

整理番号	H26-J-063	報告者氏名	舟本 聡
------	-----------	-------	------

研究課題名			
抗アルツハイマー病ペプチドの創製			
<代表研究者>	機関名：同志社大学	職名：准教授	氏名：舟本 聡
<共同研究者>	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
<研究内容・成果等の要約>			
<p>本研究では、先行研究で得られた C99 結合ペプチド S4 (Patent No. US 9,045,525, B2 ; Funamoto et al., <i>Nat. Commn.</i> 2013) の改良を目指した。改良した得たペプチドのいくつかは、オリジナルの S4 よりも低濃度で C99 選択的切断抑制を示し、特に S4RW2T が溶媒溶解度も高く有望と考えられた (図 1、図 2 参照)。一方、C99 結合ペプチドの利用範囲を拡大するために、C99 結合ペプチド#4 (Patent No. US 9,045,525, B2 ; Funamoto et al., <i>Nat. Commn.</i> 2013) による Aβ 除去能を検討した。Aβ は主に中枢神経系で産生されると考えられているが、末梢でも産生されていることが知られている。骨格筋中に Aβ 分解酵素である Neprilysin を発現させると、脳内 Aβ 量が減少する報告がある。本研究では、Biotin 化 C99 結合ペプチド#4 と Avidin ビーズで複合体を形成させた。この複合体を Aβ 含有培養上清に添加すると、複合体量依存的に培養上清の Aβ を除去することができた。</p> <p>本研究では C99 (野生型) 基質を調製した。この C99 を利用して、A673T 変異をもつ C99 からの Aβ 産生能を検討した。A673T 変異はアルツハイマー病を予防する APP 変異として知られている (Jonsson et al., <i>Nature</i> 2012)。検討の結果、細胞内では A673T 変異を持つと C99 からの Aβ 産生が低下することがわかった (Kokawa et al., <i>Acta Neuropathol. Commn.</i> 2015)。</p> <p>また、C99 選択的切断抑制を評価するために、対照として Notch 基質も調製してきた。C99 は細胞外領域と膜貫領域の三つの GXXXG モチーフがあり、これが C99 の二量体化を促進し、Aβ 分子種産生に関与していると報告されていた。Notch は、GXXXG モチーフを欠くことから、このモチーフを Notch に挿入して、このモチーフの基質切断への関与を検討した。その結果、Notch に GXXXG モチーフを挿入すると、モチーフ数依存的に Notch 基質の二量体化が抑制されていた。さらに、モチーフ数依存的に切断が高進し、切断箇所がより細胞質側で起きることもわかった (投稿中)。</p> <p>オリジナル S4: FGBTWDYWVYR S4R: FGBTWDYWVYRR S4RR: FGBTWDYWVYRRR RS4: RFGBTWDYWVYR S4RW2T: FGBTWDYTVYRR RS4W2T: RFGBTWDYTVYR 配列中の B は L-4, 4' -biphenylalanine を示す。</p> <p>図 1 改変した C99 結合ペプチド配列：S4 以外は未発表の配列。</p>			

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

ポスター発表

1. Satoru Funamoto, Asuka Kokawa, Seiko Ishihara, Mika Nobuhara and Yasuo Ihara. APP A673T mutation reduces not only β -cleavage but also γ -cleavage of APP in cells. 2015年3月18日 The 12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's disease, ADPD2015 Nice, France.
2. 藤原ひとみ、粉川明日香、石原聖子、延原美香、井原康夫、舟本 聡 「APP の A673T 変異は C99 の細胞内局在を変化させる」 2015年10月2日 日本認知症学会集会 青森市、学会奨励賞候補発表

論文

1. Asuka Kokawa, Seiko Ishihara, Hitomi Fujiwara, Mika Nobuhara, Minori Iwata, Yasuo Ihara and Satoru Funamoto (corresponding author). The A673T mutation in the amyloid precursor protein reduces the production of β -amyloid protein from its β -carboxyl terminal fragment in cells. *Acta Neuropathologica Communications* 2015 **3**: 66 doi: 10.1186/s40478-015-0247-6

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

目的

アルツハイマー病は、脳内のアミロイドβタンパク質 (Aβ) の蓄積が原因で発症し、加齢とともに認知機能が低下する症状を呈する。わが国における推計患者数は 320 万人とされ、すべての認知症患者の約 7 割を占める。認知症前段階の軽度認知症が 400 万人と推計されていることから、アルツハイマー病の発症予備群は 280 万人ほどで、毎年その 1 割が発症すると考えられている。わが国は世界一の長寿大国であることから、ここままでは確実に患者数が増大し大きな社会的損失が生じてしまう。健康で明るい長寿社会の構築のためにも、われわれはこの疾患を必ず克服しなければならない。現在のアルツハイマー病対策は、神経伝達物質の維持や神経細胞の保護を補助する対処療法が主で、根本治療については確立されておらず、まだ研究段階にある。アルツハイマー病の根本治療を目指した臨床試験も多くなされてきたが、いずれも有効な結果を得ることができず、将来に向けての不安だけが取り残された状態にある。Aβ は、アミロイド前駆体 (APP) がβセクレターゼとγセクレターゼの二種類のプロテアーゼによって切断させて生じる 40 アミノ酸ほどのペプチドである。生体内では、これらのプロテアーゼの基質が多数存在しているため、単なる酵素活性阻害では深刻な副作用が生じる。実際にγセクレターゼ阻害剤 Semagacestat の第三相臨床試験では、Notch 切断阻害による皮膚ガンの発生率の上昇がみられ、しかも認知機能のさらなる低下を引き起こした。Aβ 産生阻害のためには、基質特異的な切断阻害法の確立が必要である。

昨年度、申請者はγセクレターゼが基質のアミノ末端に結合することを発見した。この知見は、特定の基質のアミノ末端を事前に捕捉することで、特定の基質と酵素の相互作用を抑制し、基質特異的な切断抑制が可能であることを示唆した。実際に、Aβ 産生の直接の基質である C99 (APP のβセクレターゼによる切断断片) のアミノ末端に特異的に結合するペプチド (C99 結合ペプチド: Patent No. US 9,045,525, B2 ; 出願番号 PCT/JP2013/050663) を創製し、C99 特異的なγセクレターゼの切断抑制を検討した。その結果、C99 結合ペプチドは、C99 の切断のみを抑制し、Notch などの他の基質分子の切断には影響を与えなかった。C99 結合ペプチドはマウスにおいても Aβ 産生抑制を示し、基質を標的としたアプローチが有効であることを示した (Funamoto et al., *Nat. Commun.* 2013)。申請者が開発した C99 結合ペプチドをペプチド医薬として抗アルツハイマー病戦略に発展させるためには、C99 結合ペプチドの親和性や特異性を高める必要がある。そのために、本研究では、C99 結合ペプチド配列を最適化し、効果的な基質特異的な Aβ 産生抑制の実現を目的とした。

また、C99 結合ペプチドの C99 結合ペプチドの利用範囲を拡大するために、C99 結合ペプチド#4 による Aβ 除去能を検討した。さらに本研究では、C99 選択的切断抑制を評価するために、対照として Notch 基質も調製してきた。C99 は細胞外領域と膜貫領域の三つの GXXXG モチーフがあり、これが C99 の二量体化を促進し、Aβ 分子種産生に関与していると報告されていた。Notch は、GXXXG モチーフを欠くことから、このモチーフを Notch に挿入して、このモチーフの基質切断への関与の検討も行った。

経過と結果

本研究では先行研究で得られた C99 結合ペプチド S4 (FGBTWDYWVYR) は溶解度が低いため、これの最適化を目指し、多目的ペプチド合成機 (INVITAS 社製 ResPep SL) による C99 結合ペプチドの改変を試みた (Patent No. US 9,045,525, B2 ; Funamoto et al., *Nat. Commun.* 2013)。その結果、S4R (FGBTWDYWVYRR)、S4RR (FGBTWDYWVYRRR)、RS4 (RFGBTWDYWVYR)、S4RW2T (FGBTWDYTVYRR)、RS4W2T (RFGBTWDYTVYR) が得られた。これらについて、C99 特異的切断抑制能を検討した。その結果、S4RW2T (FGBTWDYTVYRR) が溶解度も高く、C99 特異的切断抑制能が高かった (図 2)。RS4W2T (RFGBTWDYTVYR) は、C99 の切断抑制には効果が高かったが、高濃度で Notch 切断も抑制傾向にあった (図 2)。したがって、今回創製したペプチドでは RS4W2T が最も有望と考えられる。

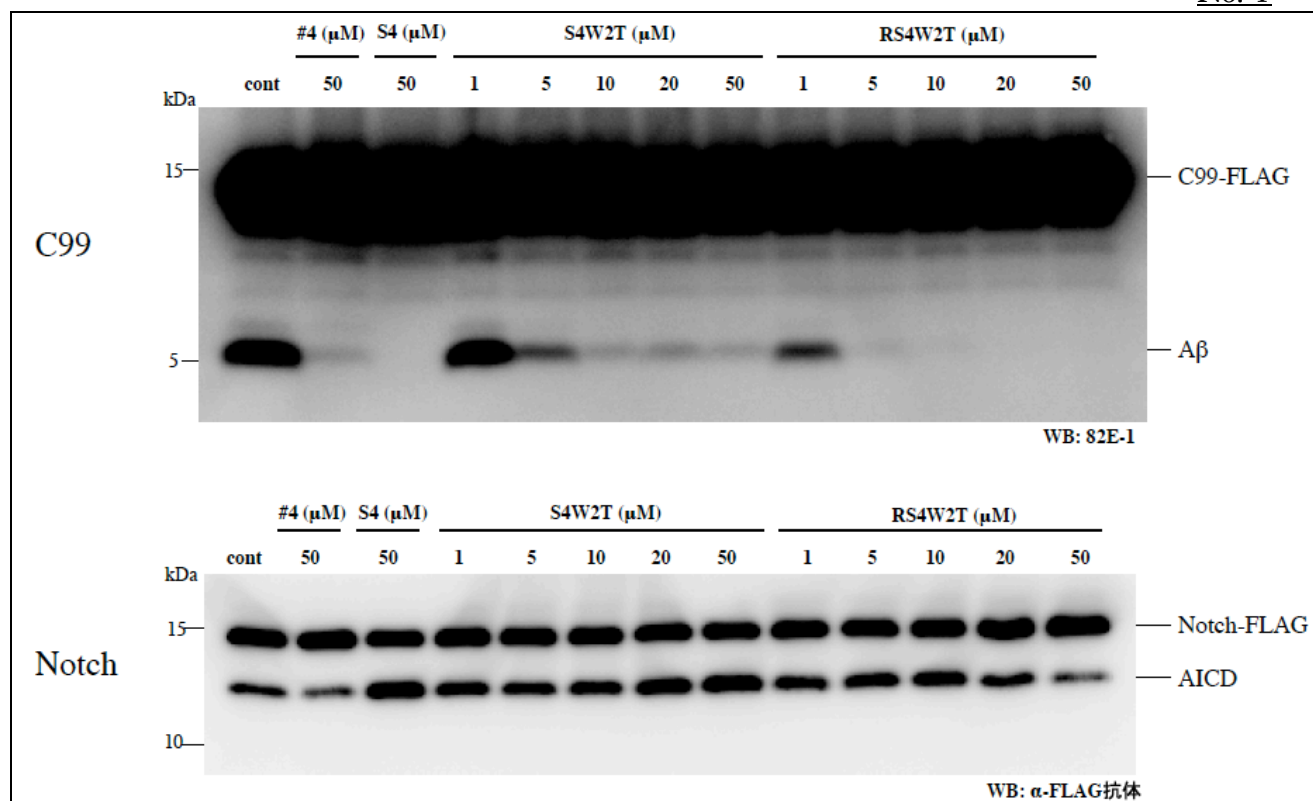


図2 改変型 C99 結合ペプチドの C99 特異的切断抑制の検討：RS4W2T は高濃度で Notch 切断を抑制したが、S4W2T は高濃度でも阻害することはなかった。Aβ 産生抑制能では、S4 や RS4W2T にやや劣るが、溶媒への溶解度が高く比較的安定して利用できる。未発表データ。

本研究では、C99 結合ペプチド #4 (Patent No. US 9,045,525, B2 ; 出願番号 PCT/JP2013/050663; Funamoto et al., *Nat. Commn.* 2013) について、Aβ 吸着剤としての役割を検討した。#4 のアミノ末端に Biotin を付加し、Avidin 磁気ビーズと複合体を形成させた。APP 過剰発現 CHO 細胞の培養上清を擬似的な血液とみなし、これに上記の複合体を添加し一晩混合した。その後の培養上清中の Aβ 量を測定すると、複合体量依存的に Aβ 量が顕著に減少していた (図 3 ; 未発表)。

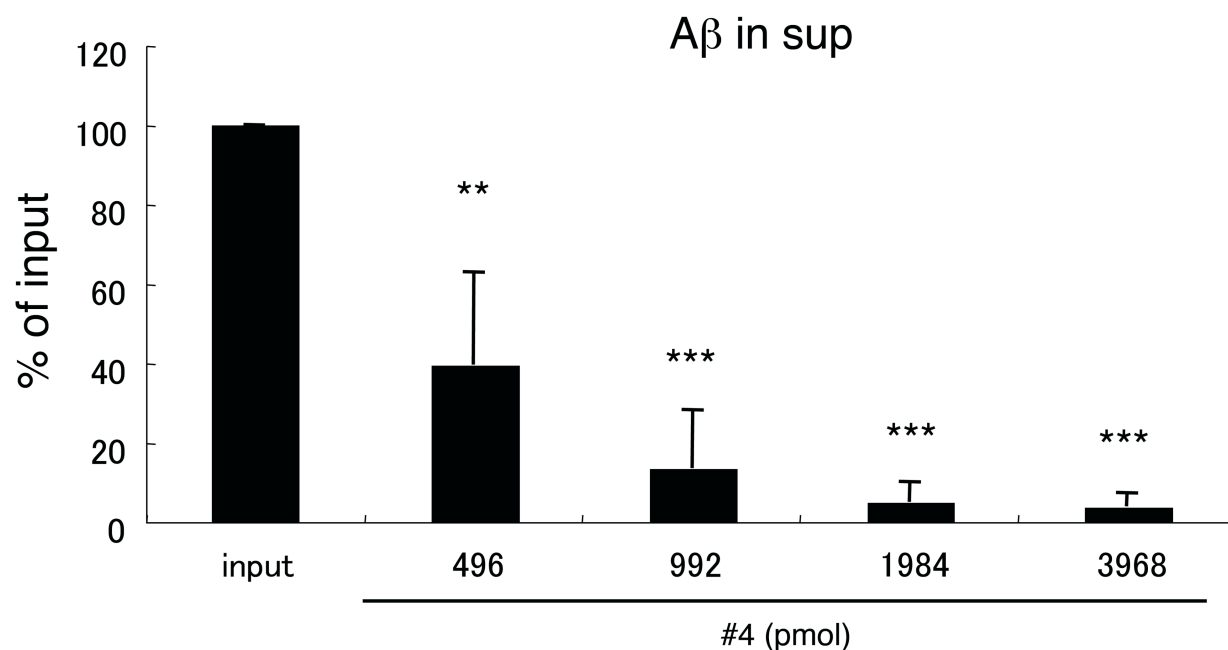


図3 C99 結合ペプチドによる培養上清中 Aβ の除去効果：培養上清中の Aβ は、#4 複合体量依存的に除去された。未発表データ。

本研究では、C99 結合ペプチドの効果を検討するために、組換え C99 基質タンパク質の調製や、C99 または APP 発現細胞を作製した。これらを利用して、APP の A673T 変異の A β 産生について検討した。APP A673T 変異は A β 産生を低下させることから、アルツハイマー病を防ぐ変異として知られている Jonsson et al., *Nature* 2012)。この変異は APP の β 切断を低下させるために、A β 産生の直接の基質となる C99 が減少するために、A β 産生が低下すると考えられていた。C99 は APP が β 切断を受けて生じた APP のカルボキシル側断片である。当研究室で A673T 変異をもつ APP からの C99 量を検討すると、野生型 APP の場合とほぼ同じであることがわかった。このことは、A673T 変異 APP からの C99 量に変化はなく、A β 産生が低下する原因は別にあることを示唆した。そこで、A673T 変異をもつ C99 (C99 A2T) を発現させ A β 量を検討すると、A β 量が野生型 C99 の約半分に低下していた (図 4)。このことは、A673T 変異が C99 からの A β 産生を低下させていることを示した (Kokawa et al., *Acta Neuropathol. Commun.* 2015)。

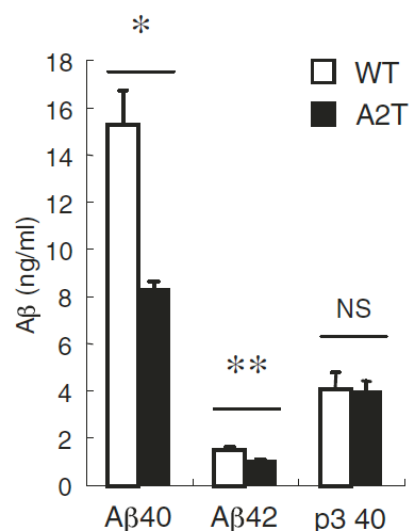


図 4 C99 A2T からの A β 産生

一方、本研究では C99 結合ペプチドの C99 特異的切断抑制を検討するために、C99 以外の組換え γ セクレターゼ基質として Notch 基質を調製した。C99 には細胞外領域と膜貫通領域に 3 つの GXXXG モチーフが存在する。このモチーフはタンパク質-タンパク質間の相互作用を促すモチーフとして知られ、C99 がこのモチーフにより二量体形成されることで、A β 分子種が変化すると報告がある (Munter et al., *J. Biol. Chem.* 2007; Kielen-Campard et al., *J. Biol. Chem.* 2008)。これを検証するために、本来 GXXXG モチーフがない Notch にこのモチーフを挿入し、二量体化や切断について検討した。その結果、GXXXG モチーフを挿入すると、むしろ二量体化が軽減し、切断が高進する結果を得た (図 5 ; 投稿中)。この結果は C99 でも同様であった (未発表)。

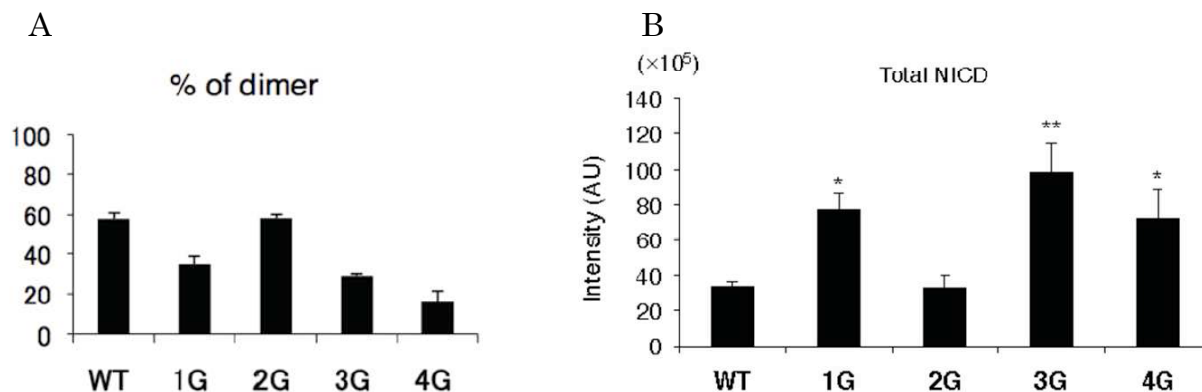


図 5 GXXXG モチーフ挿入による Notch の二量体化 (A) と切断効率 (B)

考察

本研究では抗アルツハイマー病戦略として C99 結合ペプチドの改良を行った。今回開発した C99 結合ペプチドは、従来のものよりも溶解度が高く効果的に A β 産生抑制できると考えられる。さらに、C99 結合ペプチドは、A β 産生抑制だけでなく、産生された A β の除去にも利用できることがわかった。透析によって血中 A β 除去する報告もあることから、本ペプチドを透析機器等に応用することでも、抗アルツハイマー病効果が期待できると考えられる。これについては現在、従来の透析膜と比較するなどして相乗効果を検討する予定である。また、本研究では組換え基質や細胞も作製したことから、他の研究の進展にも貢献することができた。したがって、本研究成果の波及効果は大きく、本研究助成の寄与度は極めて高い。