

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06036

研究課題名(和文) FABP3 リガンドを用いた新しいパーキンソン病治療の創製

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics for Parkinson disease by FABP3 ligands

研究代表者

矢吹 悌 (YABUKI, Yasushi)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70756121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)： $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Syn)はレビー小体の主構成蛋白質であり、その凝集体形成に伴い、パーキンソン病における神経変性および細胞死が促進される。本研究では FABP3 に結合するリガンドが $\alpha$ -Syn多量体形成を抑制し、パーキンソン病様症状を改善するか検討した。 $\alpha$ -Synおよび FABP3 過剰発現細胞に FABP3リガンドを処置することで $\alpha$ -Syn多量体形成が抑制された。FABP3 リガンド投与より、パーキンソン病モデルマウス黒質ドパミン神経細胞の $\alpha$ -Syn多量体形成が阻害され、ドパミン神経細胞死を抑制し、運動機能障害が改善された。よって、FABP3リガンドは新規病治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： $\alpha$ -synuclein is one of major components in lewy bodies and its aggregates promotes neurodegeneration and cell death in dopaminergic neurons, thereby triggering Parkinson disease. Fatty acid binding protein 3 (FABP3) aggravates MPTP-induced  $\alpha$ -synuclein oligomerizations in mouse dopaminergic neurons. In the present study, we investigated whether FABP3 ligands prevent  $\alpha$ -synuclein oligomerizations and motor impairments in Parkinson models. In vitro assay, FABP3 ligands significantly inhibited MPP<sup>+</sup>-induced  $\alpha$ -synuclein oligomerizations in both  $\alpha$ -synuclein and FABP3 over-expressed PC12 cells. In addition, oral administration of FABP3 ligands significantly prevented  $\alpha$ -synuclein oligomerizations and cell death in dopaminergic neurons in the substantia nigra, thereby improving motor impairments seen in animal model of Parkinson disease. Taken together, those results suggest that FABP3 ligands may be attractive candidate of novel therapeutics for Parkinson disease.

研究分野：神経薬理学

キーワード：パーキンソン病  $\alpha$ -シヌクレイン FABP3

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は黒質ドパミン神経細胞の変性及び脱落により、黒質-線条体ドパミン神経伝達が低下し、錐体外路症状を呈する進行性の疾患である。日本における生涯有病率は約 0.2 % であり、アルツハイマー病に次ぐ神経変性疾患である。パーキンソン病患者黒質ドパミン神経細胞ではレビー小体と呼ばれる細胞封入体がみられる。 $\alpha$ -シヌクレインはレビー小体の主構成蛋白質であり、その凝集体形成に伴い、パーキンソン病における神経変性および細胞死が促進される。私達は、アラキドン酸の取込みと代謝に関与する**脂肪酸結合蛋白質 3 (FABP3) が黒質のドパミン神経細胞に高発現すること、MPTP が誘導する  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成を促進することを発見した。**

### 2. 研究の目的

本研究では、1)  $\alpha$ -シヌクレインを遺伝子導入した PC12 細胞を用い、FABP3 合成リガンドの  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成阻害作用を生化学的手法により解析する。2) パーキンソン病モデルマウスの運動機能障害に対する FABP3 合成リガンド投与の改善効果を行動薬理学及び生化学的手法により解析する。**本研究により FABP3 リガンドのパーキンソン病新規治療薬候補としての有用性と神経保護作用の作用機序を明らかにすることを目的とした。**

### 3. 研究の方法

1)  $\alpha$ -シヌクレインおよび FABP3 を共発現させた PC12 細胞を用い、免疫プロット法および免疫組織化学染色法により、FABP3 合成リガンド (3 種類) および非親和性化合物 (1 種類) の  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成阻害作用および細胞保護作用について評価する。

2) 4 種類の化合物を MPTP 投与マウスに投与し、運動機能障害に対する改善効果について行動薬理学的手法、免疫プロット法により明らかにする。

3) FABP3 合成リガンド投与による MPTP 投与マウスの黒質ドパミン神経細胞保護作用を免疫組織化学染色法により検討する。

4)  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成阻害作用について免疫プロット法及び免疫組織化学染色法により評価し、FABP3 リガンドのドパミン神経保護作用機序について明らかにする。

### 4. 研究成果

1) In vitro 系における FABP3 合成リガンドの  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成阻害作用および細胞保護作用について評価

