

抗アルツハイマー病因子 BRI2/BRI3 の機能活性化の認知症創薬への応用

麻生悌二郎

高知大学教育研究部医療学系基礎医学部門 遺伝子機能解析学講座

【研究の背景】

アルツハイマー病は認知症の約 7 割を占めるが、根本治療法は存在せず、その開発が急務である。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 -並びに γ -セクレターゼの結合部位をマスクして APP の切断を阻害し、アミロイド β ($A\beta$) の産生を抑制する¹⁻³⁾。両 BRI 因子は $A\beta$ とも相互作用してその凝集も抑制する¹⁻³⁾。さらに、BRI2 はインスリン分解酵素 (IDE) の細胞からの分泌を増加させ、 $A\beta$ の分解も促進する¹⁻³⁾。BRI2 はまたミクログリアによる $A\beta$ の貪食に重要な TREM2 と結合し、 α -セクレターゼ切断による TREM2 機能の喪失を阻止することにより、凝集 $A\beta$ の除去も促進する⁴⁾。同時に BRI2 は、2型糖尿病の発症及び同病へのアルツハイマー病合併に深く関わる腓島アミロイドポリペプチド (IAPP) の凝集の抑制や IDE を介した IAPP の分解促進にも寄与する⁵⁾。

最近申請者らは、NRBP1 を基質認識サブユニットとしてもつユビキチンリガーゼ複合体 (NRBP1-E3) が BRI2/BRI3 をユビキチン化して分解に導くことを発見した。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 $A\beta$ 産生の有意な減少を誘導することを明らかにした⁶⁾。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治薬の創製に資するのではと着想し、当該阻害剤探索のためのアッセイ系を構築した。理化学研究所の支援の下、約 3 万種類の化合物を対象にスクリーニングを行った結果、天然物由来の2つの化合物が、神経細胞内 BRI2/BRI3 量の増加と共に IDE 分泌量の増加、 $A\beta$ の産生および凝集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。

【目 的】

本研究では、革新的アルツハイマー病治療薬の創製を目指して、NRBP1-E3 の基質認識サブユニットである NRBP1 と基質 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う。

【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・合成された AMED 中分子化合物のライブラリーを用いてハイスクリーンスクリーニング (HTS) を行った。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。一次および二次評価には、分泌型 *Gaussia* ルシフェラーゼ (Gluc) を N 末側 (Gn) と C 末側 (Gc) の2つの断片に分割し、それぞれを BRI2、NRBP1 と連結、両因子が相互作用できる場合に限り、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-NRBP1 間の相互作用が阻害されると発光が見ら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 $5 \mu\text{M}$ にて結合阻害率が 50%以上かつ細胞増殖阻害率が 50%以下を示すものを選抜した。二次評価では、濃度依存的に NRBP1-BRI2 間相互作用を阻害するものを選抜した。また、全長 Gluc を用いたカウンター試験を行い、非特異的に阻害するものを除外した。三次評価では、NRBP1-E3 による BRI2 のユビキチン化を阻害する化合物を TR-TUBE (トリプシン抵抗性ユビキチン鎖結合タンパク質) を用いて選抜した。高次評価では、 $A\beta$ 産生総量の増加

を招く Sweden 変異を導入した APP を安定発現するヒト神経系培養細胞 SH-SY5Y に化合物を添加して、(1) BRI2 の細胞内在量の増加を Western blot で、(2) 培養上清中の A β 40、A β 42 濃度の低下を A β ELISA キットにより確認した。また、(3) A β 凝集の抑制は、Gn-A β 42 と Gc-A β 42 (Hashimoto T. et al. *J Biol Chem* 2011) の安定共発現細胞に化合物を添加して、培養上清の Gluc 活性の低下により確認した。

【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、55,295 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、1,237 個のヒット化合物を選抜した。ヒット化合物数が多過ぎるため、再現性試験、カウンター試験並びに細胞毒性試験を追加で行い、199 個の化合物に絞り込んだ。さらに、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、15 個の中分子化合物を二次ヒットとして選抜した。これらのうち入手可能であった 13 個の化合物について TR-TUBE 法による三次評価を行ったところ、2 個の化合物が NRBP1-E3 による BRI2 のユビキチン化を濃度依存的に阻害することが判明した。並行してこれら 13 化合物について高次評価(終濃度 0.5~9 μ M の範囲で培養細胞に添加)を実施した。その結果、三次ヒット化合物 2 個が濃度依存的な細胞内在性 BRI2 の増加作用と A β 凝集に対する抑制作用を示した。しかしながら、両化合物とも A β 産生に対する抑制作用は示さないことが判明した。

次に、これらヒット化合物において、内在性 BRI2 増加作用と A β 産生抑制作用との間に乖離が認められる原因を明らかにするため、両化合物が NRBP1-BRI2 間結合、並びに BRI2-APP 間結合に及ぼす影響について解析した。その結果、両化合物とも NRBP1 と BRI2 間の結合は阻害するが、BRI2 と APP 間の結合は阻害しないことが判明した。

【考 察】

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(55,295 サンプル)のライブラリーを用いて二分子発光補完法による HTS を実施した。13 個のヒット候補化合物について培養細胞を用いた評価を行った結果、類似構造をもつ 2 個の化合物が濃度依存的な BRI2 ユビキチン化の抑制、細胞内在性 BRI2 の増加および A β 凝集の抑制を誘導することが明らかになった。しかしながら、両化合物とも A β の産生は抑制しないことが判明した。両化合物が NRBP1-BRI2 間の結合は阻害するが、BRI2-APP 間の結合は阻害しないことから、(1) 両化合物が BRI2 と直接結合して BRI2 の立体構造の変化を誘起すること、(2) 当該立体構造変化により BRI2 の APP への結合性が変化し、 β -および γ -セクレターゼの APP への結合部位をマスクできなくなる可能性、が考えられた。また、類似構造検索の結果、両化合物の類縁体はほとんど存在せず、構造的に合成展開も難易度が高いと考えられた。

今回の解析を含めて、これまで天然物由来、低分子、中分子化合物を含む約 13 万個のサンプルを対象に二分子発光補完法による HTS 実施してきたが、未だ良質のリード化合物の取得に至っていない。最近行った NRBP1-BRI2 間結合についての詳細な解析により、同 PPI に重要な BRI2 の領域を特定できたため、その結果を踏まえたアッセイ系の再構築と再 HTS の実施について検討を開始している。

【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。開発を目指す NRBP1-E3 阻害剤は、生理的抗アルツハイマー病因子である BRI2/BRI3 の機能活性化を作用機序とする先行品の存在しない新しいコンセプトに基づく薬剤であるため、副作用発現のリスクが低く、 β -セクレターゼ阻害剤やレカネマブに比べて優位性があると考えられる。アルツハイマー病の発症予防並びに病態進展の阻止に有効な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, Teunissen CE. Role of BRI2 in dementia. *J Alzheimers Dis.* 40(3):481-494, 2014.

- 2) Cantlon A, Frigerio CS, Walsh DM. Lessons from a Rare Familial Dementia: Amyloid and Beyond. *J Parkinsons Dis Alzheimers Dis.* 2(1):12, 2015.
- 3) Martins F, Santos I, da Cruz E Silva OAB, Tambaro S, Rebelo S. The role of the integral type II transmembrane protein BRI2 in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 78(21-22):6807-6822, 2021.
- 4) Yin T, Yesiltepe M, D'Adamio L. Functional BRI2-TREM2 interactions in microglia: implications for Alzheimer's and related dementias. *EMBO Rep.* 25(3):1326-1360, 2024.
- 5) Oskarsson ME, Hermansson E, Wang Y, Welsh N, Presto J, Johansson J, Westermarck GT. 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(12): E2752-E2761, 2018.
- 6) Yasukawa T, Tsutsui A, Tomomori-Sato C, Sato S, Saraf A, Washburn MP, Florens L, Terada T, Shimizu K, Conaway RC, Conaway JW, and Aso T. NRBP1-containing CRL2/CRL4A regulates amyloid β production by targeting BRI2 and BRI3 for degradation. *Cell Rep.* 30, 3478-3491, 2020.