

28. A β 分解系を作用点とするアルツハイマー病の創薬

岩田 修永

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子創薬科学講座 ゲノム創薬学研究室

Key words : アルツハイマー病, アミロイド β ペプチド, ネプリライシン, カテキン, カテキン結合タンパク質

緒言

アルツハイマー病 (AD) は老年期認知症の主要因となる進行性の神経変性疾患であり、臨床症状が現れるまでには細胞外アミロイド β ペプチド (A β) の蓄積→細胞内タウの凝集・蓄積→神経変性・神経細胞死という病理カスケードをたどる。それ故、AD は A β の蓄積から始まると考えられ、根本的治療のために A β の産生阻害、分解促進、凝集抑制、凝集沈着物の除去が作用点となり、抗 A β 薬開発の競争研究が世界規模で進められている。AD 治療薬については、アリセプトなどのいくつかの薬剤が存在するものの、いずれも病状を緩和する効果を有するのみであり、根本的な治療にはなっていない。一方、A β の代謝研究では産生系に関わる β および γ セクレターゼの解析から進められたため、AD の創薬研究においてもこれらの酵素を標的とする阻害剤の開発が先行し複数の薬剤について臨床試験が行われたが、副作用の問題などで次々と開発中止になっている。一方、脳内の A β はネプリライシン (NEP) と呼ばれるペプチダーゼによって分解される^{1,2)}。NEP の発現は孤発性 AD の早期段階から大脳皮質・海馬領域で部位選択的に低下することから、NEP の活性増強は新規かつ原因に即した創薬の作用点になる³⁾。A β の脳内蓄積は A β の代謝バランス (産生速度と分解速度のバランス) によって影響を受ける。家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニリンに変異が起こると A β 産生速度が 1.5 倍に増加するが、この増加比で発症が孤発性 AD に比較して 30 年前倒しされる。孤発性 AD では、発症時に NEP の発現 (A β 分解速度) が 50 % 近く低下するため、NEP 活性を 2 倍以上増強出来れば、治療に大きく貢献できる。本研究では NEP 活性を増強する低分子化合物の取得を目指し、天然化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、順次候補化合物の生体内利用率を改善した誘導体の合成と解析、*in vivo* での評価、さらに候補化合物による NEP 誘導メカニズムについての解析を進めた。

方法、結果および考察

1. *In vitro* における脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強作用

本研究では長崎大学が保有する天然化合物ライブラリーを用い、67 種類の天然ポリフェノールと代表的なカテキンである (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) にアルキル基を導入して脂溶性 (Log P 値) を高めた 8 種類の誘導体を試験した。ヒト神経系細胞の培地に被験化合物を加え、48 時間後に培地を回収した。被験化合物処置細胞からは可溶化剤 Triton X-100 を用いて細胞抽出液を調製した。NEP 活性は、NEP の特異的人工基質に対する切断活性を測定することで評価した。 α セクレターゼおよび β セクレターゼ活性の増強・抑制効果は、培地中に分泌される APPs α (α セクレターゼの指標) と APPs β (β セクレターゼ活性の指標) の量をウエスタンブロット (WB) 法で解析した。また、NEP、 α セクレターゼを構成する ADAM9、ADAM10 および ADAM17、 β セクレターゼ・BACE1 の発現量はリアルタイム PCR と WB 法で解析した。

67 種類の天然ポリフェノールのうち EGCg を含む 7 化合物が有意な NEP 活性増強効果を示したが、その程度は 2 倍弱であった。NEP 活性を増強する化合物はこれまでほとんど知られていないため、これらの化合物は創薬の重要なリード化合物になると考えられたが、水溶性が高いため腸管での吸収効率や脳内移行性などの生体内利用率に問題がある。そこで、EGCg にアルキル基を導入して脂溶性を付与し、Log P 値を改善した誘導体を試験したところ、NEP 活性を EGCg 以上に増強 (2.5–4.0 倍弱) (図 1A) するばかりか、誘導体の種類によっては A β の産生を抑制する α セクレターゼ活性の増強作用や β セクレターゼ抑制 (data not shown) も併せ持つことが明らかになった。リアルタイム

ム PCR や特異抗体を用いた WB 解析では、これらの脂溶性カテキンは NEP の遺伝子発現を介して、NEP 活性を増強することが明らかになった (図 1B、C)。