PC12 細胞に  $\alpha$ -シヌクレインを過剰発現させた細胞に、ドパミン神経毒である MPP<sup>+</sup> を処置すると  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成が起こる。FABP3 を共発現させると  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成が促進される。本研究では  $\alpha$ -シヌクレインおよび FABP3 の共発現系を用い FABP3 合成リガンドによる  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成抑制効果を検

討した。それぞれのリガンド 10  $\mu$ M を前処置すると、MPP<sup>+</sup> が引き起こす  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成が抑制された。この抑制効果は FABP3 との親和性が非常に高いリガンド 1 において特に顕著であった。非親和性リガンドでは  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成は抑制されなかった。FABP3 合成リガンド前処置により、MPP<sup>+</sup> 処置による細胞死が抑制された。

2) MPTP 投与マウスに対する FABP3 合成リガンド投与による改善効果の検討

上記実験において、最も  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマー形成抑制効果が強かったリガンド 1 が MPTP 投与マウスの運動機能障害を改善するか検討した。MPTP (25 mg/kg, i.p.) を一日一回五日間連続投与後、リガンド 1 (0.1, 0.3 or 1.0 mg/kg, p.o.) または非親和性リガンド (1.0 mg/kg, p.o.) を一日一回二週間投与した。運動機能をローターロッド試験およびビームウォーキング試験により評価したところ、MPTP 投与マウスにおける運動機能障害がリガンド 1 (0.3 or 1.0 mg/kg, p.o.) 投与により有意に改善した。また、リガンド 1 (0.3 or 1.0 mg/kg, p.o.) は黒質ドパミン神経細胞死を抑制した。一方、非親和性リガンド投与ではこれら改善効果はみられなかった。

3) FABP3 合成リガンド投与による MPTP 投与マウスの黒質ドパミン神経細胞保護作用の検討

MPTP 投与マウスにおいて黒質領域で低下したドパミン神経細胞は FABP3 リガンド 1 およびリガンド 3 投与により有意に改善された。一方、非親和性リガンド 4 はドパミン神経保護作用を示さなかった。

4)  $\alpha$ -シヌクレイン多量体形成阻害作用の検討

MPTP 投与マウスではドパミン神経の細胞体に  $\alpha$ -シヌクレインが蓄積するが、FABP3 リガンド 1 およびリガンド 3 投与により有意に改善され、リガンド 4 では改善されなかった。免疫プロット法を用い、黒質領域の  $\alpha$ -シヌクレイン多量体を測定した。MPTP 投与マウスで増加した  $\alpha$ -シヌクレイン多量体は FABP3 リガンド 1 の投与により有意に抑制された。

以上の結果をまとめ、FABP3 リガンドをシヌクレイノパチー治療薬 (PCT/JP2017/13742) として特許出願した。また、現在論文を作成中であり、英科学雑誌に投稿予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Hisanao Izumi, Hidaka Haga, Takashi Yoshida, Minoru Wakamori, Akikazu Kakei, Kenji Sakimura,

Takaichi Fukuda and Kohji Fukunaga. Pharmacological properties of SAK3, a novel T-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel enhancer. *Neuropharmacology*. 117:1-13. (2017) 査読有  
doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.011.

2. Yusuke Hirata, Miki Takahashi, Yuki Kudoh, Kuniyuki Kano, Hiroki Kawana, Kumiko Makide, Yasuharu Shinoda, Yasushi Yabuki, Kohji Fukunaga, Junken Aoki, Takuya Noguchi and Atsushi Matsuzawa. Trans-fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *J Biol Chem*. 292(20):8174-8185. (2017) 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M116.771519.

3. Kazuya Matsuo, Yasushi Yabuki (equal contribution) and Kohji Fukunaga. Combined L-citrulline and glutathione administration prevents neuronal cell death following transient brain ischemia. *Brain Res*. 1663:123-131. (2017) 査読有  
doi: 10.1016/j.brainres.2017.03.014.

4. Husain Noreen, Yasushi Yabuki and Kohji Fukunaga. Novel spiroimidazopyridine derivative SAK3 improves methimazole-induced cognitive deficits in mice. *Neurochem Int*. In press. (2017) 査読有  
doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.001.

5. Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Koga Hirano, Yasuharu Shinoda, Shigeki Moriguchi and Kohji Fukunaga. Combined memantine and donepezil treatment improves behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD)-like behaviors in olfactory bulbectomized mice. *Pharmacology*. 99(3-4):160-171. (2017) 査読有  
doi: 10.1159/000452839.

6. Norifumi Shioda, Yasushi Yabuki, Yanyan Wang, Motokazu Uchigashima, Takatoshi Hikida, Toshikuni Sasaoka, Hisashi Mori, Masahiko Watanabe, Masakiyo Sasahara and Kohji

Fukunaga. Endocytosis following dopamine D2 receptor activation is critical for neuronal activity and dendritic spine formation via Rabex-5/PDGFR $\beta$  signaling in striatopallidal medium spiny neurons. *Molecular Psychiatry*. In press. (2016) 査読有  
doi: 10.1038/mp.2016.200.

7. Shigeki Moriguchi, Toru Ishizuka, Yasushi Yabuki, Norifumi Shioda, Yuzuru Sasaki, Hideaki Tagashira, Hiromu Yawo, Jay Yeh, Hiroyuki Sakagami, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga. Blockade of the KATP channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy. *Molecular Psychiatry*. In press. (2016) 査読有  
doi: 10.1038/mp.2016.187.

8. Hisanao Izumi, Yuzuru Sasaki, Yasushi Yabuki, Yasuharu Shinoda, Nina Fujita, Satoshi Yomoda and Kohji Fukunaga. Memory Improvement by Yokukansankachimpihange and Atractylenolide III in the Olfactory Bulbectomized Mice. *Advances in Alzheimer's Disease*. 5(02): 35. (2016) 査読有  
doi: 10.4236/aad.2016.52003

9. Yasushi Yabuki, Yasuharu Shinoda, Hisanao Izumi, Tatsuya Ikuno, Norifumi Shioda and Kohji Fukunaga. Dehydroepiandrosterone administration improves memory deficits following transient brain ischemia through sigma-1 receptor stimulation. *Brain Res*. 1622:102-113. (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.006.

〔学会発表〕(計 10 件)

矢吹悺、許晶、福永浩司：T 型カルシウムチャンネル活性化薬 SAK3 は嗅球摘出マウスの海馬神経新生を促進する 第 90 回日本薬理学会年会（平成 29 年 3 月 15～17 日、長崎）  
矢吹悺、許晶、福永浩司：T 型カルシウムチャンネル活性化薬 SAK3 の神経保護作用 第 59 回 日本脳循環代謝学術集会（平成 28

年 11 月 11 ~ 12 日、徳島)

矢吹悌、松尾和哉、若森実、福永浩司：海馬依存性記憶形成における T 型カルシウムチャネルの関与 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 合同年会 (平成 28 年 9 月 8~10 日、福岡)

矢吹悌、福永浩司：一過性脳虚血発作が誘導する eNOS S-glutathionylation と L-シトルリン・グルタチオン併用投与による脳保護効果 生体機能と創薬シンポジウム 2016(平成 28 年 8 月 25~26 日、仙台)

矢吹悌、福永浩司：T 型 Ca<sup>2+</sup> チャネル活性化作用を有する spiroimidazopyridine 化合物の生理活性評価 第 68 回日本細胞生物学会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会 (平成 28 年 6 月 15~17 日、京都)

Yasushi Yabuki, Kohji Fukunaga: S-glutathionylation of endothelial nitric oxide synthase following transient brain ischemia. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide - The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan (平成 28 年 5 月 20~22 日、仙台)

矢吹悌、福永浩司：SAK3 の T 型電位依存性カルシウムチャネル活性化による認知機能改善作用 第 89 回日本薬理学会年会 (平成 28 年 3 月 9~11 日、横浜)

Yasushi Yabuki, Kohji Fukunaga: Cognitive enhancement by T-type calcium channel activator through the hippocampus circuit. NTNU - Tohoku Univ. Brain Science Meeting "Joy of Brain Research" (平成 27 年 11 月 25~27 日、仙台)

Yasushi Yabuki, Minoru Wakamori, Kohji Fukunaga: T-type Ca<sup>2+</sup> channel activation by spiroimidazopyridine compound. Pharmaceutical Science Symposium 2015 in Sendai (平成 27 年 11 月 16~17 日、仙台)

Yasushi Yabuki, Minoru Wakamori, Kohji Fukunaga: Alzheimer disease drug candidate

SAK3 stimulates Cav3.1 and Cav3.3 T-type Ca<sup>2+</sup> channels. Neuroscience 2015 (平成 27 年 10 月 17~21 日、シカゴ、アメリカ)  
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：シヌクレイノパチー治療薬  
発明者：福永浩司  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2017/13742  
出願年月日：2017 年 3 月 31 日  
国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢吹 悌 (YABUKI, Yasushi)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70756121

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )