

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/164230

発行日 平成31年2月7日 (2019.2.7)

(43) 国際公開日 **平成29年9月28日 (2017.9.28)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A	4 B O 6 3
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C12N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99	4 C O 8 4
A01K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 C O 8 5
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2018-507366 (P2018-507366)	(71) 出願人	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/011418	(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(22) 国際出願日	平成29年3月22日 (2017.3.22)	(72) 発明者	村田 等 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
(31) 優先権主張番号	特願2016-58130 (P2016-58130)	(72) 発明者	阪口 政清 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
(32) 優先日	平成28年3月23日 (2016.3.23)	(72) 発明者	木下 理恵 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸化SARM1、抗体、SARM1リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、スクリーニング方法、SARM1 改変体及び使用

(57) 【要約】

本発明は、SARM1 (Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1) の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基がリン酸化された、リン酸化SARM1を提供するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SARM1 (Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1) の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基がリン酸化された、リン酸化SARM1。

【請求項 2】

SARM1がヒト由来である、請求項1に記載のリン酸化SARM1。

【請求項 3】

SARM1の54位、548位又は622位のリン酸化Ser残基を特異的に認識し、SARM1の54位、548位及び622位の非リン酸化Ser残基を認識しない、抗リン酸化SARM1抗体。

【請求項 4】

サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) 及びJNKからなる群から選ばれる少なくとも1種の阻害剤を有効成分とするSARM1リン酸化阻害剤。

【請求項 5】

サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) 及びJNKからなる群から選ばれる少なくとも1種の阻害剤を有効成分とする神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 6】

抗SARM1抗体、SARM1のデコイペプチド及びアンタゴニストからなる群から選ばれるSARM1阻害剤を有効成分とする、神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 7】

抗SARM1抗体が、SARM1の54位、548位又は622位のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体またはSARM1の54位、548位又は622位のリン酸化Ser残基を特異的に認識し、SARM1の54位、548位及び622位の非リン酸化Ser残基を認識しない抗リン酸化SARM1抗体である、請求項6に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 8】

SARM1のデコイペプチドがSARM1のSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸又はSer⁶²²を含む断片ペプチドまたはその修飾体である、請求項6に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 9】

神経変性疾患がパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多発性硬化症、ニューロパチー及びアルツハイマー病からなる群から選ばれる請求項5~8のいずれか1項に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

【請求項 10】

SARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基のリン酸化を検出する工程を含む、神経変性疾患の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

【請求項 11】

SARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基のリン酸化を検出する工程を含む、SARM1阻害剤のスクリーニング方法。

【請求項 12】

ヒトSARM1の54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種に相当するSerがGlu又はAspで置換されたSARM1改変体。

【請求項 13】

神経変性疾患のモデル細胞又はモデル動物の作成のための請求項12に記載のSARM1改変体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リン酸化SARM1、抗体、SARM1リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、スクリーニング方法、SARM1改変体及び使用に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

SARM1(Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1)はミトコンドリア移行シグナルをもつTIRアダプタータンパク質の1つで、724アミノ酸からなっている。SARM1は主に神経系の細胞に発現が強く(非特許文献1)、虚血性の神経細胞死や神経軸索変性の原因分子となることが報告されている(非特許文献2、3)。この神経細胞死はSARM1をノックアウトすることによって著しく抑制できることから、SARM1を標的とした薬剤があれば神経細胞死を抑制し、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)など様々な神経変性疾患の治療に応用できると考えられている(特許文献1)。しかしSARM1を標的とした薬剤は現在存在しない。

【0003】

特許文献2～5は、CDK8又はCDK19の阻害剤ががんの治療に有効であることを開示している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】US20120328629

【特許文献2】W02015/159937

【特許文献3】特表2016-501845

【特許文献4】特表2016-503408

【特許文献5】特表2015-506376

【非特許文献】

20

【0005】

【非特許文献1】J Exp Med, 204(9), 2007

【非特許文献2】Science, 337(6093), 2012

【非特許文献3】J Neurosci, 33(33), 2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、SARM1の機能を抑制し、神経変性疾患を予防又は治療することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0007】

本発明者は細胞内でのSARM1の変化や機能を解析し、SARM1がミトコンドリア呼吸鎖複合体Vに作用することによってATP合成を阻害し、細胞死を誘導することを見出した。またc-Jun N-terminal kinase (JNK)がSARM1の54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種のセリン残基をリン酸化することでSARM1を活性化することを見出した。SARM1の54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種のセリン残基のリン酸化を検出する方法を開発することで、SARM1の活性状態の確認や阻害剤開発に利用していくことが可能になる。本発明者は、さらにSARM1の中にあるARMドメイン、SAMドメイン、TIRドメインを含む領域を用いることで54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種のセリン残基のリン酸化を感度よく検出する方法を開発した。また本検出方法を用いて、SARM1の阻害剤を見出した。

40

【0008】

本発明は、以下のリン酸化SARM1、抗体、SARM1リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、スクリーニング方法、SARM1改変体及び使用を提供するものである。

項1. SARM1 (Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1)の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基がリン酸化された、リン酸化SARM1。

項2. SARM1がヒト由来である、項1に記載のリン酸化SARM1。

項3. SARM1の54位、548位又は622位のリン酸化Ser残基を特異的に認識し、SARM1の54位、548位及び622位の非リン酸化Ser残基を認識しない、抗リン酸化SARM1抗体。

50

項 4 . サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) 及びJNKからなる群から選ばれる少なくとも1種の阻害剤を有効成分とするSARM1リン酸化阻害剤。

項 5 . サイクリン依存性キナーゼ8 (CDK8)、サイクリン依存性キナーゼ19 (CDK19) 及びJNKからなる群から選ばれる少なくとも1種の阻害剤を有効成分とする神経変性疾患の予防又は治療薬。

項 6 . 抗SARM1抗体、SARM1のデコイペプチド及びアントゴニストからなる群から選ばれるSARM1阻害剤を有効成分とする、神経変性疾患の予防又は治療薬。

項 7 . 抗SARM1抗体が、SARM1の54位、548位又は622位のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体またはSARM1の54位、548位又は622位のリン酸化Ser残基を特異的に認識し、SARM1の54位、548位及び622位の非リン酸化Ser残基を認識しない抗リン酸化SARM1抗体である、項 6 に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

項 8 . SARM1のデコイペプチドがSARM1のSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸又はSer⁶²²を含む断片ペプチドまたはその修飾体である、項 6 に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

項 9 . 神経変性疾患がパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多発性硬化症、ニューロパチー及びアルツハイマー病からなる群から選ばれる項 5 ~ 8のいずれか 1 項に記載の神経変性疾患の予防又は治療薬。

項 10 . SARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基のリン酸化を検出する工程を含む、神経変性疾患の予防又は治療薬のスクリーニング方法。

項 11 . SARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のSer残基のリン酸化を検出する工程を含む、SARM1阻害剤のスクリーニング方法。

項 12 . ヒトSARM1の54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種に相当するSerがGlu又はAspで置換されたSARM1改変体。

項 13 . 神経変性疾患のモデル細胞又はモデル動物の作成のための項 12 に記載のSARM1改変体の使用。

【発明の効果】

【0009】

本発明はSARM1の54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種のセリン残基のリン酸化と細胞生存率を測定することによって、SARM1の活性状態の検出及び神経細胞死抑制効果のある物質を探索することが可能な技術である。SARM1は虚血性の神経細胞死や神経軸索変性の原因分子となることが報告されており、SARM1の阻害剤を開発すれば神経細胞死や軸索変性が原因で起こるパーキンソン病やALSなど様々な神経変性疾患の治療に応用できる。これまではSARM1の細胞内での活性状態を測定できる技術が存在しなかったため、SARM1を標的とした薬剤は開発できなかった。本発明によってSARM1のリン酸化を指標にしたSARM1阻害剤のスクリーニングが可能になる。本発明ではSARM1の中に含まれるARMドメイン (28~405aa)、SAMドメイン (406~550aa)、TIRドメイン (551~724aa)、或いは54番目、548番目又は622番目のSer残基を含むその断片をリン酸化解析に用いることによって高感度かつ簡便にSARM1セリン54番目、548番目又は622番目のリン酸化を検出できるようになった。TIRドメインとして、S622、TIRのBB-loop及びDD-loop構造を含むコア領域 (D594~E670 aa) を使用してもよい (図10B)。

