

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6391318号
(P6391318)

(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N	33/50		Z
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N	33/15		Z

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2014-132309 (P2014-132309)	(73) 特許権者	502285457
(22) 出願日	平成26年6月27日 (2014.6.27)		学校法人順天堂
(65) 公開番号	特開2016-11849 (P2016-11849A)		東京都文京区本郷2-1-1
(43) 公開日	平成28年1月21日 (2016.1.21)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成29年6月26日 (2017.6.26)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病予防治療薬のスクリーニング法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験物質の存在下に、T M E M 3 0 A と C T F 又は C T F 領域を介した A P P との相互作用を測定することを特徴とする、T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との共発現又は相互作用による小胞の肥大化を抑制することに基づくアルツハイマー病予防治療薬のスクリーニング方法であって、

T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との相互作用の測定が、(1) T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との結合阻害作用を測定するか、又は (2) 培養細胞又は非ヒト動物において T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P を共発現させて小胞の肥大化又は A P P の発現量の変化を検出するものであるスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病予防治療薬をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病では、びまん性の脳萎縮、大脳皮質に老人斑(アミロイド (A) の沈着像)と、アルツハイマー型神経原線維変化の広範囲出現がみられる。家族性アルツハイマー病は遺伝子変異により A 産生制御の異常が生じるが、孤発性アルツハイマー病の発症原因は解明されていない。

【 0 0 0 3 】

一方、エンドソームの蓄積、巨大化はダウン症やアルツハイマー病の初期にみられる現象であり、エンドソームの蓄積には、アミロイド 前駆体蛋白質 (A P P) 及び B A C E 1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) 活性が必要であるが、A は必要ないと報告されている (非特許文献 1) 。 B A C E 1 産物であり、A の前駆体である A P P のカルボキシ末端断片 (C T F) は、エンドソームの蓄積、巨大化を引き起こすことが報告されている。 C T F のエンドソームにおける蓄積は、エンドソームの肥大化、ライソソームにおける代謝障害につながる、Traffic jam仮説が考えられているが、その分子機構はわかっていなかった。

【 先行技術文献 】

10

【 非特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 非特許文献 1 】 PNAS, Jiang et al., 2010; 107(4):1630-5

【 非特許文献 2 】 Nature, Lauren et al., 2009; 457(7233):1128-32

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

アルツハイマー病疾患の 9 0 % を占める孤発性アルツハイマー病の原因は明確になっておらず、その解明が待たれている。

従って、本発明の課題は、アルツハイマー病の原因解明と新たなアルツハイマー病治療薬のスクリーニング方法を提供することにある。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

そこで、本発明者は、エンドソーム - ライソソーム機構を解明すべく、 P 4 - A T P a s e ファミリータンパク質と複合体をつくり、Lipid Flippaseを形成することが知られている T M E M 3 0 A (Transmembrane protein 3 0 A (別名 C D C 5 0 A)) に着目した。 T M E M 3 0 A は、凝集 A と結合し、細胞膜上で凝集 A の受容体として機能する可能性が示唆されている (非特許文献 2) が、A 産生機構やアルツハイマー病発症機構に対する影響は不明であった。 T M E M 3 0 A は、A 前駆体である A P P と共発現させると小胞の肥大化を誘導し、エンドソーム形態を変化させること、さらには肥大化したエンドソームは各種エンドソームが融合し、ライソソームへの成熟が阻害されていることを見出した。また、 T M E M 3 0 A は A P P と結合して A P P を蓄積させる作用を有すること、 T M E M 3 0 A と A P P の結合部位が B A C E 1 活性により産生される A P P カルボキシル末端ドメインである C T F 領域にあることも見出した。かかる知見から、 T M E M 3 0 A と A P P 又は C T F との結合を阻害する物質を探索すれば、小胞の肥大化を抑制でき新たなアルツハイマー病予防治療薬がスクリーニングできることを見出し、本発明を完成した。

30

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、次の〔 1 〕 ~ 〔 3 〕 を提供するものである。

【 0 0 0 8 】

40

〔 1 〕 被験物質の存在下に、 T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との相互作用を測定することを特徴とするアルツハイマー病予防治療薬のスクリーニング方法。

〔 2 〕 T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との相互作用が、 T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との結合阻害作用である〔 1 〕 記載のスクリーニング方法。

〔 3 〕 T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P との相互作用が、培養細胞又は非ヒト動物において T M E M 3 0 A と C T F 又は A P P を共発現させて小胞体の肥大化又は A P P 発現量の変化を検出するものである〔 1 〕 記載のスクリーニング方法。

【 発明の効果 】

【 0 0 0 9 】

本発明方法によれば、アルツハイマー病やダウン症の初期に生じるエンドソームの肥大

50

化を抑制するという、新たな作用機序のアルツハイマー病予防治療薬を探索できる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】TMEM30AとAPPの共発現による小胞の変化を示す。

【図2】TMEM30AとAPPの共発現による小胞の変化を示す。

【図3】TMEM30AとAPPの相互作用を示す。

【図4】TMEM30AとAPPの直接相互作用を示す。

【図5】TMEM30AによるAPP蓄積を示す。

【図6】肥大化したエンドソームの性質を示す。

【図7】A結合化合物のTMEM30AとCTFの結合に及ぼす作用を示す。

10

【図8】A結合化合物のTMEM30AとCTFの結合に及ぼす作用を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

TMEM30Aは、APPと結合する作用を有し、その結合部位はCTF中に存在する。一方、TMEM30AとAPPとを細胞中で共発現させると小胞であるエンドソームが肥大化する。このエンドソームの肥大化は、アルツハイマー病の初期に生じることである。従って、被験物質の存在下に、TMEM30AとCTF又はAPPとの相互作用を測定し、TMEM30AとCTF又はAPPとの結合を阻害する物質を選択すれば、アルツハイマー病の予防治療薬が探索できる。

【0012】

20

TMEM30AとCTF又はAPPとの相互作用の測定は、*in vitro*でも*in vivo*でも行うことができる。*in vitro*の測定方法としては、例えば次の方法が挙げられる。

(1) TMEM30AとCTF又はAPPとを含む溶液における両者の結合性と、これに被験物質を添加した場合の結合性を対比する。

ここで、TMEM30AとCTF又はAPPとの結合性は、これらの抗体を用いた免疫沈降、GST融合タンパク質を用いた解析等により検出できる。

【0013】

(2) 被験物質の存在下で、TMEM30AとCTF又はAPPとの共発現細胞を培養し、両者の共発現性を検出する。被験物質を添加していない場合の共発現性と対比する。このとき、TMEM30AとCTF又はAPPとの共発現性は、これらの抗体を用いた免疫沈降、APPの発現増強の有無等により検出できる。

30

【0014】

(3) 被験物質の存在下で、TMEM30AとCTF又はAPPとの共発現細胞を培養し、培養した細胞の小胞の肥大化を検出する。被験物質を添加していない場合の小胞の肥大化と対比する。

【0015】

*in vivo*の測定は、被験物質を投与したアルツハイマー病モデルマウスを用いて、小胞の肥大化又はAPPの発現変化を検出すればよい。被験物質を投与しないモデルマウス的小胞又はAPPと対比すればよい。ここでアルツハイマー病モデルマウスとしては、J20(家族性変異APP(スウェーデン型およびロンドン型の二重変異)を過剰発現するマウス)、TG2576(家族性変異APP(スウェーデン型変異)を過剰発現するマウス)等が挙げられる。

40

【実施例】

【0016】

次に実施例を挙げて、本発明を更に詳細に説明する。

【0017】

試験例1

培養細胞にAPPとTMEM30Aを共発現させた。すなわち、アフリカミドリザル由来COS-7細胞に蛍光タンパク質Venusをカルボキシ末端に融合させたAPP-Venus、及びアミノ末端に蛍光たんぱく質mCherryを融合させたTMEM30A

50

を、Fugene HD (プロメガ) を用いて遺伝子導入を行った。遺伝子導入 24 時間後の細胞を 4 % パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で固定し、水溶性封入剤により観察用サンプルを作成した。APP と TMEM30A の共発現は、蛍光顕微鏡により確認した (図 1、A)。培養細胞中の小胞の大きさと、APP と TMEM30A の共発現を測定した (図 1、B)。その結果、APP と TMEM30A の共発現により、小胞が肥大化することが判明した (図 1、B)。

【0018】

COS-7 細胞に APP と蛍光たんぱく質 CFP をアミノ末端に融合させた TMEM30A を Fugene HD を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後の細胞を APP 抗体 (APP (C) : IBL 社)、初期エンドソームマーカーである Rab-5 抗体 (D-11 : サンタクルズ社) を用いて免疫染色を行った。

10

その結果、(図 2) TMEM30A と APP の共発現により、小胞の肥大化が確認されるとともに、Rab-5 が肥大化した小胞に集積する事が判明した、すなわち TMEM30A と APP の共発現により肥大化した小胞はエンドソームとしての性質を持つ事がわかった。

【0019】

試験例 2

野生型マウスの脳と、培養細胞 (APP と TMEM30A の共発現細胞) における、TMEM30A と APP の相互作用を検討した。すなわち、8 週齢の野生型マウス脳海馬、または COS-7 に APP と CFP 融合 TMEM30A を Lipofectamine 2000 (Life Technologies 社) で遺伝子導入し、48 時間後の細胞を、1 % CHAPS を含む溶解緩衝液 (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA にプロテアーゼ阻害剤カクテルを加えたもの) で溶解し、マウス海馬は TMEM30A の抗体、培養細胞は GFP 抗体 (3E6 Life Technologies 社) を用いて免疫沈降実験を行った。

20

その結果、マウスでも共発現細胞でも、TMEM30A は APP と結合し、その結合は CTF 特異的であることがわかった (図 3)。

【0020】

試験例 3

TMEM30A の細胞外ドメインを GST タンパク質と融合したタンパク質を大腸菌内で発現させ、大腸菌を 1 % Triton X 100 を含むリン酸緩衝液において溶解させた後、グルタチオンセファロースビーズを添加し、GST 融合タンパク質をビーズに吸着させ、ビーズを 3 回洗浄したのち使用した。COS-7 細胞に APP のスウェーデン型変異、または人工的な CTF である SC100 を遺伝子導入し、1 % CHAPS を含む溶解緩衝液に溶解したのち、溶解緩衝液で平衡化した融合タンパク質の吸着したビーズを添加した。コントロールとして GST を吸着したビーズを使用した。4 下で 1 時間穏やかに攪拌を行った後、1 % CHAPS を含む溶解緩衝液でビーズを 3 回洗浄し、非結合タンパク質を除去した。ビーズに吸着したタンパク質をレムリサンプル緩衝液により溶出した。各サンプルはイムノプロット法により解析した。

30

その結果、CTF は TMEM30A の細胞外ドメインに直接結合することが判明した (図 4)。

40

【0021】

試験例 4

COS-7 細胞に APP 単独、または APP と CFP 融合 TMEM30A を Lipofectamine 2000 により遺伝子導入し、遺伝子導入 48 時間後の APP の代謝をイムノプロット法により解析した。APP の代謝解析は APP のカルボキシ末端抗体 (C12C15) もしくは CTF 特異的抗体 (82E1 : IBL 社) により行った。

その結果、TMEM30A と CTF との共発現は、APP 及び CTF を有意に蓄積することが判明した (図 5)。

【0022】

50

試験例 5

COS-7細胞にAPPとCFP融合TMEM30AをFugene HDにより遺伝子導入を行い、遺伝子導入24時間後の細胞を免疫染色により観察した。APPカルボキシ末端抗体(mc99(80-90);ミリポア社)、後期エンドソームマーカであるRab-7(D95F2;Cell signaling社)、リサイクリングエンドソームマーカであるRab-11(D4F5;Cell signaling社)を用いた。

