

A β の産生ならびに凝集を共に抑制する多価型ペプチドの開発

同志社大学 生命医科学部

医生命システム学科

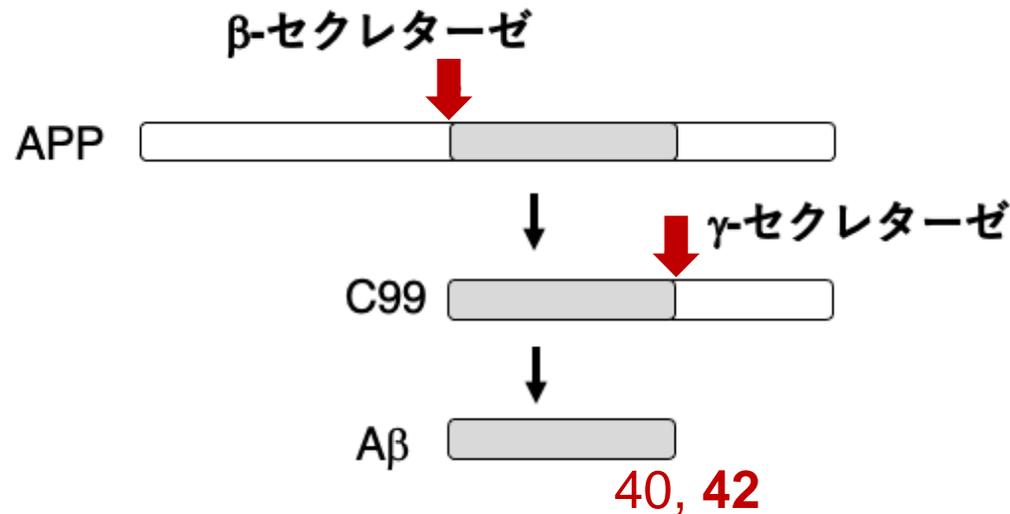
教授 西川 喜代孝

2025年2月25日

背景

アルツハイマー病(AD)は、アミロイド β ($A\beta$)の脳内沈着・凝集が発症の原因と考えられていることから、 **$A\beta$ の産生、蓄積を抑制する薬剤の開発**が求められている。

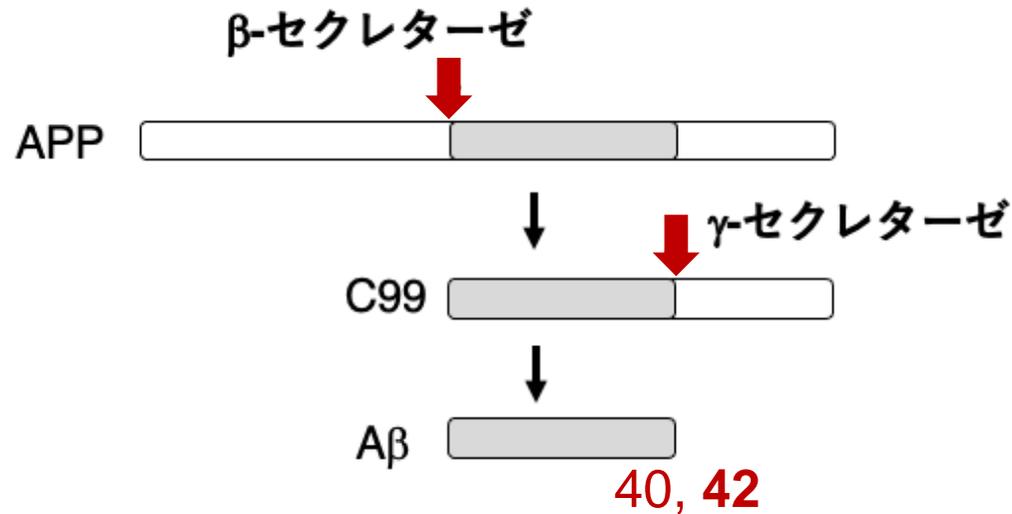
$A\beta$ はアミロイド前駆体タンパク(APP)から、 β -および γ -セクレターゼによる連続切断により産生される。



この過程のいずれかを阻害できれば、 $A\beta$ の産生、特に $A\beta$ 42の産生を抑制できる。

従来戦略の問題点

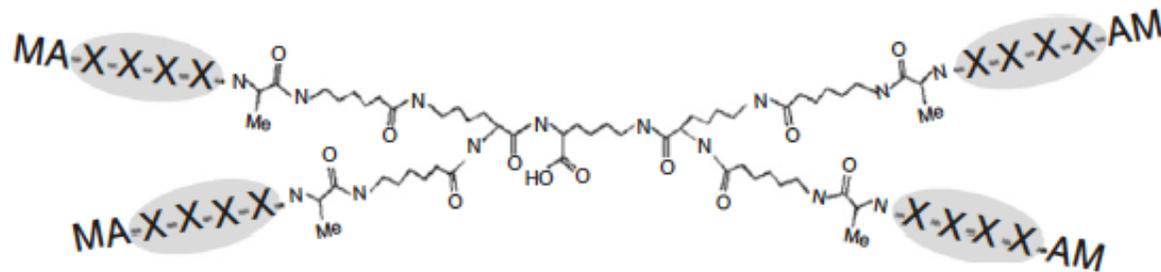
これまで、 **β -および γ -セクレターゼ阻害剤**が注目されてきたが、これら酵素を直接阻害してしまうと、APP及びC99以外の生理的に重要な基質の切断も阻害されてしまうため、**副作用の発現が問題**となっている。



基本戦略

β -または γ -セクレターゼを標的とせず、その基質であるAPP, C99, A β のいずれか(あるいはすべて)に結合し、その結果A β 産生を抑制する分子を開発する。

APP, C99, A β はいずれもクラスター化しやすい性質を持つことに着目し、それ自体がクラスター構造を持ち、強くこれら分子に結合する4価型ペプチドを取得する。

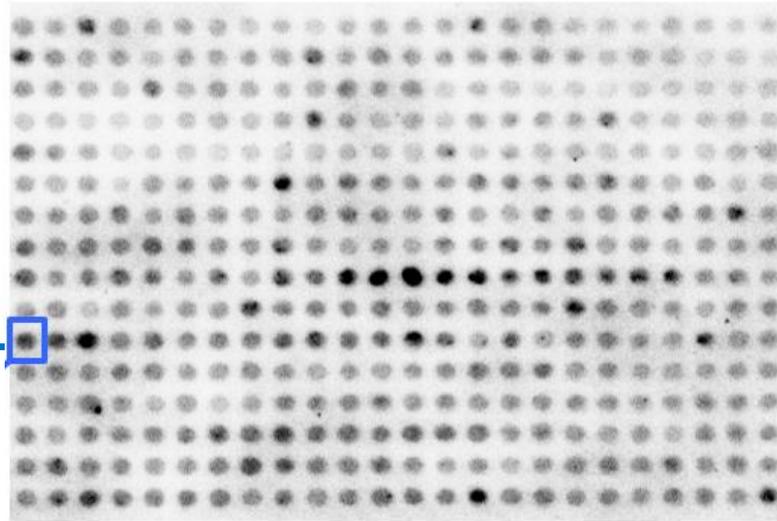
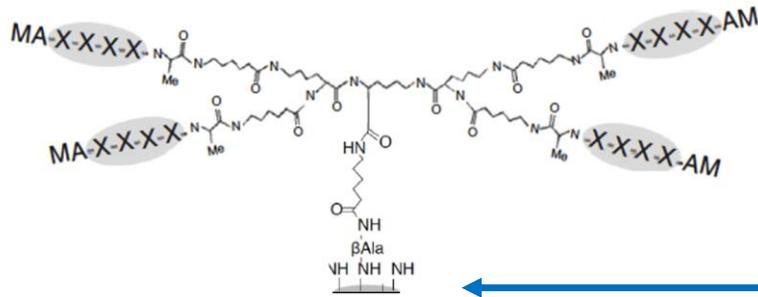


4価型構造を持つランダムペプチドライブラリー

具体的手法

4価型ランダムペプチドシートスクリーニング法

4価型ペプチドライブラリーをニトロセルロース上に
数百のレベルでスポット合成する基本技術

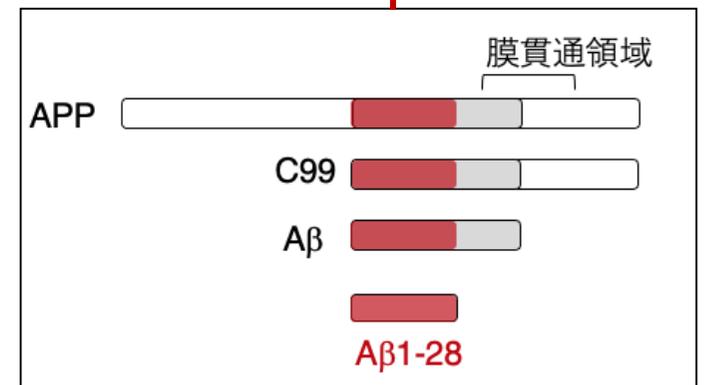


セルロース膜

← プローブ

β1-28

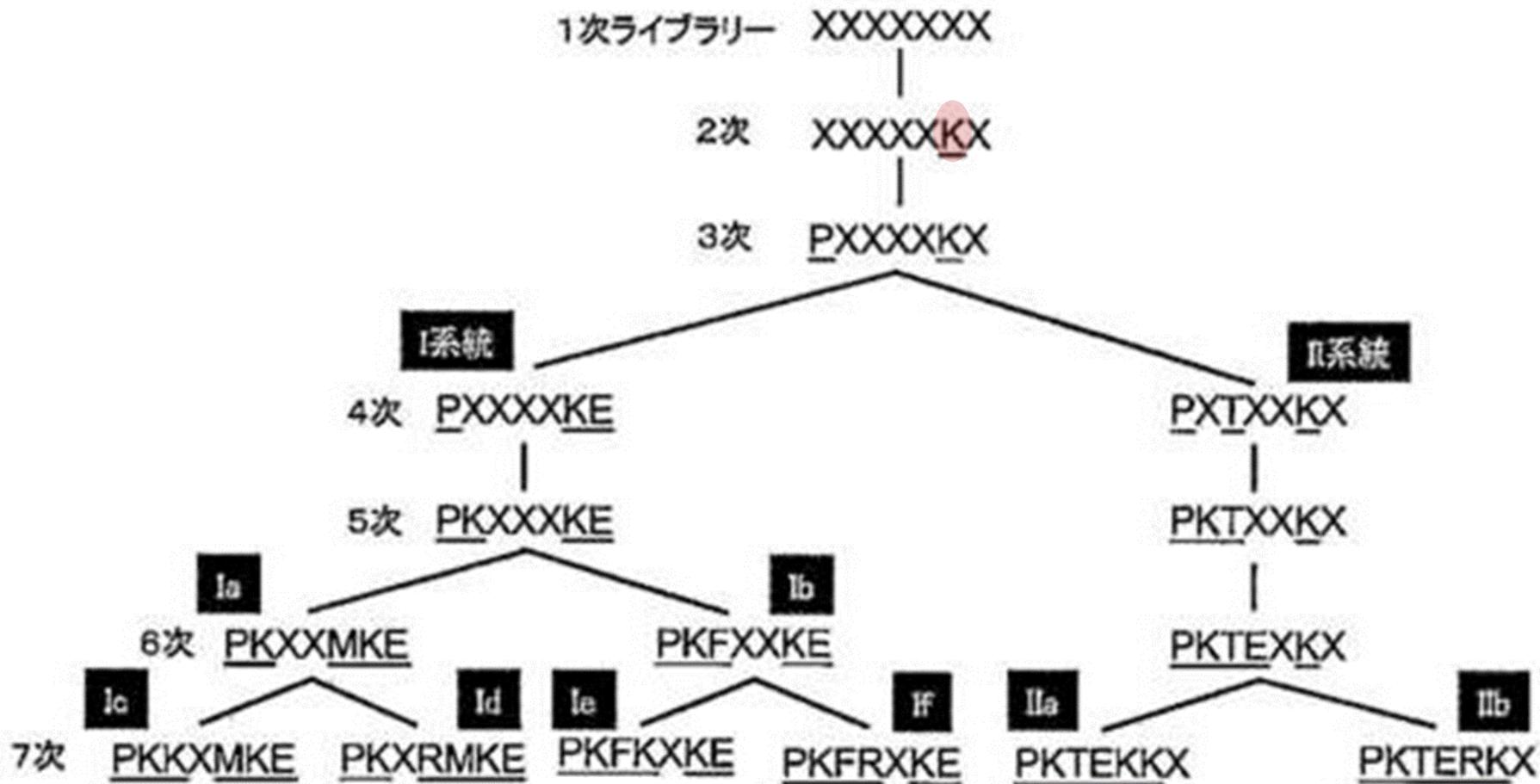
APP, C99, Aβに共通して存在し、水溶性に富む部分、**Aβ1-28**(ビオチン標識されたAβ1-28番アミノ酸)でブロットし、高親和性結合活性を指標にスクリーニングを行う。



結果1

高親和性モチーフスクリーニングの概略

7アミノ酸(XXXXXXXX)からなるライブラリーを使用した。1次ライブラリーでは、各位置のXを一つずつ20種類のアミノ酸で置換してゆく。最大結合活性を示すアミノ酸の種類とその位置を一つ決定する。



結果1

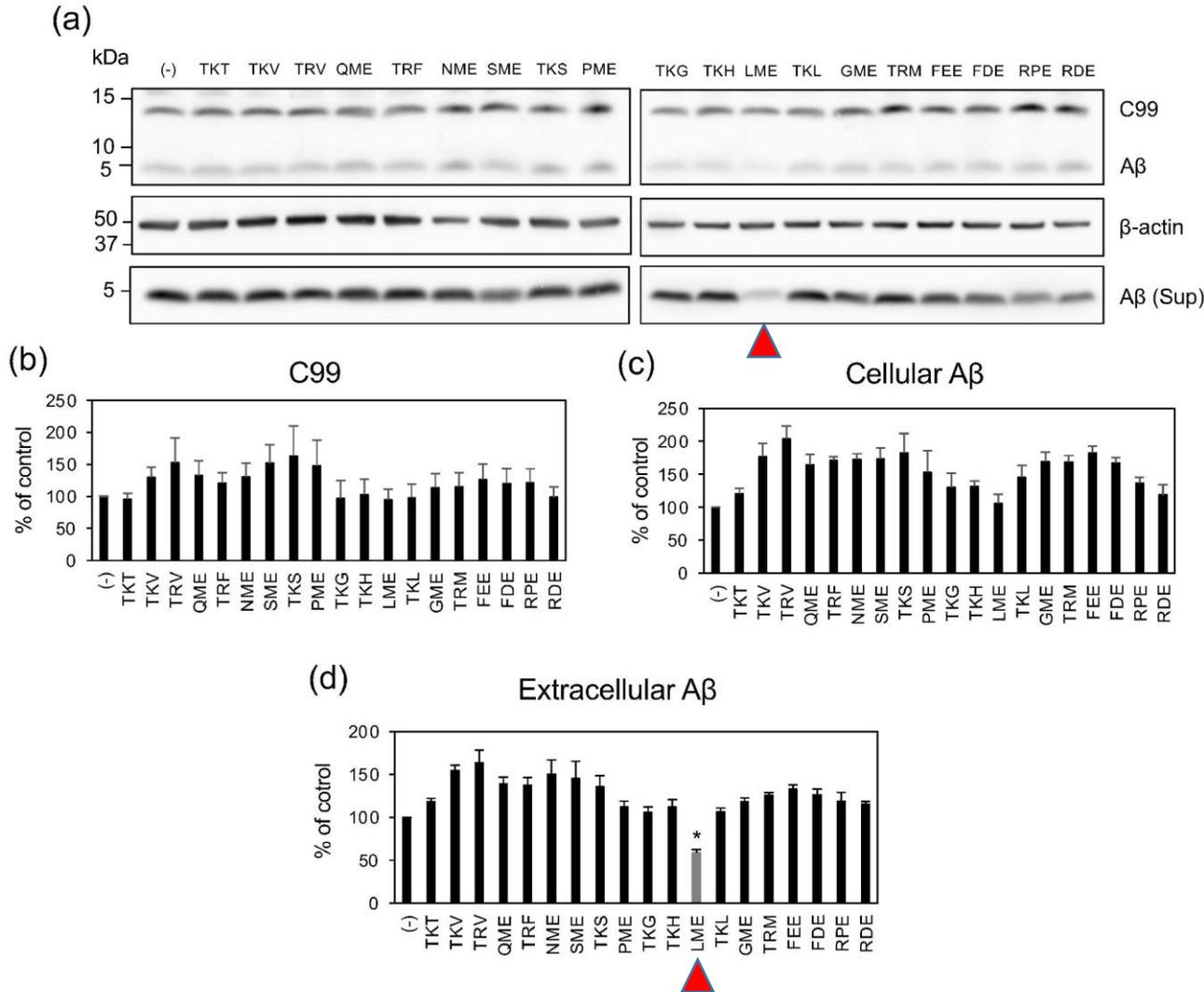
高親和性モチーフスクリーニングの概略

得られた結合モチーフ(XXXXXXXX)の配列

名称	配列	名称	配列
TKT-tet	PKTEKKT	TKH-tet	PKTEKKH
TKV-tet	PKTEKKV	LME-tet	PKLRMKE
TRV-tet	PKTERKV	TKL-tet	PKTEKKL
QME-tet	PKQRMKE	GME-tet	PKGRMKE
TRF-tet	PKTERKF	TRM-tet	PKTERKM
NME-tet	PKNRMKE	FEE-tet	PKFKEKE
SME-tet	PKSRMKE	FDE-tet	PKFKDKE
TKS-tet	PKTEKKS	RPE-tet	PKFRPKE
PME-tet	PKPRMKE	RDE-tet	PKFRDKE
TKG-tet	PKTEKKG		

結果2

細胞外に遊離するAβ量に対する効果

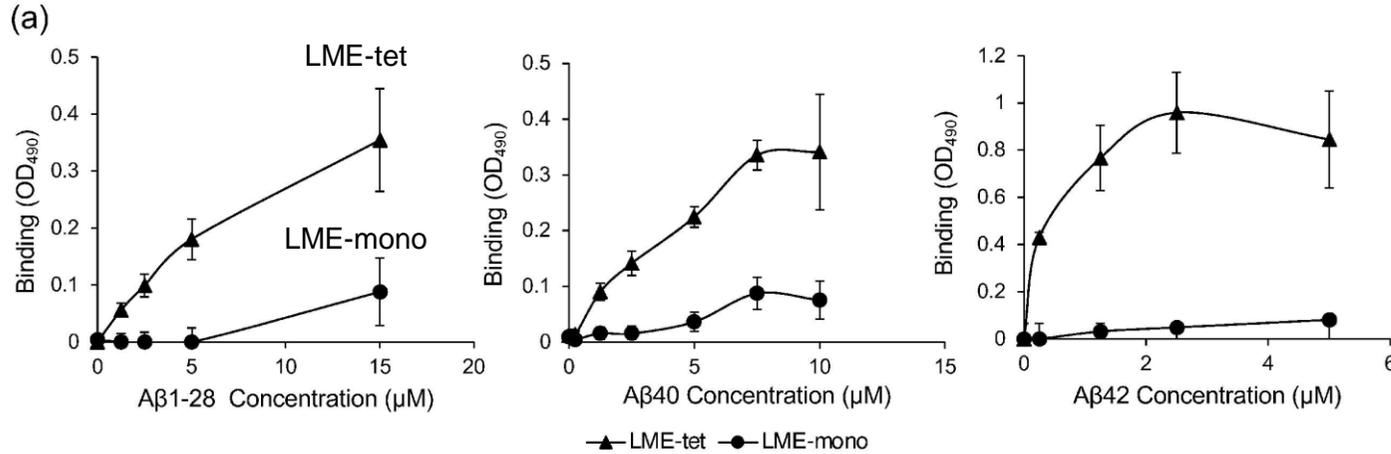


ヒトAPPを安定発現させたCHO細胞を各4価型ペプチド(50 μ M)存在下で48時間培養後、セルライセートのC99およびA β 量、ならびに培養液中のA β 量の特異的抗体を用いて検出、定量した。

