

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06769

研究課題名（和文）新規アルツハイマー病治療薬創出に向けたNRBP1-ユビキチンリガーゼ阻害剤の探索

研究課題名（英文）Discovery of NRBP1-Ubiquitin Ligase Inhibitors for the Creation of Novel Alzheimer's Disease Therapeutics

研究代表者

安川 孝史（Yasukawa, Takashi）

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・講師

研究者番号：60291936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：NRBP1とBR12間の相互作用を特異的に阻害する化合物を探索するため、化合物ライブラリー（天然物、低分子及び中分子）を用いてスクリーニングを行った。中分子化合物のいくつかでBR12のプロセッシング産物量の増加とアミロイド（A β ）の凝集の抑制が確認されたが、内在性BR12の増加とA β 産生の抑制を誘導するのに十分な作用強度の活性を持った化合物は得られなかった。天然物化合物で内在性BR12の増加とA β 産生の抑制を誘導する2種類のヒットが得られたが、どちらも構造が複雑なため、合成展開による類縁体の取得が困難なことから、これら2化合物を基にしたリード化合物の探索は断念せざるを得なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：NRBP1-BR12間の相互作用を特異的に阻害する化合物のスクリーニングによって2種類のヒット化合物が得られたことから、当該化合物の存在が確認された。さらに、神経系培養細胞レベルで、ヒット化合物の添加によって内在性BR12の増加とA β 産生の抑制が誘導されることから、NRBP1がアルツハイマー病（AD）治療薬の標的として妥当であることが示された。

社会的意義：BR12の機能を活性化するNRBP1-BR12間の相互作用を特異的に阻害する化合物が新規AD治療薬の開発につながる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：For the discovery of compounds that inhibit the interaction between NRBP1 and BR12, screening was conducted using natural product, small molecule, and middle molecule libraries. Although an increase in the amount of BR12 processing products and inhibition of amyloid (A β) aggregation were observed with some of the middle molecule compounds, no compounds were found to have sufficient potency of action to induce an increase in endogenous BR12 and inhibition of A β production. Two hit compounds were obtained that induced an increase in endogenous BR12 and suppression of A β production, but both were natural compounds with complex structures, making it difficult to obtain analogues through synthetic expansion. Therefore, the search for lead compounds based on these two compounds had to be abandoned.

研究分野：分子生物学

キーワード：アルツハイマー病 ユビキチンリガーゼ NRBP1

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A β の産生は、BRI2とその相同因子であるBRI3がアミロイド前駆体タンパク質 (APP) に結合して、APP上の β -および γ -セクレターゼの結合部位を覆い隠すことにより抑制される。加えて、BRI2、BRI3両因子はA β にも結合し、そのオリゴマー形成も抑制する。さらに、BRI2はA β 分解酵素であるInsulin degrading enzyme (IDE)の細胞からの分泌量を増やしてA β の分解も促進する。同時にBRI2は、2型糖尿病および同病患者に合併するADの発症に深く関わる膵島アミロイドポリペプチド (IAPP) のオリゴマー形成の抑制や、IDEを介したIAPPの分解促進にも寄与する。また、BRI2遺伝子の片アレルの変異による正常BRI2タンパク質量の減少は、A β 産生の亢進を招き、AD類似の臨床ならびに病理像を呈する家族性英国型/デンマーク型認知症 (FBD/FDD)の原因になる。その後、AD発症初期患者の海馬においても、APPと複合体を形成するBRI2タンパク質量の減少が認められることが判明し、FBD/FDDだけでなくADの発症にもBRI2の抗AD機能の低下が深く関わっていることが示唆されている (Del Campo M. *Neurobiol. Aging* 2014, *J. Alzheimers Dis.* 2014)。

最近申請者らは、NRBP1がTSC22D3とTSC22D4のシャペロン機能により2量体化し、Cul2およびCul4Aと結合してヘテロ2量体構造のNRBP1-E3複合体を形成、BRI2/BRI3を選択的にユビキチン(Ub)化して分解へと導くことを発見した。さらに、神経系培養細胞においてNRBP1をノックダウンすると、細胞内のBRI2/BRI3タンパク質量の増加と共にA β の産生が有意に低下することを明らかにした [Yasukawa et al. *Cell Reports* 2020]。以上より、NRBP1とBRI2/BRI3間の結合を阻害する化合物は、BRI2/BRI3を安定化して両因子の抗AD作用を増強することで、ADの治療薬になり得るのではと考え、当該化合物をスクリーニングするためのアッセイ系を構築した。本研究テーマは、理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム (DMP)の創薬テーマに選定され、同DMP支援のもと約3万種の化合物ライブラリーを用いて1回目のスクリーニングを行い、三次評価でNRBP1-E3活性を濃度依存的に阻害する12個の化合物を取得した。

2. 研究の目的

ADに対する根本治療薬創出のため、①NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用を阻害する化合物 (ヒット化合物)の探索、②ヒット化合物を基に医薬品となりうる化合物 (リード化合物)の探索とその条件を備えた化合物への最適化、③ADモデルマウスを用いた有効性の検証、を行い新規AD治療薬の開発候補化合物の取得を目指す。

3. 研究の方法

(a) ヒット化合物の探索

ライブラリーから下記の一次～高次評価によりヒット化合物を選抜する。一次/二次評価では、理研DMP支援のもと、二分子発光補完法を用いたハイスループットスクリーニング (HTS)を行う。

[二分子発光補完法] 分泌型ガウシアルシフェラーゼ (Gluc)をN末端側 (Gn)とC末端側 (Gc)の2つの断片に分割、各々BRI2とNRBP1に連結した発現用コンストラクトを作製した。培養細胞内で共発現させると両タンパク質が結合した場合にGnとGcが近接して培養上清中のGlucの活性が回復し発光が検出されるが、化合物の添加により結合が阻害されると発光が見られなくなる。(尚、BRI2の方がBRI3に比べ強力なA β およびIAPPの毒性低減作用を持っているため、HTSにはBRI2を用いる。)

一次評価：化合物濃度5 μ Mにおいて、NRBP1-BRI2間の結合阻害率50%以上かつ細胞増殖阻害率50%以下のものを選抜する。

二次評価：濃度依存的に結合を阻害するものを選抜する。また、カウンター試験を行い、非特異的に阻害するものを除外する。

三次評価：NRBP1-E3によるBRI2のUb化を濃度依存的に阻害するものを選抜する。NRBP1安定発現293T細胞に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)とBRI2を共発現させ、二次ヒット化合物を添加して48時間培養する。細胞抽出液を抗HA抗体で免疫沈降した後、抗BRI2抗体によるウェスタンブロット (WB)を行い、Ub化BRI2量を調べる。

高次評価：A β の総産生量が上昇する APP 変異体を安定発現する神経系培養細胞 SH-SY5Y および 293T 細胞を用いて以下の解析を行い、①～③を満たすものを真のヒット化合物とする。

①細胞内の BRI2/BRI3 タンパク質量を増加させる。(WB)

②培養上清中の A β 40/42 の濃度を低下させる。(WB と ELISA)

③A β の凝集を抑制する。(二分子発光補完法) : Gn-A β 42 と Gc-A β 42 (Hashimoto T et al. *J. Biol. Chem.* 2011; 東大神経病理 橋本博士より入手) の安定共発現 293T 細胞に化合物を添加し、培養上清中の Gluc 活性の低下を確認する。

(b) リード化合物の取得と最適化

ヒット化合物のクラスター解析のデータを基に類縁体化合物を入手/合成し、一次～高次評価、物性評価、*in vitro* 薬物動態評価等を行う(理研創薬化学/分子設計基盤ユニットと共同で行う)。評価結果より課題が明らかになった場合は、その解決を図る目的でクラスター解析、構造活性相関解析のデータを基に、官能基や構造の一部を換えた化合物の設計・合成(誘導体の合成展開)を行う。この化合物の[評価→設計→合成展開→評価……]の過程を繰り返すことにより、活性の向上したリード化合物に絞り込む。さらに毒性評価、安全性評価等を行ってリード化合物を最適化し、医薬品に要求される物性、薬理活性、体内動態、安全性などに関する条件を満たした開発候補化合物を創出する。

(b) リード化合物の取得と最適化

ヒット化合物のクラスター解析のデータを基に類縁体化合物を入手/合成し、一次～高次評価、物性評価、*in vitro* 薬物動態評価等を行う(理研創薬化学/分子設計基盤ユニットと共同で行う)。評価結果より課題が明らかになった場合は、その解決を図る目的でクラスター解析、構造活性相関解析のデータを基に、官能基や構造の一部を換えた化合物の設計・合成(誘導体の合成展開)を行う。この化合物の[評価→設計→合成展開→評価……]の過程を繰り返すことにより、活性の向上したリード化合物に絞り込む。さらに毒性評価、安全性評価等を行ってリード化合物を最適化し、医薬品に要求される物性、薬理活性、体内動態、安全性などに関する条件を満たした開発候補化合物を創出する。

4. 研究成果

(1) 理研 NPDepo の天然物化合物ライブラリーならびに東大コアの低分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

初回スクリーニングの三次評価で得られた 12 個の化合物の高次評価を行った。2 個の化合物 A, B (未発表のため仮称) が、内在性 BRI2 の増加作用、A β の産生抑制作用ならびに凝集抑制作用を示した(化合物 A の凝集抑制作用については全長 Gluc の活性も下がるため不確定)(図 1)。

化合物 A については、理研の生命科学・創薬研究支援基盤事業(BINDS)の支援(名古屋大 横島先生)を受けて、可能な範囲で官能基を置換した類縁体を 15 個合成し、高次評価を行った。その結果、A4 と A5 の 2 つが内在性 BRI2 の増加(図 2 A)ならびに A β の産生抑制(図 2 B)を誘導したが両化合物とも化合物 A に比して低い活性に留まった。

そこで、新たに A4 の類縁体 1 個、A5 の類縁体 7 個、化合物 A の部分構造体(A-1)を合成して評価を行ったが、いずれの化合物も A4, A5 に比べて低い活性であった(図 3)。

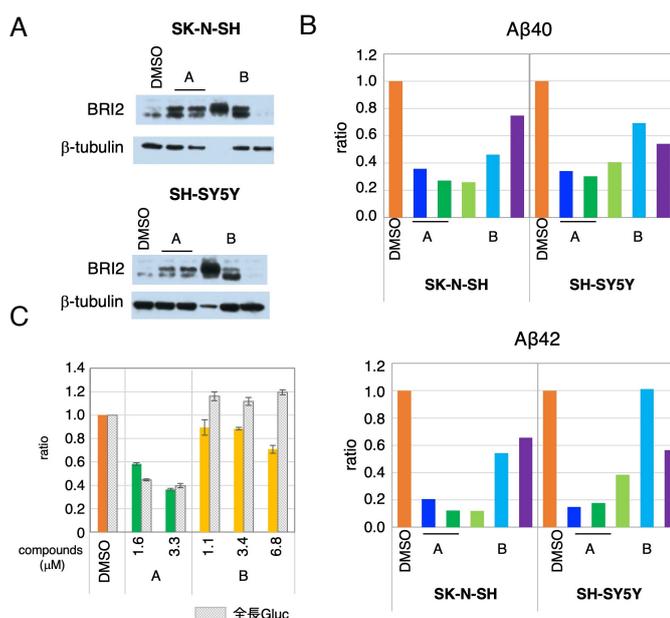


図 1 化合物 A, B の高次評価 (A) 内在性 BRI2 の増加作用、(B) A β の産生抑制作用、(C) A β 凝集抑制作用、の評価 (A, B は神経系培養細胞 SK-N-SH, SH-SY5Y、C は 293T 細胞を用いた。)

A

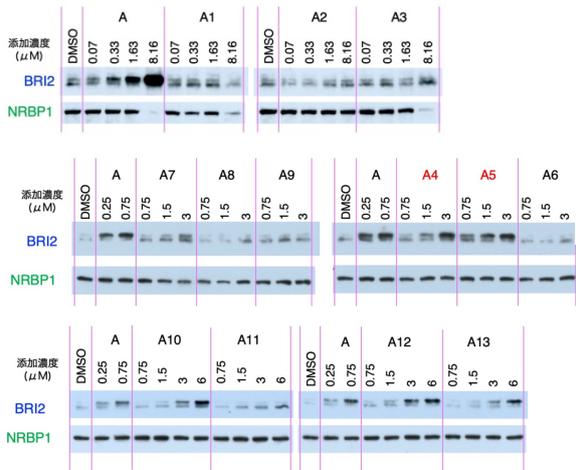
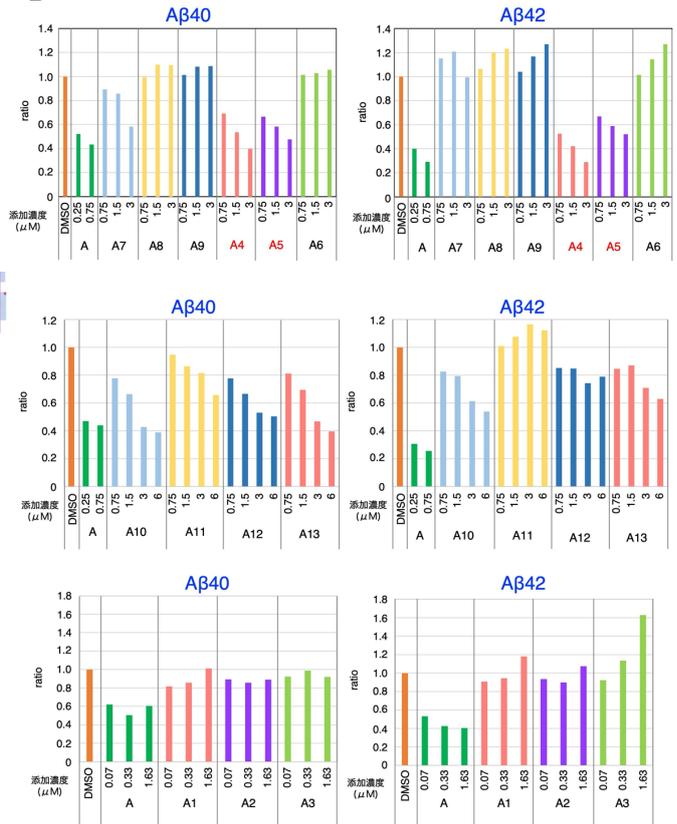


図2 化合物Aの類縁体の高次評価 (A) 内在性 BRI2 の増加作用、(B) $A\beta$ の産生抑制作用、の評価 (神経系培養細胞 SH-SY5Y を用いた。)

B



A

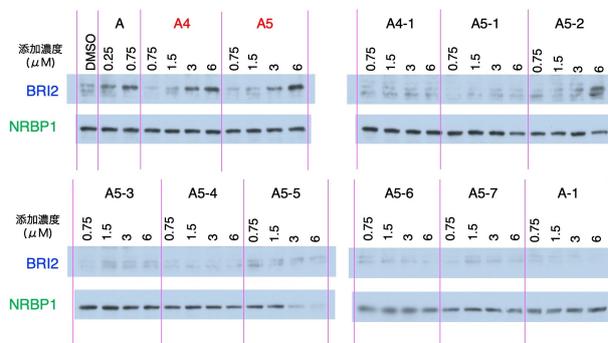
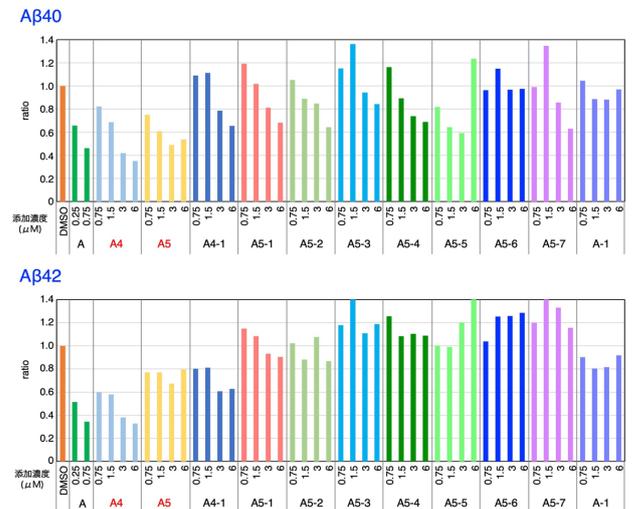


図3 化合物 A4, A5 の類縁体の高次評価 (A) 内在性 BRI2 の増加作用、(B) $A\beta$ の産生抑制作用、の評価 (神経系培養細胞 SH-SY5Y を用いた。)

B



(2) AMED 中分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

次いでタンパク質相互作用の阻害を予測して分子設計・合成され、かつ合成展開が可能な中分子化合物ライブラリー A, B (15,000 化合物) を用いてスクリーニングを実施した。

一次評価で 231 個、二次評価で 16 個の化合物を選抜した。これら 16 個の化合物の高次評価を行った。

① 内在性 BRI2 タンパク質量について (図4 A)

複数の化合物で、BRI2 のプロセッシングの産物である NTF (N-terminal fragment) のタンパク質の増加が認められたが、immature および mature BRI2 量の増加はほとんど認められなかった。

②Aβ 産生抑制作用について (図 4 B)

Aβ 40 ならびに Aβ42 の産生を再現性をもって抑制する化合物は認められなかった。

③Aβ 凝集抑制作用について (図 4 C)

ほとんどの化合物が抑制作用を示し、その作用強度と NTF 量増加の程度との間に一定の関連性が認められた。

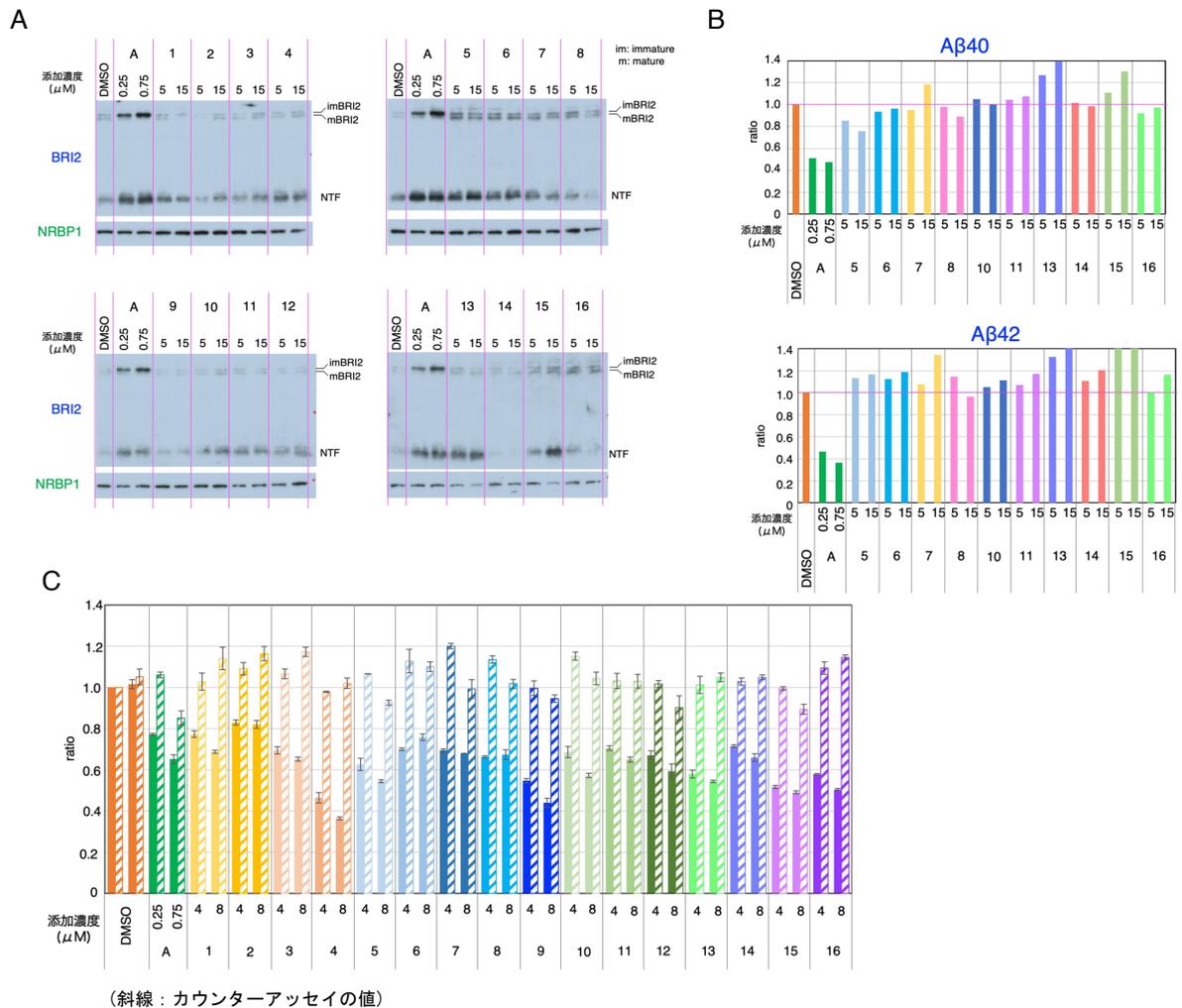


図 4 中分子ライブラリー化合物の高次評価 (A) 内在性 BRI2 の増加作用、(B) Aβ の産生抑制作用、(C) Aβ の凝集抑制作用、の評価 (A, B は神経系培養細胞 SH-SY5Y、C は 293T 細胞を用いた。)

まとめ

中分子化合物のいくつかで BRI2 の NTF 量の増加と Aβ の凝集抑制が確認されたが、内在性 BRI2 の増加と Aβ 産生の抑制を誘導するのに十分な作用強度の活性を持った化合物は、今回用いたライブラリーには存在しないと考えられた。天然物化合物ライブラリーから内在性 BRI2 の増加と Aβ 産生の抑制を誘導する 2 種類のヒット化合物が得られたが、どちらも構造が複雑なため、合成展開による類縁体の取得が困難なことから、これら 2 化合物を基にしたリード化合物の探索は断念せざるを得なかった。

今後は、中分子ライブラリー C、D や医薬品としての適正指標を満たす化合物で構成された日本パブリックライブラリコンソーシアム (J-PUBLIC) の化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安川 孝史, 筒井 文, 佐藤 チエリ, 佐藤 滋生, Anita Saraf, Michael P Washburn, Laurence Florens, 寺田 透, 清水 謙多郎, Ronald C Conaway, Joan W Conaway, 麻生 悌二郎
2. 発表標題 NRBP1-ユビキチンリガーゼは生理的抗アルツハイマー病因子であるBRI2/BRI3の分解を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------