

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：24403
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25450428
 研究課題名(和文)新規に創製したGAPDH凝集阻害ペプチドを難治性脳疾患へ治療応用する為の基盤研究

 研究課題名(英文)A novel therapeutic target for neurological disorders by inhibition of GAPDH aggregation

 研究代表者
 中嶋 秀満(Nakajima, Hidemitsu)

 大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

 研究者番号：30405360
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系酵素GAPDHは多機能蛋白質であり、我々はGAPDHが酸化ストレスによりアミロイド様凝集を形成し、細胞死に関与することを報告した。また、GAPDH凝集責任アミノ酸であるCys-152欠損GAPDHにより、内在性GAPDH凝集を阻害することで、難治性脳神経疾患への治療効果を発見した(論文投稿中)。そこで本研究では、C152欠損GAPDH変異体をベースとして、ペプチドミミック法を用いて、非ペプチド性低分子化合物GAI-Xの創製に成功した。また、GAI-Xはマウス脳卒中モデルなどの神経疾患モデルで機能改善効果を示した。本研究成果は、難治性脳神経疾患の新しい創薬ターゲットと治療法を提供する。

研究成果の概要(英文)：Glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a homotetrameric protein that also mediates cell death under oxidative stresses. We previously reported that intermolecular disulfide-bonding GAPDH aggregates through oxidation of the active site cysteine (Cys-152) participate in oxidative stress-induced cell death. We also revealed that the active site cysteine-null GAPDH (C152A-GAPDH) rescues oxidative stress-induced neuronal cell death in a dominant negative manner via the formation of these hybrid tetramer both in vitro and in vivo. Here we report that this dominant negative C152A-GAPDH mutant against endogenous GAPDH aggregation in response to oxidative stress ameliorated neuronal cell death in neurological models using a specific inhibitor of GAPDH aggregation (GAI-X) exerted decrease of neurological dysfunctions. These findings provide a therapeutic avenue of new drug target for the brain damages such as Stroke and Alzheimer disease.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：脳神経疾患 GAPDH アルツハイマー病 脳卒中 酸化ストレス 創薬 ペプチドミミック 凝集阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、解糖系酵素であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) は、酸化ストレス誘発性細胞死に関与することが明らかとなっている。また、アルツハイマー病の老人斑や原形質線維変化、パーキンソン病のレビー小体といったアミロイド病巣中に GAPDH が大量に検出されることから、脳アミロイドーシスの発症および病態形成との関連性が示唆されている。以上のことから、難治性脳疾患の病態解明および予防診断・治療法研究において、GAPDH の機能的役割に大きな関心が寄せられている。

(2) これまで我々は、酸化ストレス誘発性神経細胞死における GAPDH の機能的役割の一端を明らかにした。すなわち、酸化ストレス処置により GAPDH の活性中心である Cys152 の分子間ジスルフィド結合が生じ、それがトリガーとなってシート構造の増加と立体構造変化が惹起され、GAPDH 自身が凝集することでアミロイド様線維を形成し、その結果、細胞レベルおよび個体レベルで神経細胞死を誘導することを世界に先駆けて報告した (J. Biol. Chem. 2007 & 2009, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009)。さらに、上述の GAPDH アミロイド様線維形成機序から、GAPDH 凝集を阻害する複数のペプチドをデザインし、新規スクリーニング系を用いて、GAI ペプチド (GAPDH Aggregation Inhibitor ペプチド) を発明し、アミロイド 40 誘発神経細胞死に対して保護効果を発揮するペプチドの創製に成功した (特開 2013-24102)。

(3) 以上の背景から、難治性脳疾患、特にアルツハイマー病やパーキンソン病などの疾患関連タンパク質のアミロイド形成がリスクファクターとなる脳アミロイドーシスの病態形成メカニズムとして、GAPDH アミロイド様線維は、アミロイド形成の「種(たね) = シード」として働き、アミロイド病巣形成を促進する「クロスシード仮説」を立て、本研究を計画するに至った。つまり、GAI ペプチド投与によって、シードとしての GAPDH アミロイド様線維の形成を阻害し、疾患関連タンパク質のアミロイド形成を抑制することで、治療効果を発揮することが期待できる。

(4) しかし、GAI ペプチド単体での投与は、体内安定性および脳内移行性・特異性(神経向性)に問題がある。そこで、pH 応答性ポリマー付加リポソームに、神経向性を持たせる為に狂犬病ウイルス糖タンパク質ペプチド (RVG ペプチド) を修飾した新規な機能性リポソームを作製し、それに GAI ペプチドを内包すれば問題点は解決できると考えた。

(5) 上記の背景およびこれまでの我々の研究成果と仮説をもとに、本研究では、難治性脳アミロイドーシスとしてアルツハイマー

病に焦点を絞り、GAI ペプチド内包 RVG ペプチド修飾 pH 応答性リポソーム(以下、GAI ペプチド内包神経向性リポソーム)を遺伝子改変アルツハイマー病モデルマウスに投与することで、GAI ペプチドの難治性脳疾患への治療応用の可能性を、個体レベルで検証することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 本研究開始時点では、我々が新規に創製したグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素凝集阻害ペプチド (GAI ペプチド) を内包する神経向性リポソームを調製し、その機能性を細胞レベルで確認後、難治性脳疾患である脳アミロイドーシスのモデルマウスに投与し、病理評価および行動評価を実施することで、難治性脳疾患への GAI ペプチド治療応用の可能性を探ることを目的とした。

(2) しかしながら、本助成金採択直後に、GAI ペプチドの更なる最適化(活性の向上と副作用の低減)およびペプチドミミック法が適用可能な最適化 GAI ペプチドを発見し、より体内安定性が高く、医薬品候補物質として適した低分子有機化合物 TN-101 (特願 2015-116140 号) に用いた脳アミロイドーシス疾患モデルでの治療応用の可能性へと研究目的を変更した。

(3) また、脳アミロイドーシスモデルとしてアルツハイマー病モデルマウスと脳卒中モデルマウスの 2 つのモデルを採用することとした。即ち、アルツハイマー病モデルマウスは病態発現までに約半年~1 年間と長期間を要することから、薬効評価には化合物を大量合成する必要があるため、GAPDH 凝集とアルツハイマー病の関連性を探るための基礎知見を得ることを目的とした。一方、脳卒中モデルマウスは、1 - 2 日と短期間で、かつ化合物の有効性評価も少量で実施可能であるため、薬効評価には脳卒中モデルマウスを用いて、GAPDH 凝集阻害剤の治療応用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TN-101 の合成: 最適化 GAI ペプチド (GAI-X) とそのペプチドミミック体 TN-101 は特許出願中の為 (特願 2015-116140 号)、詳細な合成法は現時点では記載できない (2016 年 12 月 8 日公開)。概要のみ記述すると、ペプチドミミック法を用いて、ペプチド結合を除き、ペプチド N 末端側のアミド結合と C 末端側のカルボキシル基を医薬品として適切と考えられる置換基に変換して、有機合成した。

(2) アルツハイマー病モデルマウスを用いた GAPDH 凝集とアルツハイマー病の病態発生の関連性に関する基礎研究:

アミロイド 40 (以下 A 40) アミロイド

化に及ぼす GAPDH 凝集体の影響（試験管レベル）：新鮮な A 40（全くアミロイドしていない）50 μ M 溶液に、モル比 1-10 %GAPDH 凝集体を添加し、37 °C で 1 週間インキュベートした。毎日同時刻に溶液の一部をチオフラビン T（アミロイド結合色素）と反応させ、その蛍光量を測定することでアミロイド化の程度を測定した。また、生じたアミロイド構造を解析するため、コンゴレッド染色、円二色性スペクトル（CD）および原子力間顕微鏡（AFM）での測定と観察を行った。

GAPDH 凝集体誘発性アミロイド化 A 40 が脳機能に及ぼす影響（個体レベル）：GAPDH 凝集体誘発性アミロイド化 A 40 をマウス側脳室内に投与後、海馬神経細胞死の形態的観察および細胞死の原因と推測されるミトコンドリア機能障害をアポトーシス誘導因子（AIF）の核移行とチトクローム c（Cyto-c）の細胞質への放出を指標に蛍光組織化学的観察を共焦点顕微鏡で行った。

代表的アルツハイマー病モデルマウスである 3 x AD Tg マウスをジャクソン研究所から購入し、また比較対照マウス作成方法として、B6 マウスと Sv129 マウスを購入し交配させ、ファウンダーマウスの F1 マウスを作成した。このマウスを 1、3、6、12 ヶ月間飼育後、と同様に蛍光組織化学的観察を行い、海馬神経細胞における A 40 と GAPDH アミロイド化とミトコンドリア機能を評価した。また、脳内 GAPDH 遺伝子ノックダウンによる A 40 の凝集の程度をウェスタンブロット法で定量的に評価した。なお、以上の動物実験は、大阪府立大学生命環境科学部動物倫理委員会により承認された機関承認実験である。

（3）脳卒中モデルマウスを用いた TN-101 の有効性評価：

脳卒中モデルマウスによる TN-101 の有効性：ヒト脳卒中に最も近似するマウス中大脳動脈閉塞モデル（MCAO モデル）による脳卒中モデルを作成した。イソフルラン麻酔下で内頸動脈よりシリコン被覆ナイロン栓子を挿入し、左中大脳動脈起始部の血流を遮断することで局所脳虚血を負荷した。30 分間の閉塞処置後に栓子を抜去し、再還流処置を施した。再還流 24 時間後、安楽死を施し、全脳を素早く取り出し、厚さ 1 mm の冠状脳スライスを作製し、TTC 染色により脳梗塞体積を定量評価した。また、脳薄切標本および脳卒中コア部分である線条体の懸濁液を作成し、HE 染色により主として大脳皮質および線条体領域の病理解析を、抗 GAPDH 抗体による GAPDH 凝集体形成の関連性を評価した。また、脳虚血前後に TN-101（20 nmol x 3/マウス）側脳室内に投与し、脳梗塞体積と運動機能評価（片側麻痺）の評価を 24 時間後に実施した。なお、以上の動物実験は、大阪府立大学生命環境科学部動物倫理委員会により承認された機関承認実験である。

4. 研究成果

（1）TN-101 の合成：方法欄に記載の方法で合成し、約 35 mg（純度 90%以上）の TN-101 創製に成功した。また、TN-101 を含む「非ペプチド性 GAPDH 凝集阻害剤」として、国内特許出願を行った（特願 2015-116140 号、5. 主な発表論文等参照）。

（2）アルツハイマー病モデルマウスを用いた GAPDH 凝集とアルツハイマー病の病態発生の関連性に関する基礎研究：

アミロイド 40（以下 A 40）アミロイド化に及ぼす GAPDH 凝集体の影響（試験管レベル）：各アミロイド化の飽和点までの経時変化とその 50% 飽和時間を測定したところ、A 40 では 3.86 \pm 0.06 日であったのに対し、GAPDH 凝集体とインキュベートした A 40 では 1.16 \pm 0.07 日とアミロイド化の促進が認められた。また、生じたアミロイド構造を解析するため、コンゴレッド染色、CD および AFM での測定と観察を実施した結果、GAPDH 凝集体を添加した A 40 では、繊維製アミロイドの増加、アミロイド変化時に生じるシート構造の増加が観察された。以上の結果から、GAPDH 凝集体は A 40 のアミロイド化を促進する因子であることが試験管レベルで明らかとなった。

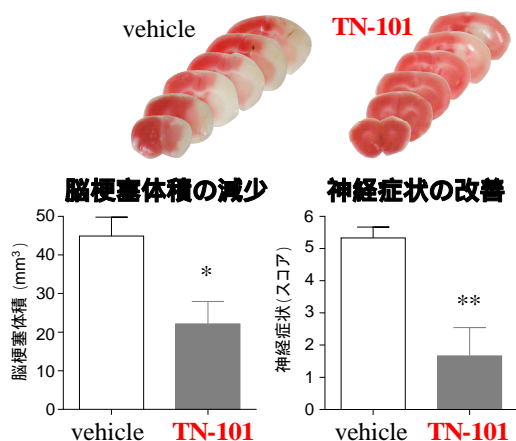
GAPDH 凝集体誘発性アミロイド化 A 40 が脳機能に及ぼす影響（個体レベル）：GAPDH 凝集体誘発性アミロイド化 A 40 をマウス側脳室内に投与 10 日後、海馬 CA3 領域の神経細胞死が観察された。この細胞死の程度は、アミロイド化 A 40 単独処置群よりも約 2.5 倍増加していた。また、細胞死の原因を探るため、アミロイド化 A 40 の細胞死機序の 1 つであるミトコンドリア機能障害を免疫染色で調査したところ、海馬 CA3 領域の神経細胞内において、AIF の核移行と Cyto-c の細胞質放出が観察された。以上の結果より、GAPDH 凝集体誘発性アミロイド化 A 40 は、個体レベルでも神経細胞死を促進し、ミトコンドリア機能障害がその原因の 1 つであると考えられた。

アルツハイマー病モデルマウス 3 x AD Tg マウスにおける病態発現と GAPDH 凝集体の関与：免疫組織化学的観察により、GAPDH 凝集体は対照マウスおよび 3 x AD Tg マウスの双方で 1 ヶ月齢から海馬神経細胞で観察された。この時、アミロイド化 A 40 は認められなかった。一方、3 ~ 6 ヶ月齢の 3 x AD Tg マウスでは、先行して発現した GAPDH 凝集体周囲にアミロイド化 A 40 が認められた。対照マウスではその様な顕微鏡像は観察されなかった。さらに、GAPDH 凝集体形成と A 40 アミロイド化促進機序を解明する為に、GAPDH-siRNA を用いて海馬 GAPDH ノックダウン処置を施し、A 40 アミロイド化を観察した。その結果、3 x AD Tg マウスの海馬 GAPDH 凝集体形成の抑制は、A 40 アミロイド化を有意に抑制した。以上の遺伝子改変マウスを用い

た結果から、GAPDH 凝集体は A アミロイド化促進の「種=シード」として働き、我々の提唱する「クロスシード仮説」の一端を明らかとした(5. 主な発表論文等参照)

(3) 脳卒中モデルマウスを用いた TN-101 の有効性評価:

マウス MCAO モデルにおいて、脳虚血前後に TN-101 (20 nmol x 3/マウス) 側脳室内に投与したところ、脳梗塞巣体積の有意な減少と運動機能障害(神経症状)の有意な改善が認められた(下図)。



以上の結果から、GAPDH 凝集阻害は脳卒中に対し有効な治療手段であり、我々の発明した非ペプチド性低分子化合物 GAPDH 凝集阻害剤 TN-101 は、脳卒中などの脳アミロイドシスの治療薬としての有望である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Kubo T, Nakajima H, Nakatsuji M, Itakura M, Kaneshige A, Azuma YT, Inui T, Takeuchi T.

Active site cysteine-null glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) rescues nitric oxide-induced cell death, Nitric Oxide, Biology and Chemistry, 査読有, Vol. 53, pp. 13-21, 2016
doi: 10.1016/j.niox.2015.12.005.

Itakura M, Nakajima H, Semi Y, Higashida S, Azuma YT, Takeuchi T.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor peptide: A potential therapeutic strategy against oxidative stress-induced cell death, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, Vol. 467(2), pp. 373-376, 2016
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.150.

Itakura M, Nakajima H, Kubo T, Semi Y, Kume S, Higashida S, Kaneshige A, Kuwamura M, Harada N, Kita A, Azuma YT, Yamaji R, Inui T, Takeuchi T.

Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Aggregates Accelerate Amyloid-Amyloidogenesis in Alzheimer Disease, J Biol Chem., 査読有, Vol. 290(43), pp. 26072-26087, 2015
doi: 10.1074/jbc.M115.669291

Tristan CA, Ramos A, Shahani N, Emiliani FE, Nakajima H, Noeh CC, Kato Y, Takeuchi T, Noguchi T, Kadowaki H, Sedlak TW, Ishizuka K, Ichijo H, Sawa A.
Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) as an activator of the GAPDH-Siah1 stress-signaling cascade, J Biol Chem., 査読有, Vol. 290(23), pp. 14493-14503, 2015
doi: 10.1074/jbc.M114.635607.

Nakajima H, Kubo T, Ihara H, Hikida T, Danjo T, Nakatsuji M, Shahani N, Itakura M, Ono Y, Azuma YT, Inui T, Kamiya A, Sawa A, Takeuchi T.
Nuclear-translocated Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Activation during Oxidative/Nitrosative Stress in Stroke. J Biol Chem., 査読有, Vol. 290(23), pp. 14493-14503, 2015
doi: 10.1074/jbc.M114.635607

[学会発表](計6件)

1.板倉正典、中嶋秀満、東田周作、瀬見優子、久保岳也、東 泰孝、竹内正吉
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) aggregates contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease, 第89回日本薬理学会年会、2016年3月10日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜会議センタ

Kita A, Kubo T, Semi Y, Higashida S, Kaneshige A, Itakura M, Azuma YT, Takeuchi T, Nakajima H.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregation inhibitor: Exploring a drug targeting for Alzheimer's disease. 45th annual meeting of the Society for Neuroscience. McCormick Place, 2015年10月19日、米国イリノイ州シカゴ

Itakura M, Nakajima H, Kubo T, Semi Y, Kume S, Higashida S, Kaneshige A, Kita A, Sato K, Azuma YT, Inui T, Takeuchi T.
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) aggregates contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease via the acceleration of A amyloidogenesis. 45th annual meeting of the Society for Neuroscience. McCormick Place, 2015年10

月 18 日, 米国イリノイ州シカゴ

Sato K, Itakura M, Azuma YT, Takeuchi T, Nakajima H.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates c-jun N-terminal kinase activation under oxidative stress conditions.

45th annual meeting of the Society for Neuroscience. McCormick Place, 2015 年 10 月 18 日, 米国イリノイ州シカゴ

板倉正典、中嶋秀満、東田周作、瀬見優子、久保岳也、東 泰孝、竹内正吉
アルツハイマー病の病態形成に GAPDH 凝集体が関与する。

第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 8 日、青森県十和田市北里大学

東田周作、久保岳也、板倉正典、中嶋秀満、東 泰孝、竹内正吉

GAPDH 凝集阻害による新規アルツハイマー病治療薬の創製

第 123 回日本薬理学会近畿部会 2013 年 7 月 12 日、愛知県名古屋市愛知県労働センター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：非ペプチド性 GAPDH 凝集阻害剤

発明者：中嶋秀満

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-116140 号

出願年月日：2015 年 6 月 8 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

Veterinary Pharmacology

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/pham/>

(研究代表者所属研究室 HP)

GE ヘルスケア・ジャパン株式会社

[http://www.gelifesciences.co.jp/technol](http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/dharmacon/pdf/3795_dharmacon_acce)

[ogies/dharmacon/pdf/3795_dharmacon_acce](http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/dharmacon/pdf/3795_dharmacon_acce)

[ll_sirna_voc.pdf#search='%E4%B8%AD%E5%B](http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/dharmacon/pdf/3795_dharmacon_acce)

[6%8B%E7%A7%80%E6%BA%80'](http://www.gelifesciences.co.jp/technologies/dharmacon/pdf/3795_dharmacon_acce)

(研究代表者研究紹介記事)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀満 (NAKAJIMA, Hidemitsu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・准教授

研究者番号：30405360

(2) 研究分担者

桑村 充 (KUWAMURA, Mitsuru)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・獣医学専攻・准教授

研究者番号：20244668

(3) 連携研究者

弓場 英二 (YUBA Eiji)

大阪府立大学・工学研究科・助教

研究者番号：80582296