

令和 元年 6 月 10 日現在

機関番号： 14401
 研究種目： 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
 研究期間： 2017～2018
 課題番号： 16KK0163
 研究課題名（和文） 新規創薬を目指したアルツハイマー病危険因子sorLAに対する低分子バインダー探索（国際共同研究強化）
 研究課題名（英文） Protein binder screening for SorLA, a risk factor of Alzheimer's disease, to identify novel targets for drug discovery (Fostering Joint International Research)
 研究代表者
 北郷 悠 (KITAGO, Yu)
 大阪大学・蛋白質研究所・助教
 研究者番号： 60507185
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円
 渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：aaa当研究においては、研究代表者が研究を行ってきた巨大一回膜貫通受容体SorLAが、アルツハイマー病(AD)に対して保護的に働いていることに着目し、SorLAの発現量を増やすことでADの予防・治療に役立てることを目的として、細胞上でSorLAの発現量が増加するような低分子化合物の選別実験を行った。渡航先では、低分子化合物ライブラリを細胞に作用させ、その効果をハイスループットで確認できる実験系が運用されており、研究代表者はその系をSorLAに適用して、期間内で10種の候補化合物を選別することができた。現在それらの追加確認実験を行っており、当研究を起点とした今後の研究展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、現在確認実験中であるために確実であるとは言えないが、当研究にてSorLAの発現量を増やすことのできる低分子化合物群を選別できた可能性がある。この成果は、第一にADの予防・治療へと応用できる可能性のある物質を得ることができたという意味で、非常に社会的意義のある結果であると言える。さらに、当研究テーマをさらに進展させていくに当たって不可欠な、未だ不明であるSorLAの生理機能を解明や、それを評価する実験系の確立など、学術的に大きな意義を持つ成果につながる研究を始めることができた。以上の成果をもとに、今後の研究展開およびその発信を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：The recipient is focusing on the protective effect of SorLA, a giant type I membrane receptor, against Alzheimer's disease (AD). In this research project, the cell-based screening trials were achieved to find compounds which increase the expression level of SorLA in living cells aiming to utilize for the preventive/therapeutic purpose for AD. The specific facilities including compound library and screening devices/robots are equipped and working in the destination (Tri-I TDI). The recipient utilized this facility against SorLA, and successfully picked up 10 candidates from 65,935 compounds in the period. Currently, the following confirmation experiments are carried out for these compounds, and its further development is expected starting from this research project.

研究分野： 構造生物学・分子生物学・細胞生物学

キーワード： アルツハイマー病 蛋白質分子 低分子化合物 スクリーニング 創薬

1. 研究開始当初の背景

巨大一回膜貫通受容体 SorLA[1-7]は、遺伝学的研究と一部の生化学的解析から、アルツハイマー病(AD)の発症と強い相関を持つと報告されていたが[8-16]、その作用機序の詳細は現在でも不明である。SorLA は 20 にもおよぶ構造体(ドメイン)から構成されるドメイン構造を取っていることが予想されているが、当研究代表者は、特に SorLA の N 末端に存在する Vps10p ドメインが、単体で AD の原因物質とされるアミロイド ペプチドを直接捕捉し、それを、細胞内消化を行う器官であるリソソームへと導く機能があることを実験的証拠から提唱した[17, 18]。この研究を発端とし、非常に巨大かつ独特のドメイン構造を持つ SorLA 分子全体が、未だ不明である生理機能とどのように相関しているのか、そしてそれがどのような作用機序で AD と関連しているのかを解明するべく、当研究の基となった研究計画にて SorLA の生化学的・構造生物学的解析を開始した(科研費若手研究(B)H26-28「アルツハイマー病危険因子 SorLA 細胞外領域の構造解明」代表)。一方で、AD に関わる蛋白質群の機能・構造研究を推進していた Weill Cornell Medicine の Petsko 博士は、神経細胞では、細胞内物質輸送の機能不全によって老廃物・不要物が蓄積し、それが最終的には AD やパーキンソン病、ALS などの神経変性疾患を引き起こすという“Traffic Jam”理論を提唱し、細胞内輸送に中心的な役割を果たす細胞質蛋白質複合体 Retromer の機能・構造解析を推進していた。その中で、SorLA が数ある Retromer のカーゴ(積み荷蛋白質)の一つであり、SorLA 上の点変異が AD 発症と強く相関していることから 2014 年に研究代表者との共同研究をスタートさせた。当初は研究代表者が調製した組み換え体の SorLA Vsp10p を Petsko 研究室へと送付し、先方のメンバーの一人がそれに相互作用する低分子化合物を探索するという体制で研究を進めていたが、さらに大規模なスクリーニング実験を計画したこと、そして Vps10p ドメインだけではなく SorLA 分子全体を扱う必要が出てきたことから、本研究計画にて研究代表者が渡航し、Petsko 研究室にてスクリーニング実験を実施する運びとなった。

2. 研究の目的

当研究では、最終的にはアルツハイマー病(AD)の予防・治療に役立てることを想定し、SorLA の細胞レベルでの発現量を増加もしくは減少させるような薬効を持つリード化合物を、化合物ライブラリから選別してくることを目的とした。

3. 研究の方法

当研究は、開始段階では次の二通りを想定していた。

研究代表者が過去に報告した SorLA Vps10p ドメインの結晶構造を基に、コンピュータ上でその構造にフィットする低分子化合物を選別もしくはデザインし、それをリード化合物として細胞での SorLA 発現レベルを増加させるような物質を導出する

培養細胞をベースとしたスクリーニング実験を設計し、その作用機序はブラックボックスとして、とにかく細胞レベルでの SorLA の発現量を増加させるような低分子化合物を化合物ライブラリから選別する

はいわゆる Structural Based Drug Design (SBDD)であるが、SorLA のケースでは、AD に対して保護的に働いているために、SorLA とそのリガンドとの結合・認識を阻害するような物質では AD に対して逆効果である。よって SorLA の機能を亢進するような物質を「設計」する必要があるわけだが、蛋白質の機能を亢進するような効果は一般化できるものではない。渡航先の共同研究者である Petsko 教授は、そのような状況下で、蛋白質の熱安定性を向上させることで、酵素活性を向上させることができるという方法論を提唱しており、それに基づいて SorLA Vps10p ドメインの熱安定性向上を主たる対象とした分子設計を指向した。そこで、SorLA Vps10p ドメインがリガンドペプチドを認識する部位(トンネル構造の内壁)を避けるとともに、結晶構造解析から高い可動性があると示唆されている部位を安定させるような分子設計を目指した。実際には、本研究計画前に取得していた SorLA Vps10p ドメイン部の結晶構造をもとに、N 型糖鎖位置を考慮し、渡航先 Weill Cornell Medicine(WCM)で用いられているソフトウェア Schrodinger 社 Maestro を使用し、分子表面の化合物結合可能部位(Hot Spot)を探索するアルゴリズムを用い、得られた部位の形状および化学的特性から手作業で分子を構築し、それと類似したものを既存の化合物ライブラリから選別する方法(*in-silico* Shape Screening)を試行した。

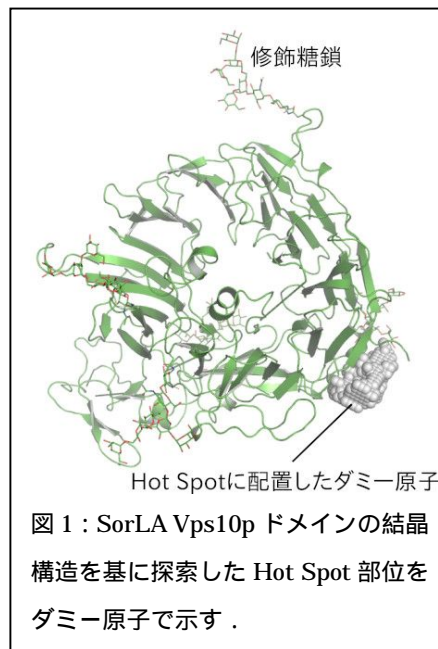
はとは全く異なるアプローチであるが、その物質が SorLA と相互作用するかどうかは全く考慮せずに、最終的に細胞内の SorLA 発現量が増加するかどうかだけを基準として、低分子化合物を選別する手法である。実際はマルチウェルプレート(384 プレート)に培養細胞を播種し、一定時間後に個々のウェルに異なった物質が入るように設計された低分子ライブラリの化合物を倍地中へと投与、さらに一定時間置いてから、細胞内の SorLA 量を SorLA 特異抗体によって定量する(*in-cell* western 法)という作業手順である。この実験には、化合物ライブラリの管理が

非常に重要であることに加え、マルチウェルプレートへの細胞・試薬等の分注とプレートの洗浄にロボットデバイスを使用することが不可欠であり、それらハードウェアリソースを保有し、かつ適切に管理・運用がなされていなくてはならない。渡航先である WCM と研究協力体制 (Tri-ITDI) にある Rockefeller University の High Throughput and Spectroscopy Resource Center (HTSRC) において、上記のスクリーニング実験を行うための環境が整備・運用されており、HTSRC の Glickman 教授のもと、SorLA に対する *in-cell* western 法による低分子化合物スクリーニング実験を行なった。HTSRC では、微量分注器として Thermo Scientific 社製 MultiDrop Combi、プレートウォッシャーとして BioTek 社製 EL406 が稼働しており、プレートリーダーの LiCOR 社製 Odyssey Sa も合わせて全て共通規格のプレート自動送り装置が備わっている。化合物ライブラリの管理と分注には、PerkinElmer 社 JANUS ワークステーションが稼働しているが、その作業は専門職員が行う体制になっており、共同利用ユーザーである研究代表者が細胞の播種を行った上から化合物ライブラリを作用させ、24 時間培養後に細胞の固定・透過処理、ブロッキング後に一次抗体反応を行い、さらに Odyssey システムに対応した IR Dye という遠赤外色素を融合させた二次抗体反応と細胞核を定量する試薬である CellTag での染色を行う。二次抗体と CellTag は、異なる波長で同時に測定可能なため、それに対応した Odyssey プレートリーダーで読み取り、得られた二次抗体シグナルを CellTag シグナルで規格化することによって、細胞当たりの目的蛋白質量を定量することができる。以上の方法により、通常の細胞と比較して、投与することで SorLA の発現量を増加させるような低分子化合物を化合物ライブラリの中からスクリーニングすることができたわけだが、実際に実施した感触では、一週間でおよそ 30 プレート、約 10,000 化合物のスクリーニングを行うことが可能であり、マンパワー当たりのアウトプットでは製薬会社等の専用施設と比較しても遜色無い性能であるとのことだった。

4. 研究成果

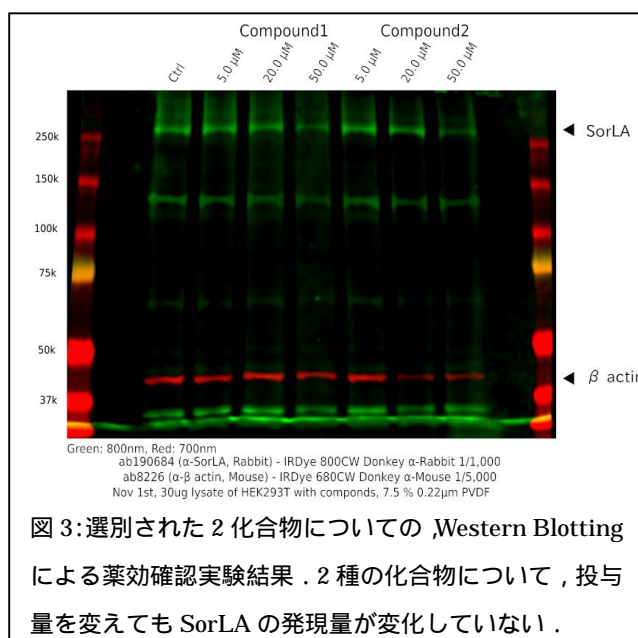
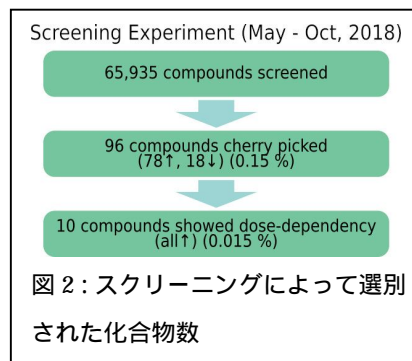
渡航期間前半は、「3. 研究の方法」に示した 2 つの実験計画を並行して進めたが、細胞ベースでの化合物スクリーニングが本格的に始動した中盤から、その実験作業の時間的制約が大きくなり、渡航先の実験環境が実施に必要な不可欠であったに絞って実験を進めた。

そのに関しては、計算に用いる Maestro のセットアップとその使用法の習得を進めるとともに、Shape Screening に用いる化合物ライブラリの整備を行った。*in-silico* のスクリーニングでは、現実のスクリーニング実験と同様に、ライブラリ内の化合物群が化学的・構造的に偏りのないような程度の選別を行っておくのが非常に重要であるが、本研究では既存の化合物ライブラリに、WCM の Petsko 研究室で別の関連蛋白質に類似した *in-silico* 解析を行っていた Dr. Liu に指導を受けて調整を加えたカスタムライブラリを使用した。そして、Maestro 上のアルゴリズムおよび蛋白質分子座標上のポケット様構造を検索するアルゴリズム POCASA (v1.1 <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/service/pocasa/>) の両方で Hot Spot 部位の計算を行った。その結果、計算結果の一部に重複した部位が認められたため(図 1)、その部位を第一候補としてその中にリード化合物を作製することにした。Hot Spot 部位表面の化学的特性を考慮しつつリード化合物を構築し始めたが、その途上で渡航先でなければ設備上の制約がかかるスクリーニング実験が本格的に始動したため、そちらを優先してこちらの実験は一時保留とした。今後、リード化合物を構築し次第、Maestro を使用できる環境で *in-silico* の Shape Screening を実行したい。



の培養細胞に対するスクリーニング実験は、実験を使用するに当たって重要な、細胞中の SorLA を検出する特異抗体の選別から開始した。渡航前～渡航後数ヶ月に渡って、市販の特異抗体および当研究室で保持している独自の特異抗体、計 23 種について、培養細胞溶解液の Western Blotting およびスクリーニング時と同様の *in-cell* western フォーマットを用いたテストを行い、抗体の特異性・感受性、使用予定量に対する入手のしやすさなどを総合的に判断し、Abcam 社製 ab190684 を使用するものとした。次に使用する培養細胞種の選別を行った。HEK293T, SH-SY5Y, U-87 の 3 種の細胞に対して細胞溶解液の Western Blotting を行い ab190684 を使って SorLA 量の定量を行った。その結果、U-87 では細胞当たりの SorLA の発現量がかなり少なく、検出が難しかった。SH-SY5Y と HEK293T では、発現量では極端な差がなかったが、SH-SY5Y では接着せずに浮遊状態のまま生育する細胞が一部存在する性質を持つこと、細胞のサイズが HEK293T よりも小さく、かつ同じ期間培養した場合にトータルの細胞数が少ない、つまり検出できる SorLA 量も少ないことから、スクリーニング実験では HEK293T 細胞を用い

るものとした。in-cell western フォーマットでのテストでは、細胞の播種濃度、一次抗体・二次抗体の濃度、プレートリーダーでのシグナル検出条件などを最適化し、ポジティブコントロールとなる SorLA の過剰発現体も、感度良く検出できたため、これで実験条件を決定した。この条件で 5 種の化合物ライブラリを使ったパイロット実験において、良好な統計値(実験自体がうまく働いているかどうかを示す)を示したため、そこから実際のスクリーニング実験を行った。2018 年 5 月から機器の予約状況やメンテナンス、他の実験作業や専門職員のスケジュールなどの関係で、計 7 週間ほど使用して、65,935 化合物についてスクリーニングを行うことができた。その結果、96 化合物が SorLA 発現量を増加もしくは減少させる可能性があるものとしてヒットし、それらについての投与量を変えた追加実験を行って、2018 年 10 月までに 10 種の SorLA 発現量を増加させる候補化合物を得ることができた(図 2)。渡航期間終盤では、これら 10 種のうちのすぐに入手可能であった 2 種について、細胞溶解液の Western Blotting による薬効確認実験を行い、1 種は完全な偽陽性であったこと(物質自体が蛍光を発していた)、もう 1 種は増加の効果が確認できないことを確かめた(図 3)。帰国後の現在、その後に入手可能であった 4 種について、同様の確認実験を行う準備を進めている。



以上、渡航によって可能となった細胞ベースのスクリーニング実験によって、細胞レベルで SorLA の発現量を増加させる可能性をもった低分子化合物を選別することができた。現在これらの物質が本当に細胞で SorLA 発現量を増加させるのかという確認実験を進めているが、細胞で確認が取れたとしても、それをマウスの 1 次ニューロンやマウス個体等に投与し、効果を確認する必要がある。このようにまだまだ越えなければならないハードルは多いものの、SorLA に関しては in-cell western 法による低分子化合物スクリーニングがうまく働くことは達成され、1 年以下の実施で候補化合物が得られているのは、スクリーニング実験としては悪くない達成率と言える。この研究をきっかけとして、さらなるスクリーニング実験や、より発展させた SorLA の分子研究を推進し、

成果を発信していきたい。

< 引用文献 >

1. Motoi, Y., et al., *Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain*. Brain research, 1999. **833**(2): p. 209-215.
2. Hampe, W., et al., *A head-activator binding protein is present in hydra in a soluble and a membrane-anchored form*. Development, 1999. **126**(18): p. 4077-4086.
3. Kanaki, T., et al., *Developmental regulation of LR11 expression in murine brain*. DNA and cell biology, 1998. **17**: p. 647-657.
4. Hermans-Borgmeyer, I., et al., *Unique expression pattern of a novel mosaic receptor in the developing cerebral cortex*. Mechanisms of development, 1998. **70**(1): p. 65-76.
5. Mörwald, S., et al., *A novel mosaic protein containing LDL receptor elements is highly conserved in humans and chickens*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1997. **17**: p. 996-1002.
6. Yamazaki, H., et al., *Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein*

- sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member.* J Biol Chem, 1996. **271**(40): p. 24761-24768.
7. Jacobsen, L., et al., *Molecular characterization of a novel human hybrid-type receptor that binds the alpha2-macroglobulin receptor-associated protein.* J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31379-31383.
 8. Pottier, C., et al., *High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease.* Mol Psychiatry, 2012. **17**(9): p. 875-879.
 9. T Cuenco, K., et al., *Association of distinct variants in SORL1 with cerebrovascular and neurodegenerative changes related to Alzheimer disease.* Archives of neurology, 2008. **65**: p. 1640-1648.
 10. Dodson, S.E., et al., *Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12877-12886.
 11. Meng, Y., et al., *Association between SORL1 and Alzheimer's disease in a genome-wide study.* Neuroreport, 2007. **18**: p. 1761-1764.
 12. Lee, J.H., et al., *Association between genetic variants in sortilin-related receptor 1 (SORL1) and Alzheimer's disease in adults with Down syndrome.* Neuroscience letters, 2007. **425**: p. 105-109.
 13. Lee, J.H., et al., *The association between genetic variants in SORL1 and Alzheimer disease in an urban, multiethnic, community-based cohort.* Archives of neurology, 2007. **64**: p. 501-506.
 14. Dodson, S.E., et al., *LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease.* Journal of neuropathology and experimental neurology, 2006. **65**: p. 866-872.
 15. Andersen, O.M., et al., *Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13461-13466.
 16. Scherzer, C.R., et al., *Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2004. **61**(8): p. 1200-1205.
 17. Kitago, Y., et al., *Structural basis for amyloidogenic peptide recognition by sorLA.* Nature structural & molecular biology, 2015. **22**: p. 199-206.
 18. Caglayan, S., et al., *Lysosomal sorting of amyloid- β by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation.* Sci Transl Med, 2014. **6**(223): p. 223ra20.

5 . 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：Gregory A Petsko, Ph.D.

所属研究機関名：Weill Cornell Medicine

部局名：Feil Family Brain & Mind Research Institute

職名：Arthur J. Mahon Professor of Neurology and Neuroscience

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：Rui Wu, Ph.D. (Weill Cornell Medicine), Ce-Feng Liu, Ph.D. (Weill Cornell Medicine), J. Fraser Glickman, Ph.D. (HTSRC, Rockefeller University), Lavoisier Ramos-Espiritu, Ph.D. (HTSRC, Rockefeller University)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。