HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規アルツハイマー病治療薬としての加齢に伴うAlcadeinβの発現低下を抑制する薬剤の開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	白石, 昂也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14411号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81893
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takaya_Shiraishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(臨床薬学)　氏　名　　白石　昂也

学 位 論 文 題 名

新規アルツハイマー病治療薬としての加齢に伴うAlcadeinβの発現低下を抑制する薬剤の開発

アルツハイマー病(Alzheimer's disease :AD)は認知機能障害を主症状とする神経変性疾患である。AD発症の最大の危険因子は加齢であり、AD患者の大半は高齢者である。現在ADの治療薬としては、症状を緩和させる薬剤しか開発されておらず、根治的な治療薬の開発が求められている。AD発症には、アミロイドβと呼ばれるペプチドが関与している。アミロイドβはその前駆体蛋白質APP(Amyloid precursor protein)の代謝により産生される。アミロイドβは凝集し、神経細胞へ沈着し細胞死を誘発し、認知機能障害をもたらすこと、アミロイドβ蓄積量は加齢に伴って増加することから、AD 発症に関与していると考えられている。そのため、アミロイドβを標的とした薬剤の開発が進められてきたが、上市には至っておらず、新規AD治療薬の標的と薬剤開発が求められている。当研究室におけるこれまでの解析により、APP と類似した代謝様式を受けるⅠ型膜蛋白質Alcadeinβ(Alcβ)の代謝産物p3-Alcβは、Aβ凝集体が誘発する神経細胞死、認知機能障害を抑制すること、Alcβの発現量、p3-Alcβの産生量は加齢に伴い低下していることを明らかにしてきた(特許第6319912号、*Alzheimer's & Dementia: TRCI*, 2019)。そこで、私は新規AD治療薬として加齢に伴う Alcβの発現低下を抑制し、p3-Alcβの産生量を増加させる薬剤の開発を目的として研究を行った。

最初に、ヒト *Alcβ*遺伝子の発現制御機構を解析するために、転写制御領域(プロモーター)の解析を行った。その結果、転写開始点から上流-200までの領域に基本となる転写領域が存在し、転写開始点から上流-600～-800の間に転写抑制領域が存在した。そして、転写抑制領域はヒト由来の神経系細胞で特異的に作用する領域であることを見いだした。そこで、*Alcβ*遺伝子の転写開始点から上流2,000塩基対をもつプロモーター活性を促進し、Alcβの発現量を増加させる化合物を単離する評価系を構築した。

*Alcβ*遺伝子のプロモーター活性を促進させる化合物を単離するための1次スクリーニング系と擬陽性化合物を排除する系を構築し、東大創薬機構コア化合物ライブラリー (9,600 化合物) を用いてスクリーニングを行い、4化合物(A・B・C・D)を単離した。4化合物は、比較的低活性で、細胞毒性を示すものが含まれたため、より高活性・低毒性の化合物を得ることを目的として、東大創薬機構構造展開ユニットが有する類縁体化合物のスクリーニングを行い、元化合物に比較して高活性・低毒性の類縁化合物を得た。ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に各類縁化合物を添加した際の内在性Alcβの発現量をRT-qPCRとWestern blotで、また培養液中に産生されたp3-Alcβ量をsandwich ELISAによりそれぞれ定量し、Alcβの発現とp3-Alcβの産生を増加させた類縁2化合物(AA・AB：元化合物 A)を最終的な候補化合物として同定した。次にマウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いて、化合物AA、ABを添加後にTotal RNAを抽出し、RT-qPCRによりmouse *Alcβ*遺伝子のmRNA量を測定した。また、マウス大脳皮質初代培養神経細胞に化合物AA、ABを添加後、細胞抽出液を調製しWestern blotによりmouse Alcβの蛋白質発現量を測定した。化合物AA、ABは、ヒト *Alcβ* promoterに選択的に作用しているのかを解析するため、plasmid(pTA-Human *Alcβ* promoter -2000nt *Firefly* Luciferase、pTA-mouse *Alcβ* promoter -2000nt *Firefly* Luciferase)

を SH-SY5Y 細胞、　およびマウス脳腫瘍細胞 CAD に Transfection 後、DMSO、化合物 AA、AB を添加し Luciferase の発光を定量した。その結果、化合物 AA、AB は細胞種による違いではなく、マウス *Alcβ* promoter よりもヒト *Alcβ* promoter に対して強く作用することが明らかになった

次に、化合物 AA、AB が作用するヒト *Alcβ* promoter の配列を決定した。化合物 AA、AB は転写開始点から上流-700～-800 塩基内の配列内に作用した。この配列に結合し得る転写因子をモチーフ解析等の手法を用いて探索した結果、TWIST1 が結合することを見いだした。化合物 AA、AB は TWIST1 の発現量を低下させた。SH-SY5Y 細胞、マウス脳腫瘍細胞 CAD 細胞で内在性の TWIST1 を knock down した時、Alcβの promoter 活性は増加し、逆に TWIST1 を過剰発現させた時は Alcβの promoter 活性は低下した。マウスの各組織の Alcβと TWIST1 の発現量を調べた結果、Alcβは脳内に特異的に発現しているのに対して、TWIST1 は他の組織に比較して脳内の発現量が著しく低いことを見いだした。以上のことから、TWIST1 は Alcβの発現を抑制的に制御することを明らかとした。

次いで、化合物 AA、AB がどのような作用機序で TWIST1 の発現量を低下させているのかを明らかにするため、化合物 AA、AB によって発現が変動した遺伝子群を同定し、プロモーター配列に共通するモチーフを enrichment 解析で調べた。その結果、化合物 AA、AB いずれも最も enrich されたモチーフは VEZF1 の結合配列であった。転写因子 VEZF1 は、DNA 配列上のメチル化サイトに結合しメチル化を抑制することで遺伝子発現を促進させる機能がある。（*PLOS GENETICS*, 2010）そして、VEZF1 結合モチーフは *TWIST1* の promoter 配列に存在した。VEZF1 の mRNA 量は RNA-seq の解析から低下する傾向を示し、化合物 AA、AB は VEZF1 の発現量を低下させることで、*TWIST1* のプロモーター配列のメチル化状態を亢進させ、*TWIST1* 遺伝子の転写を抑制すると考えられた。そこで、*TWIST1* プロモーター配列のメチル化状態を、メチル化を検出するプライマーを用いたリアルタイム PCR により解析した結果、化合物 AA、AB の添加によりプロモーターのメチル化状態は亢進していることを明らかにした。以上のことから、化合物 AA、AB は、転写因子 VEZF1 の発現量を低下させ、*TWIST1* promoter のメチル化状態を亢進することにより、TWIST1 の発現量を低下させていることが考えられた。化合物 AA、AB と類似の構造をもつ化合物の活性を測定したところ、Alcβ遺伝子発現促進活性を示した化合物はいずれも Histone Deacethylase (HDAC)阻害剤であった。このため、化合物 AA、AB は HDAC 阻害作用が本来の作用機序であり、これにより VEZF1 の発現量が低下し、*TWIST1* promoter のメチル化状態が亢進することにより、TWIST1 の発現量を低下し、Alcβの発現量が増加していることが想定された。

最後に、TWIST1 が Alcβの発現を抑制的に制御すること、加齢に伴い Alcβの発現量は低下することから、加齢と TWIST1 の発現量の相関関係を調べた。その結果、カニクイザル脳内の TWIST1 の発現量は加齢に伴い増加していることを明らかとした。

本研究により単離された化合物 AA、AB は、Alcβの発現と p3-Alcβの産生を増加させるため、新規アルツハイマー病治療薬のシーズとして期待できる。また、Alcβの抑制性の制御因子として TWIST1 を同定し、TWIST1 がアルツハイマー病発症の最大のリスクファクターである加齢に伴い増加することを発見した。このことから、TWIST1 はアルツハイマー病治療薬のターゲットとして有用であると考えられる。これまで孤発性アルツハイマー病が加齢に伴いどのようなメカニズムで発症するのかは不明であった。本研究により、加齢に伴い TWIST1 の発現量が増加することで Alcβの発現と p3-Alcβの産生が低下し、Aβオリゴマーによる毒性発現が顕在化することが発症の一因として、新たに提示された。