その結果を図6に示す。

肥大化したエンドソームは各種エンドソームマーカが集積(通常では局在は異なる)していた(図6A、B)。またLysosomeマーカ(Lysotracker:Lifetechnologies社)と一致しなかったため(図6C)、Lysosomeへの移行が阻害されている可能性を考えた。LysosomeでAPPを分解するカテプシンの阻害剤の効果を検証した結果、APP単独発現では阻害剤処理によりAPP-CTFが蓄積するが、TMEM30Aとの共発現でもともと蓄積したAPP-CTFは阻害剤処理により変化しない、この結果はTMEM30Aとの共発現でLysosome分解低下が起こっていた事を示しており、APPのLysosome分解が低下するとするTraffic jam仮説と矛盾しない。

【0023】

試験例 6

A 結合化合物であるクルクミンとタキシフォリンを用いて、TMEM30AとCTFの結合阻害、CTFの蓄積性を検討した。まず毒性評価のため、COS-7細胞にクルクミン(50、100μM)、タキシフォリン(100、200μM)を加え8時間後、アラマブルー反応液を含む培地で1時間培養し、培地に放出される蛍光物質の量をコントロール細胞(溶媒のみ加えた細胞)の値により規格化して検討した。次にCOS-7細胞にAPPとCFP融合TMEM30AをLipofectamine2000を用いて共発現させ、24時間後にクルクミン(50μM)タキシフォリン(100μM)を添加し、8時間培養した。サンプルはレムリサンプル緩衝液で溶解し、イムノプロット法により解析した。COS-7細胞に遺伝子導入したCTF(SC100)を1%CHAPSを含む細胞溶解緩衝液により溶解し、溶解液をクルクミン(50μM)、タキシフォリン(100μM)で前処理を行い、30分後にGST融合TMEM30A細胞外ドメインを吸着させたグルタチオンセファロースビーズを添加し、1時間4で穏やかに攪拌した。ビーズに吸着したタンパク質をレムリサンプル緩衝液により溶解してイムノプロット法により解析した

その結果、A 結合化合物(図7、A)は、TMEM30AとCTFの相互作用を阻害し(図7、F)、細胞毒性が軽微な(10%未満)濃度で(図7、B)APP-CTFの蓄積を減少させた(図7C~E)。

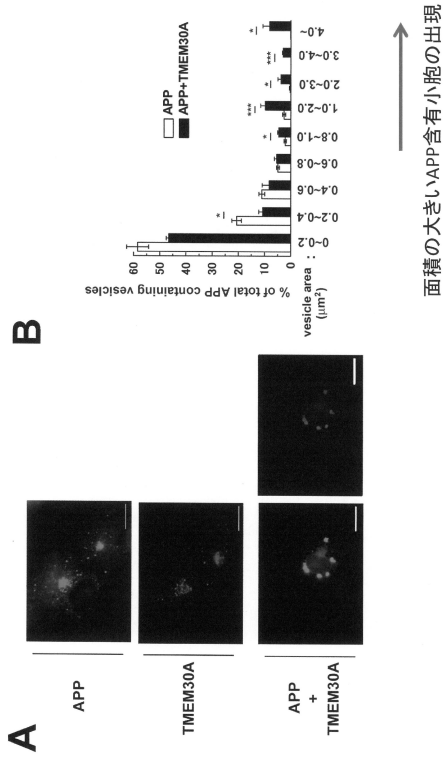
【0024】

試験例 7

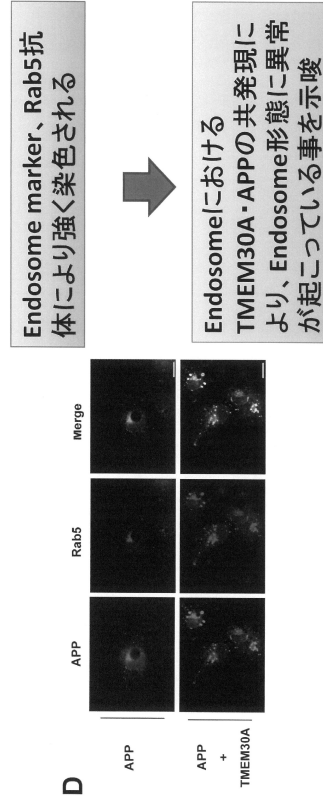
クルクミンとタキシフォリンが、TMEM30AとAPP共発現系に及ぼす作用について検討した。COS-7細胞にVenus融合APP、及びmcherry融合TMEM30AをFugene HDにより遺伝子導入した。遺伝子導入24時間後、クルクミン(50μM)、タキシフォリン(100μM)を含む培地で8時間培養した。