【0010】

またSARM1をリン酸化するJNK1、JNK2、JNK3およびSARM1のリン酸化を増強するCDK19、CDK8を見出したので、これらリン酸化酵素の阻害剤は有望な神経細胞死抑制剤の候補となる。また神経変性疾患患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞などを用いてSARM1のセリン54番目、548番目及び622番目からなる群から選ばれる少なくとも1種のセリン残基のリン酸化状態を解析することによって、病気の進行度などの評価に応用できる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】SARM1の発現抑制条件下でのストレス誘導性細胞死率の測定

【図2】 SARM1のミトコンドリア呼吸阻害による細胞死誘導

【図3】 SARM1のセリン548番のリン酸化

【図4】 CDK19、CDK8によるSARM1のリン酸化及び活性制御

【図5】 リン酸化を指標にしたSARM1阻害剤の開発

【図6】 JNKによるSARM1のリン酸化

【図7】 SARM1-Ser⁵⁴⁸リン酸化検出を利用したSARM1リン酸化阻害剤のスクリーニング法

【図8】 SARM1-Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸、Ser⁶²²のリン酸化

【図9】 SARM1のリン酸化による結合タンパク質の変化

【図10】 SAMドメイン、TIRドメインを利用したSARM1結合物質のスクリーニング法

【発明を実施するための形態】

10

【0012】

本明細書において、SARM1はミトコンドリアに局在する724アミノ酸からなるタンパク質であり、ミトコンドリア局在配列、ARM、SAM、TIRの各ドメインを有する(図2A)。

【0013】

ヒトSARM1のアミノ酸配列を配列番号1に示す。ヒトSARM1のpIは6.1であり、分子量は79388である。

【0014】

SARM1には多数のリン酸化可能なThr残基、Ser残基があるが、本発明者はSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²、好ましくはSer⁵⁴⁸及びSer⁶²²がリン酸化部位であることを見出した。Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種、好ましくはSer⁵⁴⁸及び/又はSer⁶²²がリン酸化されることでSARM1は活性化され、ミトコンドリア呼吸を阻害し、細胞死を誘導するので、Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種、好ましくはSer⁵⁴⁸及び/又はSer⁶²²のリン酸化を阻害することで、ミトコンドリア呼吸の阻害が解除され、神経細胞死の誘導を抑制できる。したがって、Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種、好ましくはSer⁵⁴⁸及び/又はSer⁶²²のリン酸化阻害物質は、神経変性疾患の予防又は治療剤として有用である。

20

【0015】

神経変性疾患としては、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、多発性硬化症及びアルツハイマー病が挙げられ、特にパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)が挙げられる。

30

【0016】

本発明者は、SARM1のリン酸化がサイクリン依存性キナーゼ8(CDK8)及び/又はサイクリン依存性キナーゼ19(CDK19)、さらにJNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)により行われることを見出した。CDK8とCDK19の一方又は両方(好ましくは両方)、JNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)を阻害することで、SARM1の活性化を抑制することができ、神経細胞死を抑制し、神経変性疾患を予防又は治療することができる。神経細胞は、細胞死後にCDK8とCDK19の一方又は両方(好ましくは両方)、さらにJNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)を阻害しても再生しないので、CDK8及び/又はCDK19、さらにJNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)の阻害剤は、神経変性疾患の予防もしくは進行を止めるか遅らせるのに有用である。また、軸索変性の場合には、本発明の神経変性疾患の予防又は治療薬で再生可能である。

40

【0017】

JNKによるSARM1のリン酸化モチーフを以下に示す。

Ser⁵⁴ : REVSPGAG

Ser⁵⁴⁸ : MLHSPLPC

Ser⁶²² : LVLSPGAL

また、神経変性疾患は、抗SARM1抗体、SARM1のデコイペプチド及びアンタゴニストからなる群から選ばれるSARM1阻害剤により予防又は治療することができる。SARM1のデコイペプチドとしては、SARM1のSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸又はSer⁶²²を含む断片ペプチドまたはその修飾体が挙げられる。修飾体は、N末端のアミノ基がアシル化(アセチル化、プロピオニル化な

50

ど)、アルキル化(メチル化、エチル化など)されたもの、C末端のカルボキシル基がエステル化、アミド化されたものが挙げられる。このようなデコイペプチドは配列番号1のヒトSARM1のアミノ酸配列から当業者であれば容易に設計できる。SARM1のアンタゴニストとしては、SAMドメイン(分子量約17000)、ARMドメイン(分子量約40000)、TIRドメイン(分子量約19000)が挙げられるが、より低分子量のアンタゴニストであってもよい。デコイペプチドはSARM1のアンタゴニストに包含される。

【0018】

神経変性疾患の予防又は治療に有効である抗SARM1抗体は、SARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種、好ましくは548位及び/又は622位のSer残基のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体またはSARM1の54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少なくとも1種のリン酸化Ser残基を特異的に認識し、SARM1の54位、548位及び622位の非リン酸化Ser残基を認識しない抗リン酸化SARM1抗体が挙げられる。このような抗体の作製に使用可能なペプチドとしては、

RGPREVSPGAGTEVQ (Ser(S)残基がリン酸化されたペプチドは、抗リン酸化SARM1抗体の作製に使用でき、Ser(S)残基がリン酸化されていないペプチドは、SARM1のSer⁵⁴のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体の作製に使用できる)、

AREMLHSPLPCTGGK (Ser(S)残基がリン酸化されたペプチドは、抗リン酸化SARM1抗体の作製に使用でき、Ser(S)残基がリン酸化されていないペプチドは、SARM1のSer⁵⁴⁸のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体の作製に使用できる)、

NFVLVLSPGALDKCM (Ser(S)残基がリン酸化されたペプチドは、抗リン酸化SARM1抗体の作製に使用でき、Ser(S)残基がリン酸化されていないペプチドは、SARM1のSer⁶²²のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体の作製に使用できる)

が挙げられるが、これらに限定されず、Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸又はSer⁶²²を含むペプチドが使用可能である。

【0019】

本明細書で、「SARM1のSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種のリン酸化を抑制可能な非リン酸化SARM1に対する抗体」とは、Ser54、Ser548又はSer622を含むエピトープを認識する抗体であってもよく、Ser54、Ser548又はSer622の近傍のエピトープを認識し、抗体結合によりSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種のリン酸化を抑制可能な抗体であってもよい。

【0020】

CDK8及び/又はCDK19の阻害剤は、例えばW02015/159937、US20120071477、US20120071477、WO2013/116786、特表2015-506376、特表2016-503408に記載のものが挙げられ、現在公知であるか、将来見出されるCDK8及び/又はCDK19の阻害剤は全て神経変性疾患の予防又は治療剤或いはSARM1のリン酸化阻害剤/活性化阻害剤として本発明に包含される。また、SARM1のARMドメイン、SAMドメイン、TIRドメイン或いはSer⁵⁴、Ser⁵⁴⁸又はSer⁶²²を含むその断片は、SARM1のリン酸化を競合的に阻害できるので、SARM1のリン酸化阻害剤/活性化阻害剤/神経変性疾患の予防又は治療剤として有用である。

【0021】

JNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)の阻害剤は多数知られており、現在公知であるか、将来見出されるJNK(JNK-1、JNK-2、JNK-3、特にJNK-3)の阻害剤は全て神経変性疾患の予防又は治療剤或いはSARM1のリン酸化阻害剤/活性化阻害剤として本発明に包含される。

【0022】

SARM1の54位、548位又は622位のSerをAsp(D)又はGlu(E)に置換することで、神経細胞死の誘導作用を増強することができ、SARM1の54位、548位又は622位のSerをAlaなどのリン酸化されず、かつ、酸性でないアミノ酸に置換することでSARM1の活性化を阻害し、SARM1による神経細胞死の誘導作用を軽減もしくは消失させることができる。SARM1のAsp⁵⁴又はGlu⁵⁴変体、Asp⁵⁴⁸又はGlu⁵⁴⁸変体、Asp⁶²²又はGlu⁶²²変体は、SARM1の神経細胞死誘導作用を増強することができるので、54位、548位及び622位からなる群から選ばれる少

