

【総説】

アルツハイマー病βアミロイド蛋白凝集機構解明から予防・治療薬開発へ

The development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease that inhibit the β-amyloid aggregation

金沢大学附属病院神経内科  
小野賢二郎

はじめに

20世紀初頭に登場したアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、増加の一途をたどり、今日の超高齢化社会において深刻な問題となっている。ADの病態や治療薬開発に関する研究は精力的に進められているが、依然、病態の全貌は不明であり、病態成立の中核をなす神経細胞死を抑制できる根本的治療薬はいまだに開発されていない。ADの病理学的特徴としては、アミロイドβ蛋白 (Aβ) から成る老人斑、タウ蛋白から成る神経原線維変化、さらに神経細胞脱落があげられる。なかでもADの病態生理においては、Aβがその前駆体蛋白質であるアミロイド前駆体蛋白から切り出され、異常凝集し、神経細胞を傷害する過程が重要な役割を果たすと考えられている (アミロイド仮説)<sup>1)</sup>。従ってアミロイド仮説の実態を明らかにすることがAD研究の最重要ターゲットとなっており、この仮説に基づいた診断法、治療法の開発も行われている。

1. Aβ凝集

Aβが凝集していく過程では、無構造のモノマーからβ-シートへの構造変換を起こし、続いて重合核が形成され、プロトファイブリル、さらには成熟線維 (fAβ) が形成される (図1)<sup>1)</sup>。従来脳アミロイドとして蓄積するfAβが神経毒性を発揮すると考えられていたが、最近、可溶性オリゴマーの毒性に注目が集まっている<sup>2)</sup>。

以上のことを背景にAβ凝集を制御する化合物の探索が行われており、実験系での効果だけでなく、臨床試験での有効性を有する化合物が報告されている。

2. 有機化合物のAβ凝集抑制

我々は、ADにおける様々な疫学的報告を背景にしてワイン関連ポリフェノール、クルクミン、ロスマリン酸、ニコチン等の有機化合物が、*in vitro*にてfAβ形成・伸長を抑制することを明らかにした (図2)<sup>2)</sup>。

さらに、Photo induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) を主に用いてブドウ種子由来ポリフェノールであるメガナチュラル (MN) が、Aβオリゴマー形成を抑制し (図3)、細胞毒性を軽減させることを明らかにした<sup>3)</sup>。また、MNが無構造状態からβ-シートへの2次構造変換やプロトファイブリル形成 (図4) を抑制する作用も有することを確認した<sup>3)</sup>。

その他に、*in vitro*において、我々以外のグループから、Aβ凝集抑制が報告されている化合物としては、リファンピシシ、メラトニン、ポリ硫酸化合物、クリオキノールなどがあげられる<sup>2)</sup>。

また、我々は、6及び10ヶ月齢ADモデルマウスに5ヶ月間MNを経口摂取させたところ、脳内のAβ沈着だけでなく、可溶性オリゴマーも減少させ、さらに高次脳機能障害も改善することを報告した<sup>4)</sup>。同様に、我々は、ロスマリン酸を5ヶ月齢ADモデルマウスに10ヶ月間経口投与すると脳内のAβ沈着だけでなく、オリゴマーも抑

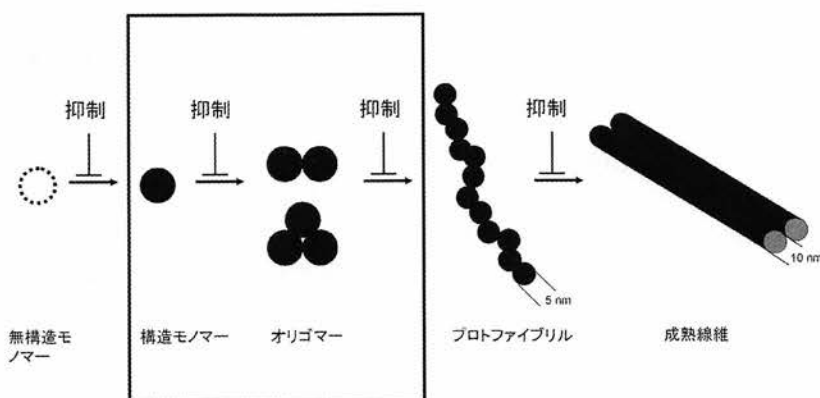


図1. Aβ凝集モデル

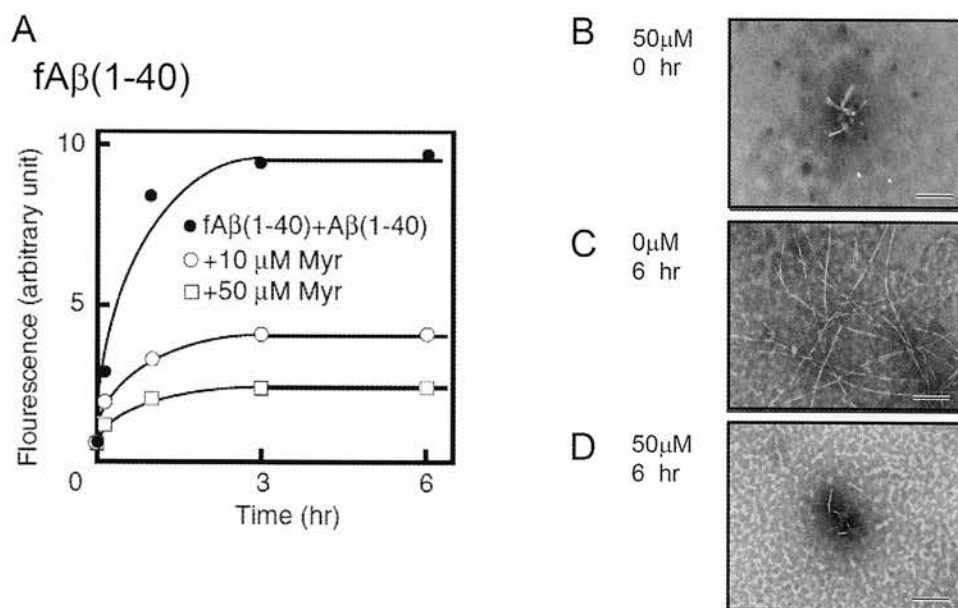


図2. Aβ線維伸長反応におけるミリセチン (Myr) の抑制効果

(A-D) Aβを超音波により切断したfAβ(B)と混合して37℃にてインキュベートすると、ThTの蛍光値が飽和曲線的に増加し、明らかな伸長反応を認める(C)。この混合液にワイン関連ポリフェノールであるミリセチンを加えるとThTの蛍光値が低下し、線維伸長を認めない(D)。

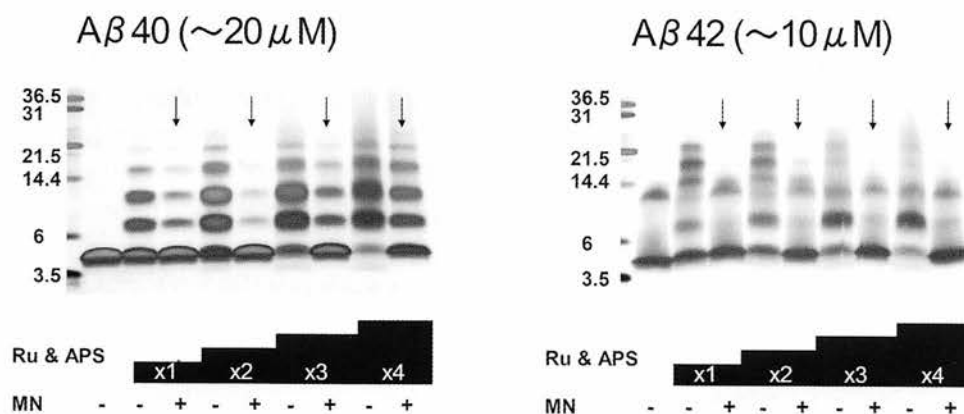


図3. Aβオリゴマー形成におけるメガナチュラル (MN) の効果

Aβ溶液にAPSとRuを加え、光照射を加えると、オリゴマーが形成される。しかし、この反応溶液にMNを加えると、オリゴマー形成が抑制される。

制されることも報告した<sup>9)</sup>。

その他に*in vivo*において、Aβ凝集抑制が報告されている化合物としては、クルクミン、ニコチン、メラトニン、ポリ硫酸化合物、クリオキノールなどがあげられる<sup>2) 6) 7) 8)</sup>。

Adlardらは、クリオキノールの脳内透過性を高めた次世代アナログであるPBT2を開発した。ADモデルマウスにPBT2を経口摂取させたところ、脳内の可溶性Aβを減少させ、さらに高次機能障害を改善させ、その効果はクリオキノールより強力であった<sup>9)</sup>。

Coleらは、10ヶ月齢ADモデルマウスに6ヶ月間クルクミンを投与すると、脳内のAβ沈着が抑制されることを報告し<sup>7)</sup>、その後、クルクミンが直接Aβに結合してオリゴマー形成を抑制することも報告している<sup>8)</sup>。

臨床試験が行われている化合物として、クルクミン、ポリ硫酸化合物、クリオキノールなどがある<sup>2)</sup>。

Ringmanらは、クルクミン複合体を軽度～中等度のAD患者33人に投与するphase II試験を行っている<sup>2)</sup>。

クリオキノールのアナログであるPBT2の臨床試験では、軽度～中等度のAD患者78人に対して、投与を行ったところ、前頭葉機能の有意な改善と脳脊髄液中のAβ42の有意な減少を認めた(phase II)<sup>9)</sup>。

### 3. Aβオリゴマーの構造毒性相関

従来、脳アミロイドとして蓄積するfAβが神経毒性を発揮すると考えられていたが、近年、可溶性オリゴマー、特に低分子オリゴマーに注目が集まっている<sup>1)</sup>。

可溶性オリゴマーは非常に不安定で生体濃度が低い

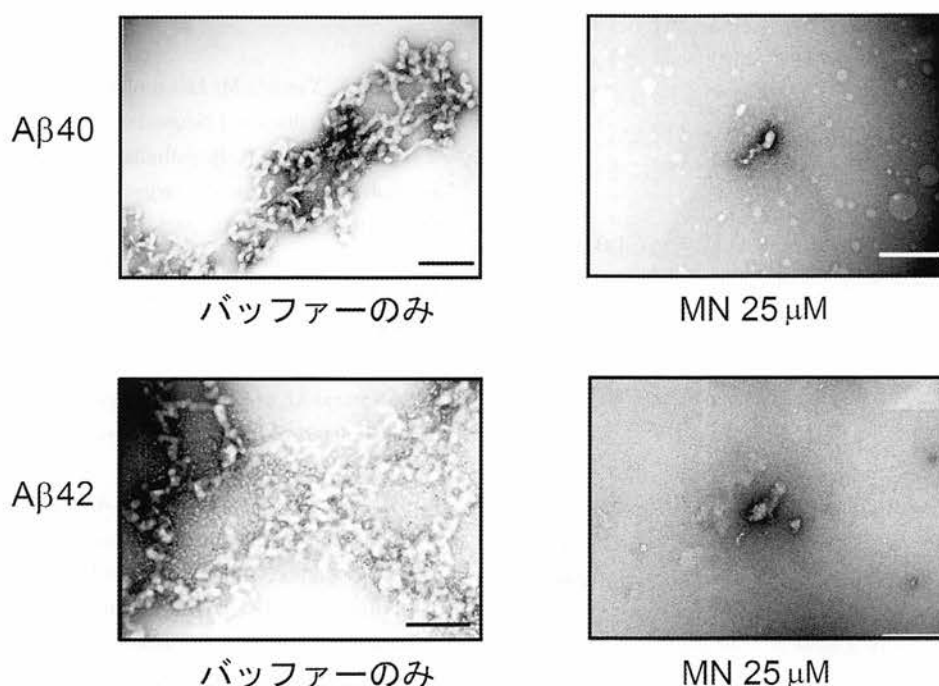


図4. A $\beta$ のプロトファイブリル形成におけるメガナチュラル (MN) の効果  
A $\beta$ を37℃にて10日間、インキュベートした後に分子排斥クロマトグラフィーにて分離すると、幅約7nmのプロトファイブリル形成を認めるようになるが、MNを加えるとプロトファイブリルはほとんど認められない。スケールバー=100nm。

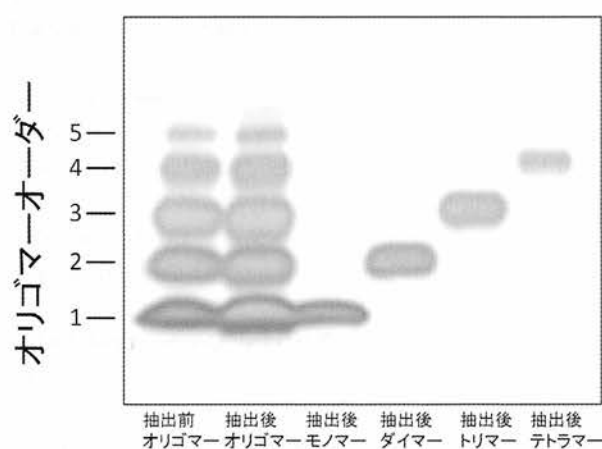


図5. A $\beta$ オリゴマーの電気泳動

め、生化学的研究は不可能とされてきたが、我々は、PICUPを用いて可溶性オリゴマーを安定化した状態で分離して抽出することに成功し(図5)、抽出されたオリゴマーを用いて解析をおこなった結果、ダイマー、トリマー、テトラマーがモノマーに比し、 $\beta$ -シート構造の割合やseeding効果が増加し、それに伴い、形態学的にも増大することを明らかにした。さらにオーダー依存性に細胞毒性も増加することを明らかにした<sup>1)</sup>。

さらに、最近、我々は、イングランド型や鳥取型変異A $\beta$ は、野生型に比較してオリゴマー形成が促進され、それに伴い $\beta$ -シート構造の割合、seeding効果、細胞毒性も増加することを明らかにした<sup>1)</sup>。

#### 4. AD患者試料によるA $\beta$ 凝集への影響の解析

当教室では、神経内科外来に「もの忘れ外来」を開設し、もの忘れを主訴とする患者の診療を行いながら、そこで得られた臨床データおよび検体をもとにADの新規診断法の開発や病態解明を目的とした研究を行っている。

その一端として、ADおよびnon-AD患者の脳脊髄液が試験管内fA $\beta$ 形成に及ぼす影響を解析した結果、リン酸緩衝生理食塩水での線維形成に比べて脳脊髄液でのfA $\beta$ 形成反応は、ADおよびnon-AD患者のいずれにおいてもより抑制されるが、non-AD患者の方がさらに抑制されることが分かった<sup>10)</sup>。さらにAD患者におけるfA $\beta$  40, fA $\beta$  42形成の程度は脳脊髄液中のA $\beta$  42濃度と有意に負の相関を示し、fA $\beta$  42形成の程度は、AD患者における重症度評価法の1つであるClinical Dementia Rating (CDR) と有意に正の相関を示すこと確認した<sup>10)</sup>。さらに我々は、最近、PICUPを用いてAD患者の脳脊髄液は、non-AD患者に比較してオリゴマー形成を促進する環境を有していることを報告した<sup>11)</sup>。

#### 5. $\alpha$ -シヌクレイン蛋白( $\alpha$ S)凝集

パーキンソン病やレビー小体型認知症といったLewy body disease (LBD) の薬物療法は現在、特効薬はなく、病態形成上重要な役割を果たしているとされる $\alpha$ Sの凝集と神経変性にターゲットをしばった研究が全世界で精力的に行われている。 $\alpha$ Sが凝集して $\alpha$ シヌクレイン線維(f $\alpha$ S)を形成する過程は、A $\beta$ と同様に、まず、(1)  $\alpha$ Sが核、あるいは種を形成するフェーズ(重合核

形成相), 次に (2) それに  $\alpha$ S が次々と結合して線維が形成されていくフェーズ (線維伸長相) が推定されている<sup>12)</sup>. 従来, レビー小体として蓄積する  $f\alpha$ S が神経毒性を発揮すると考えられていたが,  $A\beta$  と同じく, プロトファイブリルや可溶性オリゴマーの研究にも注目が集まっている<sup>13)</sup>.

我々は,  $\alpha$ S の異常凝集抑制という観点から LBD の新規予防・治療薬を開発することを目的として, 試験管内  $f\alpha$ S 形成・分解機構解明のための基本モデルを開発・確立し, このモデルを用いて  $f\alpha$ S 形成・不安定化過程に及ぼす様々な有機化合物の影響を解析した. その結果, ワイン関連ポリフェノール, タバコの主成分であるニコチン, カレースパイスの主成分であるクルクミンやビタミン A 類といった物質が,  $f\alpha$ S の形成を抑制するばかりでなく, すでに形成された  $f\alpha$ S をも不安定化することを明らかにし, LBD の予防・治療薬としての可能性を提唱した<sup>14)</sup>. 最近, Fink らのグループは, フラボノイドの一種であるバイカレインや抗生物質の一種であるリファンピシンが,  $f\alpha$ S の形成を抑制するばかりでなく, 既成の  $f\alpha$ S も脱重合させることを明らかにして, その機序としては  $\alpha$ S に結合することでオリゴマーを安定化させることを提唱している<sup>14)</sup>. 最近, Ehrnhoefer らは, ポリフェノールの 1 つである (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) が  $\alpha$ S 凝集を抑制する機序として, EGCG が無構造なモノマーに結合することで通常の凝集経路とは別の経路 (off-pathway) に進むことで凝集が抑制されることを報告している<sup>15)</sup>.

## おわりに

$A\beta$  凝集抑制薬候補として, *in vitro* だけでなく, *in vivo* 実験系においても凝集抑制効果を示し, 臨床試験まで進んでいる化合物が報告されている.  $\alpha$ S 凝集抑制薬開発の研究も近年, 精力的に行われている.  $A\beta$  および  $\alpha$ S 凝集制御薬は, AD および LBD の根本治療において重要な位置を占める可能性がある.

## 謝辞

まず, 研究および本総説執筆にあたり, 終始多大なるご指導, ご鞭撻を賜りました金沢大学大学院医学保健学総合研究科脳老化・神経病態学 (神経内科学) 講座 山田正仁教授に深謝します. また, アミロイド研究の基礎をご指導下さった福井大学分子病理学 内木宏延先生, ロサンジェルスで最高の思い出をプレゼントして頂いたカリフォルニア大学ロサンジェルス校神経学 David B. Teplow 先生に深く感謝します. 上述の 3 人のボス以外に, 国立長寿医療センター研究所 (高島明彦先生, 吉池裕二先生), カリフォルニア大学ロサンジェルス校神経学教室, マウントサイナイ病院精神医学 (Giulio M. Pasinetti 先生), そして, 金沢大学大学院脳老化・神経病態学 (神経内科学) 教室員の関係各先生方に深く感謝します. 最後に, 今回の執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会編集委員長 井関尚一教授ならびに関係方々に厚くお礼申し上げます.

## 文 献

- 1) Ono K, Yamada M: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 117: 19-28, 2011
- 2) Yamin G, Ono K, Inayathullah M, et al: Amyloid  $\beta$ -protein assembly as a therapeutic target of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 14, 3231-3246, 2008
- 3) Ono K, Condrón MM, Ho L, et al: Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid  $\beta$ -protein self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem* 283, 32176-32187, 2008.
- 4) Wang J, Ho L, Zhao W, et al: Grape seed extract MegaNatural-AZ prevents  $A\beta$  oligomerization and attenuates cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28, 6388-6392, 2008
- 5) Hamaguchi T, Ono K, Murase A, et al: Phenolic compounds prevent Alzheimer's pathology through different effects on the amyloid  $\beta$  aggregation pathway. *Am J Pathol* 175, 2557-2565, 2009
- 6) Adlard PA, Cherny RA, Finkelstein DI, et al: Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial  $A\beta$ . *Neuron* 59, 43-55, 2008
- 7) Lim GP, Chu T, Yang F, et al: The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370-8377, 2001
- 8) Yang F, Lim GP, Begum AN, et al: Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*. *J Biol Chem* 280, 5892-5901, 2005
- 9) Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, et al: Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting  $A\beta$  as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 7, 779-786, 2008
- 10) Ono K, Noguchi M, Matsumoto Y, et al: Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes  $\beta$ -amyloid fibril formation *in vitro*. *Neurobiol Dis* 20, 233-240, 2005
- 11) Ikeda T, Ono K, Elshoff D, et al: Cerebrospinal fluid of Alzheimer patients promotes amyloid  $\beta$ -Protein oligomerization. *J Alzheimers Dis* 21, 81-86, 2010
- 12) Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, et al:  $\alpha$ -synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem* 274, 19509-19512, 1999
- 13) Goldberg MS, Lansbury PT Jr: Is there a cause-and-effect relationship between  $\alpha$ -synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2, E115-119, 2000
- 14) Ono K, Hirohata M, Yamada M:  $\alpha$ -synuclein assembly as a therapeutic target of Parkinson's disease and related disorders. *Curr Pharm Des* 14, 3247-3266, 2008
- 15) Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, et al: EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol* 15, 558-566, 2008