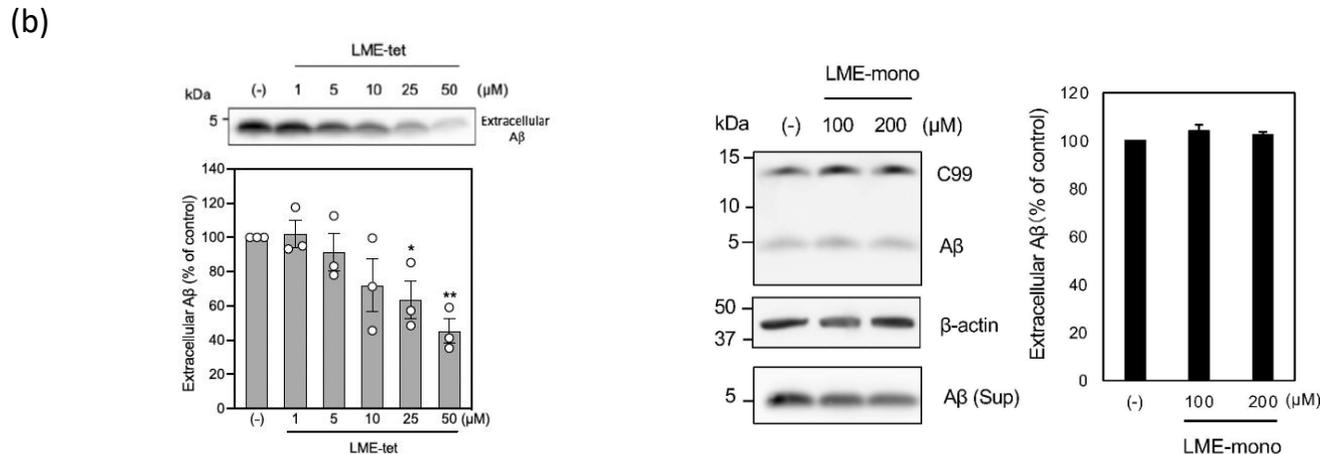
LME-tetのみA β の細胞外遊離を顕著に阻害した。
この遊離阻害は、ほぼA β の産生阻害を反映している。

結果3

Aβ1-28, Aβ40, Aβ42に対するLME-tetの結合能



LME-tetまたはLME-tetと同じペプチドモチーフを持つモノマー体(LME-mono)を用いて、Aβ1-28、Aβ40、Aβ42に対する結合活性をELISAにて測定した。



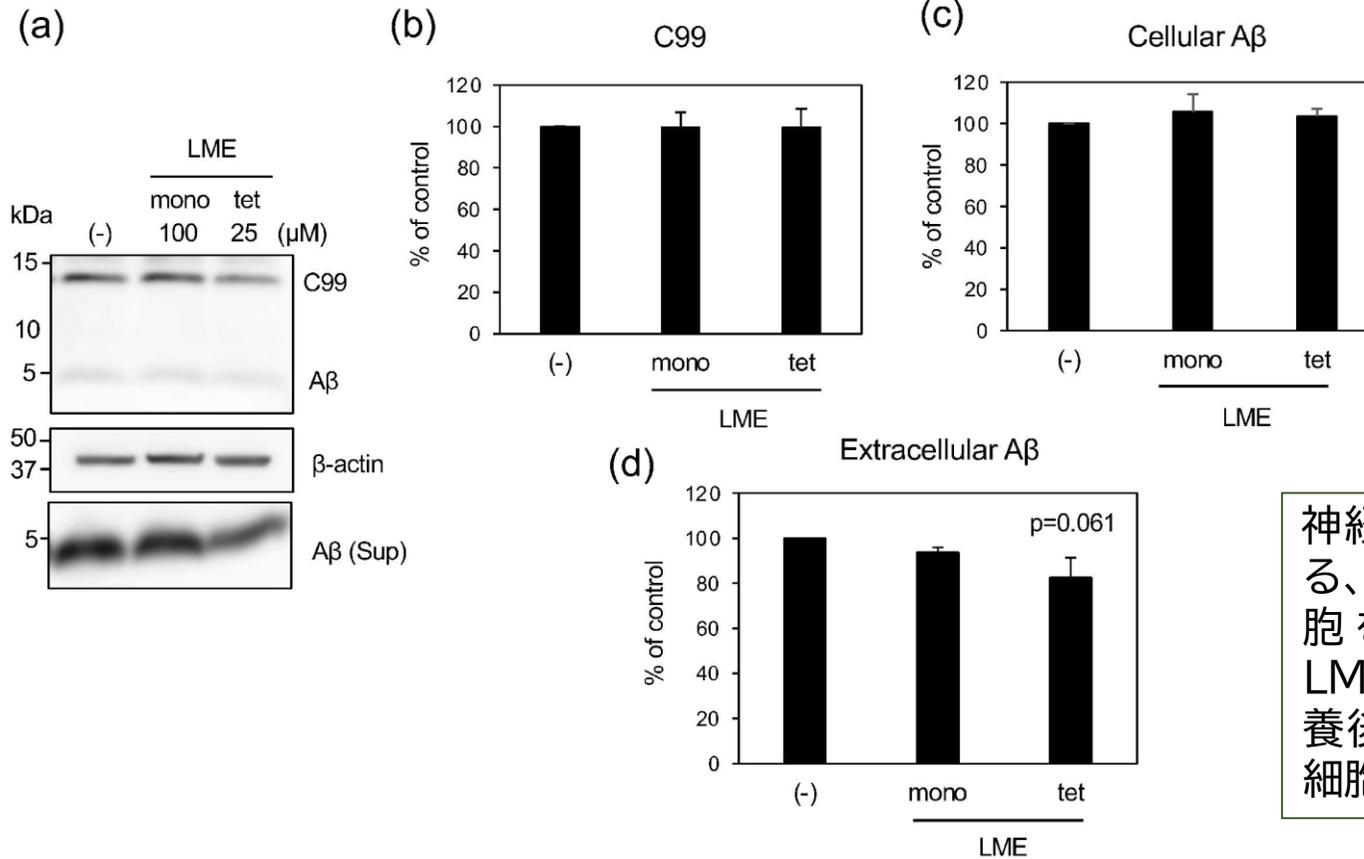
ヒトAPPを安定発現させたCHO細胞をLME-mono存在下で48時間培養後、細胞内C99およびAβ量、細胞外Aβ量を検出、定量した。

LME-tetはAβ1-28、Aβ40、Aβ42いずれにも親和性高く結合するのに対し、LME-monoはほとんど結合しない(図a)。LME-monoはAβの細胞外遊離を抑制しない(図b)。

