

<研究課題> 抗アルツハイマー病因子 BRI2/BRI3 のユビキチン化阻害による革新的認知症創薬

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

【抄録】

アルツハイマー病に対する根本治療薬の開発を目指して、中分子化合物（55,295 サンプル）のライブラリーを対象に NRBP1 と BRI2 間の相互作用を特異的に阻害する化合物のハイスループットスクリーニング（HTS）を実施した。同定した 13 個のヒット化合物について培養細胞を用いた三次/高次評価を行った結果、類似構造をもつ 2 つの化合物が濃度依存的な BRI2 ユビキチン化の抑制、細胞内在性 BRI2 の増加および A β 凝集の抑制を誘導したが、両化合物とも A β 産生は抑制できないことが判明した。両化合物が NRBP1-BRI2 間結合は阻害するが、BRI2-APP 間結合は阻害しないことから、(1) 両化合物が BRI2 と直接結合して BRI2 の立体構造の変化を誘起すること、(2) 当該立体構造変化により BRI2 の APP への結合性が変化し、 β -および γ -セクレターゼの APP への結合部位をマスクできなくなる可能性、が考えられた。

1. 研究の目的

認知症患者は現在国内に約 500 万人（7 割程度がアルツハイマー病（AD）患者）存在し、2040 年には 65 歳以上の高齢者の 3 人に 1 人が認知症か軽度認知障害（MCI）になると予測されているが、未だに高い有効性を示す治療薬は存在しない。アミロイド前駆体（APP）結合タンパク質である BRI2 と BRI3 は、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 BRI 因子は A β とともに相互作用して A β の凝集も抑制する。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。BRI2 はまたミクログリアによる A β の貪食に重要な TREM2 と結合し、 α -セクレターゼ切断による TREM2 の機能喪失を阻止することにより、A β 凝集体の除去も促進する。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）の凝集の抑制や IDE を介した IAPP の分解促進にも寄与する（図 1 の①～⑥）。また、BRI2 遺伝子の変異による正常 BRI2 タンパク質量の減少は、AD 類似の臨床症状と神経病理学的所見を示す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ことが知られている。

最近申請者らは、NRBP1 を基質認識タンパク

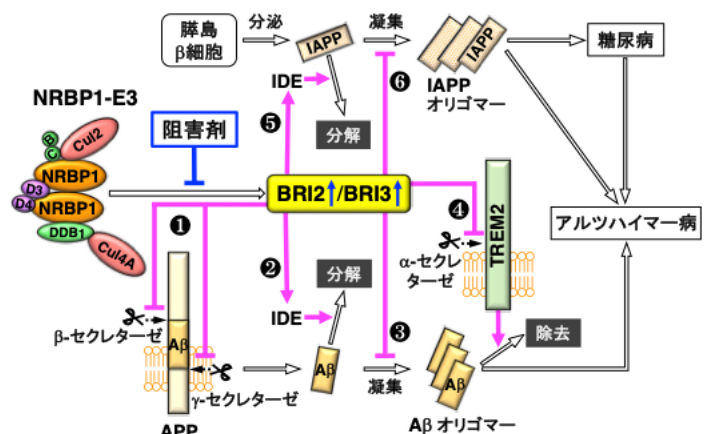


図1. NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用の阻害は、A β の①産生抑制②分解促進③凝集抑制と④A β 凝集体除去の促進及びIAPPの⑤分解促進⑥凝集抑制を一括して増強すると期待される。

質としてもつユビキチンリガーゼ（NRBP1-E3）が BRI2/BRI3 をユビキチン（Ub）化してリソソームによる分解に導くことを発見した。さらに、神経系細胞における NRBP1 の機能阻害が、BRI2/BRI3 の細胞内在量の増加と共に 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（Cell Rep. 2020）。以上より、BRI2 と BRI3 の Ub 化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と着想し（図 1）、当該阻害剤探索のためのアッセイ系を構築した。

本研究では、NRBP1 と BRI2/BRI3 間の相互作用を阻害して両 BRI 因子の細胞内在量を増加

させ、A β の産生抑制/凝集抑制/分解促進/沈着抑制および IAPP の凝集抑制/分解促進の 6 つの異なる作用機序から成る抗 AD 作用を一括して活性化すると期待される NRB P1-E3 阻害剤の創製を目指す(図 1)。

2. 研究方法と経過

2-1 NRB P1-BRI2 間の相互作用を阻害する中分子化合物の探索 (HTS)

タンパク質間相互作用 (PPI) の阻害を予測して分子設計・合成された AMED 中分子化合物 (55, 295 サンプル) のライブラリーを用いてハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。尚、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、HTS には BRI2 を用いた。

一次および二次評価には、分泌型 *Gaussia* ルシフェラーゼ (Gluc) を N 末側 (Gn) と C 末側 (Gc) の 2 つの断片に分割して不活性体とし、それぞれを BRI2、NRB P1 と連結、両因子が相互作用できる場合に限り、Gn と Gc 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-NRB P1 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た。

一次評価では、化合物濃度 5 μ M にて結合阻害率が 50%以上かつ細胞増殖阻害率が 50%以下を示す化合物を選抜した。

二次評価では、濃度依存的に NRB P1-BRI2 間相互作用を阻害する化合物を選抜した。また、全長 Gluc を用いたカウンター試験を行い、非特異的に阻害するものを除外した。

2-2 三次評価

NRB P1-E3 による BRI2 の Ub 化を濃度依存的に阻害する化合物を選抜した。具体的には、NRB P1 と TSC22D3/TSC22D4 を安定発現する 293T 細胞に 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 h 培養した。細胞溶解液を抗 HA 抗体で免疫沈降した後、抗 BRI2 抗体による免疫ブロットを行い、Ub 化 BRI2 量を調べた。

2-3 高次評価

A β 産生総量の増加を招く Sweden 変異を導入した APP を安定発現するヒト神経系培養細胞 SH-SY5Y に化合物を添加して、(1) BRI2 の細胞内在量の増加を WB で、(2) 培養上清中の A β 40、A β 42 濃度の低下を A β ELISA キットにより確認した。また、(3) A β 凝集の抑制は、

Gn-A β 42 と Gc-A β 42 (橋本唯史博士よりプラスミド DNA を入手; Hashimoto T. et al. *J Biol Chem* 2011) の安定共発現 293T 細胞に化合物を添加して、培養上清の Gluc 活性の低下により確認した。

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、55, 295 化合物を含む次世代創薬シーズ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、1, 237 個のヒット化合物を選抜した。ヒット数が多いため、再現性試験、カウンター試験並びに細胞毒性試験を追加で行い、199 個の化合物に絞った。さらに、NRB P1-BRI2 間相互作用阻害の濃度依存性試験、カウンター試験および細胞毒性試験から成る二次評価を実施し、15 個の中分子化合物を二次ヒットとして選抜した。

3-2 三次評価の結果

入手可能であった 13 個の化合物について TR-TUBE 法による三次評価を実施し、NRB P1-E3 による BRI2 の Ub 化を濃度依存的に阻害する 2 個の化合物を三次ヒットとして選抜した。

3-3 高次評価の結果

三次評価と並行して 13 化合物について高次評価 (終濃度 0.5~9 μ M の範囲で培養細胞に添加) を実施した。その結果、三次ヒット化合物 2 個が濃度依存的な細胞内在性 BRI2 の増加作用と A β 凝集に対する抑制作用を示した。しかしながら、両化合物とも A β 産生に対する抑制作用は示さないことが判明した。

次に、両化合物が内在性 BRI2 量を増加させるにも関わらず A β 産生を抑制できない原因を明らかにするため、両化合物の NRB P1-BRI2 間、並びに BRI2-APP 間相互作用に及ぼす影響について解析した。その結果、両化合物とも NRB P1 と BRI2 間の結合は阻害するが、BRI2 と APP 間の結合は阻害しないことが判明した。

4. 今後の課題

本研究では PPI の阻害が期待でき、合成展開が可能な中分子化合物のライブラリーを用いて二分子発光補完法による HTS を実施した。13 個のヒット候補化合物について培養細胞を用いた三次/高次評価を行った結果、類似構造をもつ 2 個の化合物が濃度依存的な BRI2 Ub 化の抑制、細胞内在性 BRI2 の増加および A β 凝集の抑制を誘導することが明らかになった。し

かしながら、両化合物とも A β の産生は抑制できないことが判明した。両化合物が NRBP1 と BRI2 間の結合は阻害するが、BRI2 と APP 間の結合は阻害しないことから、(1) 両化合物が BRI2 と直接結合して BRI2 に立体構造の変化を誘起すること、(2) 当該立体構造変化により BRI2 の APP への結合性が変化し、 β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼの APP への結合部位をマスクできなくなる可能性、が考えられた。また、類似構造検索の結果、両化合物の類縁体はほとんど存在せず、構造的に合成展開も難易度が高いと考えられた。

今回の解析を含めて、これまで天然物由来、

低分子、中分子化合物を含む 13 万個余のサンプルを対象に二分子発光補完法による HTS 実施してきたが、未だ良質のリード化合物の取得に至っていない。最近行った NRBP1-BRI2 間相互作用についての詳細な解析により、同 PPI に重要な BRI2 の領域を特定できたため、その結果を踏まえたアッセイ系の再構築と再 HTS の実施について検討を開始している。

5. 研究成果の公表方法

本研究に関連する研究成果は、原著論文として学術誌へ投稿する予定である。

以上

Development of a novel therapeutic agent for dementia that suppresses the ubiquitination of anti-Alzheimer's disease modulators BRI2 and BRI3

Primary Researcher: Teijiro Aso
Professor, Medical Science Cluster, Kochi University

Co-researchers: Takashi Yasukawa
Assistant Professor, Medical Science Cluster, Kochi University

To develop an innovative therapeutic strategy for Alzheimer's disease, we performed a high-throughput screening (HTS) of a medium-sized molecular library comprising 55,295 compounds to identify specific inhibitors of the NRBP1–BRI2 interaction. Thirteen primary hits were obtained and subsequently subjected to tertiary and advanced characterization in cultured cell models. Two structurally related compounds exhibited concentration-dependent inhibition of BRI2 ubiquitination, elevation of intracellular BRI2 levels, and suppression of A β aggregation, although neither compound inhibited A β production. Both compounds selectively disrupted the NRBP1–BRI2 interaction without perturbing the BRI2–APP association. These findings suggest that (1) the compounds directly interact with BRI2, inducing a conformational alteration, and (2) this structural modification may modulate BRI2's binding affinity to APP, thereby potentially preventing BRI2 from occluding the β - and γ -secretase cleavage sites on APP.