

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

ケミカルバイオロジーによるアミロイド関連分子の代謝機構の解明と
その血液バイオマーカーと治療薬開発への応用

(19-19)

主任研究者 福森 亮雄 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

研究要旨

アルツハイマー病(AD)に対するアミロイドβ蛋白(Aβ)を標的とする抗体療法の Phase III 臨床試験が行われているが、未だに Aβ の前駆体であるアミロイド前駆体蛋白(APP; Amyloid Precursor Protein)の機能は解明されておらず、Aβ を含む APP 代謝産物の生理的機能の根本的な理解が欠けている。これまでに申請者らはケミカルバイオロジーの技術より、アミノ酸レベルでの結合分子をマップし、アミロイド産生酵素であるγセクレターゼ上に APP の結合分子やエクソサイトと呼ばれる基質結合部位を同定してきた (福森ら EMBO J., 2016)。本研究計画ではこの技術を応用・発展させ、さらに最近の AD 研究の現状を踏まえつつ、アルツハイマー病の新規治療薬やバイオマーカーの発見を目指し、以下の3つの計画を行う。本年度は①、②の準備及び③を主に取り組み、AD バイオマーカー分子 APP669-711 の産生機構とその高感度測定に向けての前進があった。

① APP の生理的機能解明を目指すケミカルバイオロジーによるリガンドの同定

これまでの大腸菌で作成したツールに加え、より、生理的な条件での結合を可視化するため、哺乳類細胞でのケミカルバイオロジーツールを作成する。APP のリガンドを解明することで、APP や Aβ の生理的機能や代謝のメカニズムを解明し、新規のバイオマーカーや治療薬開発を目指す。

② γセクレターゼのエクソサイトを標的とする AD の治療薬開発

エクソサイトは基質を選別する部位と考えられ、同部位を標的とすることで、AD のみを標的とし、副作用の少ない Aβ 選択的産生阻害剤の開発が期待できる。

③ AD バイオマーカー分子 APP669-711 の測定とその産生機構の解明

APP669-711 の産生・放出・代謝機構のメカニズム研究を行う。さらに、AMED により当研究部に設置される高感度 ELISA で APP669-711 定量システムを構築し、より定量的に高速で APP669-711 を測定する。それに基づき、APP や Aβ を修飾する新規のバイオマーカーの高速かつ高感度測定や新側面からの治療薬開発を目指す。

主任研究者

福森 亮雄 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

分担研究者

里 直行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (部長)

篠原 充 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

A. 研究目的

米国NIA/AAからの最新の診断基準ではA β 陽性の認知症をADと定義され、そのA β を抗体を用いて除去する治療法が検証されている段階にある。このように直接A β を標的とする診断・治療の段階にあるにもかかわらず、未だにA β の前駆体であるAPPのリガンドは同定されておらず、APPやA β の生理的機能や代謝のメカニズムは解明されていない。

また、昨年、陽性診断率90%以上のADの血液バイオマーカーとしてAPP669-711/A β 42が長寿研の中村と柳澤らによって報告された。このバイオマーカー要素のうち、A β 42の病的意義は遺伝的に明らかである。一方、APP669-711は同じAPPの代謝産物であるが、産生放出メカニズムはわかっていない。また、APP669-711は質量分析で測定され、定量性やスループットがあまり高くない現状である。

これまでに申請者らはケミカルバイオロジーの技術により、アミノ酸レベルでの結合分子をマップし、アミロイド産生酵素である γ セクレターゼ上にAPPの結合分子やエクソサイトを同定してきた(福森らEMBO J., 2016)。本研究計画ではこの技術を応用・発展させ、最近の現状を踏まえアルツハイマー病の新規治療薬やバイオマーカーの発見を目指し、以下の3つの計画で行う。

① APPの生理的機能解明を目指すケミカルバイオロジーによるリガンドの同定

APPファミリー分子の単一ノックアウト(KO)マウスには明らかな表現型は見られないが、そのファミリーメンバーのダブルKOマウスは致死である。そのため、APPファミリーには何らかの生理的に重要な機能があり、その機能性リガンドの存在が想定されてきたが、未だに見つかっていない。この根本的な分子を、これまでなされてきた手法とは異なる特色と独創性のあるケミカルバイオロジー技術により同定する。期間内にリガンドの候補分子を同定しその機能を解明する。

② γ セクレターゼのエクソサイトを標的とするADの治療薬開発

申請者らが同定したエクソサイトでのAPPを含む基質の結合メカニズムを解明し、その阻害物質を同定する。上述のケミカルバイオロジーの技術を応用する。期間内に結合メカニズムや抑制メカニズムを解明し、非臨床POCを取得する。

③ ADバイオマーカー分子APP669-711の測定とその産生機構の解明

申請者らは、偶然約10年前の別の研究で培養細胞由来のAPP699-711を質量分析で検

出しており、その放出メカニズムのプレリミナリーな実験結果を持っている。それを発展延長させ、期間内に ELISA による定量システムを構築し、切断酵素や放出メカニズムを解明する。

B. 研究方法

(1) 全体計画

計画全体として、本質的なケミカルバイオロジー技術の革新をする比較的挑戦的な計画(①)と、これまでのケミカルバイオロジー技術を用いて、すでに得ている治療法やバイオマーカー開発やそのシーズの Proof of Concept(POC)をする比較的取り組みやすい計画(計画②、③)から成り立っている。

(2) 年度別計画

2019年度

① APPの生理的機能解明を目指すケミカルバイオロジーによるリガンドの同定 (里、福森)

- これまでの大腸菌由来のケミカルバイオロジーツールの APP への直接応用
- 新たな技術革新として、哺乳類細胞でのケミカルバイオロジーツールの発現系の構築とその最適化
- 蛍光タンパク質GFPに取り込み用の変異(GFP40B)を入れて、その蛍光シグナルを指標に最適コンストラクトを作成する。
- ケミカルバイオロジー解析に必要なAPP変異体コンストラクトを作成する。(100個程度)

② γセクレターゼのエクソサイトを標的とするADの治療薬開発 (福森)

- エクソサイトの結合を抑制する小化合物を探索するため、評価系の最適化を行う。
- エクソサイトの認識機構をアミノ酸レベルで調べ、その正確なマッピングを行う。

③ADバイオマーカー分子APP669-711の測定とその産生機構の解明 (里、篠原、福森)

- HEK293 や HeLa 細胞から放出される APP669-711 を質量分析計で解析する。
- その測定系で、HEK293 や HeLa 細胞において APP669-711 放出に Bafilomycin や Dynamin1 dominant negative mutant の影響を調べる。
- APP669-711 抗体を作成し、ウェスタンブロットや ELISA での検出を行う。

(倫理面への配慮)

すべての基礎研究は、国立長寿医療研究センターの規定する DNA および動物実験プロトコールなどで承認を取得後に行う。組み換え DNA 実験に関しては平成 16 年 2 月に施行されたカルタヘナ法 (遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律) を遵守し、規定に則った実験プロトコールを作成し遵守して研究を行う。また、本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。

「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)

「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日科発第 0601001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）

また、ヒト血液を用いる研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」（平成 26 年度文部科学省・厚生労働省告示第 3 号）を遵守する。国立長寿医療研究センターでの倫理委員会に本研究の申請を行う。

C. 研究結果

① APP の生理的機能解明を目指すケミカルバイオロジーによるリガンドの同定

大腸菌蛋白発現システムと哺乳類のそれは異なるため、これら両方での発現システムで研究を展開する。まず、大腸菌ベースのケミカルバイオロジーツールのコンストラクトやその基質を精製した。さらに、ケミカルバイオロジー解析に必要な APP 変異体コンストラクトを約 50 個作成した。今後これらのシステムを用いて、実際に結合する分子があるか WESTERN BLOT で解析する予定である。また、同時に発現向上に向けたコンストラクトの改変も行う予定である。

② γ セクレターゼのエクソサイトを標的とする AD の治療薬開発

エクソサイトの結合を抑制する小化合物を探索するための評価系の再現性や最適化を行った。ニカストリンと PS-NTF で効率よく可視化できることが確認された。また、エクソサイトの認識機構をアミノ酸レベルでの結合の確認実験を行い、正確なマッピング解析中である。さらに定量を進めており、市販の阻害剤での結合の変化を数値化している。今後、いくつかのコンパウンドを実際に検証する予定である。

③ AD バイオマーカー分子 APP669-711 の測定とその産生機構の解明

APP669-711 のアミノ末端を認識するウサギポリクローナル抗体 0248 を作成した。0248 抗体は APP669-711 ペプチドを western blot で検出可能であった。陰性コントロールの長いペプチド APP664-711 に対しても若干交差反応も見られたが、おおむね問題ない抗体が取得できたと考えている。また、0248 抗体は APP669-711 ペプチドを免疫沈降することも可能であった。

これらの抗体の特性評価に基づき、さらに APP669-711 のアミノ末端の切断酵素を探索するために、APP669-711 の前駆体である 669CTF の検出を試みた。細胞ライセートを 0248 抗体で免疫沈降し、それを APP のカルボキシル末端の抗体で染色することで、669CTF の可視化に成功した。現在データベース解析から絞り込んだ APP の 668/669 部位の切断酵素候補である分子 X の効果を、過剰発現やノックアウトにより検討中である。また分子 X 以外にも、膜近傍の細胞外領域を切断する酵素を 668/669 部位の切断酵素候補として、同様の手法で検証中である。以上のように APP669-711 の産生機構を解明しつつあり、早急にデータをまとめて論文化することを考えている。

また、APP669-711 の臨床サンプルからの測定のために、上記ウサギポリクローナル抗体 0248 を利用することもできるが、やはり高感度な測定が望ましいことから、モノクローナル抗体の作成を進めている。そのために、迅速に良質の抗体を取得できる技術を持つ富山大学の磯部教授、黒澤教授と共同研究を進め、APP669-711 に特異的に反応するモノクローナル抗体のクローンを見つけた。

D. 考察と結論

我々は APP669-711 のアミノ末端を認識するポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いて、APP669-711 の前駆体である CTF669 の検出に成功した。この検出システムを用いて、分子 X が、APP669-711 のアミノ末端の切断酵素を強く支持するデータを得ており、今後、その論文化を目指す。さらに、富山大学との共同研究において、APP669-711 を特異的に認識するモノクローナル抗体を見出した。今後、この抗体を評価し、有用であれば、当部に設置されている超高感度 ELISA Simoa にカスタム応用し、より感度と定量性の高い APP669-711 測定システムの構築を目指す。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Torben Mentrup, Kosta Theodorou, Florencia Cabrera-Cabrera, Andreas Helbig, Kathrin Happ, Marion Gijbels, Ann-Christine Gradtke, Björn Rabe, Fukumori A, Harald Steiner, Andreas Tholey, Regina Fluhrer, Marjo Donners, and Bernd Schröder., Atherogenic LOX-1 signaling is controlled by SPPL2-mediated intramembrane proteolysis, *J Exp Med*. 216(4):807-830. 2019
2. Shinohara M, Tashiro Y, Shinohara M, Hirokawa J, Suzuki K, Onishi-Takeya M, Mukouzono M, Takeda S, Saito T, Fukumori A, Saido T, C, Morishita R, Sato N. Increased levels of A β 42 decrease the lifespan of ob/ob mice with dysregulation of microglia and astrocytes. *FASEB Journal*, 34(2):2425-2435, 2019
3. Shinohara M, Tashiro Y, Suzuki K, Fukumori A, Bu G, Sato N. Interaction between APOE genotype and diabetes in cognitive decline. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, accepted, 2019
4. Trambauer J, Rodríguez Sarmiento RM, Fukumori A, Feederle R, Baumann

K, Steiner H. A β 43-producing PS1 FAD mutants cause altered substrate interactions and respond to γ -secretase modulation. EMBO Rep. 21(1):e47996. 2020

2. 学会発表

1. 篠原 充、福森 亮雄、他. ob/ob マウスにおける A β 42 の増加は寿命を短くさせる. 第 38 回日本認知症学会学術集会. ポスター〈基礎 A β 、APP、presenilin〉
2019 年 11 月 7 日 東京都
2. 福森 亮雄. ケミカルバイオロジーを用いたアミロイド産生酵素の切断メカニズム解析. 名古屋大学 脳とこころの研究センター 第 4 回拡大ワークショップ講演.
2019 年 9 月 18 日 名古屋市
3. H. Steiner, J. Trambauer, R.M. Rodríguez Sarmiento, A. Fukumori, R. Feederle^{2,6}, K. Baumann, A β 43-producing presenilin-1 FAD mutants cause substrate-binding changes and respond to γ -secretase modulation, 11th General Meeting of the International Proteolysis Society ‘ Interfaces in Proteolysis’, ポスター発表. Sep 30th, 2019, Praha, Czech Republic
4. J. Trambauer, R.M. Rodríguez Sarmiento, A. Fukumori, R. Feederle, K. Baumann, H. Steiner, Alzheimer’s disease associated A β 43-generating presenilin-1 mutants distinctively alter interactions with the C99 cleavage domain, 11th General Meeting of the International Proteolysis Society ‘ Interfaces in Proteolysis’, ポスター発表. Sep 30th, 2019, Praha, Czech Republic
5. L. P. Feilen¹, A. Fukumori, R. Feederle, H. Steiner, Activity and processivity of the presenilin-type intramembrane protease PSH are promoted by the membrane lipid environment, 11th General Meeting of the International Proteolysis Society ‘ Interfaces in Proteolysis’, ポスター発表. Sep 30th, 2019, Praha, Czech Republic

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし