

令和3年12月8日

〈研究課題〉 NRBP1-BRI2 間の相互作用を標的とする新規認知症治療薬の開発

代表研究者 高知大学 教育研究部医療学系 基礎医学部門 教授 麻生 悌二郎

共同研究者 高知大学 教育研究部医療学系 基礎医学部門 講師 安川 孝史

【まとめ】

アルツハイマー病(AD)に対する根本治療薬の開発を目指して、NRBP1とBRI2間の相互作用を特異的に阻害する化合物の探索を行った。次いで、取得したヒット化合物を用いて本創薬コンセプトの妥当性を検証した結果、少なくとも2つの化合物が、細胞内BRI2/BRI3タンパク質量の増加と共にアミロイド β (A β)産生の有意な抑制を誘導することが判明し、POC(proof of concept)の取得に成功した。

1. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)は認知症の原因疾患として最も頻度が高いが、根治療法は存在せず、その開発が急務である。BRI2とその相同因子BRI3は、アミロイド前駆体(APP)上の β -並びに γ -セクレターゼの結合部位をマスクしてAPPのプロセッシングを阻害し、アミロイド β (A β)の産生を抑制する。両因子はA β とも相互作用してA β オリゴマーの形成も抑制する。さらに、BRI2はInsulin degrading enzyme (IDE)の細胞からの分泌量を増加させ、A β の分解も促進する。同時にBRI2は、2型糖尿病の発症および同病へのAD合併に深く関与する膵島アミロイドポリペプチド(IAPP)のオリゴマー形成の抑制やIDEを介したIAPPの分解促進にも寄与する。また、BRI2遺伝子の片アレルの変異は、正常BRI2タンパク質量の減少によるA β 産生の亢進を招き、AD類似の臨床症状と神経病理学的所見を示す常染色体優性遺伝性

の家族性英国型認知症(Familial British Dementia; FBD)並びに家族性デンマーク型認知症(Familial Danish Dementia; FDD)の発症原因にもなる。最近、AD発症早期患者の海馬においても、APPと結合してプロセッシング抑制に寄与しているBRI2タンパク質量の減少が認められることが判明し、FBD/FDDのみならずADの発症にもBRI2の抗AD作用の低下が関与していることが示唆されている(Del Campo M. et al. *J Alzheimers Dis.* 2014; Del Campo M. et al. *Neurobiol Aging* 2014)。

最近申請者らは、NRBP1を基質認識タンパク質としてもつユビキチンリガーゼ複合体(NRBP1-E3)がBRI2とBRI3を選択的にユビキチン(Ub)化してプロテアソームによる分解へと導くことを発見した。また、神経系細胞におけるNRBP1の機能阻害が、細胞内BRI2/BRI3タンパク質量の増加と共にA β 産生量の有意な減少を誘導することを明らかにした(Yasukawa T., Aso T. et al. *Cell Rep.* 2020)。以上より、NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用を特異的に阻害する化合物を開発すれば、両BRI因子の抗AD機能を人為的に活性化させることが可能となり、ADに対する根本治療薬の創製に資するのではないかと着想した。

本研究では、NRBP1とBRI2間の相互作用を特異的に阻害する化合物の探索を行い、内在性BRI2/BRI3タンパク質量の増加並びにA β 産生の有意な抑制を誘導するヒット化合物の同定を目指す。

2. 研究方法と経過

2-1 HTS(一次/二次評価): NRBP1-BRI2 間の相互作用を阻害する化合物を選抜する。

BRI2の方がBRI3に比べて強力なA β およびIAPPへの毒性低減作用を有するため、High Throughput Screening(HTS)にはBRI2を用いる。

分泌型 *Gussia* luciferase(Gluc)をN末端側(luci; Gn)とC末端側(ferase; Gc)の2つの断片に分割して不活性体とし、それぞれをBRI2、NRBP1と連結させて、BRI2-Gn、NRBP1-Gcの2種類の発現ベクターを作製した。両融合体を培養細胞で共発現させた際、BRI2とNRBP1が相互作用できる場合に限りGnとGcとが近接して培養上清のGluc活性が回復し発光が検出されるが、化合物によりBRI2-NRBP1間の相互作用が阻害されると発光が見られなくなる二分子発光補完法を用いる。

(a) 一次評価: 化合物濃度 5 μ Mにて、NRBP1-BRI2間の相互作用に対する阻害率が50%以上を示し、かつ細胞増殖阻害率が50%以下である化合物を選抜する。

(b) 二次評価: 濃度依存的にNRBP1-BRI2間の相互作用を阻害する化合物を選抜する。また、全長Glucへの阻害作用を調べるカウンター試験を行い、非特異的な阻害を示す化合物を除外する。

2-2 三次評価: NRBP1-E3によるBRI2のUb化を阻害する化合物に絞り込む。

NRBP1と分子シャペロン様機能を発揮するTSC22D3/TSC22D4を安定発現する293T細胞株にBRI2とHA-tagを付加したTR-TUBE(トリプシン抵抗性Ub鎖結合タンパク質)を共発現させ、化合物を添加して48時間(h)培養する。細胞抽出液を抗HA抗体で免疫沈降(IP)した後、抗BRI2抗体による免疫ブロット(WB)を行い、Ub化BRI2量を調べる。

2-3 高次評価: (a) BRI2/BRI3の細胞内含量の増加、(b) A β 産生の抑制、の両方を誘導するものを真のヒット化合物とする。

A β 産生総量の増加を招くSwedish変異を導入したAPPを安定発現するヒト神経系SH-SY5Y細胞株の培養系に化合物を添加、48h後に培養上清と細胞を回収し、(a)細胞内BRI2/BRI3タンパク質量をWBで、(b)培養上清中のA β 40、A β 42の濃度をELISAキットで、それぞれ調べる。

3. 研究の成果

3-1 HTS(一次/二次評価)の結果

理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム(理研DMP)の支援のもと、約3万種類の化合物(低分子化合物:9600個、天然物化合物:20393個)を含むライブラリーを対象に二分子発光補完法による一次評価を実施し、439個のヒット化合物(低分子:175個、天然物:264個)を得た。次いで、濃度依存性試験とカウンター試験から成る二次評価により偽陽性を除外して、88個のヒット化合物(低分子:35個、天然物:53個)を得た。

3-2 三次評価の結果

TR-TUBE法を用いてNRBP1-E3によるBRI2のUb化を濃度依存的に阻害するものを選抜し、12個のヒット化合物(低分子:2個、天然物:10個)を得た。

3-3 高次評価の結果

本創薬コンセプトの妥当性の検証のため、三次ヒット化合物を神経系培養細胞SH-SY5Yに添加したところ、少なくとも2つの化合物が、細胞内BRI2/BRI3タンパク質量の増加と共にA β 40並びにA β 42産生の有意な抑制を誘導することが判明し、POC(proof of concept)の取得に成功した。

4. 今後の課題

今回のスクリーニングでは、低分子化合物と天然物由来化合物のライブラリーを用い

たが、低分子化合物からはヒットが得られず、天然物由来の2つの化合物のみが真のヒットとして同定された。しかし、両ヒットとも分子構造が複雑なため合成展開を進めるのが困難という問題に直面している。また、タンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) の表面は比較的平坦で広いことが多いため、低分子の化合物から特異性の高い阻害剤を見出すのは容易でないことが示唆された。

そこで次回は、(i) PPI の阻害が期待できる、(ii) 合成展開が可能、(iii) 細胞膜透過が可能、等の特性を備えた中分子化合物のライブラリーを用いてスクリーニングを実施する予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究に関連する研究成果は、学会発表をすると共に、原著論文として学術誌へ投稿する予定である。