

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06562

研究課題名(和文)アルツハイマー病克服を目指した β -および γ -セクレターゼ阻害剤の開発

研究課題名(英文) Design of beta- and gamma-secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease

研究代表者

浜田 芳男 (Hamada, Yoshio)

甲南大学・フロンティアサイエンス研究科・特別研究員

研究者番号：70424968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本は急速に高齢化社会に移行しており、アルツハイマー病(AD)患者の増加は国家の基盤を揺るがす社会問題となっている。A β がAD発症の原因物質であると考えられている。最近、AD発症の要因として第三のセクレターゼ経路が報告されている。本研究課題では β -セクレターゼ阻害剤を開発するとともに、 γ -セクレターゼ仮説に基づいた γ -セクレターゼ阻害剤を設計・合成する。 β -セクレターゼ阻害剤ではすでに強力な低分子型阻害剤を開発しており、研究用試薬として富士フイルム和光純薬(株)より発売している。また γ -セクレターゼを用いた阻害活性評価実験で弱い γ -セクレターゼ阻害活性がある化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

β -セクレターゼ阻害剤ではすでに強力な低分子型阻害剤を開発しており、研究用試薬として富士フイルム和光純薬(株)より発売している。その中で、KMI-574は培養細胞での阻害活性が向上しており、これは細胞膜透過性の向上によるものと思われ、AD治療薬として有望であると思われる。また、酵素阻害活性評価実験において Fmoc-Apnsに阻害活性が認められたことは、BACE1と β -セクレターゼのS2からS3は疎水性アミノ酸を認識し、かなりの類似性が認められたことから、両酵素を阻害できる可能性があり、大きな発見だと思われる。

研究成果の概要(英文)：A β that is produced in the β -secretase pathway is thought to be a causative agent in the development of AD. Recently, a third secretase pathway has been reported as a factor in AD pathogenesis. In this research project, we will develop β -secretase inhibitors and design and synthesize γ -secretase inhibitors based on the γ -secretase hypothesis. We have already developed potent BACE1 inhibitors. These compounds are now available as research reagents from FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd. In addition, we have found some compounds with weak inhibitory activity against γ -secretase in the evaluation of inhibitory activity using β -secretase.

研究分野：創薬化学

キーワード：アルツハイマー病 BACE1 β -セクレターゼ

1. 研究開始当初の背景

日本は急速に高齢化社会に移行しており、アルツハイマー病(AD)患者の増加は国家の基盤を揺るがす社会問題となっている。AD 発症の原因物質であると考えられているアミロイド β ペプチド(A β)を標的とした治療薬の開発が国内外で進んでいる。しかしながら、臨床試験中の A β をターゲットとした治療薬は脳内の A β 濃度を下げることに成功しているが、顕著な認知機能の改善は見られない。最近、AD 発症の要因として第三のセクレターゼ経路が報告されている。 β -セクレターゼ阻害剤により A β の産生が抑えられても、新たなプロセシング酵素である η (イータ)-セクレターゼが A β ドメインの上流を切断し、次に α -セクレターゼによりアミロイド η ペプチド (A η) が産生される経路である。A η は A β より神経毒性が強いとされており、AD 治療ためには β -セクレターゼとともに η -セクレターゼも阻害する必要があると思われる。

2. 研究の目的

AD は初老期以降に発症し、大脳に神経原線維変化(Neurofibrillary Tangle: NFT)と老人斑を特徴とする神経変性疾患で、ドイツの精神科医 Alois Alzheimer が最初の症例を報告してから 100 年以上経つが、いまだに根本的治療薬は存在しない。A β ペプチドは老人斑の主要な構成成分であり、AD 発症の原因物質であると考えられている。A β はその前駆体である APP(amyloid β precursor protein)から β -secretase (BACE1: β -site APP cleaving enzyme) および γ -secretase の 2 種類のプロセシング酵素により産生される。A β としてはアミノ酸残基 40 個からなる A β_{40} と 42 個からなる A β_{42} が存在し、A β_{42} はより高い凝集性・神経毒性を示すため、AD 発症の鍵となる化合物であると考えられている