10

20

30

40

50

なくとも1種のSerをAsp(D)又はGlu(E)に改変したSARM1改変体は、神経変性疾患のモデル動物又はモデル細胞を作成するのに有用である。例えば野生型SARM1遺伝子をAsp⁵⁴又はGlu⁵⁴改変体遺伝子、Asp⁵⁴⁸又はGlu⁵⁴⁸改変体遺伝子、Asp⁶²²又はGlu⁶²²改変体遺伝子に置換(ノックイン)した非ヒト哺乳動物/細胞、或いは、Asp⁵⁴又はGlu⁵⁴改変体遺伝子、Asp⁵⁴⁸又はGlu⁵⁴⁸改変体遺伝子、Asp⁶²²又はGlu⁶²²改変体遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物/細胞は、神経変性疾患のモデル動物/モデル細胞(細胞はヒトを含む)となり得る。54位、548位、622位の2種以上を改変してもよい。

【0023】

哺乳動物としては、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヤギ、イヌ、ネコ、サル、ウシ、ブタなどが挙げられる。これら哺乳動物のSARM1の塩基配列及びアミノ酸配列は公知であるか、公知のSARM1の塩基配列から容易に遺伝子を取得し、アミノ酸配列を決定することができる。

【0024】

本発明の抗リン酸化SARM1抗体は、Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸及びSer⁶²²からなる群から選ばれる少なくとも1種のリン酸化SARM1又はリン酸化Ser⁵⁴及び/又はSer⁵⁴⁸及び/又はSer⁶²²を含むその断片をマウスに免疫して得られたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、モノクローナル抗体が好ましい。以下において、「Ser⁵⁴及び/又はSer⁵⁴⁸及び/又はSer⁶²²」を「Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²」と略すことがある。

【0025】

Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化SARM1又はリン酸化Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²を含むその断片でマウスなどの哺乳動物に免疫した後、いくつかのハイブリドーマが得られる。その中で必要となる抗体は、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化SARM1に反応し、非リン酸化SARM1に反応しない抗体を産生するハイブリドーマである。

【0026】

本発明の抗非リン酸化SARM1抗体は、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²非リン酸化SARM1又は非リン酸化Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²を含むその断片をマウスに免疫して得られたハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、モノクローナル抗体が好ましい。Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²非リン酸化SARM1又は非リン酸化Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²を含むその断片でマウスなどの哺乳動物に免疫した後、いくつかのハイブリドーマが得られる。その中で必要となる抗体は、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²非リン酸化SARM1に反応し、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化SARM1に反応しない抗体を産生するハイブリドーマである。

【0027】

免疫に用いられる哺乳動物には、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ等が挙げられるが、マウスが特に好ましい。本発明の抗体を得るためには、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化/非リン酸化SARM1またはリン酸化/非リン酸化Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²を含むその断片を免疫原としてハイブリドーマを作製した後、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化/非リン酸化SARM1に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択する必要がある。免疫の惹起は、通常1ng~10mgの量の免疫原を10~14日の日数を開けて1~5回に分けて投与することで行うことができる。十分な免疫後、抗体産生能を有する器官(脾臓やリンパ節)を哺乳動物から無菌的に摘出し、細胞融合時の親株とする。なお、摘出する器官としては、脾臓が最も好ましい。細胞融合のパートナーとしては、ミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞には、マウス由来、ラット由来、ヒト由来等があるが、マウス由来が好ましい。細胞融合には、ポリエチレングリコールを用いる方法、細胞電気融合法等が挙げられる。細胞融合しなかった脾臓細胞やミエローマ細胞とハイブリドーマとの選択は、例えばHATサプリメントを添加した血清培地で培養することで行うことができる。

【0028】

Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化/非リン酸化SARM1に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマの選択は、前述の培養上清を採取し、Ser⁵⁴/Ser⁵⁴⁸/Ser⁶²²リン酸化/非

10

20

30

40

50

リン酸化SARM1またはリン酸化/非リン酸化Ser⁵⁴ / Ser⁵⁴⁸ / Ser⁶²²を含むその断片と非リン酸化/リン酸化SARM1を固相化したEIAプレートでの直接ELISAが好ましい。直接ELISAの結果、Ser⁵⁴ / Ser⁵⁴⁸ / Ser⁶²²リン酸化/非リン酸化SARM1またはリン酸化/非リン酸化Ser⁵⁴ / Ser⁵⁴⁸ / Ser⁶²²を含むその断片と強く発色し、非リン酸化/リン酸化SARM1とは発色しないウエルを選択し、そのウエルの細胞をクローニングに供する。その培養上清に対応するハイブリドーマを、Ser⁵⁴ / Ser⁵⁴⁸ / Ser⁶²²リン酸化/非リン酸化SARM1に特異的に反応する抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。クローニングとは、抗体産生ハイブリドーマを選別し単一化する作業であり、限界希釈法、フィブリンゲル法、セルソーターを用いる方法等があるが限界希釈法が好ましい。これにより、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを獲得することができる。上記方法により得られたハイブリドーマを培養することで、培養上清中にモノクローナル抗体を得ることができる。

10

【0029】

神経変性疾患の予防又は治療薬のスクリーニング方法としては、具体的には、健常者及び神経変性疾患患者由来iPS細胞から神経細胞を誘導し、候補薬剤または溶媒対照群を添加し、その後リン酸化SARM1抗体を用いた免疫染色、ウェスタンブロッティング、MTSアッセイでSARM1リン酸化と神経細胞生存率の評価を行うことで実施可能である。或いは、神経変性疾患モデルマウスに候補薬剤または溶媒対照群を投与し、その後脳の凍結切片を作製し、リン酸化SARM1抗体、Tyrosine hydroxylase抗体（パーキンソン病モデルの場合）を用いた組織染色でSARM1リン酸化レベルと神経細胞生存率の評価を行い、神経変性疾患の予防又は治療薬をスクリーニングすることができる。

20

【0030】

SARM1を発現する細胞として、HAタグ、Hisタグ、FLAGタグなどのタグを付加したSARM1と別のタグが付加されたARMドメイン、SAMドメイン、TIRドメイン、或いは、Ser⁵⁴、Ser⁵⁴⁸、Ser⁶²²を含むその断片を共発現させた細胞がより好ましい。このような細胞の培養液に候補物質を添加して細胞培養を行い、SARM1のタグに対する抗体結合ビーズを用いてタグ化SARM1の免疫沈降を行い、リン酸化されているかを、本発明の抗体或いはリン酸化セリン・スレオニン検出抗体などの抗体を用いて検出することができる。本発明のスクリーニング方法では、SARM1のリン酸化を抑制する物質を目的物質として選別することができる。

【実施例】

30

【0031】

以下、本発明を実施例に基づいてより詳細に説明する。

【0032】

実施例 1

(1) SARM1発現抑制による神経細胞死抑制

SARM1が神経細胞死誘導に関与するか否かを確認するために、siRNAを用いた発現抑制実験を行った。ヒト神経芽腫SH-SY5Y細胞 3×10^5 個を12 ウェルプレートにまき、コントロールもしくはSARM1に対する10 μ M siRNA (QIAGEN) 4 μ lにトランスフェクション試薬Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) 8 μ lを混合し、最終濃度20 nMでトランスフェクションを行った。48時間後に酸化ストレス試薬でパーキンソン病様症状誘発試薬として用いられる40 μ M 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA)、1 mM パラコート、1 μ Mロテノンを追加し、24時間後にヘキスト溶液 (Thermo Fisher Scientific) で染色し、細胞死誘導率を測定した (図1)。コントロール群と比較して、SARM1の発現抑制は有意に細胞死を抑制した。この結果はSARM1の発現や機能を阻害することで、ストレス誘導性の神経細胞死を抑制できる可能性があることを示している。

40

【0033】

(2) SARM1のミトコンドリア呼吸阻害による細胞死誘導

次にSARM1の細胞死誘導機構について検討を行った。SARM1がミトコンドリア移行シグナルをもつタンパク質であることから、ミトコンドリアの機能に着目して実験を行った。その結果SARM1がミトコンドリア呼吸を阻害し、ATP合成を減少させることを見出した。SARM

