

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名：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)

Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

ACceleration Transformative research for Medical innovation(ACT-MS)

研究開発課題名：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

Development of inhibitors against Reelin-cleaving enzymes for the treatment of Alzheimer's disease.

研究開発担当者 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 服部光治

所属 役職 氏名：Mitsuharu Hattori

実施期間：平成 28年 10月 13日 ～ 平成 29年 3月 31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

松川則之教授（名古屋市立大学大学院医学研究科）、赤津裕康特任教授（名古屋市立大学大学院医学研究科）らのグループとともに、リーリン分解酵素阻害によるアルツハイマー病（AD）治療効果解明を目指している。リーリン分解酵素を欠損するアルツハイマー病モデルマウス、および非切断型リーリンを発現するアルツハイマー病モデルマウスの作製を行い、その一部については完成し、解析を開始した。また、ヒト死後脳におけるリーリンおよび関連分子の発現を解析した。

分泌タンパク質リーリンの量または活性を上昇させることはアルツハイマー病（AD）を改善すると考えられている。これを達成する方法として、リーリンの分解・不活化を抑制することが考えられる。我々はこのリーリン分解・不活化酵素を神経細胞培養上清から精製し、ADAMTS-3 (A Disintegrin And Metalloproteinase Thrombospondin motifs 3)という分子であることを発見したADAMTS-3 ノックアウト（KO）マウス脳ではリーリンの分解が減少し、下流シグナルも活性化されていた。一方、このマウスの脳ではリーリンの分解が完全にゼロにはなっていないことから、ADAMTS-3以外にもリーリンを分解・不活化する酵素の存在が示唆された。我々は、ADAMTS-3の類縁分子であるADAMTS-2の寄与を想定し、ADAMTS-2のKOマウスも樹立した。さらにリーリンの分解部位を1244番目のプロリン残基のC末端側であることを同定し、この残基に変異を持つリーリン（以下、Reelin-PDと呼ぶ）は分解を受けず、生物活性の持続時間が飛躍的に伸びることを見出した。

本研究では、ADAMTS-2 KO マウスを作製するとともに、これと ADAMTS-3 KO マウスを交配し、ADAMTS-2/3 二重欠損・AD モデルマウスとその対照群を数匹得ることができた。また、Reelin-PD を発現するノックインマウス (Reelin-PD KI マウス) を作製・解析し、大脳皮質および海馬において確かにリーリン分解が顕著に減少していることを見出した。また、Reelin-PD KI マウスと AD モデルマウスの交配を開始した。さらにヒト AD 患者サンプルを解析した結果、AD 患者では全体的にリーリン量が低下していることを見出した。一方、市販抗体をいくつか試した結果、ヒトサンプル中のタンパク質を検出できる抗 ADAMTS-2 抗体および抗 ADAMTS-3 抗体を見出せなかった。抗 ADAMTS-3 モノクローナル抗体の作製には 2 度チャレンジしたが、今にいたるまで、内在性タンパクを検出できる抗体は得られていない。内在性の ADAMTS-2 および ADAMTS-3 の存在量は非常に少ないとも考えられる。

ADAMTS-2/3 二重欠損マウスおよび Reelin-PD KI マウスとの交配により AD モデルマウスの症状が改善できれば、ADAMTS-2/3 阻害剤の開発には大きな情報となる。またヒト AD の発症や症状とリーリン関連分子の発現や存在量が相関すれば、薬物評価の際には重要な評価項目になる。引き続きこれらの達成を目指し研究を続ける。

Reelin is a secreted protein and reduced Reelin activity has been suggested to contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. We previously found that the proteolytic cleavage of Reelin abolishes Reelin activity *in vitro* and we identified A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs-3 (ADAMTS-3) as the major protease that inactivates Reelin in the brain. Reelin cleavage of ADAMTS-3 knock-out (KO) mice still remained at some extent, indicating the presence of other proteases that can mediate N-t cleavage. We found that ADAMTS-2 is the likely candidate protease. We also found that a Reelin mutant in which a certain Pro residue was replaced with aspartate (Reelin-PD) was resistant to ADAMTS-3 or other proteases, and its biological activity of stayed longer than that of wild-type Reelin.

In this study, ADAMTS-2 KO mice were prepared and crossed with ADAMTS-3 KO mice, and several ADAMTS-2/3 double-KO AD model mice and their control group were obtained. In addition, knock-in mice expressing Reelin-PD (Reelin-PD KI mice) were prepared and analyzed. It was found that the Reelin degradation was greatly reduced in cerebral cortex and hippocampus of Reelin-PD KI mouse. Mating of Reelin-PD KI mouse and AD model mouse was already started. Furthermore, as a result of analysis of human AD patient sample, we found that the total amount of Reelin decreased in AD patients. On the other hand, although we have tested several commercially available antibodies, there were no anti-ADAMTS-2 and anti-ADAMTS-3 antibodies capable of detecting proteins in human samples. We challenged twice to prepare anti-ADAMTS-3 monoclonal antibody, but until now we have not obtained antibodies capable of detecting endogenous proteins. It is considered that the abundance of endogenous ADAMTS-2 and ADAMTS-3 is very small.

If the symptoms of AD model mice can be improved by mating with ADAMTS-2/3 double KO mouse and Reelin-PD KI mouse, it will be big information for development of ADAMTS-2/3 inhibitor. Also, correlating the symptoms of human AD with the expression and abundance of Reelin-related molecules is an important step in drug evaluation. We will continue this line of researches.

### 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. Ogino, H., Hisanaga, A., Kohno, T., Kondo, Y., Okumura, K., Kamei, T., Sato, T., Asahara, H., Tsujii, H., Fukata, M., and Hattori, M. Secreted metalloproteinase ADAMTS-3 inactivates Reelin. **J. Neurosci.** 2017, 37, 3181-3191.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 成体脳における、分泌タンパク質リーリンの不活性化を担う ADAMTS プロテアーゼ群に関する解析, ポスター, 加藤路尚, 宮本智美, 河野孝夫, 服部光治, 第 39 回 日本分子生物学会年会、2016/12/12, 国内.
2. 巨大分泌タンパク質リーリンの機能は、ADAMTS-3 による特異的切断により制御される、口頭、河野孝夫、荻野ひまり、久永有紗、近藤佑多、築地仁美、服部光治、日本薬学会第 137 年会、2017/3/26, 国内.
3. 成体脳における、分泌タンパク質リーリンの不活性化を担う ADAMTS プロテアーゼに関する解析、口頭、加藤路尚、宮本智美、河野孝夫、服部光治、日本薬学会第 137 年会、2017/3/26, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし