  先制治療法開発と (2) 脳 ILEI 低下が A $\beta$  蓄積リスクになることの検証を進めている。(1-a) ILEI 遺伝子転写開始点から上流約 8.8 kb をレポーターアッセイにて解析し、神経系ないし非神経系培養細胞において転写活性の高い領域の分布を明らかにした。また、転写因子ノックダウン MCF-7 細胞由来 RNA アレイによる検討から、数種の転写因子と抑制因子の候補を同定した。ILEI 転写誘導薬のスクリーニングに向け、レポーターアッセイ用細胞株を作製している。(1-b) 統計力学 3D-RISM 理論により、Presenilin-1 と ILEI との結合を解析し候補結合部位が浮上した。当該部位の変異体を作製し培養細胞での A $\beta$  産生抑制活性を評価している。(1-c) ILEI 様活性を示す薬剤の同定に向け、Presenilin-1 の ILEI 結合部位に作用する化合物の *in vitro* スクリーニング系を樹立した。(2-a) 誘導型コンディショナル ILEI ノックアウトマウス作出に向け、ベクターDNA の作製を完了し、ゲノム編集受精卵からの出産試行を始めた。(2-b) ヒト血清ないし髄液中 ILEI 定量に向け、高感度 ELISA システムの構築を完了した。

北海道大学 (分担者) では、アルカデイン  $\beta$  (Alc $\beta$ )由来の脳内在性ペプチド p3-Alc $\beta$  が A $\beta$  誘導性の神経障害を抑制する事を見いだしており、これをシーズとした予防治療薬の開発を進めている。

H28年度は、(1-a) 内在性ペプチドの一部であるリードペプチドの標的分子の探索、(1-b) リードの体内動態解析、(2)  $\text{Alc}\beta$  遺伝子の発現系の解析、(3) 治療実験に用いる AD マウスモデルの整備を行った。(1-a) リードペプチドに結合する脳タンパク質を単離し、LC-MS/MS および抗体でタンパクを同定し候補とした。現在、これらの候補群から標的分子の同定を進めている。(1-b) リードペプチドはマウスへの末梢(腹腔)投与で  $\text{A}\beta$  誘導性認知障害を改善する。H28年度は皮下投与で血中、脳への移行性を確認した。体内動態を解析するリガンドアッセイ系の改良を行った。(2) 老化と共に低下する  $\text{Alc}\beta$  の発現は、内在性ペプチドの生成量の低下を引き起こすため、 $\text{Alc}\beta$  遺伝子の発現を維持・高める創薬をめざし、 $\text{Alc}\beta$  遺伝子のプロモーター解析を行い、発現を検定できるレポーターアッセイ系を樹立した。(3) H29年度以降の治療実験を実行するための AD マウスモデル個体群を整備した。

新潟大学(分担者)では、早期の段階で最適なバイオマーカーを用いることにより、予防的治療法を実現するために必要となる適切な被検者リクルートを可能にする課題を進めている。本症の脳内病理を反映するバイオマーカーとして脳脊髄液中の  $\text{A}\beta_{42}$ 、総タウ、リン酸化タウが知られている。脳実質の老人斑の沈着は脳脊髄液中の  $\text{A}\beta_{42}$  値と相関し、神経原線維変化はリン酸化タウと相関する。この知見に基づき、独自に患者から収集した脳脊髄液中の  $\text{A}\beta_{42}$  とリン酸化タウ値のカットオフ値を設定し、脳脊髄液中の  $\text{A}\beta_{42}$  とリン酸化タウ値を用いて次の4つのカテゴリーに分類した。脳脊髄液  $\text{A}\beta_{42}$  低下の有無によりアミロイド蓄積(+/-)、リン酸化タウの上昇の有無により神経変性(+/-)。脳脊髄液中  $\text{A}\beta_{38}$  と  $\text{A}\beta_{40}$  の測定を行い、4つのカテゴリーでこれらが特徴的な変動を呈することが示された。

The projects of the Shiga University of Medical Science team are (1) to develop preventive therapies for Alzheimer's disease by targeting ILEI (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer, also known as FAM3C) and (2) to examine the possibility that reduced level of brain ILEI is a risk for brain  $\text{A}\beta$  deposition. (1-a) Using luciferase reporter assay, we found the transcriptional activation elements in the 5' non-coding region of human ILEI gene in cultured neuronal and non-neuronal cells. To screen ILEI-inducing chemicals, we have prepared HEK293 and SH-SY5Y cell lines stably expressing the transcription-regulating region fused with a luciferase reporter gene. (1-b) The three dimensional interaction site model (3D-RISM) theory predicted a candidate Presenilin-1-binding site on human ILEI. We are testing  $\text{A}\beta$ -reducing activity of the mutants harboring amino acid substitution in the candidate site. (1-c) We have established *in vitro* detection system of ILEI:Presenilin-1 binding, which is for screening of ILEI activity-mimicking chemicals. (2-a) We have completed construction of the plasmids for generation of ILEI-floxed mice with genome-editing technique. (2-b) We have established sandwich ELISA system for measurement of ILEI in CSF and serum.

The group of Hokkaido University has found that p3- $\text{Alc}\beta$ , which is a secretases-cleaved product of a neuronal type I membrane protein alcadin  $\beta$  ( $\text{Alc}\beta$ ), suppresses neuronal impairments induced by  $\text{A}\beta$  oligomers ( $\text{A}\beta\text{O}$ ). In the first year of the project, we had specific aims as follow; (1-a) To explore target molecules of the lead peptide which is a part of p3- $\text{Alc}\beta$ , (1-b) to analyze pharmacokinetics of lead peptide in mouse, (2) to analyze  $\text{Alc}\beta$  gene expression, and (3) the preparation of AD mouse model population. Result summary are follows; (1-a) We isolated proteins bound to the lead peptide and identified these with LC-MS analysis as candidates of target molecule to p3- $\text{Alc}\beta$ . (1-b) Because the lead peptide is effective to suppress  $\text{A}\beta\text{O}$ -induced

memory impairment in mouse by peripheral administration, we analyzed a pharmacokinetics of the lead peptide in mice. Furthermore, to improve an assay system to quantify the lead peptide, we generated monoclonal antibodies raised to the lead peptide. (2) To enhance  $\text{Alc}\beta$  gene expression, we revealed a promoter structure of  $\text{Alc}\beta$  gene and prepared assay system to assess gene expression of  $\text{Alc}\beta$ . (3) We introduced APP-KI AD mouse model from RIKEN for therapeutic studies.

The project by the Niigata University team is aimed to establish early detection of biomarker alterations that are associated with the pathological changes of Alzheimer's disease. We determined the levels of  $\text{A}\beta_{38}$ ,  $\text{A}\beta_{40}$ ,  $\text{A}\beta_{42}$ , total tau, and phospho-tau in cerebrospinal fluid (CSF) from the patients with Alzheimer's disease and controls. By setting appropriate cut-off values for each of biomarkers, we classified the subjects into four categories on the basis of the biomarker results. We showed that each of the categories appears to be associated with estimated pathological changes in brain. These analyses may enhance early detection of Alzheimer's disease by CSF biomarker analysis, and promote our understanding of the pathogenesis underlying Alzheimer's disease.

### 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 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Implication of ILEI/FAM3C in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. Nishimura M. The 7th BRI International Symposium 2017, Niigata University, 2017/3/10-11、国内.
2. Function of Alcadin in neurons and the utilization of its  $\gamma$ -secretase product peptide p3-Alc in diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. 口頭(招待講演) Toshiharu Suzuki. The 7th BRI International Symposium 2017, March 10-11, 2017. 国内 (Brain Research Institute, Niigata University).
3. A novel biomarker p3- $\text{Alc}\alpha$ , produced by  $\gamma$ -secretase cleavage, altered in AD patients. ポスター、Chior Omori, Saori Hata, Kazuo Yamamoto, Toshiharu Suzuki. The 7th BRI International Symposium 2017, March 10-11, 2017. 国内 (Brain Research Institute, Niigata University).
4. Altered cellular cholesterol level causes aberrant  $\gamma$ -secretase cleavages of APP and Alcadin. ポスター、Hu Anqi, Yi Piao, Saori Hata, Toshiharu Suzuki. The 7th BRI International Symposium 2017, March 10-11, 2017. 国内 (Brain Research Institute, Niigata University).
5. ILEI を標的としたアルツハイマー病の予防的治療法の開発. 西村正樹. 『融合脳』滋賀医大キックオフシンポジウム、2017/1/17、国内.
6. 脳 ILEI 発現の加齢性低下と  $\text{A}\beta$  蓄積リスクおよび ILEI 発現誘導による予防的治療法. 渡邊直希. 『融合脳』滋賀医大キックオフシンポジウム、2017/1/17、国内.

7. 池内 健. アルツハイマー病の遺伝的因子と臨床的意義. 「遺伝医療と認知症」文部科学省課題解決型人材養成プログラム 北陸認知症プロフェッショナル医養成プラン・難病克服 次世代スーパードクター育成 2016.12.20. 金沢市, 国内・口頭発表
8. A $\beta$  oligomer による神経毒性を抑制する内在性 p3-A $\beta$  ペプチドの体内動態と機能、ポスター、 斎藤遥、大森智織、木村彩乃、内山藍、熊谷久美子、西尾秀喜、前田雅弘、羽田沙緒里、鈴木利治. 第 35 回日本認知症学会学術集会、2016 年 12 月 1-3 日 国内(東京国際フォーラム)。
9. ApoE4 存在下での X11L 下流遺伝子発現変化、ポスター、 豊田めぐみ、羽田沙緒里、道川誠、中矢正、鈴木利治. 第 35 回日本認知症学会学術集会、2016 年 12 月 1-3 日 国内 (東京国際フォーラム)。
10. 黒羽泰子, 長谷川有香, 谷 卓, 松原奈絵, 斎藤泰晴, 大平徹郎, 春日健作, 池内 健, 小池亮子. 慢性呼吸不全患者における認知機能障害と 13-IMP 脳血流 SPECT 所見の検討. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.2. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
11. 春日健作, 桑野良三, 岩坪威, 池内 健. 認知症関連コホートにおける硬膜穿刺後頭痛の頻度と発症に関わる因子の検討. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.2. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
12. 徳武孝允, 春日健作, 三浦健, 目崎直実, 平井香織, 西澤正豊, 小野寺理, 池内 健. 意味性認知症の臨床症状・画像的特徴・脳脊髄液バイオマーカーの検討. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.2. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
13. 原 範和, 石黒敬信, 目崎直実, 三浦健, 春日健作, 月江珠緒, 宮下哲典, 池内 健. 末梢血を用いた網羅的 RNA-Seq 解析により示されたアルツハイマー病に特徴的な発現変動. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.2. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
14. 横山裕一, 春日健作, 池内 健, 吉田悠里, 染矢俊幸. 若年性アルツハイマー病の臨床早期にみられた非典型的進行性失語について. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.1. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
15. 三浦 健, 目崎直実, 三瓶一弘, 青木賢樹, 竹内亮子, 田中英智, 豊島靖子, 柿田明美, 小野寺理, 池内 健. 病理診断された Globular Glial Tauopathy の臨床的特徴: 自験 2 例と既報 39 例のまとめ. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.1. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
16. 目崎直実, 三浦 健, 野崎洋明, 大垣光太郎, 河尻澄宏, 大熊泰之, 小野南月, 原英夫, 小野寺理, 池内 健. LaminB1 関連常染色体優性遺伝性白質脳症: 遺伝子重複と臨床的特徴. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.1. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
17. 渡邊裕美, 北村香織, 若杉三奈子, 横関明男, 三瓶一弘, 小野寺理, 池内 健, 百都健, 成田一衛, 遠藤直人. 地域総合病院通院患者における腎透析と認知機能スケールとの関連:PROST. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.1. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016.12.2. 東京フォーラム (東京), 国内・ポスター発表
18. Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda S, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T. Clinical characterization of Adult-onset Leukoencephalopathy with Axonal

Spheroids and Pigmented Glia. 141st Annual Meeting of American Neurological Association.  
2016.10.17, Baltimore, USA, 国外・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 池内 健. 物忘れと記憶の脳内メカニズム. 三条市成人大学講座. 2016.12.8. 三条市中央公民館, 国内
2. 西村正樹. アルツハイマー病は予防できるのか? 養父市市民健康講座、2016/11/26、国内.
3. 池内 健. 認知症治療のいま. みどり病院 認知症セミナー. 2016.10.29. ユニゾンプラザ (新潟市), 国内

(4) 特許出願

なし