その結果、TMEM30AとAPPの共発現によりAPP発現蛍光強度が強くなるが、クルクミンとタキシフォリンは、いずれも、その蛍光強度を低下させた(図8)。

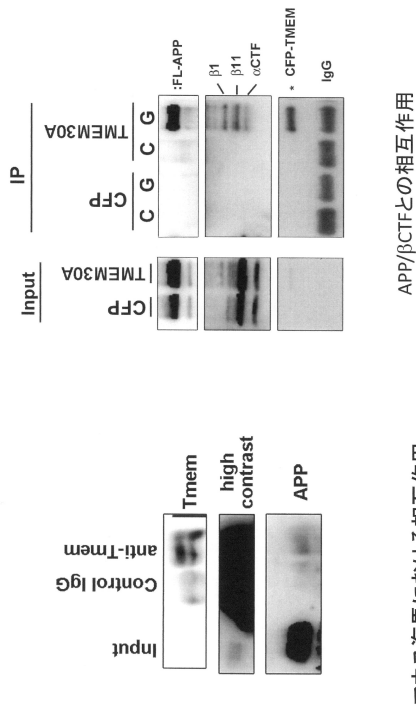
【 図 1 】



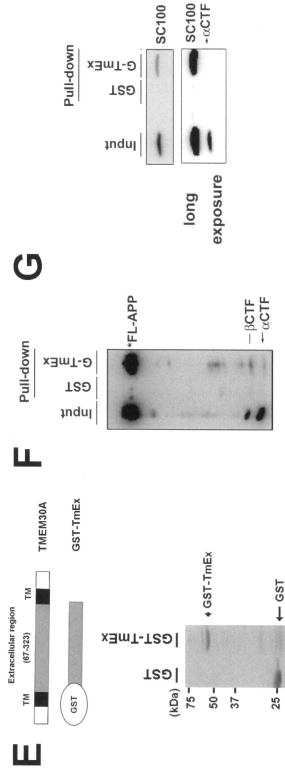
【 図 2 】



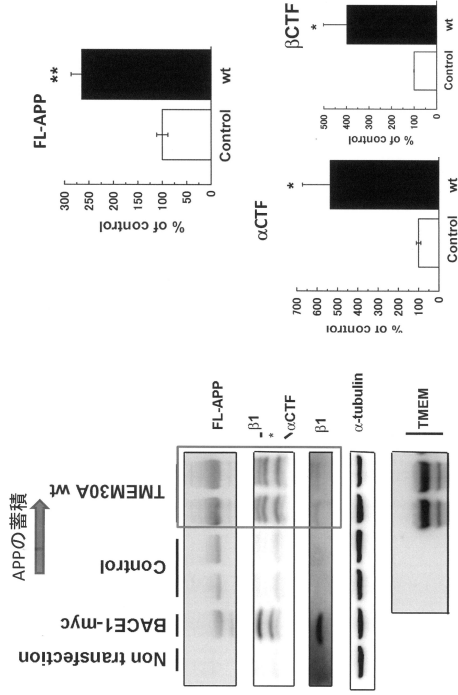
【 図 3 】



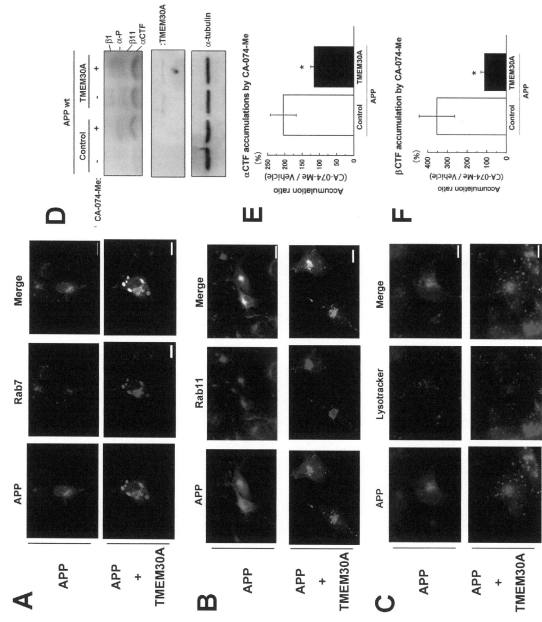
【 図 4 】



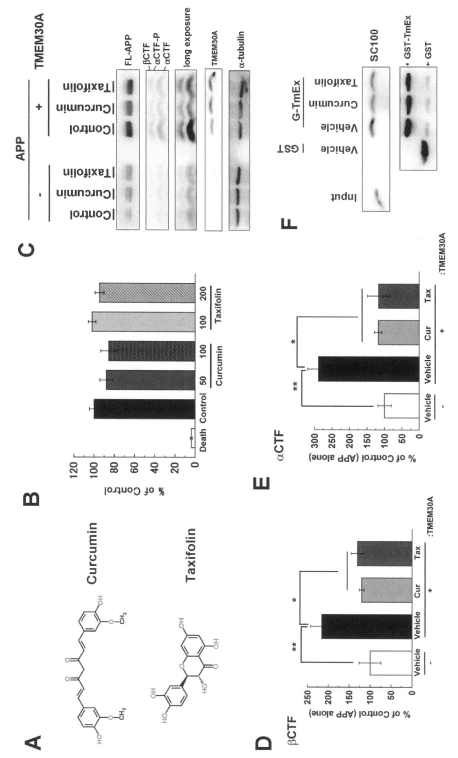
【 図 5 】



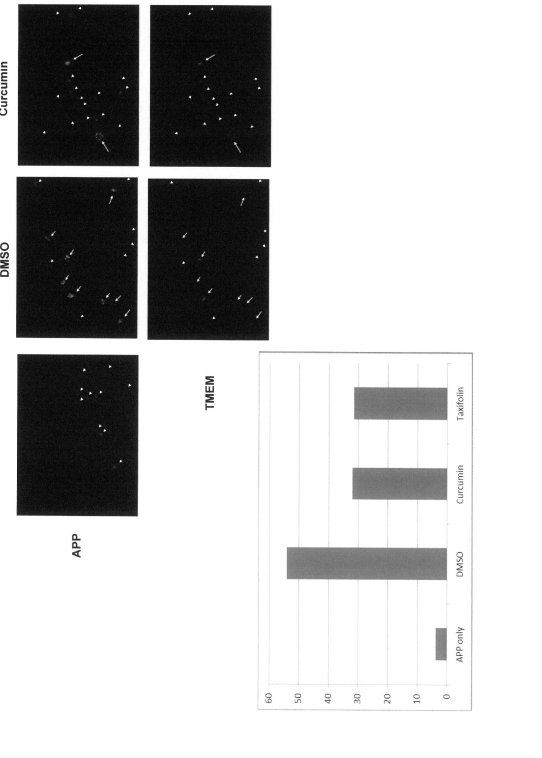
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

- (72)発明者 高杉 展正
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 櫻井 隆
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内
- (72)発明者 清水 瑠奈
東京都文京区本郷2 - 1 - 1 順天堂大学内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表2009 - 509503 (JP, A)
特表2002 - 543425 (JP, A)
国際公開第2006 / 004194 (WO, A1)
国際公開第2013 / 066764 (WO, A1)
国際公開第2013 / 106577 (WO, A1)
特表2011 - 517282 (JP, A)
米国特許出願公開第2009 / 0068678 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33 / 48 - 33 / 98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)