50

1は724アミノ酸からなるタンパク質でミトコンドリア移行シグナル、ARMドメイン、2つのSAMドメイン、TIRドメインを有している(図2A)。それぞれのドメインの機能を解析するためにHEK293T細胞 3×10^5 個を12ウェルプレートにまき、全長のSARM1(1~724aa)、ミトコンドリア移行シグナルを除いたN(28~724aa)、TIRドメインを除いたT(1~550aa)、ARMドメインを含むN末端側を除いたA(406~724aa)をコードするpDNA 2 μ gをトランスフェクション試薬FuGENE-HD (Promega) 4 μ lと混合しトランスフェクションを行った。8時間後に細胞をはがし、96ウェルプレートに 3×10^4 個ずつ再播種を行った。トランスフェクションから48時間後にCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay試薬 (Promega) (図2B) 及びCellTiter-Glo Assay試薬 (Promega) (図2C) を用いて細胞生存率とATP量を測定した。コントロールと比較してSARM1は細胞生存率を減少させた。この効果はミトコンドリア移行シグナルを除くと多少緩和され(N)、Tで完全になくなり、Aでは増強された。この値に相関して細胞のATP量も変化した(図2C)。これらの結果は細胞死誘導及びATP合成の障害にはTIRドメインが重要であり、ARMドメインを含む領域はSARM1の活性を抑制するために重要であることを示唆する。同様のトランスフェクション条件の下、フラックスアナライザー-XFe96 (SeahorseBioscience) を用いてミトコンドリア呼吸能(図2D)を、ROS-Glo H₂O₂ assay (Promega) を用いて活性酸素種の1つであるH₂O₂の量(図2E)を測定した。ATP量と相関して、全長のSARM1やAはミトコンドリア呼吸能、特に予備呼吸能を減少させ、Tは増加させた。またH₂O₂の量は全長のSARM1やAの発現によって増加した(図2E)。これらの結果はSARM1がミトコンドリア呼吸鎖複合体に作用してミトコンドリア呼吸を障害し、ATP合成の減少、活性酸素種発生の誘発によって細胞死を誘導することを示している。

10

20

【0034】

(3) SARM1のセリン548番のリン酸化検出

次にSARM1の活性がいかにして制御されているかの解析を行った。その解析の中、SARM1の強制発現でATP合成が障害される条件において、SARM1がリン酸化されることを見出した。HEK293T細胞(8×10^5 個/6ウェルプレート)にコントロールもしくはSARM1-Flag(pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l)のトランスフェクションを行い、24時間後にFlag抗体結合ビーズを用いて免疫沈降を行った。その後、リン酸化セリン・スレオニン(P-Ser/Thr)検出抗体(BD Bioscience)、Flag抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、SARM1のバンドと同様の位置にP-Ser/Thr抗体で検出されるバンドが出現した(図3A)。SARM1のどの部分のセリン、スレオニンがリン酸化されているのかを確認するために、SARM1を3つの領域(ARM: 1~405aa、SAM: 406~550aa、TIR: 551~724aa)に分けて図3Aと同様の手法でリン酸化の検出を行った。図3Bに示すように3つの領域の中でSAMドメインがリン酸化されていた。SAMドメイン(406~550aa)の中にはセリンが12個、スレオニンが9個含まれている。この中のどのアミノ酸がリン酸化されているのかを特定するために、21個全てのアミノ酸を1つずつアラニンに置換して野生型(WT)のSAMドメインとの比較を行った。21個のアミノ酸のうち、セリン548番をアラニンに置換した場合のみP-Ser/Thr抗体で検出されるバンドが消失した(図3C)。これらの結果からセリン548番がSARM1のリン酸化部位であることが判明した。

30

40

【0035】

(4) CDK19、CDK8によるSARM1のリン酸化亢進

SARM1のリン酸化を制御するリン酸化酵素を同定するために質量分析計を用いた実験を行った。HEK293T細胞(8×10^5 個/6ウェルプレート)にコントロールもしくはSAM(406~550aa)-Flag(pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l)のトランスフェクションを行い、24時間後にFlag抗体結合ビーズを用いて免疫沈降を行った。銀染色によってSAM-Flagと共沈降したバンドを検出し(図4A)、質量分析計で結合タンパク質の解析を行った。その結果、SAMドメインと結合するタンパク質としてCyclin dependent kinase 19 (CDK19)を同定した。CDK19はCDKファミリータンパク質の1つで、よく機能が似たパラログとしてCDK8が存在することが知られている。SAMドメインとCDK19、CDK8の結合及びリン酸化制御を確認するためにHAタグを付加したCDK19及びCDK8(HA-CDK19、HA-CDK8)発現ベクターを作製した。HE

50

K293T細胞 (8×10^5 個/6ウェルプレート) にコントロール、SAM-Flag、HA-CDK19及びHA-CDK8 (pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l) のトランスフェクションを行い、24時間後にFlag抗体結合ビーズを用いて免疫沈降を行った。図4Bに示すようにCDK19、CDK8はSAMドメインと結合し、SAMドメインのリン酸化を著しく増強した。これらの結果からCDK19、CDK8がSARM1のセリン548番のリン酸化を亢進させることが判明した。次にCDK19もしくはCDK8をSARM1と共発現させた場合の細胞生存率をMTSアッセイ (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay試薬) で測定した。CDK19及びCDK8の強制発現によって細胞生存率は低下し、SARM1との共発現によって細胞生存率は更に低下した (図4C)。これらの結果はCDK19、CDK8によるSARM1セリン548番のリン酸化がSARM1の活性化及び細胞死誘導に重要であることを示している。

10

【0036】

(5) リン酸化を指標にしたSARM1阻害剤の開発

図4の結果から、SARM1のセリン548番のリン酸化を阻害すれば細胞死を抑制できる可能性があることが判明した。そこでSARM1のリン酸化状態を指標にしてSARM1の阻害剤開発が可能か否かの検討を行った。図3で示したようにSARM1のSAMドメイン (406~550aa) は細胞内で強力にリン酸化されることから、細胞内で全長のSARM1のリン酸化を阻害するアンタゴニストとして機能することが考えられる。HEK293T細胞 (8×10^5 個/6ウェルプレート) にコントロール、HAタグを付加したSARM1 (SARM1-HA) 及びSARM1-HAとSAM-Flagを共発現させる条件 (pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l) でトランスフェクションを行い、24時間後にHA抗体結合ビーズ (SIGMA) を用いてSARM1-HAの免疫沈降を行った。図5Aに示すようにSARM1-HA単独の場合はSARM1のリン酸化が検出されたが、SAM-Flagを共発現させた場合はリン酸化が検出されなかった。更に同様のトランスフェクション条件でCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay試薬を用いて細胞生存率を測定したところ、SARM1の強制発現によって誘導される細胞死の割合が、SAMドメインの共発現によって減少した (図5B)。次にSARM1のCDK19/CDK8によるリン酸化を阻害するために、CDK19/CDK8阻害剤であるSenexin A (TOCRIS) を用いてリン酸化の検討を行った。HEK293T細胞 (8×10^5 個/6ウェルプレート) にコントロールもしくはSAM-Flag (pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l) のトランスフェクションを行い、8時間後に0~10 μ MのSenexin Aを添加した。トランスフェクションから24時間後にFlag抗体結合ビーズを用いて免疫沈降を行った。Senexin Aは濃度依存的にSAMドメインのリン酸化を抑制した (図5C)。次に酸化ストレス誘導性の細胞死に対するSenexin Aの効果を検証した。神経芽腫SH-SY5Y細胞 3×10^4 個を96ウェルプレートにまき、0~20 μ MのSenexin A及び1 mMパラコートを添加した。48時間後にCellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay試薬を用いて細胞生存率を測定した。図5Dに示すように、Senexin Aは濃度依存的に酸化ストレスによって誘導される細胞死を抑制した。これらの結果よりSARM1のリン酸化を阻害する物質を開発すれば、SARM1によって誘導される細胞死を抑制できることが判明した。