LME-tetがAβの産生・細胞外遊離を効率よく阻害するのは、**多価型構造を取ることによってクラスター効果を発揮している**ためであることが示唆された。

結果4

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞でのLME-tetの評価

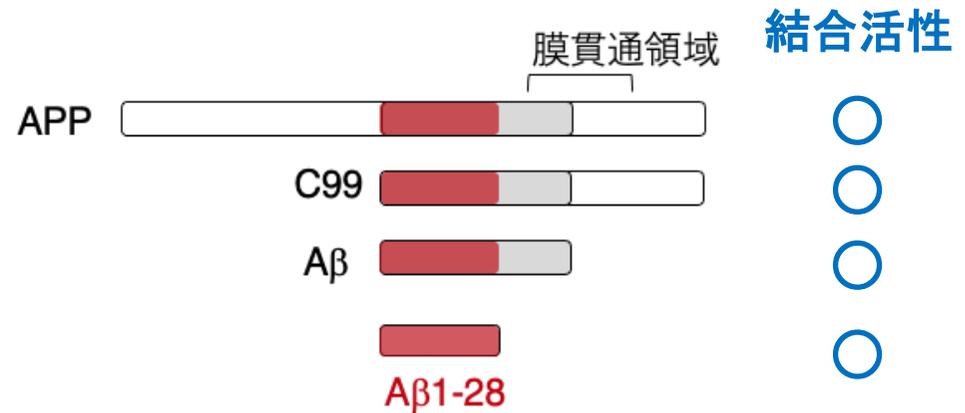
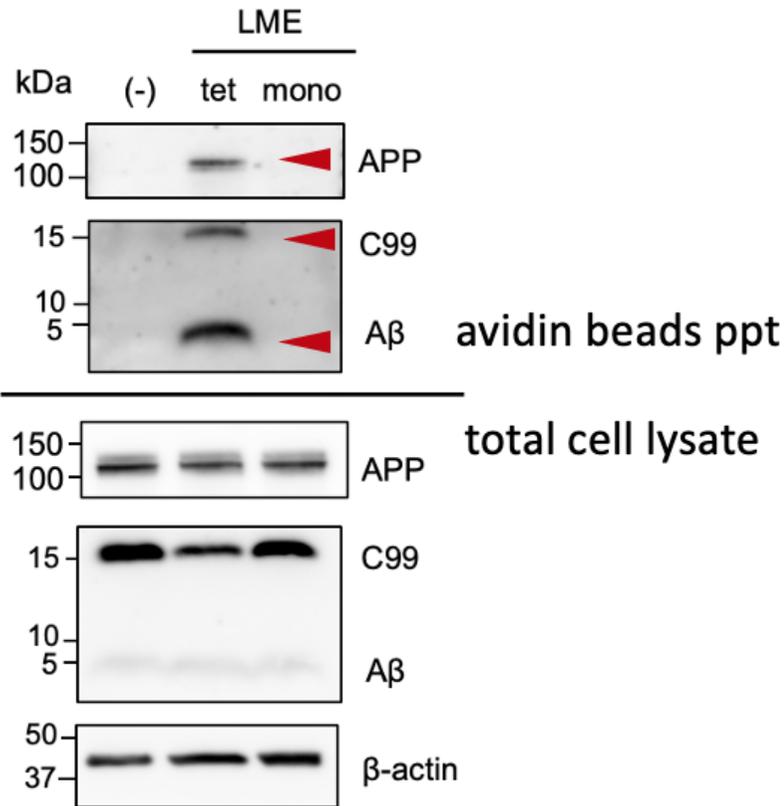


神経細胞のモデルとして用いられる、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いて、LME-tetまたはLME-mono存在下で48時間培養後、細胞内C99およびAβ量、細胞外Aβ量を検出、定量した。

LME-tetは神経細胞でもAβの産生・細胞外遊離を阻害する。

結果5

APP, C99, A β に対するLME-tetの結合能



ヒトAPP発現CHO細胞にビオチン標識LME-tetを添加し、ライセートを調製後アビジンビーズで沈降させ、共沈される分子を調べた。APP, C99, A β はいずれも共沈すること、すなわち細胞内でLME-tetはAPP, C99, A β のすべてに対し結合能を持つことが示された。

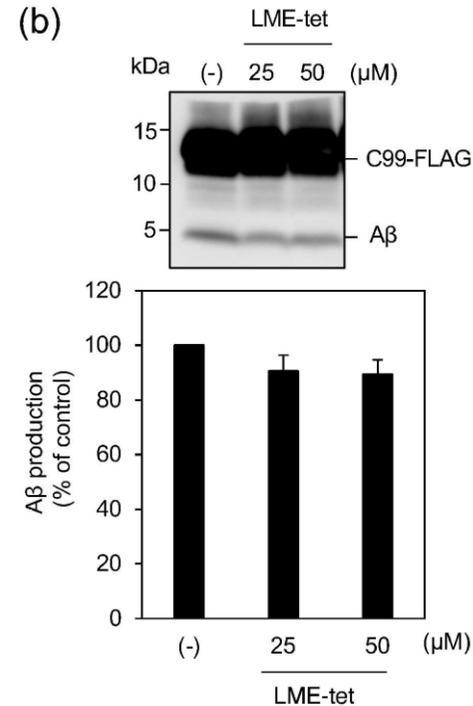
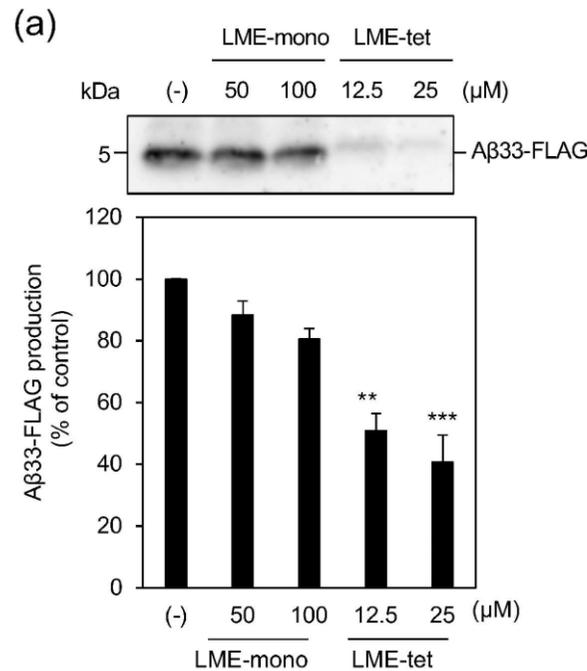
結果6

LME-tetはAPPに結合し、 β -セクレターゼによるAPPの切断を阻害する

β -セクレターゼ

γ -セクレターゼ

(a)
 β -セクレターゼによる切断部位を有する、リコンビナントFlag標識 APP6633-685 を基質とし、ヒト精製 β -セクレターゼによる切断活性に対する LME-mono および LME-tet の阻害効果を *in vitro* で評価した。



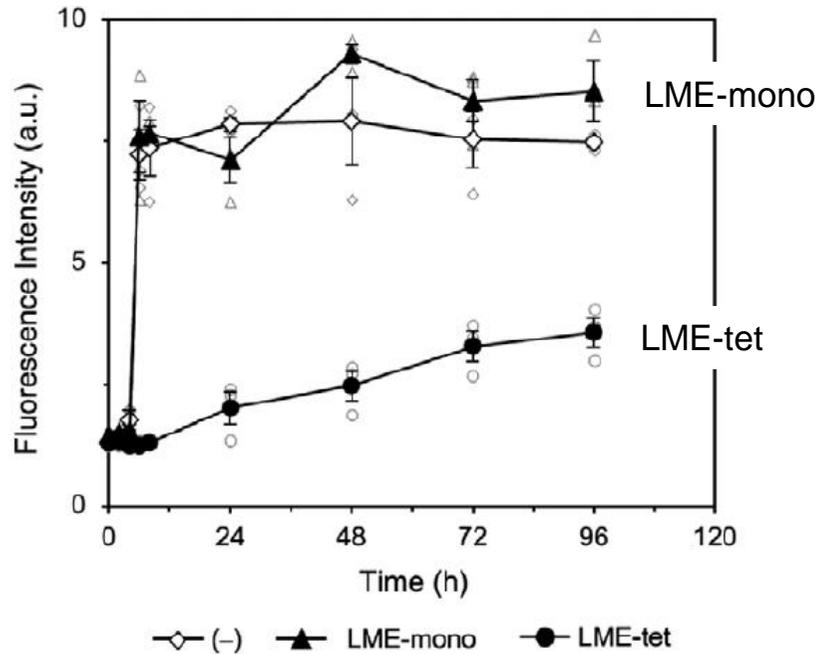
(b)
リコンビナントFlag標識C99を基質とし、ヒト γ -セクレターゼを発現させたHEK 293ライセートによる切断活性に対する LME-tet の阻害効果を評価した。