これらのプロセシング酵素が AD 治療のための創薬ターゲットとして注目されており、その中で、BACE1 のノックアウトマウスでは A β 産生がほとんどなく、脳にも異常が認められなかったことから、AD の創薬ターゲットとして BACE1 の阻害剤が注目されている。本研究代表者はすでに低分子で強力な BACE1 阻害剤を開発しており、AD 治療薬として期待されている。しかしながら、国内外の製薬企業により臨床試験中の BACE1 阻害剤は脳内の A β 濃度を下げることに成功しているが、顕著な認知機能の改善は見られない。最近、上述したセクレターゼ以外に第三のセクレターゼ経路の存在が提唱されており、AD を克服するためにはその経路の存在の有無を確かめる必要があると思われる。投与が可能で、脳血液関門(BBB)を透過する BACE1 阻害剤が開発できれば、AD の治療薬として現実味を帯びてくる。しかしながら、国内外で臨床試験されている BACE1 阻害剤、 γ -セクレターゼ阻害剤および γ -セクレターゼモジュレーター(GSM)などの A β の産生系をターゲットとする薬物は、脳内の A β_{42} の濃度を下げることに成功しているが、顕著な認知機能の改善は見られない。一方では最近、第三のセクレターゼ経路が提唱されている。BACE1 を阻害しても η -セクレターゼが APP の A β ドメインの上流を切断し、さらに α -セクレターゼにより、A η (A η - α)ペプチドが産生される可能性が示唆されている(図4, *Nature*, 2015, 526, 443-447)。A η は A β より神経毒性が強いとされ、AD 克服のためにはこの第三の経路の存在を確認する必要がある。本研究の目的は、AD 克服を目指した実用的な BACE1 阻害剤の開発と、 η -セクレターゼ仮説に基づいた η -セクレターゼ阻害剤の開発である。 η -セクレターゼ阻害によりこの第三のセクレターゼ経路の存在を証明できれば、未だ根本的治療薬のない AD 治療に新たな道が開かれる可能性がある。

3. 研究の方法

BBB を透過する実用的な BACE1 阻害剤を開発する。本研究代表者は BACE1 の阻害剤ライブラリーを構築しており、その中には *in-vitro* での阻害活性は低いものの BACE1-HEK2933 細胞に対して比較的強い阻害活性を示すものが存在する。これらの阻害剤の化学構造を参考にして、細胞膜透過性の高い阻害剤を設計・スクリーニングする。これらの阻害剤の細胞に

対する阻害効果は細胞膜透過性の改善によるものと考えられる。BACE1 および APP は細胞膜表面にも存在するが、実際に Aβ が作られるのはこれらプロセシング酵素の酸性の至適 pH を持つ ER や trans-Golgi network などの細胞小器官内であり、最終的に細胞膜上へ排出される。さらに市販の BBB キットを使って細胞膜透過性の高い阻害剤から、BBB を透過しうる AD 治療薬の候補化合物を選別する。

次に、 η -セクレターゼ阻害剤の開発を行う。 η -セクレターゼは APP695 の 504 位と 505 位間のペプチド結合を切断する MT5 サブクラス膜結合型 MMP である。 η -セクレターゼによる認識部位から Ligand-Based Drug Design (LBDD) による阻害剤設計が可能であり、市販されている MT5-MMP の His-Tag 付触媒ドメインおよび FRET 基質を使って設計した阻害剤を評価する。しかしながら、LBDD のみの手法では実用的な AD 治療薬創製は困難だと思われる。MT5-MMP の全アミノ酸配列はすでに報告されており、近縁 MMP 類の結晶構造を参考にして MT5-MMP のホモロジーモデリングを行う。この座標データを基に、ドッキングシミュレーションによる Structure-Based Drug Design (SBDD) や *in-silico* スクリーニングを行い、drug-like で実用的な η -セクレターゼ阻害剤を設計する。

実用的な AD 治療薬を開発するため BACE1 および η -セクレターゼの両方を阻害する阻害剤が有効ではないかと考え、APP の各セクレターゼによる切断部位および BACE1 阻害剤を比較した(図 5)。P₃ および P₂' 部位は両セクレターゼによる認識部位および BACE1 阻害剤(OM99-2, YHI-1830)に共通して疎水性アミノ酸である。BACE1 による P₂ 認識部位は Lys (Wild-type APP) および Asn (Swedish-mutant APP) であるが、BACE1 による minor cleavage site では Gly もしくは Val であり、 η -セクレターゼ

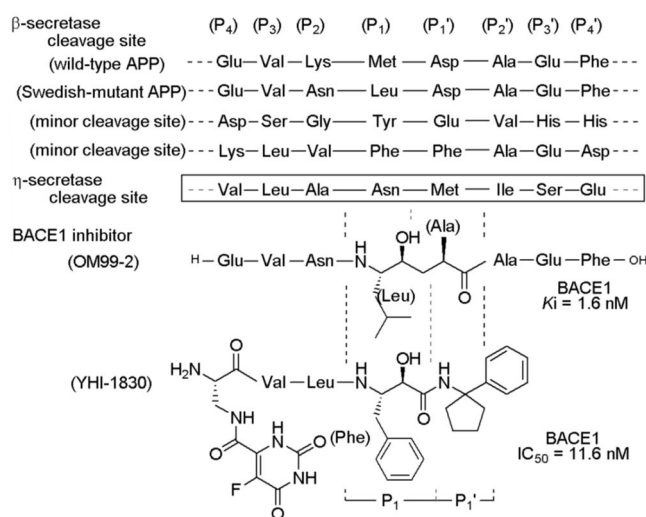


図1. および η -セクレターゼによる切断部位

の P₂ 認識部位も疎水性の Ala となっている。我々の阻害剤 YHI-1830 も P₂ に疎水性アミノ酸である Leu を導入すると強力な阻害活性を示したのは注目に値する。P₁' 認識部位は wild-type および Swedish-mutant APP とも Asp であるが、minor cleavage site では Phe となっており、阻害剤 OM99-2 および YHI-1830 でも、それぞれ Ala アナログ、シクロヘキシル基と疎水性であり、 η -セクレターゼの Met の疎水性と一致する。このように、P₁ 部位を除き P₃ から P₂' 部位にかけて、BACE1 と η -セクレターゼによる認識部位にはかなりの類似性が認められる。以上のことから次の段階では、BACE1 と η -セクレターゼの両方を阻害する薬物の *in-silico* 設計を行い、マルチターゲットな阻害剤の開発を行う。

4. 研究成果

BACE1 阻害剤に関しては、低分子型で強力な化合物をいくつか見出し、4 化合物(KMI-1027, KMI-574, KMI-1303, KMI-574) を富士写真フイルム和光純薬工業株式会社より研究用試薬として発売している。その中で、KMI-574 は培養細胞を用いた評価実験での阻害活性が向上しており、これは P₄ 部位に核酸類似構造を持つ KMI-574 の細胞膜透過性の向上によるものと考えられる。これらの阻害剤は IC₅₀ が数 nM の高い阻害活性を持っており、AD 治療薬として有望だと期待される。

市販の η -セクレターゼを用いた阻害活性評価実験でフェニルアラニンの基質遷移状態 ア

η -セクレターゼ阻害剤では基質遷移状態アナログである Apns を有する Fmoc-Apns に弱い η -セクレターゼ阻害活性があるのを見出した。本研究代表者らは P1 部位に Apns を有する BACE1 阻害剤を開発しており、BACE1 および η -セクレターゼの S2 および S3 の認識部位が疎水性アミノ酸を認識することから、かなりの類似性が認めらる (図 1)。これは BACE1 および η -セクレターゼの両方を阻害する阻害剤の開発が可能であることを意味し、重要な発見だと思われ、本研究課題の大きな成果だと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Keisuke Shimizu, Batsaikhan Mijiddorj, Masataka Usami, Ikuro Mizoguchi, Shuhei Yoshida, Shiori Akayama, Yoshio Hamada, Akifumi Ohyama, Kenji Usui, Izuru Kawamura, Ryuji Kawano	4. 巻 17
2. 論文標題 De Novo Design of a Nanopore for Single-Molecule Detection That Incorporates a Beta-Hairpin Peptide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 67-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41565-021-01008-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiroshi Miyazaki, Hikaru Takaishi, Hidefumi Ikeda, Hideto Ariumi, Yoshio Hamada, Kunihiko Yamashita, Kenji Usui	4. 巻 8
2. 論文標題 Synthesis of peptide-immobilized magnetic beads, and peptide reactivity assay for assessing skin sensitization utilizing chromophore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pr8101257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiroshi Miyazaki, Yasutaka Samejima, Kazuya Iwata, Yuuki Minamino, Shinya Hikida, Hideto Ariumi, Hidefumi Ikeda, Yoshio Hamada, Kunihiko Yamashita, Kenji Usui	4. 巻 21
2. 論文標題 Mass spectrometry-based solid phase peptide reaction assay for detecting allergenicity using an immobilized peptide-conjugating photo-cleavable linker	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21218332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki Hiroshi, Hamada Yoshio, Takaishi Hikaru, Minamino Yuuki, Ikeda Hidefumi, Mekata Hideaki, Takaishi Masayuki, Yamashita Kunihiko, Usui Kenji	4. 巻 145
2. 論文標題 Development of a chromophore-solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) for assessing skin sensitization in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3211 ~ 3216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9an02514f	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Ozaki, Shungo Sakashita, Yoshio Hamada, Kenji Usui	4. 巻 25
2. 論文標題 Peptides for Silica Precipitation: Amino Acid Sequences for Directing Mineralization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein & Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 15-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929866525666171214111007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kin-ya Tomizaki, Yoshio Hamada, Kenji Usui	4. 巻 25
2. 論文標題 Editorial: Organic-Inorganic Hybrid Materials and Their Applications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein & Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 2-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/092986652501180418150844	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshio Hamada, Kenji Usui
2. 発表標題 A Series of Quinine Prodrugs as Anti-malaria Treatment.
3. 学会等名 第56回日本ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshio Hamada, Kenji Usui
2. 発表標題 Novel Quinine Prodrugs as Anti-malaria Drug Candidates.
3. 学会等名 26th American Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜田 芳男、白井 健二
2. 発表標題 HIV-1プロテアーゼ阻害剤の水溶性プロドラッグ
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜田芳男
2. 発表標題 マラリア治療薬としての新規なキニーネプロドラッグ
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshio Hamada, Kenji Usui
2. 発表標題 Novel HIV-1 protease inhibitor prodrugs using a degradation reaction of N-amidino-peptides
3. 学会等名 35th European Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshio Hamada, Kenji Usui
2. 発表標題 Water soluble prodrug of ritonavir
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜田芳男、白井健二
2. 発表標題 固定化ペプチドを用いた新規感作性評価法
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 Yoshio Hamada, Zyta M. Ziora	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 9
3. 書名 Peptide Synthesis	

1. 著者名 Yoshio Hamada, Yoshiaki Kiso	4. 発行年 2019年
2. 出版社 John Willy & Sons, Inc.	5. 総ページ数 20
3. 書名 Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology	

1. 著者名 Yoshio Hamada	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Intech	5. 総ページ数 12
3. 書名 Peptide Synthesis	

1. 著者名 白井健二、宮崎洋、南野裕槻、瀧田芳男、山下邦彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 8
3. 書名 皮膚安全性・有用性評価法	

1. 著者名 Yoshio Hamada	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Intech	5. 総ページ数 18
3. 書名 Pyridine	

1. 著者名 浜田芳男	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 14
3. 書名 バイオ医薬品の開発と市場 2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>甲南大学ニュースリリース Nature Nanotechnologyに掲載されました。 https://www.konan-u.ac.jp/news/wp/wp-content/uploads/2021/11/public-relations-department-limited/20211124pressrelease-pi.pdf 本研究代表者のホームページ https://sites.google.com/site/pynden/home F1000primeの推薦論文に選定されました。 https://f1000.com/prime/726181487 ACS Medicinal Chemistry Lettersの表紙絵に採用される。 https://pubs.acs.org/toc/amclct/3/3 Amyloid/secretase分野において日本で第4位の専門家として評価されました。 https://sites.google.com/site/pynden/hot-news/expertscape%E3%81%A7%E5%8F%96%E3%82%8A%E4%B8%8A%E3%81%92%E3%82%89%E3%82%8C%E3%81%BE%E3%81%97%E3%81%9F</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------