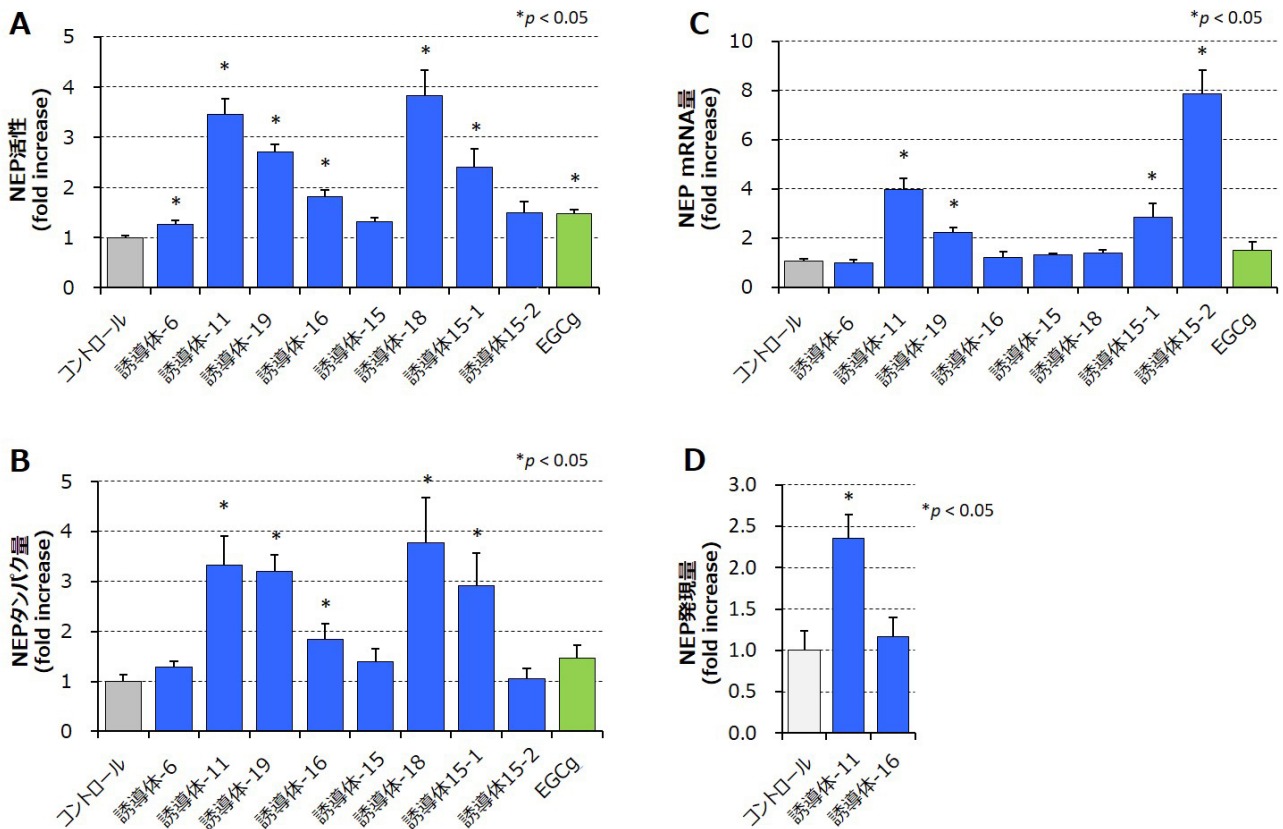


図 1. *In vitro* および *in vivo* における脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強作用

ヒト神経系細胞の培地に EGCg または脂溶性カテキン誘導体を加え、48 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液中の NEP 活性を測定した (A)。NEP の発現量は WB 法 (タンパク質レベル) (B) とリアルタイム PCR (mRNA レベル) (C) で解析した。一元配置分散分析、*post hoc* 多重比較検定: $*p < 0.05$; コントロール群と有意に異なる。

(D) 10 mM EGCg または脂溶性カテキン誘導体の各々 $1 \mu\text{L}$ を若週齢の野生型マウスの脳室内に投与し、48 時間後にマウスから脳を摘出し、NEP の発現増強効果を免疫組織化学的に解析した。グラフはマウス歯状回外側分子層における NEP の発現量の増加を示している。一元配置分散分析、*post hoc* 多重比較検定: $*p < 0.05$; コントロール群と有意に異なる。

2. *In vivo* における脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強作用

次に、若週齢の野生型マウスに 10 mM EGCg または脂溶性カテキン誘導体 (4 種類) 各々 $1 \mu\text{L}$ を脳室内投与し、投与 48 時間後にマウスから脳を摘出し、NEP の発現増強効果を特異抗体を用いて免疫組織化学的に解析した。海馬体を中心に NEP の発現強度を詳細に解析したところ、対照群に比較してカテキン誘導体-11 を投与した群で歯状回の外側分子層で NEP の発現が有意に上昇していた ($p < 0.05$) (図 1D)。歯状回外側分子層は加齢により NEP の発現が減少する部位であると共に AD 病理で最も脆弱な神経回路 (貫通線維束) の投射先でもあり、またいずれの AD モデルマウスでも加齢依存的にアミロイド蓄積が観察される部位でもある。従って、この部位の NEP の発現を上昇させることができれば効果的な $A\beta$ 除去につながると考えられる。

これまで、遺伝子発現を介して、神経系細胞で NEP の活性を数倍に増強する化合物は見出されていない。今回開発した脂溶性カテキン誘導体は、産生系と分解系を同時に制御して、効率よく脳内 $A\beta$ を低下させることができるため、新しい作用点を持つ根本的 AD 治療薬として有力なリード化合物になる。

3. 脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強メカニズムの解析

脂溶性カテキン誘導体による NEP や α セクレターゼ、 β セクレターゼの発現調節メカニズムを明らかにする目的で、カテキン結合分子（受容体）のスクリーニングを行った。NEP 活性を制御するカテキン受容体が既知の受容体でありそのアゴニストに既に本邦で承認されている薬剤があれば、脂溶性カテキン誘導体を用いた創薬に加え、リポジショニングの適用も可能になり、より早期に根本的治療薬の開発が実現できる可能性がある。そこで、EGCg の A 環に長鎖アルキル鎖を結合させた誘導体を合成し、磁気ビーズにカップリングさせた。ネガティブコントロールとしてはアルキル鎖のみを固定化させた磁気ビーズを用いた。これらの磁気ビーズと神経系細胞の抽出液を反応させ、結合したタンパク質を塩濃度勾配で溶出させた。各画分のサンプルを SDS-PAGE で分離後、結合タンタンパク質を質量分析法により解析した。その結果、ネガティブコントロールの磁気ビーズには結合せず、二種類のカテキン磁気ビーズの両方に結合する複数のタンパク質を同定した。同定したタンパク質のうち複数回行った実験で再現性が得られた分子の中から二つの分子（遺伝子 A と遺伝子 B）に着目し、これらのタンパク質をコードする遺伝子を安定的に発現する過剰発現細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、脂溶性カテキン誘導体による NEP および α セクレターゼ活性増強作用および β セクレターゼ活性抑制作用を評価した。ここでは遺伝子 B の結果について言及する。遺伝子 B の過剰発現細胞では Mock 細胞に比較し、NEP 活性は増大し（図 2A）、脂溶性カテキン誘導体-18 と -19 の存在下で NEP 活性はさらに増大した（図 2B）。このように、遺伝子 B が部分的にも NEP 活性増強作用に関与することが明らかになった。但し、脂溶性カテキン誘導体の NEP に対する作用は一様ではなく、またそれぞれの作用機序も複数存在すると推測されるため、さらに網羅的にカテキン結合タンパク質を同定していく必要がある。

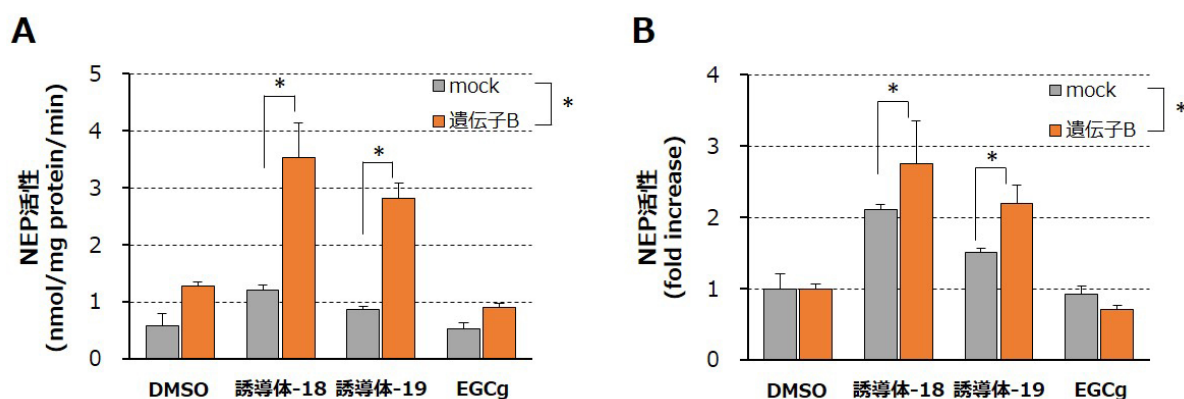


図 2. 遺伝子 B 安定発現細胞における脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強作用

遺伝子 B を安定的に過剰発現する細胞に EGCg または脂溶性カテキン誘導体を加え、48 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液中の NEP 活性を測定した。(A) 遺伝子 B の過剰発現細胞では Mock 細胞に比較し、NEP 活性が増大した。 $*p < 0.05$; mock 細胞群と有意に異なる。(B) パネル (A) の Mock 細胞および遺伝子 B 過剰発現細胞のコントロール (DMSO) 群の NEP 活性値を基準にして、各々のカテキン投与群の値を補正した。Mock 細胞に比較して遺伝子 B 過剰発現細胞では、脂溶性カテキン誘導体による NEP 活性増強率がさらに上昇しているのがわかる。 $*p < 0.05$; mock 細胞群と有意に異なる。二元配置分散分析：遺伝子 B と脂溶性カテキン誘導体処置間に交互作用有り ($F_{(3,16)} = 21.137$; $p < 0.001$)。

共同研究者

本研究の共同研究者は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）天然物化学研究室の 田中隆教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝します。

文 献

- 1) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, Kawashima-Morishima M, Lee HJ, Hama E, Sekine-Aizawa Y, Saido TC. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med.* 2000;6(2):143-50. PubMed PMID: 10655101
- 2) Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin. *Science.* 2001;292(5521):1550-2. PubMed PMID: 11375493
- 3) Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid- β peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.* 2005;108(2):129-48. PubMed PMID: 10655101