



京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)  
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構

## アルツハイマー病病因物質を低減させる既存薬カクテルの同定

～患者由来 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニングと *in vitro* トライアル～

### ポイント

- アルツハイマー病 (AD) <sup>注1</sup> の病因物質と考えられている、アミロイドベータ ( $A\beta$ ) <sup>注2</sup> を低減させる効果のある化合物を探索するため、患者さん由来 iPS 細胞から作製した高純度の脳皮質神経細胞を用いたスクリーニング系を確立した。
- スクリーニングに続いて、効果のあった化合物群をケモインフォマティクス<sup>注3</sup>により分子構造式の類似性にもとづいて分類し、アミロイドベータを相乗的に低減させる効果がある 3 種類の既存薬の組合せ (カクテル) を同定した。
- 同定した既存薬カクテルの多人数の AD 患者さんでの効果を推定するために、家族性および孤発性 AD 患者さんの細胞を用いた *in vitro* トライアル<sup>注4</sup>を実施し、有効性を確認した。

### 1. 要旨

近藤孝之特定拠点助教および井上治久教授 (京都大学 CiRA 増殖分化機構研究部門幹細胞医学分野・理化学研究所バイオリソースセンター創薬細胞基盤開発チーム) らの研究グループは、アルツハイマー病患者さん由来 iPS 細胞を用いた化合物スクリーニング系を構築し、アルツハイマー病の病因物質のひとつである、アミロイドベータ ( $A\beta$ ) を減らす事ができる既存薬の組み合わせ (カクテル) を見出しました。 $A\beta$  を標的とするアルツハイマー病の薬物治療においては、発症前から長期間の投薬が必要と考えられています。そこで、すでに市場で長期間の安全性に関する情報が整備されている既存薬のスクリーニングを行いました。スクリーニングの後、効果のあった化合物群をケモインフォマティクスにより分子構造式の類似性にもとづいて分類し、相乗的な組み合わせ (カクテル) を見出しました。同定した既存薬カクテルは、家族性アルツハイマー病及び孤発性アルツハイマー病の 10 余名の患者さんの iPS 細胞から分化誘導した脳皮質神経細胞において  $A\beta$  の減少効果を示しました。この *in vitro* トライアルは、多人数の患者さんにおける効果や有効性の個人差の推測に有用であることがわかりました。

この研究成果は2017年11月21日正午（米国時間）に米国科学誌「Cell Reports」でオンライン公開されました。

## 2. 研究の背景

アルツハイマー病（AD）は、認知症の中で最も多い疾患であり、遺伝子変異が原因で起こる家族性ADと、家族歴のない孤発性ADに大別されます。どちらの種類も、大脳皮質の神経細胞内にアミロイドベータ（ $A\beta$ ）が蓄積することが病因のひとつと考えられています。家族性ADの原因遺伝子であるアミロイド $\beta$ 前駆体タンパク（APP）やプレセニン1（PSEN1）に変異があると、 $A\beta$ が増えることが知られています。一方で、アイスランドにおける全ゲノム解析コホート研究<sup>注5</sup>において、 $A\beta$ を30~45%程度減らす効果があるAPP A673T変異はAD発症や認知機能低下に保護的に働くことがわかりました（Jonsson T et al., Nature, 2012;488;96, Maloney J. et al., J Biol Chem., 2014;289;30990）。すなわち、 $A\beta$ 量がADの発症に強く関連しており、 $A\beta$ は重要なADの治療標的といえます。しかし、AD患者さんの脳内の $A\beta$ 蓄積は、認知症症状が生じるよりも二十年ほど前から始まっていることが知られており（図1）、 $A\beta$ を標的とする治療薬は数十年の間投与できる安全性が求められます。これまで、 $A\beta$ の産生を行う酵素の作用を直接抑える化合物が数多く作製されましたが、いくつかの臨床試験においては副作用の発露によりその試験が中止されています。そのため未知の作用に対する慎重な配慮のもと臨床試験が進められています。

そこで本研究グループは、長期間の内服に関する安全性情報が整備されている既存薬の中から $A\beta$ を低減させる化合物を見出すことにしました。患者さん由来のiPS細胞から迅速かつ大量に高純度の脳皮質神経細胞を作製する技術を用いてスクリーニング系の構築研究に取り組みました。

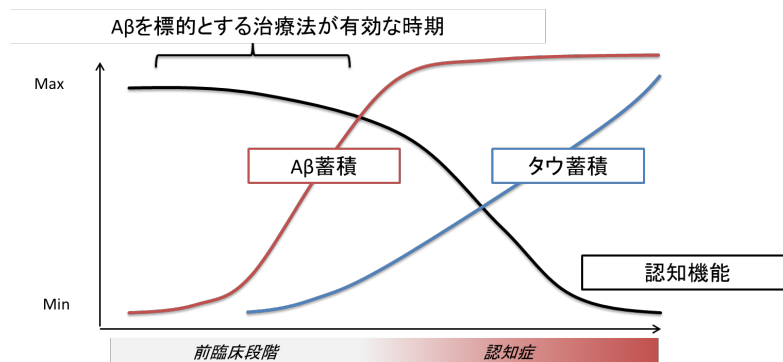


図1：アルツハイマー病の病態自然経過と $A\beta$ を標的とする治療法が有効な時期（Jack CR, Lancet Neurol., 2010;9;119より改変）

## 3. 研究結果

### 1) 患者さん由来 iPS 細胞を用いて化合物スクリーニング系を構築

#### ① 患者さん由来 iPS 細胞から高効率で大脳皮質神経細胞を作製する方法

ADの病理学的特徴を厳密に再現し、多くの化合物の効果を調べる化合物スクリーニングを行うためには、患者さん由来 iPS 細胞から迅速かつ大量に純度の高い脳皮質神経細胞を作製することが必要です。本研究グループが用いた細胞株では、iPS細胞にNGN2遺伝子を発現させた後、8日後にほぼ100%の純度で脳皮質神経細胞が得られています。

#### ② 患者さん由来の脳皮質神経細胞がアルツハイマー病の病態を再現

$A\beta$ には構成するアミノ酸の長さが異なるいくつかの種類があり、特に毒性が高い種類である $A\beta$ 42は、家族性ADの原因となるPSEN1遺伝子変異があると増加することが知られています。そこで、PSEN1遺伝子に変異がある家族性AD患者さんの皮膚線維芽細胞から樹立したiPS細胞を用いて、①の方法に

より大脳皮質神経細胞を分化誘導しました。同時に PSEN1 遺伝子の変異をゲノム編集技術<sup>注6</sup>により修復した細胞株と比較することで、PSEN1 遺伝子変異が A $\beta$  に与える影響を調べました。これより、PSEN1 遺伝子変異が存在すると、培養上清中で測定される A $\beta$  42 の産生量が多いことがわかりました。さらに、同じ家族性 AD 患者さんの末梢血単核球細胞から iPS 細胞を樹立して分化誘導した大脳皮質神経細胞は、線維芽細胞由来の iPS 細胞を用いた場合と同様の A $\beta$  産生動態を示しました。これらのことから、本研究で構築した A $\beta$  評価系は、異なる体細胞由来の異なる iPS 細胞株であっても、AD 患者さんの表現型を反映することがわかりました。この A $\beta$  評価系は既存の A $\beta$  産生調製化合物にも濃度依存性に反応し、化合物スクリーニングに適応できることが確認されました。

## 2) アミロイドベータの蓄積を抑える既存薬の組合せの探索

次に、A $\beta$  の産生を抑制する既存薬の探索を行いました。スクリーニングには、長期間内服に関する安全性情報が整備されている 1,258 種類の既存薬で構成される化合物ライブラリを用いました。スクリーニングの結果、細胞毒性が低く、細胞培養上清中の A $\beta$  42 量を低下させる化合物を選び出しました(図 2)。

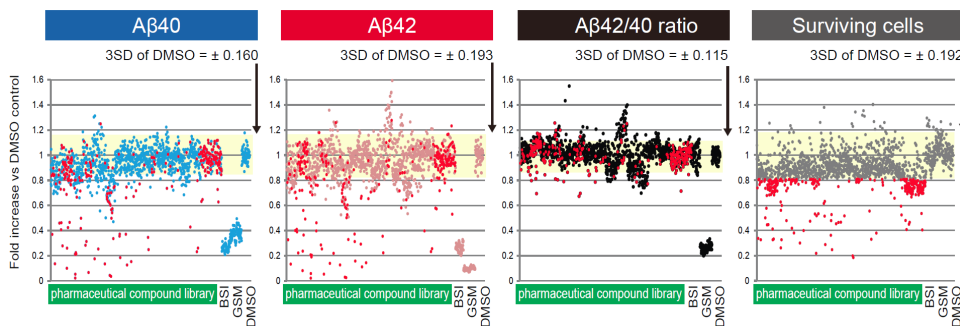


図 2：培養上清中 A $\beta$  の変動を指標としてスクリーニングを実施

横軸はライブラリの異なる化合物、および陽性コントロールの  $\beta$ -セクレターゼ阻害薬 (BSI)、 $\gamma$ -セクレターゼ調製薬 (GSM)、陰性コントロールとして用いた化合物溶媒 (DMSO) を示す。縦軸は DMSO のみを添加した際の A $\beta$  量を 100%とした時の、相対変化率を示す。グラフは左から A $\beta$  40・A $\beta$  42・A $\beta$  42/40 比率 (数値が低いほど薬効が高い)、生細胞のプロット図 (数値が低いほど毒性が強い) を示す。

一方で、見出した化合物の A $\beta$  低減効果は、既知の  $\beta$ -あるいは  $\gamma$ -セクレターゼ阻害作用をもつ化合物と比べて弱いものでした。そこで、化合物を組み合わせることで A $\beta$  低減効果を増強することを目的として、A $\beta$  低減効果のあった化合物を分子構造式の類似性にもとづいて 10 種類のグループに分類しました。それぞれのグループから用量依存性が明確で最も A $\beta$  低減効果が強い 6 種類の化合物、プロモクリプチン・シロスタゾール・クロモリン・フルバスタチン・プロブコール・トピラマートを選び出しました。

次に、6 種類の化合物を組み合わせることで A $\beta$  の低減効果を最大化するために、2 種あるいは 3 種の総当たりで化合物を組み合わせ、それぞれの A $\beta$  産生動態に与える影響を比較しました。すると、プロモクリプチン、クロモリン、トピラマートの 3 種類の組合せ (BCroT) において最も A $\beta$  の低減効果が高まることがわかりました。さらにこの BCroT の組み合わせにおいても、用量依存性の効果が明確に見られました。

## 3) 家族性 AD および孤発性 AD 患者さんの iPS 細胞での BCroT の効果検証

BCroT が多様な AD に対して効果があるのかを調べるため、スクリーニングに用いた患者さんに加えて、PSEN1 遺伝子または APP 遺伝子に変異のある家族性 AD 患者さん、孤発性 AD 患者さん、健常者由来の iPS 細胞および家族性 AD 患者さん由来の細胞の遺伝子変異を修復した iPS 細胞から作製した大脳神経細

胞に BCroT を添加し、 $A\beta$  の産生を抑える効果を検証しました。すると、個人差はあるものの、すべての患者さんの大脳神経細胞において BCroT は  $A\beta 42$  および  $A\beta 40$  の産生量を 30%以上低下させることがわかりました (図 3)。

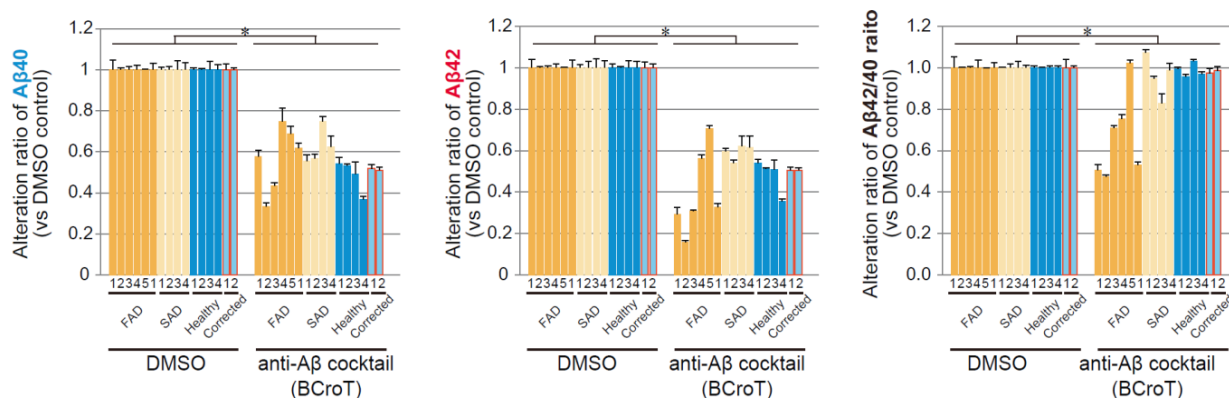


図 3 : BCroT をさまざまなアルツハイマー病患者さんの大脳神経細胞に添加したときの  $A\beta 40$  の相対量 (左)、 $A\beta 42$  の相対量 (中央)、 $A\beta 42/40$  比率の相対値 (右)

FAD : 家族性 AD 患者さん、SAD : 孤発性 AD 患者さん、Healthy : 健常者、Corrected : 家族性 AD 患者さんの遺伝子変異を修復、DMSO : 化合物溶媒である DMSO のみを添加した陰性コントロール、既存薬カクテル(BCroT) : BCroT を加えたときの結果。縦軸は DMSO を添加した際の  $A\beta$  量を 100%とした時の、相対変化率を示す (数値が低いほど薬効が高い)。

#### 4. まとめ

本研究では、AD 患者さん由来の iPS 細胞を用いて、AD の病因のひとつである  $A\beta$  の産生を抑える効果のある化合物を探索するためのスクリーニング系を確立、相乗効果のある 3 種類の化合物の組合せ BCroT を同定しました。BCroT は家族性 AD 患者さんおよび孤発性 AD 患者さん iPS 細胞由来の大脳神経細胞の  $A\beta$  の産生を抑える効果があることがわかりました。 $A\beta$  を低減させる既存薬カクテルである BCroT を構成する、プロモクリプチン・クロモリン・トピラマートは臨床で使われている薬剤で、長期間の内服に関する安全性情報が整備されています。本研究で行った iPS 細胞モデルを用いた既存薬の同定によって、今後、長期間の安全性が必要なアルツハイマー病の治療薬開発が進展することが期待されます。

#### 5. 論文名と著者

##### ○ 論文名

iPSC-based compound screening and *in vitro* trials identify a synergistic anti-amyloid  $\beta$  combination for Alzheimer's disease

##### ○ ジャーナル名

Cell Reports

##### ○ 著者

Takayuki Kondo<sup>1,2</sup>, Keiko Imamura<sup>1,2</sup>, Misato Funayama<sup>1</sup>, Kayoko Tsukita<sup>1</sup>, Michiyo Miyake<sup>1,2</sup>, Akira Ohta<sup>1</sup>, Knut Woltjen<sup>1,3</sup>, Masato Nakagawa<sup>1</sup>, Takashi Asada<sup>4</sup>, Tetsuaki Arai<sup>4</sup>, Shinobu Kawakatsu<sup>5</sup>, Yuishin Izumi<sup>6</sup>, Ryuji Kaji<sup>6</sup>, Nobuhisa Iwata<sup>7,8</sup>, Haruhisa Inoue<sup>1,2\*</sup>

\*責任著者

##### ○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所

2. 理化学研究所バイオリソースセンター創薬細胞基盤開発チーム
3. 京都大学白眉センター
4. 筑波大学附属病院精神神経科
5. 福島県立医科大学会津医療センター精神医学講座
6. 徳島大学大学院医歯薬学研究部臨床神経科学（神経内科）
7. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科ゲノム創薬学研究室
8. 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科認知症創薬研究ユニット

## 6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金その他の支援を受けて実施されました。

- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生医療実用化研究事業
- 国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）再生医療実現拠点ネットワークプログラム（iPS細胞研究中核拠点）
- 科研費若手研究（B）（17K16121）

## 7. 用語説明

### 注1) アルツハイマー病（AD）

ドイツの精神科医、アルツハイマー博士により 1905 年に報告された進行性の記憶障害を伴う認知症。中高年で発病し、徐々に進行して生活に支障をきたすようになり、最終的には意思疎通ができなくなる。その病理特徴としては、脳内に老人斑といわれるタンパク質の沈着が見られ、この老人斑の主成分がアミロイドベータ（注2）であることから、アミロイドベータの過剰な蓄積がアルツハイマー病の発症に深く関わっていると考えられてきた。我が国でも患者数は数百万人で、進行を止める治療がない現状のままでは、今世紀半ばには世界で1億人に達するとされる。

### 注2) アミロイドベータ（A $\beta$ ）

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である APP がコードするアミロイド $\beta$ 前駆体タンパクから、 $\beta$ -セクレターゼ・ $\gamma$ -セクレターゼなどの酵素切断の結果産生される。近年の大規模ヒト遺伝医学的研究から、A $\beta$ 産生が低下すると AD の発症が抑制されることが示されている。

### 注3) ケモインフォマティクス

計算機と情報処理技術を化学領域の問題に適応し解決を目指す研究手法。本研究においては、スクリーニングで見出された化合物群と A $\beta$  産生を制御することが知られている化合物群の構造式を、計算機が処理しやすい線形表記に変換して一度に構造式の類似性検討を行い、化学構造が類似するクラスに分類した。

#### 注 4) *in vitro* トライアル

様々なヒト（患者さんや健常者）を対象として新しい治療法の有効性を検討する臨床試験（トライアル）とはことなり、様々なヒト（患者さんや健常者）由来の細胞を用いて *in vitro* 環境下（培養皿の中）で新しい治療法の薬効を検討するという研究手法。疾患関連遺伝子を過剰発現することでモデル化したがん細胞株や動物では評価することができない、ヒトの個性を反映した薬効評価を行うことが出来ると期待される。

#### 注 5) 全ゲノム解析コホート研究

被験者のゲノムを解析し、特定の要因をもつ集団とそうでない集団について一定期間追跡調査を行い、疾患の発症率などを比較する研究。

#### 注 6) ゲノム編集技術

部位特異的にはたらく DNA 切断酵素を用いて、目標とするゲノム領域を編集する技術。