

記者資料提供（平成 27 年 7 月 28 日）

公益財団法人先端医療振興財団

経営企画部企画課 安藤、清水

TEL：078-306-0806 E-mail：media@fbri.org

国立大学法人京都大学

企画・情報部広報課 進藤

TEL：075-753-2071 E-mail：kohho52@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子の発見

先端医療振興財団客員上席研究員（京都大学大学院医学研究科特定准教授 兼任）星 美奈子らの研究グループが、アルツハイマー病の脳で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子を発見し、その研究成果が平成 27 年 7 月 27 日の週に米国科学アカデミー紀要「PNAS（※）」の電子版に掲載される予定ですのでお知らせ致します。研究成果等の具体的な内容につきましては、添付資料をご参照下さい。また、下記要領で、本件に関する記者会見を行います。

日 時：平成 27 年 7 月 31 日（金） 午前 11 時～（1 時間程度） ※受付 10 時 30 分～

場 所：先端医療センター臨床棟 4 階 研修室
（神戸市中央区港島南町 2 丁目 2 番）

説明者：星 美奈子

先端医療振興財団先端医療センター研究所客員上席研究員

京都大学大学院医学研究科特定准教授

中村 祐

香川大学医学部医学系研究科教授

鍋島 陽一

先端医療振興財団 先端医療センターセンター長（研究所長兼務）

- 研究内容や成果等に関する説明(スライドを用いたプレゼンテーション)を 30 分程度で行い、その後、質疑応答 30 分程度を予定しています。

【お問い合わせ先（研究内容に関すること）】

星 美奈子 公益財団法人先端医療振興財団先端医療センター研究所
医薬品開発研究グループ

TEL：078-303-3684 FAX：078-303-3683

国立大学法人京都大学大学院医学研究科

TEL：075-753-4341

e-mail：hoshi.minako.8w@kyoto-u.ac.jp；携帯番号：080-8316-9761

※PNAS : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)

The National Academy of Sciences は、科学利用の推進を目的として 1863 年に設立された非政府・非営利の組織。議会の決議により、科学と工業分野に関して連邦政府の諮問機関として機能を果たすことを求められている。会員には、古くは Einstein 博士を始め、多くのノーベル賞受賞者を有している。

本論文の Editor は、学術的専門を考慮して 2013 年のノーベル生理学・医学賞受賞者である Thomas C. Südhof 博士（スタンフォード大学医学部教授）が任命され、その監修の下に審査が行われ採択に至った。

平成 27 年 7 月 28 日



報道機関 御中

公益財団法人先端医療振興財団
国立大学法人京都大学

アルツハイマー病で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子の発見

—神経細胞死の新たな分子メカニズム解明による革新的治療法の開発に期待—

概要

星 美奈子 先端医療振興財団客員上席研究員（京都大学大学院医学研究科特定准教授 兼任；2009年まで三菱化学生命科学研究所主任研究員）らの研究グループは、文部科学省並びに厚生労働省等から支援を受け、新潟大学、名古屋大学、愛媛大学、京都大学、自治医科大学、University of California, Los Angeles、Nanyang Technological University、福井大学、東北大学、高崎健康福祉大学、香川大学及び TAO ヘルスライフファーマ株式会社と共同研究を行い、アルツハイマー病の脳で起こる神経細胞死の新たなターゲット分子を発見しました。

