

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19476

研究課題名（和文）細胞内アミロイドのケミカルバイオロジー

研究課題名（英文）chemical biology for cytosolic amyloid beta

研究代表者

石川 稔（Ishikawa, Minoru）

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：70526839

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患は、アミロイドやシヌクレインなどの疾患原因タンパク質が変性を経て凝集体を形成し、脳内に蓄積することにより発症する。我々は、神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンドを連結した低分子が、神経変性疾患の一種であるハンチントン病の原因タンパク質を分解誘導することを見出していた。そこで本研究では、ハンチントン病以外の神経変性疾患原因タンパク質を分解誘導することを目標に設定した。生細胞中でシヌクレインが凝集する評価系を構築し、生細胞中のシヌクレイン量を減少させる新規低分子の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

65歳以上の約7人に1人が認知症と推計されており、この対策が本国にとっても最重要課題のひとつである。今回、認知症の原因となる凝集性タンパク質の存在量を減少させる低分子を創製した。本発見は、認知症に対する新しい創薬手法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, and Parkinson's disease (are caused by aggregates of misfolded proteins including amyloid beta and alpha synuclein. We had shown that small hybrid molecules by linking a ligand for ubiquitin ligase with probes for aggregates induce selective degradation of mutant huntingtin. Here, we aimed at decrease of other aggregation-prone proteins that induce neurodegenerative disorders. As a result, we discovered a small molecule that induce decrease of apha synuclein in living cells.

研究分野：創薬化学

キーワード：神経変性疾患

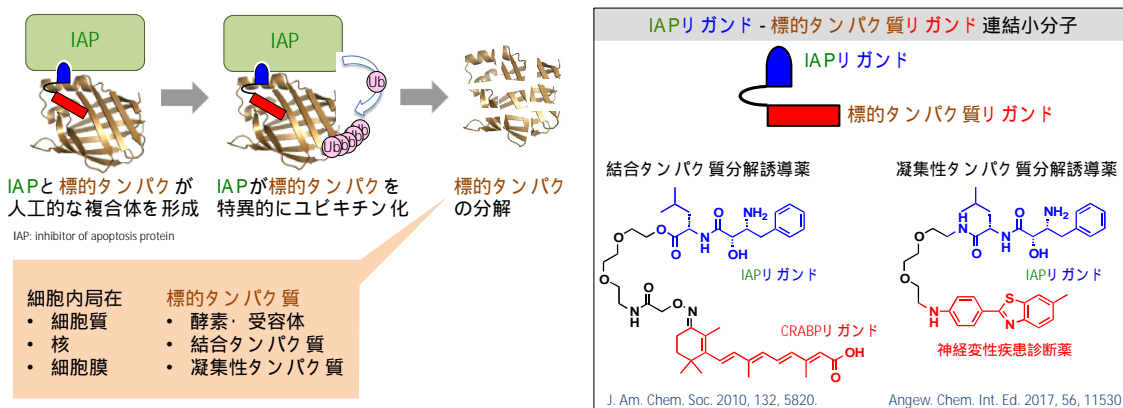
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知症とは、慢性または進行性の脳疾患によって生じ、記憶、思考、見当識、理解、計算、学習、言語、判断など多数の高次脳機能の障害からなる症候群である。65歳以上の約7人に1人が認知症と推計されており、この対策が本国にとっても最重要課題のひとつである。高齢者における認知症の原因は、アルツハイマー病と血管性認知症が上位を占める。この他にも、ハンチントン病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病なども認知症の原因となる。

アルツハイマー病・パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病などの神経変性疾患は、アミロイド β ・ α シヌクレイン・プリオン・変異ハンチンチン (mHtt) などの疾患原因タンパク質の異常凝集により発症すると考えられている。即ち、これら疾患原因タンパク質が、フォールディング異常によりクロス β 構造に富む特徴的な構造に変性すると、これが異常凝集して神経細胞死を引き起こすとの仮説が存在する。このことから、神経変性疾患の治療には毒性の高い凝集タンパク質を減らすことが重要と考えられているが、神経変性疾患に対する根治療法は知られていない。この一因として、神経変性疾患原因タンパク質に対する低分子リガンドがほとんど知られていないことが挙げられる。即ち、タンパク質の機能を制御する古典的な「鍵と鍵穴創薬」では対応が困難な undruggable と認識されている。

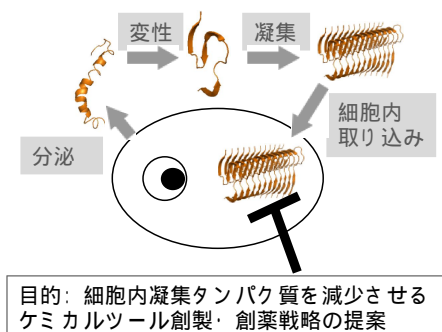
我々は、生細胞内で標的タンパク質のポリユビキチン化を人工的に促進するタンパク質ロックダウン法を開発してきた。この方法は、ユビキチンリガーゼの一種である IAP (inhibitor apoptosis protein) と任意の標的タンパク質の複合体を生理的な条件で人工的に形成できれば、標的タンパク質は IAP によりポリユビキチン化され、プロテアソームで分解されるとの概念を基盤としている。そして、IAP と標的タンパク質の複合体を形成させる為に、IAP の低分子リガンド (ベスタチンメチルエステルや IAP アンタゴニスト) と標的タンパク質のリガンドを連結させた低分子を設計・化学合成した。そして、この低分子が、生細胞中で幾つかの標的タンパク質 (例えば細胞内レチノイン酸結合タンパク質: CRABP) を特異的に減少させることを確認した [J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 5820 etc]。次にこのタンパク質ロックダウン法を用いて、神経変性疾患の原因タンパク質を分解誘導する技術を開発した。先述した通り、神経変性疾患原因タンパク質に対する低分子リガンドはほとんど知られていない。そこで低分子リガンドの代わりに、変性タンパク質の構造的特徴であるクロス β 構造を特異的に認識する神経変性疾患診断薬に着目した。そして、神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンドを連結させた化合物を設計・合成した。本連結低分子が、ハンチントン病の原因タンパク質である mHtt を分解誘導することを見出した [Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 11530, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018, 28, 707]。神経変性疾患においては、ユビキチン・プロテアソーム系が機能障害に陥っているとの報告が数多く存在する一方で、ユビキチン・プロテアソーム系は機能しているとの意見もある。今回、ユビキチン・プロテアソーム系を人工的に利用する低分子により、生細胞実験系にて mHtt 量やその凝集体量を減少させることができ、神経変性疾患の新しい治療戦略の可能性を提案することができた。



2. 研究の目的

神経変性疾患の原因タンパク質の一つである mHtt の存在量を減少させる低分子を創製できたものの、他の神経変性疾患原因タンパク質に対する適用一般性は十分に検討されていなかった。そこで本研究では、タンパク質ロックダウン法を用いた凝集性タンパク質分解誘導が、mHtt 以外のクロス β 構造を構造的特徴とする神経変性疾患原因タンパク質にも適応可能か、一般性を確認することを研究目標に設定した。特に以下の理由より、アルツハイマー病の原因タンパ

ク質であるアミロイドβやαシヌクレインに着目し、これらの分解誘導作用を検討することにした。アミロイドβは、分泌タンパク質である。変性・凝集した細胞外のアミロイドβが脳に沈着し、神経細胞死を引き起こすことが、アルツハイマー病発症の一因であるとの考え方が主流である。このことから、細胞内のユビキチン・プロテアソーム系を人工利用するタンパク質ノックダウン法では、細胞外に局在する凝集性タンパク質を標的にすることは困難と考えられる。しかし近年、細胞外アミロイドβが細胞内に取り込まれ、この細胞内アミロイドβが神経細胞死や記憶障害を強く引き起こす可能性、すなわち細胞間伝播も、複数の研究グループにより指摘されている。もし細胞内のアミロイドβを特異的に減少できれば、研究ツールとして利用でき、細胞間伝播や神経細胞死発現メカニズム解明の一端を担うことが期待できる。また、アミロイドβだけでなくαシヌクレインも細胞間伝播により周囲へと病変を拡大させることが指摘されている。細胞間伝播に対する考察や、疾患治療の新しい戦略の提案を目指し、αシヌクレインも研究対象に設定した。後述するように、不溶性凝集タンパク質の細胞間伝播のモデル評価系が報告されていることも、αシヌクレインを標的にする理由の一つである。



3. 研究の方法

アルツハイマー病原因タンパク質アミロイドβへの適用：

アミノ酸が42個つながったアミロイドβ(アミロイドβ42)タンパク質の凝集体を培養細胞株の培地中に添加すると、凝集体が細胞内に取り込まれるとの情報を、学会コミュニティにて入手した。そこで、市販アミロイドβ42を既存情報により自発的に凝集させ、この凝集体を培養細胞株の培地中に添加し、細胞内のアミロイドβ量をウェスタンブロット法や神経変性疾患診断薬(チオフラビンT)染色により評価した。

アルツハイマー病原因αシヌクレインへの適用：

培養細胞株に、凝集したαシヌクレインタンパク質と遺伝子導入試薬を共添加すると、細胞内に凝集αシヌクレインが蓄積するとの報告がある[J. Biol. Chem. 2010, 285, 34885]。この評価系を利用し、細胞内のαシヌクレイン量をウェスタンブロット法やチオフラビンT染色により評価した。

化合物の構造最適化：

mHttを分解誘導する神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンドを連結させた化合物について、神経変性疾患診断薬やユビキチンリガーゼリガンドの部分構造、リンカー導入位置、リンカー長のどれについても、構造最適化は未実施であった。そこで、種々の神経変性疾患の原因タンパク質に対する分解誘導活性を示すためには、その分解誘導活性の増強も望まれる。そこで分解誘導活性の増強を目指し、本化合物の構造展開を実施した。

4. 研究成果

細胞内アミロイドβの分解誘導活性：

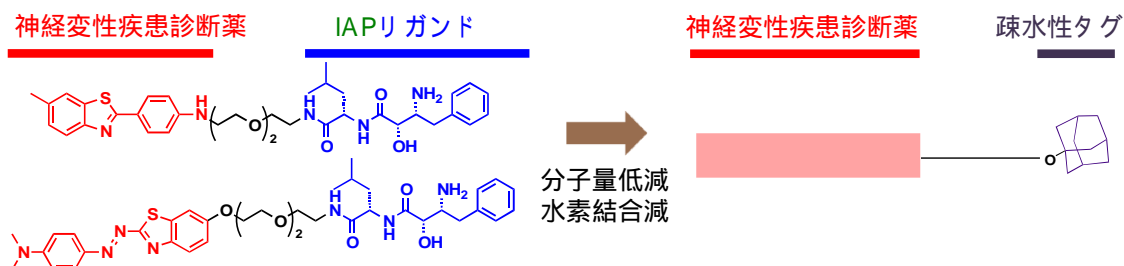
市販のアミロイドβ42タンパク質を自発的に凝集させ、この凝集体を種々の培養細胞株に添加した。種々条件を検討したが、細胞内に凝集体が蓄積する様子は我々の評価系では観測されなかった。アミロイドβ凝集体が細胞間伝播することは報告されているものの、簡易的な評価系である培養細胞において細胞内取り込みが起こる報告が見つからなかったこともあり、本検討は保留した。ところで、家族性アルツハイマー病の原因タンパク質である変異アミロイドβは細胞内で凝集する報告があること、患者様由来の人工多能性幹細胞を用いると細胞内に変異アミロイドβが蓄積するとの報告がある。そこで、人工多能性幹細胞を用いた細胞内アミロイドβ評価系を共同研究により構築している。

αシヌクレインへの分解誘導活性：

既存の報告を参考にして、市販αシヌクレインタンパク質を自発的に凝集させ、この凝集体とαシヌクレインプラスミドを遺伝子導入試薬と共に培養細胞株に添加した。この条件において、細胞内に神経変性疾患診断薬(チオフラビンT)で染色される凝集体の存在が確認された。そこで次に、構築した評価系に、神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンド(ベスタ

チンメチルエステル)を連結させた化合物を処理し、その後細胞を破碎し、 α シヌクレイン抗体を用いたウェスタンブロット法により、細胞内の α シヌクレインの存在量を評価した。しかしながら、この系においては化合物処理により α シヌクレインの存在量が顕著に減少する結果は得られなかった。

そこで次に、連結低分子の類縁体を合成し、これら類縁体の有効性を評価する計画を立案した。具体的な分子設計として、1)ユビキチンリガーゼと連結分子の親和性を向上させるべく、ユビキチンリガーゼリガンドの構造展開を実施する、2)クロス β 構造と連結分子の親和性を向上させるべく、神経変性疾患診断薬の構造展開を実施する、3)細胞膜透過性向上を目指し、連結化合物の分子量低減と水素結合のドナー・アクセプター数を減少させる構造展開を実施する、3点を立案した。1)2)については、それぞれ8種、4種の化合物を合成し、その一部については細胞障害性試験を実施した。3)に関して、神経変性疾患診断薬とアダマンチル基を連結した化合物が、タンパク質の品質管理機構を人工利用し、神経変性疾患原因タンパク質をポリユビキチン化することにより分解誘導できると期待した。アダマンチル基はベスタチンメチルエステルと比較すると低分子量かつ水素結合ドナー・アクセプター数が少ない(存在しない)ため、細胞膜透過性が向上することも期待された。この連結化合物を合成し、先述の評価系において細胞内 α シヌクレイン量を評価したところ、本連結化合物が生細胞中の α シヌクレイン量を減少させることを見出した[山下博子博士論文(東京大学大学院薬学系研究科)]。更に、疎水性タグとしてアダマンチル基以外の疎水性部分構造を連結した化合物を合成し、構造活性相関を解析した。本成果を、他課題研究の成果と合わせて学会発表したところ、平成29年度日本薬学会医薬化学部会メディシナルケミストリーシンポジウム優秀賞の受賞に至った。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

1. 石川 稔 標的タンパク質のケミカルロックダウンと応用展開 日本薬学会第139年会シンポジウム 選択的タンパク質分解医薬品開発の最前線(招待講演) 2019年3月23日
2. 石川稔 標的タンパク質のケミカルロックダウン 理化学研究所 Pioneering Project: Chemical Probe(生命現象探索分子)第一回合同合宿セミナー メイプルイン幕張(千葉県千葉市)(招待講演) 2018年10月13日
3. 山下 博子、友重 秀介、野村 さやか、大金 賢司、橋本 祐一、石川 稔 凝集性タンパク質分解における疎水性タグの有効性の検討 第75回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 千葉大学西千葉キャンパス(千葉県千葉市) 2018年5月20日
4. 石川 稔 ユビキチン化により標的タンパク質を分解する低分子 第1回ユビキチン研究会 東京大学薬学部(東京都文京区)(招待講演) 2018年1月20日
5. 友重 秀介、野村 さやか、山下 博子、大金 賢司、橋本 祐一、石川 稔 神経変性疾患原因タンパク質のケミカルロックダウン 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム 名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)(平成29年度日本薬学会メディシナルケミストリーシンポジウム優秀賞) 2017年10月26日

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-8ken-HP/Index.html>

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chem/IMCB-strategy-HP/Top.html>

6. 研究組織

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。