20

30

【0037】

(6) JNKによるSARM1セリン548番のリン酸化誘導

図4に示したようにCDK19やCDK8の強制発現はSAMドメインのリン酸化を亢進させた。CDK19及びCDK8が直接SAMドメインのリン酸化を誘導するか否かを確認するためにin vitro kinase assayを行った。しかしSAMドメインとCDK19もしくはCDK8をATP存在下で反応させたところ、SAMドメインのリン酸化は確認できなかった。そこでSARM1を直接リン酸化する別のキナーゼを見出すために、キナーゼ阻害剤を用いた検討を行った。HEK293T細胞 (3×10^5 個/12ウェルプレート) にSAM-Flag発現ベクター (pDNA 2 μ g + FuGENE-HD 4 μ l) のトランスフェクションを行い、8時間後に種々のキナーゼ阻害剤 (EGFR-I、MEK-I、p38-I、JNK-I、Akt-I) を添加し16時間培養後、細胞を回収しウェスタンブロッティングを行った。キナーゼ阻害剤のスクリーニングにおいてJNK阻害剤 (JNK-I : JNK inhibitor VIII (Cayman)) がSAMドメインのリン酸化を抑制した (図6A)。次にJNKによるSAMドメインの直接のリン酸化を確認するためにGSTタグを付加したSAMドメインとキナーゼ (p38、JNK1、JNK2、JNK3) をATP存在下で反応させin vitro kinase assayを行った。図6Bに示すように

40

50

、JNK（特にJNK3）が直接SAMドメインのセリン548番のリン酸化を誘導することを確認した。

【0038】

SARM1のセリン548番のリン酸化を特異的に検出するために抗体の作製を行った。セリン548番を含むAREMLHSPLPCTGGKのリン酸化ペプチドをマウスに免疫し、ハイブリドーマを得た。ハイブリドーマから産生されたモノクローナル抗体の反応性をELISAで確認し、リン酸化ペプチドに反応し、非リン酸化ペプチドに反応性の低いクローンを選定し（図6C）、抗体の精製を行った。獲得したSARM1セリン548番リン酸化認識抗体は全長のSARM1のリン酸化を特異的に認識した。この抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、強制発現したSARM1のリン酸化が検出され、JNK1~3の共発現によってリン酸化が更に亢進した（図6D）。また内在性SARM1のセリン548番リン酸化も検出可能であった。SH-SY5Y細胞に種々のストレス刺激を加え24時間培養を行い、細胞抽出液を回収した。細胞死が誘導されるストレス刺激（パラコート、6-OHDA、ロテノン処理）によってSARM1のセリン548番リン酸化が亢進した（図6E）。これらの結果より、JNKがSARM1セリン548番の直接のリン酸化を担っており、細胞死が誘導されるようなストレス環境下でJNKが活性化し、SARM1のリン酸化を行い、神経細胞死誘導に寄与していることが考えられた。

10

【0039】

(7) SARM1-Ser548リン酸化検出を利用したSARM1リン酸化阻害剤のスクリーニング法

図6に示したように、ストレス環境下でSARM1はリン酸化され、細胞死を誘導した。このことからSARM1のリン酸化を阻害する物質を見出せば、SARM1によって誘導される神経細胞死を抑制できる可能性がある。そこでSARM1-Ser548リン酸化検出を利用したSARM1リン酸化阻害剤のスクリーニング方法を示した。GST-SAM 1 μ gを50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂、1.8 mM ATP、1 mM DTTのパッファー中に加え、JNK3 100 ng及びJNK阻害剤やデコイペプチド、抗体などを加え37 °Cで1時間反応させた。JNK阻害剤はJNK inhibitor VIII (Cayman)、デコイペプチドはセリン548番を含むAREMLHSPLPCTGGKの配列をもつペプチド、マウスコントロールIgG (mIgG) は正常マウスIgG (Wako)、SARM1抗体はセリン548番を含むペプチドをマウスに免疫し、そこから得られたハイブリドーマから精製した抗体 (No. 1、2、16、18、30及び33) を使用した。その後3 x SDSサンプルパッファーを加え反応を止め、ウェスタンブロッティングでSARM1のリン酸化レベルを評価した。JNK阻害剤（図7A）、デコイペプチド（図7B）、抗体（図7C）はそれぞれSARM1-Ser548リン酸化を抑制する効果をもっていた。特にJNK阻害剤（JNK-I）やSARM1抗体（No. 1、2、16）は強いリン酸化抑制効果をもっており、これらの物質はSARM1によって誘導される細胞死を抑制した。HEK293T細胞にSARM1 pDNAのトランスフェクションを行い、8時間後にJNK阻害剤や抗体を加え16時間培養を行った。JNK阻害剤及び抗体はリン酸化解析に使用したものと同等のものを使用した。抗体はエレクトロポレーション法（Neon transfection system, Thermo Fisher Scientific）で導入を行った。その後MTSアッセイによって細胞生存率を評価した。JNK阻害剤やSARM1抗体は細胞死抑制効果をもっており（図7D、E）、SARM1のリン酸化検出と細胞生存率評価のアッセイを組み合わせることにより、SARM1の活性化を阻害する物質のスクリーニングが可能であることを示している。

20

30

【0040】

(8) JNKによるSARM1セリン54番、セリン548番、セリン622番のリン酸化誘導

JNKはSARM1セリン548番のリン酸化を誘導し、JNKの阻害はSARM1セリン548番のリン酸化を減少させ細胞死誘導を抑制した。SARM1セリン548番のリン酸化がSARM1の活性に与える影響を確認するために、セリン548番をアラニンに置換したSARM1変異体発現ベクター（S548A）を作製し、野生型SARM1との比較をMTSアッセイで行った。その結果、野生型SARM1と比較してS548Aの活性は低下するが、それほど大きな差ではないことがわかった（図7A）。そこでJNKによってSARM1の他のセリン・スレオニンもリン酸化される可能性を考え、SARM1の全配列を調査したところ、SARM1はJNKによってリン酸化される可能性のあるモチーフを3箇所（Ser⁵⁴ : REVSPGAG、Ser⁵⁴⁸ : MLHSPLPC、Ser⁶²² : LVLSPGAL）含んでいた。そこでセリン54番、セリン548番、セリン622番を1箇所ずつもしくは複数箇所アラニンに置換

40

50

した変異体発現ベクターを作製し、野生型SARM1との比較をMTSアッセイで行った。その結果、S622AがSARM1の活性を最も低下させ、次いでS548A、S54Aの順番であり、3箇所全てを変異させるとSARM1の細胞死誘導活性がほとんど消失した(図8A)。セリン54番、セリン622番のリン酸化は図3に示したリン酸化セリン・スレオニン認識抗体を用いた方法では検出できなかったことから、Phos-tag(Wako)を用いた別の方法での検出を試みた。Phos-tagはリン酸基と結合する性質がある物質で、SDS-PAGEゲルに混ぜることによってリン酸化タンパク質の泳動が非リン酸化タンパク質よりも遅くなり、リン酸化タンパク質を検出できる方法である。この方法を用いてSARM1変異体の比較を行った。図8Bの上の写真で示すように、通常のSDS-PAGEゲルを用いた検出ではSARM1のバンドは1本で検出される。しかし図8Bの下の写真で示すように、Phos-tagを含むSDS-PAGEゲルでは泳動が早い黒矢印で示すバンドと泳動が遅い白矢印で示すバンドが現れ、SARM1がリン酸化されていることが確認された(白矢印)。更にセリン548番だけでなくセリン54番、セリン622番をアラニンに置換した変異体においても野生型SARM1と比較するとバンドパターンが変化しており、これらのセリンもリン酸化されていることが示唆された。しかしセリン54番、548番、622番を全てアラニンに置換した変異体においてもリン酸化のバンドが検出されることから、これらのセリン以外にもSARM1にはリン酸化を受けるアミノ酸が存在することが示唆される。セリン54番、548番、622番がJNKによってリン酸化されていることを更に明らかにするために、SARM1をドメインごとに発現させ、JNK1~3との共発現を行い、Phos-tagを用いた検出を行った。図8Cに示すように、セリン54番を含むARMドメイン、セリン548番を含むSAMドメイン、セリン622番を含むTIRドメインそれぞれにおいてJNK(特にJNK3)の共発現によってリン酸化バンドが増加することが確認された。これらの結果より、JNKはSARM1のセリン54番、セリン548番、セリン622番のリン酸化を誘導すると考えられる。

10

20

【0041】

(9) SARM1のリン酸化による結合タンパク質の変化

SARM1のリン酸化の意義を明らかにするために、SARM1変異体の結合タンパク質の比較を行った。HEK293T細胞(8×10^5 個/6ウェルプレート)にコントロール、野生型SARM1-Flagもしくは変異体SARM1-Flag(pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l)のトランスフェクションを行った。24時間後に1% Triton-X100を含む細胞溶解液で細胞抽出液を調製し、Flag抗体結合ビーズ(SIGMA) 20 μ lを用いて2時間免疫沈降を行い、0.1 M グリシン溶液(pH2.5)で免疫沈降物を回収した。1 M トリス溶液(pH 9)、SDS溶液を混合した後、SDS-PAGEで展開した。銀染色キット(Wako)によってSARM1-Flagと共沈降したバンドを検出し(図9A)、質量分析計で結合タンパク質の解析を行った。その結果、野生型や点変異を含む全長のSARM1はミトコンドリア呼吸鎖複合体complex VのサブユニットATP5B、ATP5C1、ATP50との結合が確認され、その結合はS548A変異で減少していた。一方、SARM1活性が全くないTIRや活性がほとんどなくなるS622A変異体では70 kDa付近にSARM1との結合が増加しているバンドが検出され、このバンドはHeat shock protein 70 (HSP70)であった。この結合は免疫沈降後のウェスタンブロッティングによっても確認された(図9B)。これらの結果からSARM1はcomplex Vとの相互作用によりATP合成を阻害し(図2C)、HSP70がその作用を抑制していることが示唆される。更にセリン622番のリン酸化がHSP70との解離に重要で、セリン548番のリン酸化がcomplex Vとの結合に寄与していることが考えられる。

30

40

【0042】

SARM1がcomplex Vに結合しATP合成を阻害することが細胞死誘導につながると想定した場合、complex Vのサブユニットを過剰に導入し、デコイとして機能させることで、SARM1によって誘導される細胞死を抑制することができると推察される。HEK293T細胞(3×10^5 個/12ウェルプレート)にSARM1-Flagとコントロール、ATP5B、ATP50 pDNA(pDNA 4 μ g + FuGENE-HD 8 μ l)の共発現を行い、24時間後にMTSアッセイによって細胞生存率を解析した。ATP5B、ATP50のSARM1との共発現はSARM1によって誘導される細胞死を有意に抑制した(図9C)この結果から、SARM1がcomplex Vに結合しATP合成を阻害することが、SARM1による細胞死誘導に重要な作用であることが判明し、結合に重要なSARM1のリン酸化を阻害する物質を見出すことによってSARM1の機能を抑制することが可能であると考えられる。

50

【 0 0 4 3 】

(10) SAMドメイン、TIRドメインを利用したSARM1結合物質のスクリーニング方法

図9の結果からcomplex Vとの結合に重要なセリン548番のリン酸化を抑制する化合物や、HSP70との解離に必要なセリン622番のリン酸化を抑制する化合物はSARM1の活性化を阻害し、神経細胞死を抑制するために効果のある化合物であることが想定される。このことからこれらの物質のスクリーニングのための方法を開発した。

【 0 0 4 4 】

SAMドメインをT7プロモーターを有する発現ベクターpET28aにクローンし(pET28a-SAM-Flag(6His-T7-SAM-Flag))、大腸菌BL21(DE3)-RPに形質転換して作製したグリセロールストックをLB-Kan(カナマイシン 30 µg/ml)培地で37、10時間振盪培養し、次に、IPTGを、1 mMの最終濃度となるまで加え、25で16時間振盪培養してSAMドメインを発現させた。20質量%のショ糖バッファー中で超音波処理を行うことで大腸菌の破砕物を得た。この破砕物を遠心分離し、上清をコバルトカラムに添加後、PBS-T(Phosphate Buffered Saline with Tween 20)+10mMイミダゾールを洗浄液とし、PBS+500mMイミダゾールを溶離液として精製し、さらにPBSに対して透析を行うことでSAMドメインを精製した(図10A)。

10

【 0 0 4 5 】

TIRドメインの部分領域(D594~E670 aa)をtacプロモーターを有する発現ベクターpGEX-6P-1にクローンし(pGEX-6P-1-TIR(GST-TIR))、大腸菌BL21(DE3)-RPに形質転換して作製したグリセロールストックをLB-Amp(アンピシリン 100 µg/ml)培地で37、10時間振盪培養し、次に、IPTGを、1 mMの最終濃度となるまで加え、25で16時間振盪培養してTIRドメインを発現させた。20質量%のショ糖バッファー中で超音波処理を行うことで大腸菌の破砕物を得た。この破砕物を遠心分離し、上清をSephadex-Bカラム(GEヘルスケア)に添加後、PBS-T(Phosphate Buffered Saline with Tween 20)を洗浄液とし、50 mM Tris-HCl(pH 8)+10 mM還元型グルタチオンを溶離液として精製し、さらにPBSに対して透析を行うことでTIRドメインを精製した(図10B)。

20

【 0 0 4 6 】

精製したSAMドメインを用いて分子相互作用解析を行うためにBiacoreセンサーチップを作製した。PBSに溶けているSAMドメイン0.4 mg/mlを10 mM酢酸緩衝液(pH 4.5)で4倍希釈(0.1 mg/ml)し、アミンカップリング法でCM5センサーチップに固定化した。アナライトとの相互作用測定方法として、ランニング緩衝液はHBS-EP buffer(GEヘルスケア)を用い、アナライトはランニング緩衝液で20 µg/mlに希釈し使用した。SAMドメインへの分子相互作用を確認するためにSARM1抗体及びSAMドメインを添加し、解析を行った(図10C)。SAMドメインは2量体形成を行うので、SAMドメインを添加することによってSAMドメイン同士の結合が確認された。いくつかのSAMドメインのセリン548番近傍を認識する抗体はSAMドメインの結合よりも強い結合が確認され、これらの抗体はSAMドメインの2量体形成を阻害し、SARM1の機能を阻害することが示唆された。一方、コントロールIgGやSARM1の他の領域を認識する抗体ではSAMドメインとの結合は確認されなかった。これらの結果よりBiacoreによる分子相互作用解析を用いることでSARM1のドメインに結合する化合物を選定できることが示された。

30

40

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 4 7 】

現在、神経変性疾患(パーキンソン病、ALSなど)の進行を予防、治療できる薬剤は存在しない。

【 0 0 4 8 】

SARM1は神経変性疾患で観察される神経細胞死や神経軸索変性の原因となる分子の一つである。

【 0 0 4 9 】

SARM1の機能を阻害できれば、様々な神経変性疾患の予防、治療が可能になるかもしれない。

50

【 0 0 5 0 】

しかしSARM1の細胞内での活性化機構が不明であったので、現在利用できるSARM1の阻害剤は存在しなかった。

【 0 0 5 1 】

本発明者はSARM1のセリン54番、セリン548番、セリン622番がJNKによってリン酸化されることがSARM1の活性化に必要なことを見出した。

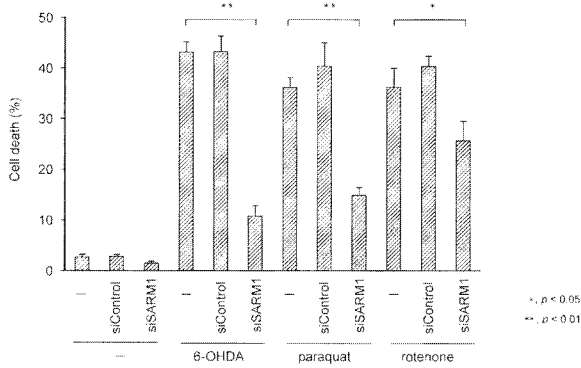
【 0 0 5 2 】

本発明者はSARM1のリン酸化検出と細胞生存率の測定を組み合わせることで、SARM1の活性化を阻害する薬剤のスクリーニング法を開発した。

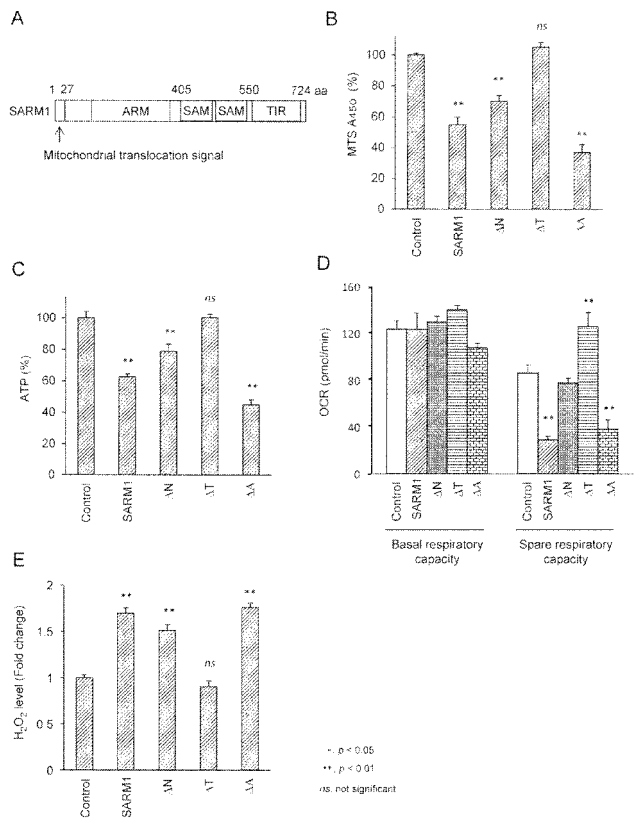
【 0 0 5 3 】

本発明を用いることによって神経変性疾患の予防、治療に有望なSARM1阻害剤の開発が可能になる。

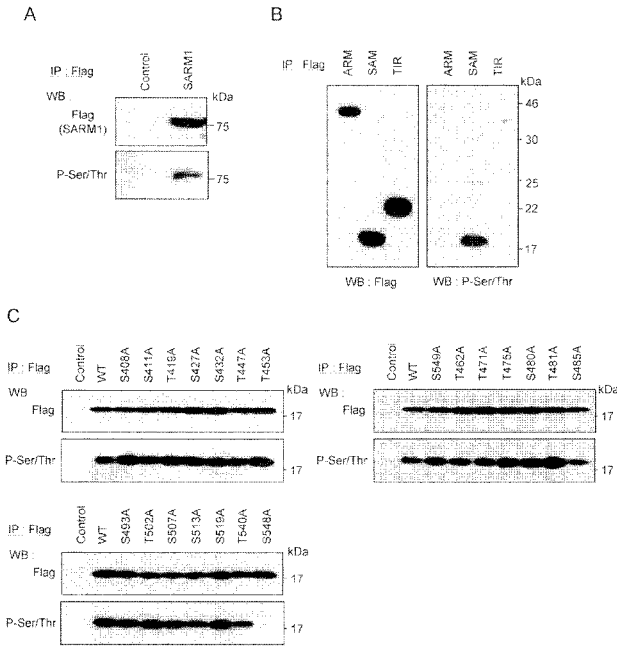
【 図 1 】



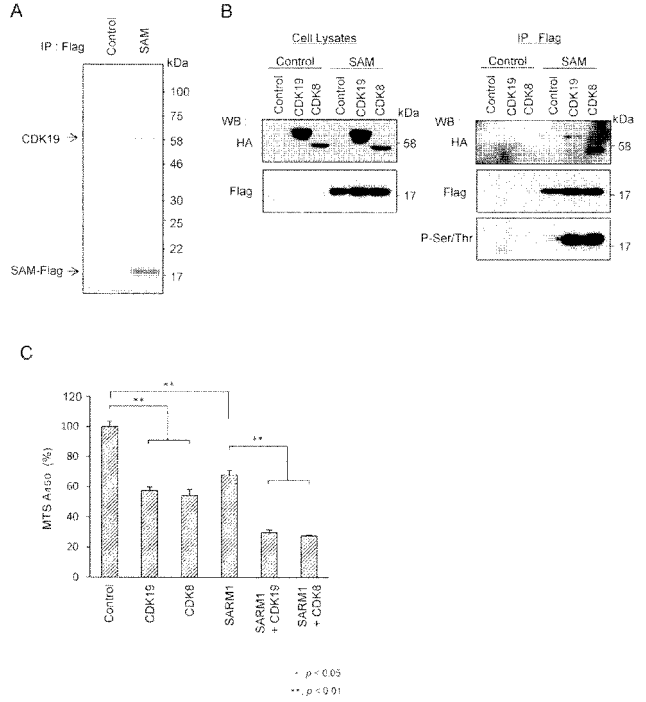
【 図 2 】



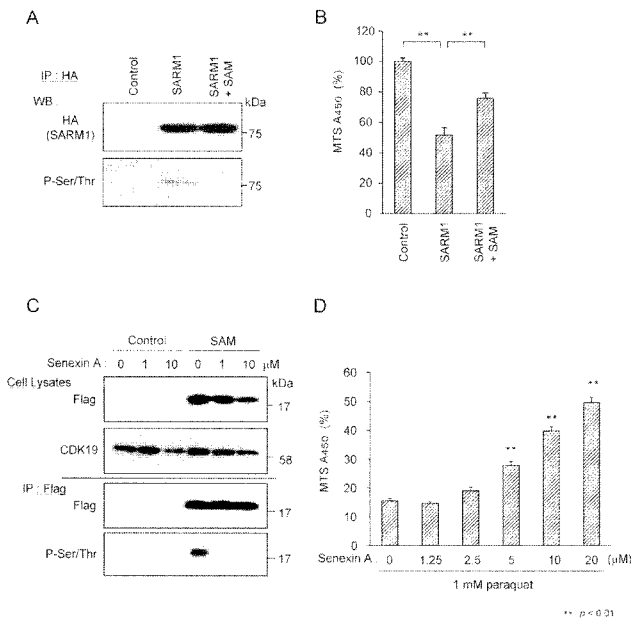
【 3 】



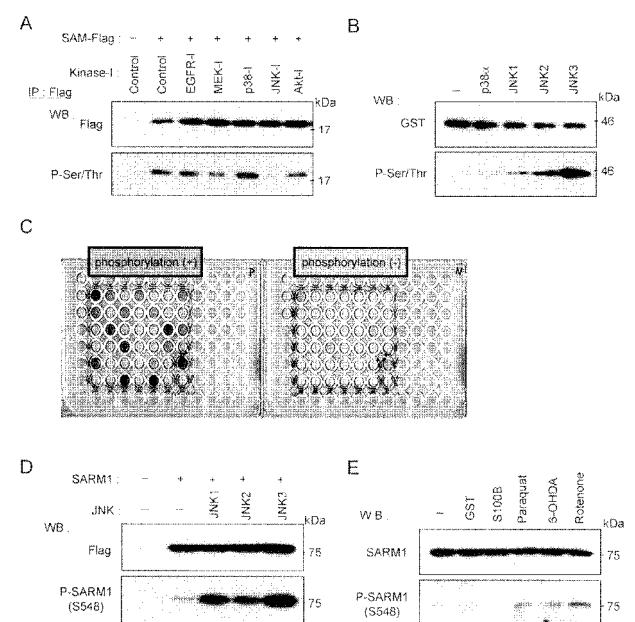
【 4 】



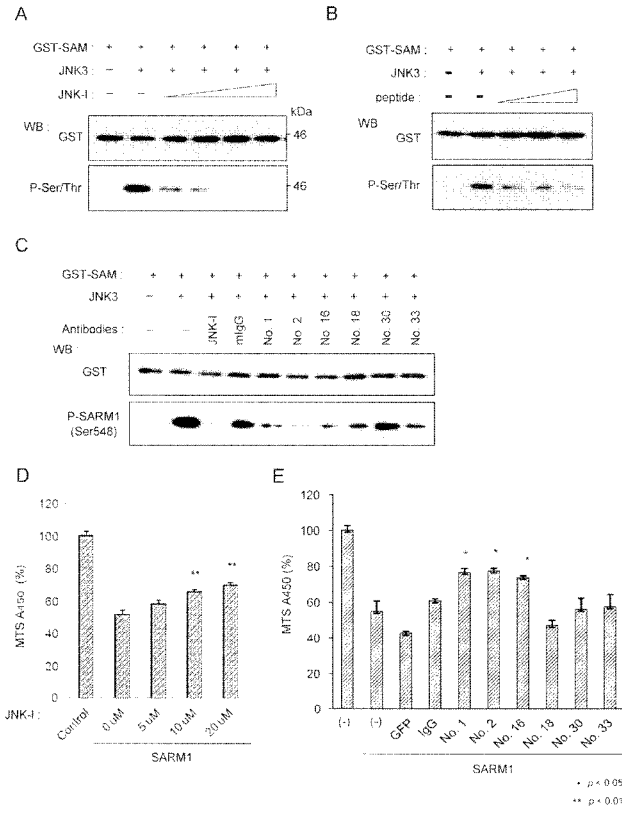
【 5 】



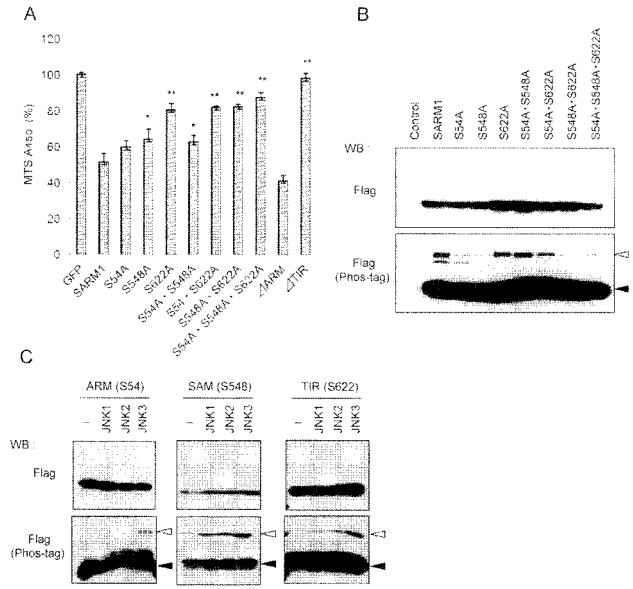
【 6 】



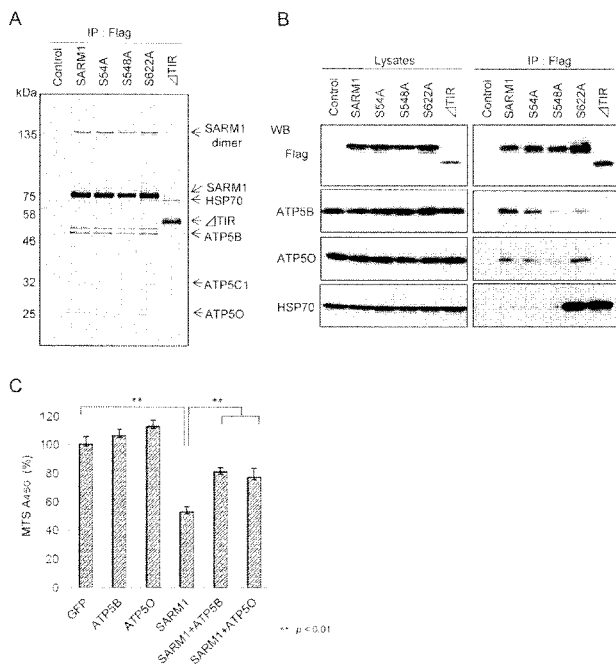
【 7 】



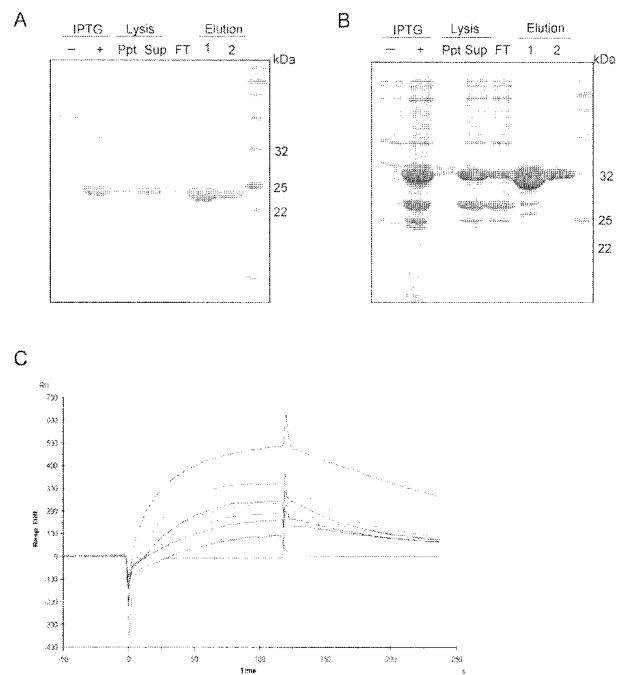
【 8 】



【 9 】



【 10 】



【配列表】

2017164230000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/011418
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K14/47, A01K67/027, A61K38/02, A61K39/395, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	MUKHERJEE P., ET AL, Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARM1, leading to neuronal death., Immunity, 2013, Vol.38, No.4, p.705-716, SUMMARY, EXPERIMENTAL PROCEDURES, Figure1, Figure5	1, 2/3-13
X/A	GERDTS J., ET AL, Axon Self-Destruction: New Links among SARM1, MAPKs, and NAD+ Metabolism., Neuron, 2016, Vol.89, No.3, p.449-460, page 449, right column, 1st paragraph, Figure1	5, 9/1-4, 6-8, 10-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 May 2017 (26.05.17)		Date of mailing of the international search report 06 June 2017 (06.06.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/011418

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2015-506376 A (Senex Biotechnology Inc.), 02 March 2015 (02.03.2015), paragraphs [0022], [0023] & US 2014/0038958 A1 paragraphs [0041] to [0043] & WO 2013/116786 A1 & EP 2809324 A & CN 104363913 A & KR 10-2015-0023223 A	5, 9/1-4, 6-8, 10-13
X/A	US 2012/0328629 A1 (FREEMAN, Marc), 27 December 2012 (27.12.2012), paragraphs [0025], [0026], [0063], [0064], [0073], [0074], [0083] & WO 2012/178022 A2	6, 9/1-5, 7, 8, 10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/011418

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