本研究成果は、平成 27 年 7 月 27 日の週に米国科学アカデミー紀要「PNAS」の電子版に掲載される予定です。

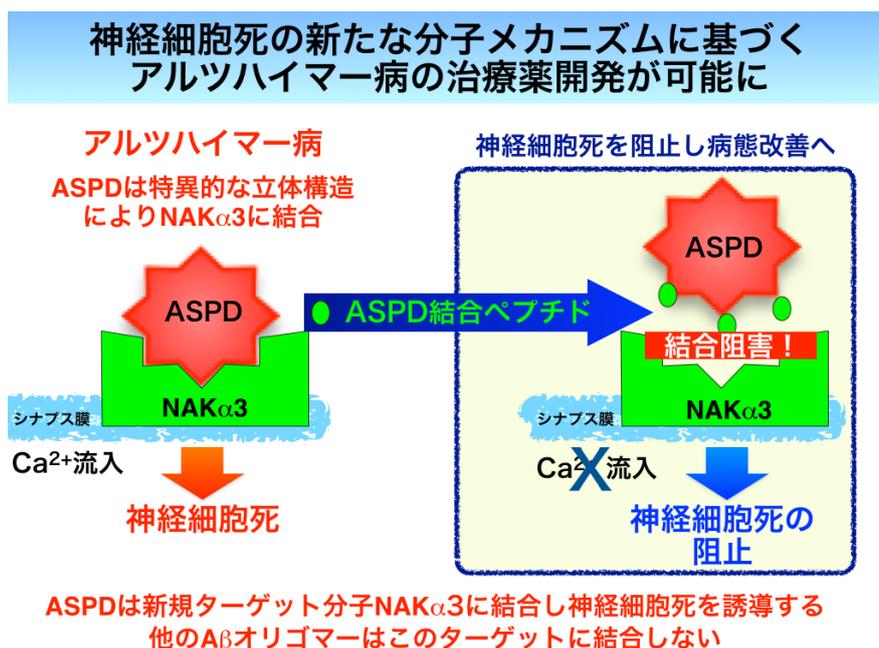
脳の機能は、神経細胞が「シナプス」という場を介してアクティブなネットワークを形成することで保たれています。認知症の約 6 割を占めるアルツハイマー病では、神経細胞のシナプスにまず異常が起こり最終的には神経細胞自体が失われることで脳の高次機能が低下します。最近の仮説では、この神経細胞の傷害は、生理的には単量体として作られているアミロイド β ($A\beta$) と呼ばれる小さいタンパク質が、凝集し「 $A\beta$ オリゴマー」と呼ばれる集合体を作ることによって神経細胞に対する毒性を持つためと考えられてきました。しかしながら、神経細胞死の原因となるオリゴマーの実体と、その分子メカニズムは殆ど解明されていませんでした。

星らは、これまでに、 $A\beta$ が約 30 個集まって直径 10-15 nm のサイズの球状構造を取ることで強い神経毒性を持つようになることを発見し、この新たな球状構造体を「アミロスフェロイド (amylospheroids; 以下 ASPD と略)」と命名しました (Hoshi et al. PNAS 2003)。さらに、ASPD を選択的に認識する抗体を作製し、この抗体を用いることで、アルツハイマー病患者脳内から ASPD を単離する方法を確立していました (Noguchi et al. JBC 2009)。

今回、上記の成果をさらに発展させることで、神経細胞死における ASPD のターゲットが、神経の生存と機能に極めて重要な役割を果たしているシナプスタンパク質「 Na^+ , K^+ -ATPase ポンプの $\alpha 3$ サブユニット (以下 $NAK\alpha 3$)」であることを初めて発見しました。ASPD の結合により $NAK\alpha 3$ の機能が低下し、

神経細胞が過剰に興奮することで、神経細胞は死に至ります。このような神経細胞の過剰興奮は、アルツハイマー病患者脳で神経細胞死が起きる初期の現象として報告されていましたが、そのメカニズムは不明でした。興味深いことに、ASPD は患者脳内に蓄積する Aβオリゴマーの約 6 割を占める主要な成分であり、患者脳における ASPD 存在量はアルツハイマー病の重症度と関連していました。

上記に加えて、本研究グループは、ASPD に結合する 4 アミノ酸のペプチドを発見し、この ASPD 結合ペプチドが ASPD 表面を覆い隠すことで、ASPD と NAKα3 との相互作用を阻止し神経細胞死を抑制することが出来ることも発見しました。ASPD 結合ペプチドの分子サイズは低分子化合物に匹敵するほど小さく、アルツハイマー病で起こる神経細胞死に対する新たな治療薬開発への道を拓きました（下図）。



図：ASPD は NAKα3 に結合し神経細胞死を誘導します（左）。ASPD に選択的なペプチドあるいはペプチド類縁化合物によって ASPD 表面をマスクすることで NAKα3 への結合を阻害し、ASPD による神経細胞死を抑制することが可能です（右）【図：星 美奈子博士 提供】

1. 背景

アルツハイマー病の原因と考えられている Aβは、正常では恒常的に単量体として作られています。アルツハイマー病では凝集し、脳のシミと呼ばれる老人斑を形成します。最近の研究から、老人斑の成分である線維状の Aβ集合体以外に、2量体から数 100 量体に亘る様々な種類の Aβオリゴマーと総称される集合体が患者脳にはあり、この Aβオリゴマーの方が線維よりも強い神経毒性を持つことが解ってきました。しかしながら、脳への Aβオリゴマーの蓄積が、神経細胞が死ぬことで臨床症状が表に出てくる時期よりもかなり早くから始まることが示唆されていたため、Aβオリゴマーが神経細胞死の直接原因であるかについては疑問視されていました。従って、神経細胞死の分子メカニズムについても、神経細胞死が阻止出来るかどうかについても、全く不明でした。特に、齧歯類を用いた従来のアルツハイマー病の病態モデルは、殆どの場合、シナプ스에異常が起きる疾患の初期段階にとどまり神経細胞死を伴わないため、ヒト脳で起きる病態を解明するためには患者由来の試料を用いることが重要と考えられました。

