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［全文の要約］
Author(s)	白石, 昂也
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81898
Type	doctoral thesis
File Information	Takaya_Shiraishi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

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)。しかし、加齢に伴い Alcβの発現量が低下する要因は分かっていない。また、Alcβをターゲットとした薬剤の開発はされていない。本研究は、Alcβの発現量を制御している因子の解明、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ものである。

1. ヒト *Alcadeinβ*(*Alcβ*)遺伝子のプロモーター解析結果

ヒト *Alcβ*遺伝子の転写開始点から上流 2,000 塩基をクローニングし、下流にホタル由来のルシフェラーゼを組み込んだコンストラクトを用いてプロモーター活性を評価した結果、転写開始点から上流 200 塩基内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 に神経系の細胞特異的な抑制領域が存在することを明らかとした。

2. *Alcβ*遺伝子を標的とした化合物スクリーニング系の構築と実施

前記した plasmid を安定的に発現するヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を樹立し、ヒト *Alcβ* プロモーターの活性を促進させる化合物を単離するための評価系を構築した。東京大学創薬機構コア化合物ライブラリー9,600 個に対し活性を促進させる化合物を単離した結果 4 化合物(A・B・C・D)が HIT した。4 化合物の中に、高活性で低毒性の化合物は無かったため、類似構造体を用いて再度スクリーニングを行った。その結果、化合物 A の類縁体 AA、AB は元化合物に比較して高活性で低毒性の化合物であることが判明した。

3. ヒト由来の細胞とマウス由来の細胞を用いた化合物 AA、AB の薬効評価

化合物 AA、AB を SH-SY5Y 細胞に添加後、内在性の Alcβの発現量を定量した結果、発現量は増加傾向を示し、p3-Alcβは増加していることが判明した。一方、化合物 AA,AB をマウス大脳皮質初代培養神経細胞に添加後、内在性の Alcβの発現量を測定した結果、発現量は増加していなかった。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(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。

4. ヒト *Alcβ* プロモーター配列内の HIT 化合物の作用点解析

化合物 AA、AB がヒト *Alcβ*プロモーター配列内の作用点を解析することにした。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。

5. 化合物 AA、AB の上流の作用機序解析

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。

6. 加齢に伴う TWIST1 の発現量変化

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。