*C07K14/47(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i,
A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i,
C12N15/09(2006.01)n*

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 1 1 4 1 8													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. 特別ページ参照															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K14/47, A01K67/027, A61K38/02, A61K39/395, A61K45/00, A61P25/00, A61P25/16, A61P25/28, C07K16/18, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09															
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
X/A	MUKHERJEE P., ET AL, Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARMI, leading to neuronal death., Immunity, 2013, Vol. 38, No. 4, p. 705-716, SUMMARY, EXPERIMENTAL PROCEDURES, Figure1, Figure5	1, 2/3-13													
X/A	GERDTS J., ET AL, Axon Self-Destruction: New Links among SARMI, MAPKs, and NAD+ Metabolism., Neuron, 2016, Vol. 89, No. 3, p. 449-460, 第 449 頁右欄第 1 段落, Figure1	5, 9/1-4, 6-8, 10-13													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 26.05.2017		国際調査報告の発送日 06.06.2017													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 5 3 4												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2017/011418
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 2015-506376 A (セネックス バイオテクノロジー インク.) 2015.03.02, 【0022】 , 【0023】 段落 & US 2014/0038958 A1, [0041]-[0043]段落 & WO 2013/116786 A1 & EP 2809324 A & CN 104363913 A & KR 10-2015-0023223 A	5, 9/1-4, 6-8, 10-13
X/A	US 2012/0328629 A1 (FREEMAN, Marc) 2012.12.27, [0025]、[0026]、 [0063]、[0064]、[0073]、[0074]、[0083]段落 & WO 2012/178022 A2	6, 9/1-5, 7, 8, 10-13

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2017/011418

発明の属する分野の分類

C07K14/47(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K38/02(2006.01)i,
A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i,
A61P25/28(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i,
G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
	C 1 2 N 15/12	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72) 発明者 山本 健一

岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ79 QQ95 QR07 QR24 QS15 QS33

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 CA24 CA44 CA46 CA60

4C084 AA02 AA03 AA17 BA44 DC50 NA14 ZA021 ZA161 ZA221 ZA941

ZC202 ZC221 ZC411 ZC412

4C085 AA13 AA14 CC05 CC21 DD63 DD88 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 EA21

FA74

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。