2. 研究手法・成果

上記を考慮して、本研究グループでは、新潟大学脳研究所の支援により、患者脳から ASPD を単離しました。そして、それを釣り針として用いて ASPD に相互作用する分子を探索したところ、神経細胞のシナプス表面だけに存在する NAK α 3 を見出しました。Na⁺, K⁺-ATPase ポンプは細胞の内外のイオンバランスを保持する極めて重要なポンプであり、神経細胞では細胞が生み出す ATP (エネルギー) の約 7 割を消費してその機能を果たしています。従って、ポンプの発現は厳密に制御されており、人工的な発現は非常に困難でした。そこで、愛媛大学の技術により無細胞発現系を使って合成した NAK α 3 をリポソーム膜に埋め込みました。この NAK α 3 を用いて、TAO ヘルスライフファーマ (株) の技術により ASPD が NAK α 3 に直接結合することを表面プラズモン共鳴装置により証明しました。また、NAK α 3 が確かに ASPD のターゲット分子であることは、自治医科大学の協力により AAV ウィルス遺伝子ベクターを用いて NAK α 3 の遺伝子発現量を下げること、ASPD の結合と神経細胞死が阻止されることで証明しています。

神経細胞では NAK α 3 の働きにより細胞膜の電位は約 -70 mV に保たれています。ASPD により NAK α 3 の機能が阻害されることでこの膜電位が上昇し、細胞は過剰に興奮し、膜の電位依存性カルシウムチャンネルが開いて細胞外から多量のカルシウムが流れ込み、ミトコンドリアの機能が破綻し、神経細胞は死に至ります。その過程で、アルツハイマー病の脳に特徴的に認められるタウのリン酸化も起こることが解りました。上記の一連の現象はいずれもアルツハイマー病で報告されている現象と良く一致しています。実際、新潟大学並びに京都大学の協力により、アルツハイマー病の患者脳では ASPD が蓄積している脳の部位で、NAK α 3 を発現する神経細胞が失われていることがわかりました。

興味深いことに、他の A β オリゴマーは NAK α 3 に結合しません。名古屋大学の協力により溶液 NMR を駆使することで ASPD の構造解析を行い、ASPD はその表面に棘のような構造が出ていることを示唆するデータを得ました。今回の結果を過去の結果と総合すると、ASPD は他の A β オリゴマーとは明確に異なる非常に特徴的な立体構造を取っており、表面にあるこの棘の部分で NAK α 3 と相互作用していると考えられました。一方、NAK α 3 は 10 回膜貫通タンパク質であり、細胞外に 5 つのループが出ていますが、そのうち細胞外ドメイン 4 の Asn879 と Trp880 を含む部位が ASPD との結合に重要な配列であることを見出しました。分子モデリングから NAK α 3 の構造シミュレーションを行ったところ、この ASPD 結合部位は外に露出しており ASPD が外からアクセス出来ることがわかりました。

本研究グループでは、ファージディスプレイ法により、ASPD に結合するペプチドをスクリーニングしたところ、ASPD に結合しその神経毒性を阻止する活性を持つ複数のペプチドを発見しました。そして、それらが全て共通なコア配列として NAK α 3 の細胞外ドメイン 4 にある ASPD 結合配列を持つことが解り、ASPD 結合配列の 4 アミノ酸からなるペプチドが患者由来 ASPD の結合と神経細胞死を抑制することを明らかにしました。4 アミノ酸の分子量は低分子化合物に匹敵するほどに小さいため、この配列を基盤として低分子化合物をデザインすることが可能であり、ASPD の神経毒性を抑制する低分子化合物の開発に繋がるのが期待されます。上記を踏まえて、本研究グループはアルツハイマー病治療の新たな戦略を提案するに至りました。

3. 波及効果

NAK α 3 はアルツハイマー病患者脳において神経細胞脱落が認められる部位に多く存在しており、過去の研究により患者脳において NAK α 3 の量や活性の低下が起きることが報告されていましたが、それが病

気の原因か結果かは不明でした。今回、初めて ASPD が NAK α 3 に直接結合することで神経細胞を死に至らしめることを証明しました。これにより、アルツハイマー病患者脳で起こる神経細胞死の分子メカニズムを明解に説明することが可能になりました。NAK α 3 の機能が低下することで起きる現象としてけいれん発作がありますが、アルツハイマー病の患者において神経細胞死が起こり始める最初の時期にけいれん発作が認められるという報告もあり (Vossel et al. JAMA Neurol. 2013)、今回明らかにした神経細胞死の分子メカニズムが患者脳内で実際に起きている可能性は充分考えられます。NAK α 3 はヒトでは染色体の 19q13.31 に存在していますが、神経細胞の機能と生存に取って極めて重要な分子であるために、NAK α 3 の異常はどのような異常であれ重篤な疾患 (rapid-onset dystonia parkinsonism (RDP), alternating hemiplegia of childhood (AHC), cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, and sensorineural hearing loss (CAPOS) syndrome) に繋がります。そのことを考えた場合、今回提案するように、NAK α 3 側ではなく、ASPD 側をマスクするというのはより安全性の高い治療法に繋がることが期待されます。

