

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590151

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療薬を目指したアミロイドベータを加水分解する抗体の開発

研究課題名(英文)Development of antibodies with Abeta hydrolyzing activity for treatment of Alzheimer's disease

研究代表者

田口 博明 (Taguchi, Hiroaki)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：20549068

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)：アルツハイマー病(AD)は認知機能が低下し、神経細胞の機能障害を伴う痴呆症である。これまでの研究で、アミロイドペプチド(A β)が病因として関与していることが考えられている。本研究では、AD治療薬を目指したA β を加水分解する抗体を誘導するための抗体誘導試薬の分子設計と合成を行った。分子設計されたリン酸ジエステル誘導体は、加水分解活性を有する抗体モデルとして用いた酵素に対して高い阻害活性を示した。さらに、このリン酸ジエステル誘導体をA β に導入することにより、A β 加水分解抗体を誘導する試薬を得た。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of amyloid- β -peptide (A β) in the brain is one of the pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) and has been considered to play a crucial role in the neurodegenerative events underlying AD. Catalytic Abs capable of binding and hydrolyzing A β are candidates as immunotherapeutic agents for AD due to their ability to inactivate multiple A β molecules per Ab molecule.

In this study, we designed and synthesized phosphonate esters that could be induced production of Abs capable of hydrolytic activity. Evaluation of phosphonate esters containing a hydroxyl group or motif that can capture a water molecule was carried out using trypsin as a model of catalytic Abs. According to the assay results, most promising phosphonate ester to induce catalytic Abs was used for the synthesis of the reagent that can induce Abs capable of binding and hydrolyzing A β .

研究分野：医薬品化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は認知機能が低下し、神経細胞の機能障害を伴う痴呆症である。これまでの研究で、アミロイドβペプチド (Aβ) が病因として関与していることが考えられている。現在では脳内 Aβ の増加・凝集が AD 発症の原因であるという「アミロイド仮説」を基にして、様々な治療薬の開発が行われている。

申請者はこれまで、タンパク質を加水分解する触媒抗体の単離や機能の解析、セリンプロテアーゼの不可逆的阻害剤であるリン酸ジエステル誘導体を用いた触媒抗体の作成方法の研究を行ってきた。触媒抗体は高い親和性と基質特異性を持つ抗体分子に、酵素のような触媒作用をもちこんだ分子であり、オーダーメイドの人工触媒として、幅広い分野で注目を集めている。触媒抗体の最も有意義な応用分野として、医薬品としての臨床応用が挙げられる。すなわち、触媒抗体が病原性タンパク質を選択的に加水分解することができれば、これらタンパク質を永久的に無毒化することができるはずである。その作用機構より、触媒抗体 1 分子は生体内での半減期までに約数万個の基質分子を加水分解することができる。一方、現在臨床に用いられている典型的な抗体 1 分子は 2 個の分子しか除去することができない。このことは、触媒抗体が抗体治療に用いられている典型的な抗体より非常に少ない投与量で、治療効果を与えることができ、抗体治療における副作用の軽減と治療費の抑制が可能である。しかしながら、触媒抗体の加水分解活性は同様の反応を触媒する酵素より低いことが知られており、臨床応用を視野に入れた場合、より加水分解活性の高いものが必要である。申請者は加水分解活性が低い原因の一つが、基質の加水分解に必要な水分子の可触性不足にあると考えている。すなわち水分子を触媒抗体の活性中心近傍に配置すれば、酵素のようにスムーズに加水分解が進み、酵素と同程度の加水分解活性を持つ触媒抗体の産生が可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、触媒抗体の加水分解活性の改善に重要であると考えられる水分子、を模倣または捕獲できる構造を持ったリン酸ジエステル誘導体の合成方法と反応条件を確立すること、そして合成された種々のリン酸ジエステル誘導体の物理化学的、生化学的評価を行い、最も評価が高かったリン酸ジエステル誘導体を Aβ へ導入することを目的とする。

このような触媒抗体誘導試薬を用いて誘導された触媒抗体は、その触媒活性の向上が期待され、当該分野での医学的及び産業的な利用への発展が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) 水分子を模倣したリン酸ジエステル誘導体の合成方法の確立

水分子を模倣した構造を有するリン酸ジエステル誘導体は、ヒドロキシ基 (水分子を模倣) が触媒抗体の活性中心近傍に配置されるように、リン酸ジエステルとヒドロキシ基間の距離を考慮して分子設計を行った。適切な空間配置を探索するため、リンカー部分の検討を行った。水分子を模倣した部分にセリンやトレオニンなどのヒドロキシ基を持ったアミノ酸や炭素鎖の異なるアミノアルコールを用い、また、リンカー部分にサルコシンを用いた。リジンをも模倣したジフェニルリン酸部分の合成は Oleksyszyn 反応を用い構築し、水分子を模倣した部分と縮合することにより、リン酸ジエステル誘導体の合成を行った。

(2) 水分子を捕獲できる構造を持ったリン酸ジエステル誘導体の合成方法の確立

水分子を捕獲できる構造を有するリン酸ジエステル誘導体の分子設計は、炭酸脱水酵素やアミノペプチダーゼに代表される金属酵素の活性中心を模倣するように行った。環状ポリアミンは人工金属酵素の開発に用いられ、種々の金属イオンと安定な配位結合を形成することが知られている。それら環状ポリアミンの金属錯体の axial 位に補足された水分子が、加水分解反応を触媒していることが報告されている。そこで、水分子を捕獲できる構造部分に金属酵素の活性中心を模倣した構造である、環状ポリアミン (サイクレン、サイクラムなど) を用い合成を行った。環状アミンは Boc 基で選択的に保護を行い、その後、リジンをも模倣したジフェニルリン酸と縮合することにより目的物を得た。

(3) リン酸ジエステル誘導体の評価

(1) および (2) で合成されたリン酸ジエステル誘導体について評価を行った。加水分解活性を有する抗体のモデルとして、トリプシンを用い、その加水分解の阻害活性をペプチド性蛍光合成基質を用い測定した。さらに、リン酸ジエステル誘導体について分子軌道法やドッキング実験により構造解析を行い、水分子模倣部位または水分子捕獲部位とリン酸部分の距離について調べた。

(4) リン酸ジエステル誘導体の Aβ への導入

構造解析および生化学的評価の結果より最も評価の高かったリン酸ジエステル誘導体を選び、Aβ1-40 および Aβ17-27 への導入を試みた。Aβ1-40 は固相ペプチド合成と HPLC 精製により得、緩衝液中 GMBS で Lys 側

鎖を修飾したのち、Cys 残基を含むリン酸ジエステル誘導体を導入することにより目的物を得た。一方、AB17-27 への導入は、固相ペプチド合成により得られた保護 AB17-27 とリン酸ジフェニルエステルを縮合した後、脱保護、HPLC 精製により目的物を得ることに成功した。

4. 研究成果

水分子を模倣または水分子を捕獲できる構造を持ったリン酸ジエステル誘導体の合成法を確立し、19 種類のリン酸ジエステル誘導体の合成に成功した。また得られたリン酸ジエステル誘導体を HPLC にて精製することによりジアステレオマーを分離することに成功した (図 1)。

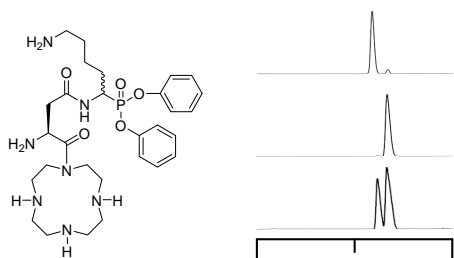
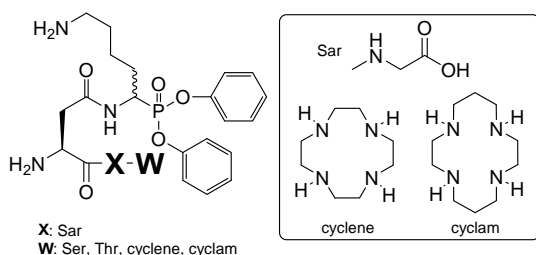


図 1、リン酸ジエステル誘導体の構造と HPLC によるジアステレオマーの分離

得られたリン酸ジエステルの阻害活性を調べた結果の一部を図 2 に示す。水分子を模倣した誘導体である 1b に非常に強い活性が見られた。一方、水分子を捕獲する構造を有する誘導体 5、6 はその活性が 1b に比べ、20 倍以上低かった。



Compound	X	W	Stereochemistry*	$k_{obs}/[I], M^{-1}min^{-1}$
1a	—	Ser	S	7045 ± 132
1b	—	Ser	R	727916 ± 101804
2a	—	Thr	S	2200 ± 227
2b	—	Thr	R	319966 ± 27397
3a	Sar	Ser	S	4389 ± 405
3b	Sar	Ser	R	10618 ± 1562
4a	Sar	Thr	S	4049 ± 325
4b	Sar	Thr	R	7446 ± 1870
5a	—	cyclene	R	Ni ²⁺
5b	—	cyclene	S	Ni ²⁺
6a	—	cyclam	R	36118 ± 2784
6b	—	cyclam	S	6728 ± 1714

図 2、リン酸ジエステル誘導体による加水分解の阻害活性

さらに、これら化合物 5 について分子モデリングを行って構造解析を行ったところ、水分子捕獲部位とリン酸部分の距離は約 4 オングストロームと分子設計通りであったが (図 3)、ドッキング実験より水分子捕獲部位の立体障害により、酵素との複合体がうまく形成できないことが示唆された。このため酵素阻害活性が低下したものであると考えられる。

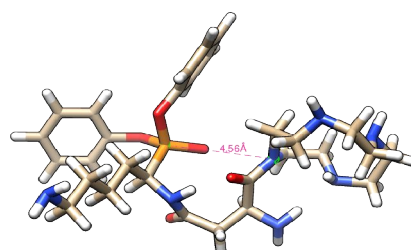


図 3、水分子捕獲構造を有するリン酸ジエステル誘導体 5 のモデル

一方、水分子を模倣した構造を有するリン酸ジエステル誘導体 1b のドッキング実験では、リン酸部位が酵素の活性中心と相互作用しており、水酸基がその近傍に配置されていることがわかった (図 4)。

以上のことから、生化学的および構造化学的手法を用い候補化合物を評価することが有効な実験方法であることが示された。

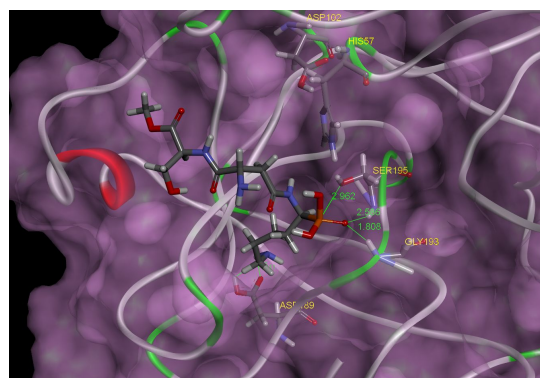


図 4、水分子模倣構造を有するリン酸ジエステル誘導体 1b のドッキングモデル

これらの結果より、候補化合物を 1b とし、AB への導入を試み、目的物を得ることに成功した。今後、得られたペプチドリン酸ジエステルを含む AB 誘導体が AB を加水分解する抗体を誘導することができるかを検討するため、マウスを用いた免疫を行う。誘導されたポリクローナル抗体の AB に対する特異的な結合や加水分解能を生化学的手法により検討し、さらにモノクローナル抗体の作成を行い、AD 治療薬の開発へつなげる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Taguchi H, Fujita Y, and Tsuda Y.
Design and synthesis of biotinylated
peptidyl phosphonate probe for the
isolation of single chain Fv with
hydrolyzing activity
Peptide 2012, **32**, 196-197 (2013) 査読有

Taguchi H, Fujita Y, and Tsuda Y.
Design and Synthesis of Peptidyl
Phosphonate for Isolation of Antibodies
with Hydrolyzing Activity
Peptide Science, **49**, 301-302 (2013) 査読有

Nishiyama Y, Taguchi H, Hara M, Planque
SA, Mitsuda Y, and Paul S
Metal-dependent amyloid -degrading
catalytic antibody construct
J Biotechnol, **180**, 17-22 (2014) 査読有
doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.026.

Taguchi H, Ogawa M, Oohashi S, and Fujita
Y.
Synthesis and Biochemical Evaluation of
Isopeptidyl Phosphonate Ester Derivatives
containing Hydroxyl Group or Macrocyclic
Polyamine
Peptide Science, **50**, 153-154 (2014) 査読有

Taguchi H, Etou D, Oode M, Oohashi S,
Ogawa M, and Fujita Y.
Synthesis of isopeptidyl phosphonate
derivatives
Peptides 2014, **33**, 196-197 (2015) 査読有

Taguchi H
Synthesis and development of peptides
directed to drugs
Chemical Industry, **65**, 897-902 (2014) 査読無

Planque SA, Nishiyama Y, Sonoda S, Lin
Y, Taguchi H, Hara M, Kolodziej S, Mitsuda
Y, Gonzalez V, Sait HB, Fukuchi K, Massey
RJ, Friedland RP, O'Nualain B, Sigurdsson
EM, and Paul S
Specific Amyloid Clearance by a
Catalytic Antibody Construct
J Biol Chem, **290**, 10229-10241 (2015) 査読有
doi:10.1074/jbc.M115.641738.

〔学会発表〕(計 14 件)

田口博明, 藤田快男, 津田裕子
アミロイド ペプチド加水分解抗体の単離
を指向したプローブの開発
日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会,
2012年6月7日-9日, 京都

田口博明, 藤田快男, 津田裕子
触媒抗体単離を目指したプローブの開発
第58回日本薬学会東海支部大会, 2012年7
月7日, 静岡

Taguchi H, Fujita Y, and Tsuda Y.
Design and synthesis of biotinylated
peptidyl phosphonate probe for the
isolation of single chain Fv with
hydrolyzing activity
32nd European Peptide Symposium, 2012年
9月2日-7日, Athens, Greek

田口博明, 藤田快男, 津田裕子
加水分解活性を有する抗体の単離を指向し
たペプチド性リン酸ジエステルのデザイン
と合成
第49回ペプチド討論会, 2012年11月7日-
9日, 鹿児島

田口博明, 大橋駿, 小川光広, 藤田快男
環状ポリアミンを含んだペプチド性リン酸
ジエステル誘導体の合成
第133回日本薬学会, 2013年3月27日-
30日, 横浜

小川光広, 大橋駿, 藤田快男, 田口博明
水酸基を有するイソペプチドリリン酸ジエス
テル誘導体の酵素阻害活性評価
第59回日本薬学会東海支部大会, 2013年7
月6日, 名古屋

Taguchi H, Ogawa M, Oohashi S, and Fujita
Y.
Synthesis and Biochemical Evaluation of
Isopeptidyl Phosphonate Ester Derivatives
containing Hydroxyl Group or Macrocyclic
Polyamine
4th Asia-Pacific international Peptide
Symposium, 2013年11月6日-8日, 大阪

大橋駿, 小川光広, 藤田快男, 田口博明
環状ポリアミンを含んだイソペプチドリ
ン酸誘導体の合成と酵素阻害活性評価
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部合同学術大会, 2013年11月10日,
鈴鹿

小川光広, 大橋駿, 藤田快男, 田口博明
水酸基を有するイソペプチドリリン酸誘導
体の合成とそのトリプシン阻害活性
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会
東海支部合同学術大会, 2013年11月10日,
鈴鹿

田口博明, 衛藤大輝, 大出慎, 小川光広,
大橋駿, 藤田快男
水酸基を有するイソペプチドリリン酸ジエス
テル誘導体の合成と酵素阻害活性評価

第 134 回日本薬学会，2014 年 3 月 27 日-
30 日，熊本

衛藤大輝，大出慎，佐々木みく，森本佐知
子，藤田快男，田口博明
加水分解活性を有する抗体の誘導を目指し
た試薬の開発

第 60 回日本薬学会東海支部大会，2014 年 07
月 05 日，鈴鹿

Taguchi H, Etou D, Oode M, Oohashi S,
Ogawa M, and Fujita Y.

Synthesis of isopeptidyl phosphonate
derivatives and their biochemical
evaluation

33rd European Peptide Symposium, 2014 年
8 月 31 日-2014 年 9 月 5 日, Sofia, Bulgaria

田口博明

抗体医薬開発ツールとしてのリン酸ジエス
テル含有ペプチドの開発

第 20 回ペプチドフォーラム「生命分子・ペ
プチド機能に学ぶ医薬品」

2015 年 3 月 13 日，長浜

田口博明，上村尚子，松島慶，藤田快男
部分アミロイド ペプチド配列を含む消光
性蛍光基質の開発

第 135 回日本薬学会，2015 年 3 月 25 日-
28 日，神戸

6．研究組織

(1)研究代表者

田口 博明 (TAGUCHI HIROAKI)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：20549068