LME-tetは β -セクレターゼ活性のみを阻害する。

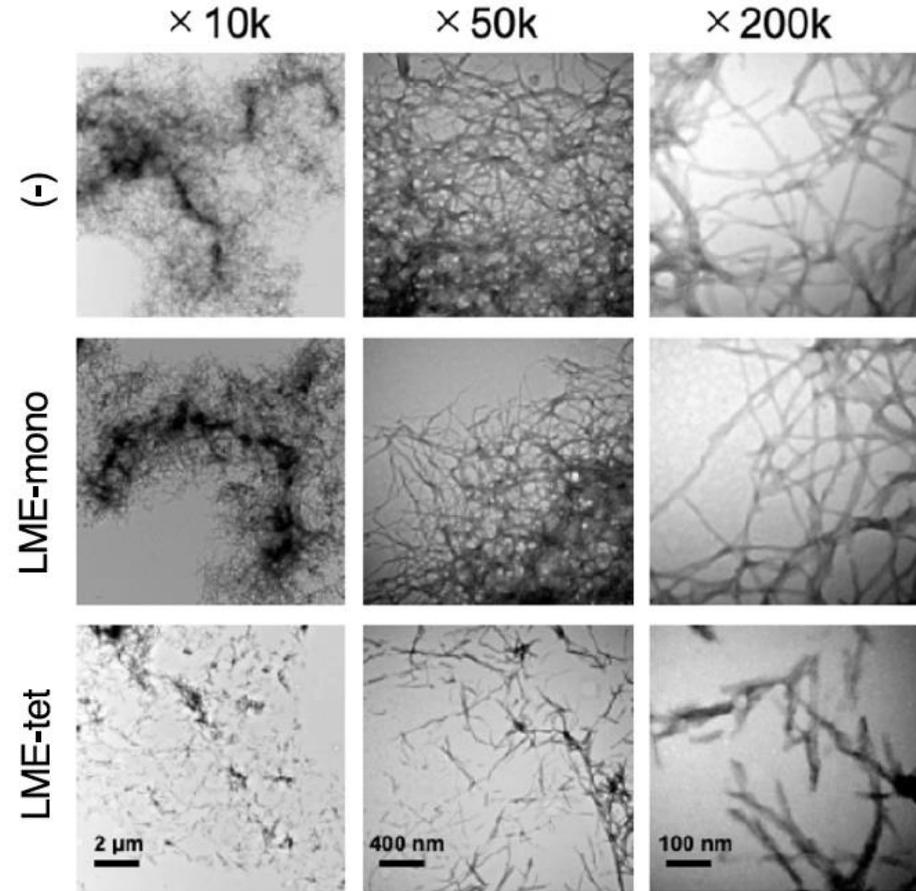
細胞内でLME-tetはクラスター効果を発揮して効率良くAPPに結合し、その結果 β -セクレターゼによるAPPの β -切断を阻害すること、このために強いA β 産生阻害効果を示す。

結果7

LME-tetはA β 42の凝集・線維化を阻害する



チオフラビンT法による凝集測定



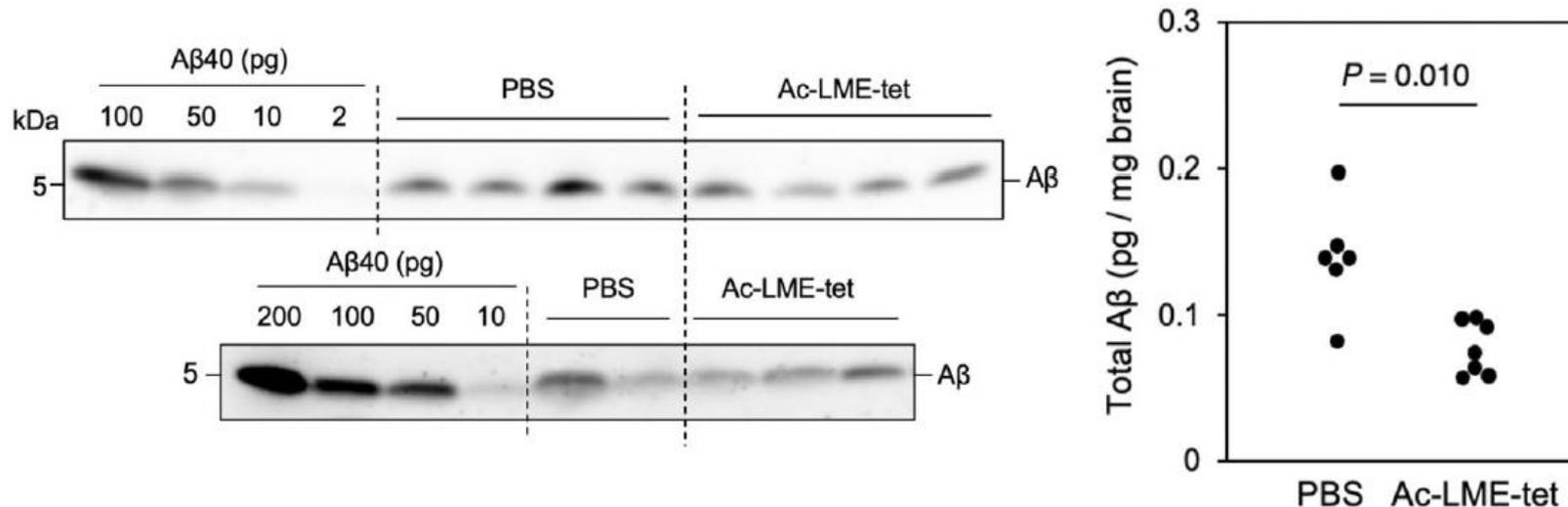
電子顕微鏡による線維化像

LME-tetはA β 42の凝集・線維化阻害する。

結果8

ADモデルマウスでのLME-tetの効果

ADモデルマウス ($App^{NL-G-F/NL-G-F}$): APPのA β 配列をヒト化し、さらに家族性AD患者にみられる遺伝子変異を導入。6週齢以降で脳内にA β の蓄積が観察され、2ヶ月齢でAD患者と同じA β 種の凝集体を形成する。

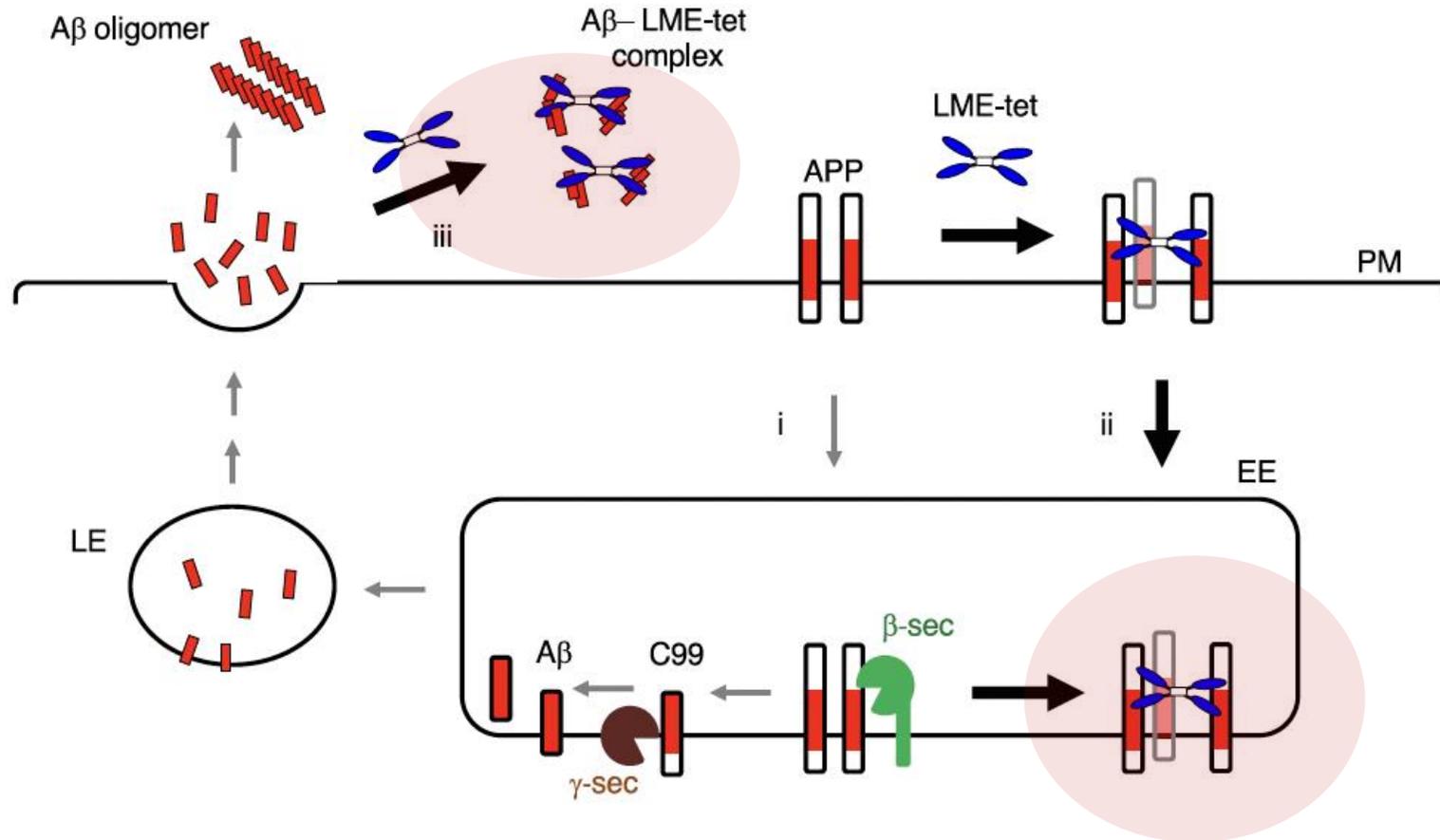


6-8週齢のADモデルマウスに、PBSあるいはLME-tet(71 mg/kg)を腹腔内投与した。1週間後に脳を摘出し、大脳皮質及び嗅球を回収した。ホモゲナイズ後、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法によりA β 量を定量した。なお、ここでは、LME-tetのN末端をアセチル化することでプロテアーゼによる分解を抑制し、生体内での安定性を高めたものを使用した。

アセチル化LME-tet投与により、**脳内A β の蓄積量が顕著に減少**した。

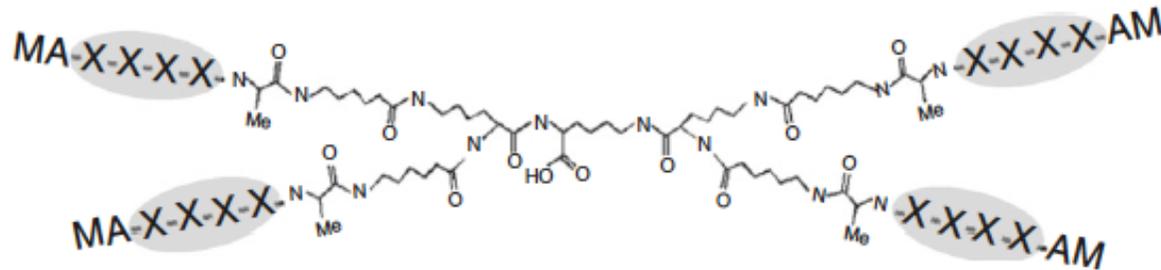
まとめ

LME-tetはA β の産生ならびに凝集を共に阻害する



技術的な優位性

多価型ペプチドライブラリー法は、
クラスター効果を発揮して機能する分子に対する
制御ペプチドを同定できる唯一の方法である。



4価型構造を持つランダムペプチドライブラリー

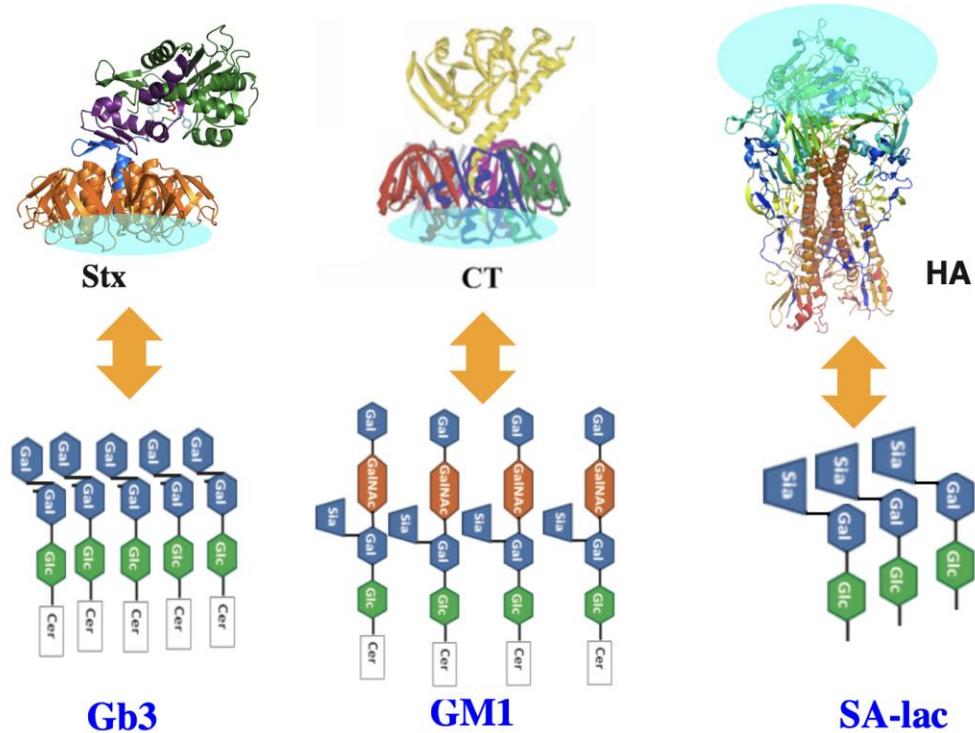
技術的な優位性

制御ペプチド同定に至った疾患関連分子

対象分野	対象疾患	標的分子	知財
感染症	腸管出血性大腸菌感染症	志賀毒素 (Stx) Subtype; Stx1a, 2a, 2c, 2d	特許第5897178号 特許第5635779号 特許第4744443号
	コレラ	コレラ毒素 (CT)	特願2014-050828
	インフルエンザ	ヘマグルチニン (HA)	特許第6910043号
炎症	敗血症・炎症性腸疾患	CaMKII	特許第5754008号
	骨粗鬆症・関節リウマチ	TRAF6	特許第7156635号
疼痛	神経障害性疼痛	CaMKII	
がん	慢性骨髄性白血病	Bcr-Abl	特願2019-198946
	非小細胞肺癌	EML4-ALK	特許第7385191号
	転移	S100A8	特許第7569054号 PCT/JP2021/020095

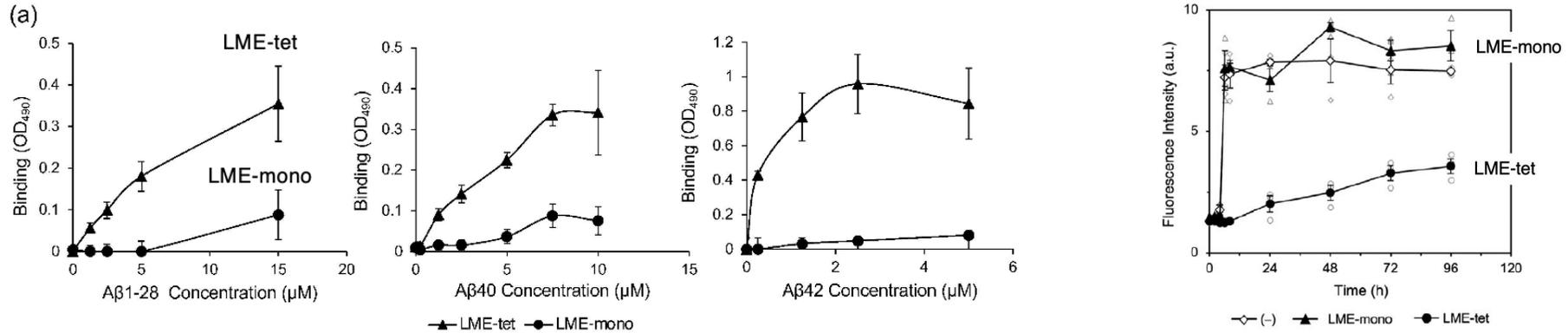
技術的な優位性

制御ペプチド同定に至った疾患関連分子

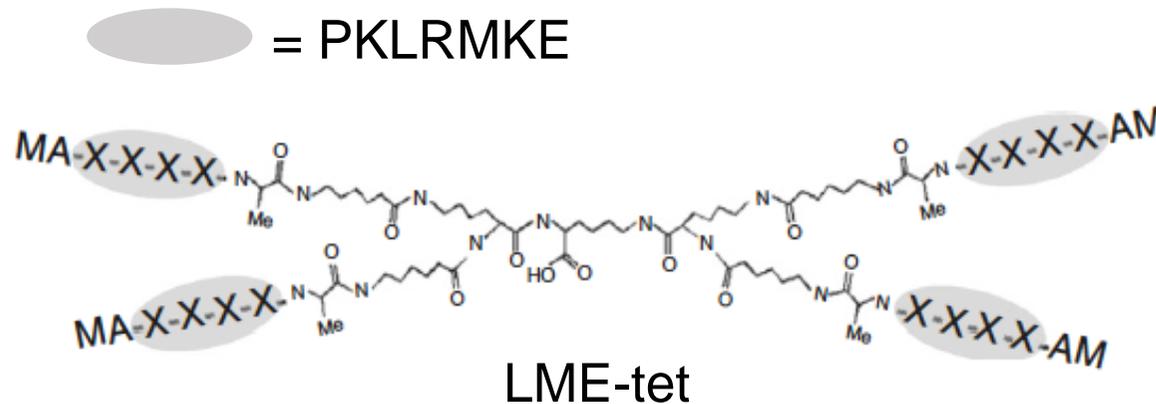


これら分子は**多量体を形成**しており、そのリガンド分子と**多価型の結合を形成**することで結合親和性を著しく高めている(**クラスター効果**)。このため、従来型の、**低分子化合物ライブラリー**のスクリーニングではこの強い相互作用を阻害する分子の同定は**ほぼ不可能**である。

技術的な優位性



LME-tetのモノマー体は、Aβに対する結合活性、Aβ42凝集阻害活性を全く示さない。



このことは、**Aβもクラスター効果を発揮すること**を示しており、**本法以外でLME-tet様の機能を発揮する分子の同定は困難**である。

従来戦術に対する優位性

従来の β -および γ -セクレターゼ阻害剤は、APP及びC99以外の生理的に重要な基質の切断も阻害してしまうため、**副作用の発現が重大な問題**であった。

これに対して、**LME-tet**は、 β -セクレターゼの**基質であるAPPに直接結合することによって、APPの β -切断を特異的に阻害するため、副作用を大幅に減少できると期待される。**

実用化に向けた課題

- 構造最適化(アミノ酸置換、人工アミノ酸の導入、各種化学修飾)による**阻害能や安定性の向上**
- **脳内移行性の向上**(構造修飾、投与法の検討)
- **体内動態**の検討
- **長期投与の効果・影響**に関する検討

企業への期待

- LME-tetの実用化に向け、様々な**ADモデルマウス系を持つ企業との共同研究**を希望。
- 質量分析器等を用いた**LME-tetの体内動態解析が可能な企業との共同研究**を希望。
- ADに限らず、各種増殖因子受容体、インスリン受容体、等**多量体を形成して機能する分子を標的とした創薬**を目指す企業との共同研究を希望。

企業への貢献、PRポイント

- LME-tetの作用機構はこれまでのA β 産生抑制分子とは全く異なることから、**新たな治療戦略分野を提供できる可能性**がある。
- LME-tetのA β 42凝集阻害活性は極めて強く、**既存の抗A β 抗体との併用により、抗体の反応性の増強が期待**できる。
- 各種ホルモン、増殖因子の受容体にはTyr-キナーゼ型受容体をはじめ、多量体を形成して機能するものが多い。本技術は、**多量体を形成して機能する分子に対する制御分子を同定する新たな手法**であり、幅広い応用が期待できる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 :
「A β 産生抑制ペプチドおよびこれを含有する
医薬組成物、飲食品」
- 出願番号 : 特願2021-144907
- 出願人 : 学校法人同志社
- 発明者 : 西川喜代孝、高橋美帆、
舟本聡、佐藤和佳

産学連携の経歴（過去3年）

- 2021年-
AMED「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業」にて「重症例由来下痢症起因菌のサーベイランス手法および病原性評価系の確立に関する研究」を実施
- 2024年-
AMED「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業」にて「重症例由来腸内細菌科細菌の病原性解明に関する研究」を実施

お問い合わせ先

同志社大学

リエゾンオフィス／知的財産センター

TEL 0774-65-6223

e-mail jt-liais@mail.doshisha.ac.jp