4. 今後の予定

今後、ASPD がどのように脳内で作られ、発症の時系列においていつ形成されるのかを明らかにしていく予定です。最近の研究からは、発症プロセスで、全ての A β オリゴマーが同時期に形成される訳ではないようだということが示唆されています (Lesné et al., Brain 2013)。ASPD の場合、健常な老人の脳では殆ど検出されないことから、A β が脳内に蓄積され始める初期からではなく、その後の段階で形成されているのではないかと考えており、今後の課題として取り組む予定です。また、NAK α 3 自体についても解明すべき課題は多く残されています。臨床応用については、ASPD 自体をワクチンとして用いる免疫療法、そして、ASPD 結合ペプチドから低分子治療薬を開発する方法の主に 2つの戦略が考えられますが、これについては京都大学発ベンチャーである TAO ヘルスライフファーマ株式会社において今後進めていく予定です。

<論文タイトルと著者>

Na,K-ATPase α 3 Is a Death Target of Alzheimer Patient Amyloid- β Assembly

Takayuki Ohnishi^{a,b1}, Masako Yanazawa^{c1}, Tomoya Sasahara^{a,b}, Yasuki Kitamura^c, Hidekazu Hiroaki^d, Yugo Fukazawa^e, Isao Kii^f, Takashi Nishiyama^{a,f}, Akiyoshi Kakita^g, Hiroyuki Takeda^h, Akihide Takeuchi^f, Yoshie Arai^{a,b}, Akane Ito^c, Hitomi Komura^{a,b}, Hajime Hiraoⁱ, Kaori Satomura^{a,b}, Masafumi Inoue^{a,b}, Shin-ichi Muramatsu^j, Ko Matsui^k, Mari Tada^g, Michio Sato^c, Eri Saijo^{a,b}, Yoshiki Shigemitsu^d, Satoko Sakai^{a,b}, Yoshitaka Umetsu^d, Natsuko Goda^d, Naomi Takino^b, Hitoshi Takahashi^g, Masatoshi Hagiwara^f, Tatsuya Sawasaki^h, Genji Iwasaki^l, Yu Nakamura^m, Yo-ichi Nabeshima^a, David B. Teplowⁿ, and Minako Hoshi^{a,c,f,2}

^aInstitute of Biomedical Research and Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation (FBRI), Kobe 650-0047, Japan; ^bTAO Health Life Pharma Co., Ltd. (TAO), Medical Innovation Center in Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan; ^cMitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences (MITILS; dissolved in March 2010);

^dDepartment of Basic Medicinal Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan; ^eDepartment of Histological and Physiological Sciences, Faculty of Medical Science, University of Fukui, Yoshida 910-1193, Japan; ^fDepartment of Anatomy and Developmental Biology, Graduate School of

Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; [§]Department of Pathology, Brain Research Institute, Niigata University, Niigata 951-8585, Japan; ^hProteo-Science Center, Ehime University, Matsuyama 790-8577, Japan; ⁱSchool of Physical and Mathematical Sciences, Nanyang Technological University, Singapore 637371; ^jDepartment of Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke 329-0498, Japan; ^kDivision of Interdisciplinary Medical Science, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai 980-8575, Japan; ^lFaculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare, Takasaki 370-0033, Japan; ^mDepartment of Neuropsychiatry, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa 761-0793, Japan; ⁿDepartment of Neurology, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA 90095

^lT.O. and M.Y. equally contributed to this work.

²To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hoshi.minako.8w@kyoto-u.ac.jp

<お問い合わせ先>

(研究内容に関すること)

星 美奈子 先端医療振興財団先端医療センター研究所 医薬品開発研究グループ

TEL: 078-303-3684 FAX: 078-303-3683

京都大学大学院医学研究科

TEL: 075-753-4341

E-mail: hoshi.minako.8w@kyoto-u.ac.jp ; 携帯番号 : 080-8316-9761

(報道に関すること)

公益財団法人先端医療振興財団 経営企画部企画課

TEL: 078-306-0806 E-mail: media@fbri.org

国立大学法人京都大学 企画・情報部広報課

TEL: 075-753-2071 FAX: 075-753-2094 E-mail: kohho52@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp