

BRI2/BRI3 のユビキチン化阻害による革新的アルツハイマー病創薬

麻生 悌二郎

高知大学教育研究部医療学系 遺伝子機能解析学講座

【研究の背景】

アミロイド前駆体(APP)結合タンパク質であるBRI2とBRI3は、APP上の β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼの結合部位をマスクしてAPPのプロセッシングを阻害し、アミロイド β ($A\beta$)の産生を抑制する。両BRI因子は $A\beta$ とも相互作用して $A\beta$ オリゴマーの形成も抑制する。さらに、BRI2はInsulin degrading enzyme (IDE)の細胞からの分泌量を増加させ、 $A\beta$ の分解も促進する¹⁾。同時にBRI2は、2型糖尿病の発症および同病へのアルツハイマー病合併に深く関わる膵島アミロイドポリペプチド(IAPP; 別名アミリン)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²⁾(図1の①~⑤)。また、BRI2遺伝子の片方のアレルの変異は、正常BRI2量の減少による $A\beta$ 産生の亢進を招き、アルツハイマー病類似の臨床症状と神経病理学的所見を示す家族性の英国型認知症(familial British dementia; FBD)並びにデンマーク型認知症(familial Danish dementia; FDD)の発症原因になることが知られている¹⁾。

最近私どもは、NRBP1を基質認識タンパク質としてもつユビキチンリガーゼ(NRBP1-E3)がBRI2/BRI3を選択的にユビキチン(Ub)化して分解に導く(図1)ことを発見した。また、神経系細胞におけるNRBP1の機能阻害が、BRI2/BRI3の細胞内在量の増加と共に $A\beta$ 産生量の有意な減少を誘導することを明らかにした³⁾。以上より、NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用を特異的に阻害する化合物を開発すれば、両BRI因子の抗アルツハイマー病機能を人為的に活性化させることが可能となり、アルツハイマー病に対する根本治療薬の創製に資するのではないかと着想し(図1)、当該阻害剤探索のためのアッセイ系を構築した。

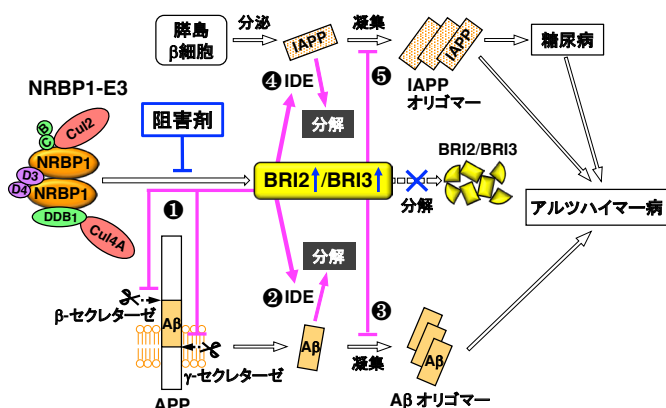


図1. NRBP1と抗AD因子BRI2/BRI3間の相互作用の阻害は、 $A\beta$ の①産生抑制、②分解促進、③凝集抑制およびIAPPの④分解促進、⑤凝集抑制を一括して増強すると期待される。

【目的】

本研究では、NRBP1とBRI2/BRI3間の相互作用を特異的に阻害する化合物の探索を行い、革新的アルツハイマー病治療薬の開発に寄与することを目的とする。

【方法】

タンパク質間相互作用(PPI)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AMED中分子化合物(15,000サンプル)のライブラリーを用いてハイスループットスクリーニング(HTS)を実施した。尚、BRI2の方がBRI3に比べて強力な $A\beta$ およびIAPPへの毒性低減作用を有するため、HTSにはBRI2を用いた。分泌型Gaussiaルンフェラージェ(Gluc)をN末側(luci; Gn)とC末側(ferase; Gc)の2つの断片に分割して不活性体とし、それぞれをBRI2、NRBP1と連結させて、BRI2-Gn、NRBP1-Gcの2種類の発現コンストラクトを作製した。両融合体を培養動物細胞で共発現させた際、BRI2とNRBP1が相互作用できる場合に限り、GnとGcが近接して培養上清のGluc活性が回復し発光が検出されるが、化合物に

より BRI2 と NRBP1 間の相互作用が阻害されると発光が検出されなくなる二分子発光補完法を用いた。

一次評価では、化合物濃度 5 μ M にて、NRBP1-BRI2 間相互作用に対する阻害率が 50%以上かつ細胞増殖阻害率が 50%以下であった化合物を選抜した。二次評価では、濃度依存的に NRBP1-BRI2 間相互作用を阻害する化合物を選抜した。また、全長 Gluc を用いたカウンター試験を行い、非特異的な阻害作用を示す化合物を除外した。

【結 果】

理化学研究所の創薬・医療技術基盤プログラム(理研 DMP)の支援のもと、15,000 化合物を含む次世代創薬シーズライブラリーを対象に二分子発光補完法による一次評価を実施し、321 個のヒット化合物を得た。次いで、NRBP1-BRI2 間相互作用阻害の濃度依存性試験、カウンター試験および細胞毒性試験から成る二次評価を実施し、19 個のヒット化合物を得た。構造を確認したところ、これらヒットの中には共通並びに類似の母核構造を有する化合物が複数個含まれていることが判明している。

【考 察】

本研究開始前に実施した初回 HTS では、3 万種類の化合物(低分子 9,600 個; 天然物 20,400 個)を対象にスクリーニングを行い、12 個のヒット化合物を得た。これらヒットを培養神経細胞に添加した結果、天然物由来の2つの化合物が、細胞内 BRI2 量の増加と A β の産生の抑制を誘導することが判明し、本創薬コンセプトの実証に成功した。しかしながら、両ヒット化合物とも分子構造が複雑で合成展開が困難なことが判明したため、本研究では PPI の阻害が期待でき、合成展開が可能な中分子化合物のライブラリーを用いて HTS を実施した。今回 19 個の二次ヒット化合物が取得できたため、今後はこれら化合物が BRI2 の細胞内在量の増加と共に A β の産生および凝集の抑制を誘導できるか細胞系での評価を実施していく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在アルツハイマー病に対する根治療法は存在しない。NRBP1-E3 阻害剤が創出されれば、APP 以外のセクレターゼの基質の切断には影響を及ぼさずに A β および IAPP の毒性低減に薬効を発揮可能と想定されるため、セクレターゼ阻害剤やアデュカヌマブに比べて優位性があると考えられる。重大な副作用の発現を伴うことなく、アルツハイマー病に対する根本治療薬となることが期待される。

【参考・引用文献】

1. Del Campo M., and Teunissen C.E. (2014). Role of BRI2 in dementia. *J. Alzheimer's Dis.* 40, 481-494.
2. Oskarsson M.E., Hermansson E., Wang Y., Welsh N., Presto J., Johansson J., and Westermarck G.T. (2018). BRICHOS domain of Bri2 inhibits islet amyloid polypeptide (IAPP) fibril formation and toxicity in human beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 2752-2761.
3. Yasukawa T., Tsutsui A., Tomomori-Sato C., Sato S., Saraf A., Washburn M.P., Florens L., Terada T., Shimizu K., Conaway R.C., Conaway J.W., and Aso T. (2020). NRBP1-containing CRL2/CRL4A regulates amyloid β production by targeting BRI2 and BRI3 for degradation. *Cell Rep.* 30, 3478-3491.