

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08013

研究課題名(和文) レンツトレハロースによるオートファジー誘導機構の解明と神経変性疾患治療薬の開発

研究課題名(英文) Mechanism of lentztrehalose-induced autophagy; its application for the treatment of neurodegenerative diseases

研究代表者

和田 俊一 (WADA, Shun-ichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40450233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：トレハロースタイプのオートファジー誘導物質を新たに数十種、発見または合成した。このうちTRH-Xは大量生産が可能な見込みで、更なる誘導体の合成原料としても適した化合物である。誘導体化合物の中には、トレハロースや他の誘導体に比べて強力なオートファジー誘導効果を示すものが複数あり、神経細胞内での異常タンパク質凝集の解消を作用機構とした神経変性疾患治療薬としての開発が期待される。また、トレハロースによるアルツハイマー病治療効果についてモデルマウスを用いて検討したところ、発症初期における有意な認知機能の向上と脳内アミロイド斑の減少が確認された。今後の新規誘導体化合物の治療薬としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Dozens of new trehalose-type autophagy inducers were discovered or synthesized. Among them, TRH-X was estimated as mass-producible and suitable as the material to synthesize further derivative compounds. Some of the TRH-X derivatives showed higher autophagy inducing activities than trehalose and other analogues. They would be the promising drug candidates for the treatment of neurodegenerative diseases to dissolve the aggregation of abnormal proteins in the neuronal cells.

The curative effect of trehalose in Alzheimer's disease was evaluated using a model mouse. Trehalose administrated mice in the early stage of the disease showed significantly better cognitive function and reduced amyloid plaque. The development and application of the new trehalose analogue compound for the treatment of Alzheimer's disease are expected.

研究分野：天然物利用

キーワード：レンツトレハロース トレハロース 神経変性疾患 アルツハイマー病 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経変性疾患には、全般的に決定的な治療法、治療薬が存在せず、既存の薬剤を凌ぐ効果を示す新薬が常に求められている。グルコース二分子が 1,1-結合した還元性の無い二糖のトレハロースはマウスのモデルにおいて、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経変性疾患に顕著な治療効果を示すことが報告されていた。食品にも含まれ安全性が高いトレハロースには、新たな治療薬としての敷居が低い化合物として開発が期待されていたが、体内で特異的分解酵素トレハラーゼにより分解されるためか、効果を発揮させるためには大量の投与が必要であった。また、それにより分解産物であるグルコースが大量に生成し血糖値を上げるため、長期的な投与を考えると健康リスクが懸念された。このため、より低濃度で有効性を示し、血糖値の上昇を伴わないものとして、トレハラーゼに分解されないトレハロース類縁体化合物の開発に期待が寄せられていた。

(2) トレハロースによる神経変性疾患治療効果については、神経細胞へのオートファジー誘導作用や分子シャペロンとしての機能によるものと推測される場合が多かったが作用機構が不明であった。これを解明するための一戦略として、各種標識体を用いた結合タンパク質の探索や、構造活性相関の検討などでのトレハロース類縁体化合物の活用が有望視された。トレハロース類縁体化合物は世界的にみると複数の有機合成化学者が多くのもを開発してきているが、大量かつ安価な合成が可能なのは無く、トレハロース類縁体化合物として一般的に入手可能なものは存在していなかった。

(3) 本研究者は研究開始時点では放線菌由来新規トレハロース類縁体化合物レンツトレハロース A を論文報告しており、類縁体化合物 B, C を発見し、論文投稿準備中であった。予備実験で、レンツトレハロース類はいずれも哺乳類トレハラーゼおよび各種微生物による分解を受けず、トレハロースに比べて生物学的利用能が高い化合物であることが示唆され、神経変性疾患治療分野での応用が期待された。また、特にレンツトレハロース B については分子中の二重結合を切断しアルデヒドとすることで、原料化合物として多くの誘導体化合物を容易に合成できるものと考えられた。一方でレンツトレハロース類は動物実験や、より高度な開発を見据えた場合、生産量が低いという難点があった。

2. 研究の目的

レンツトレハロース類を始め、トレハラーゼや各種の微生物に分解されず、生物学的利用能が高いトレハロース化合物を新たに発見、開発する。また、培養細胞やマウスのモ

デルを用いた実験を行い、それぞれの化合物の神経変性疾患治療薬としての適性を評価する。このうち、有望なものや、さらなる誘導体化合物群の合成に適した類縁体化合物については、将来的な工業的スケールでの生産につなげていくため、大量生産法の検討を行う。また、レンツトレハロース B のような誘導体合成原料として適した化合物より、各種の標識化トレハロースを合成し、ヒトにおけるトレハロース結合タンパク質の探索を行い、トレハロース類化合物によるオートファジー誘導機構の解明につなげる。

3. 研究の方法

(1) レンツトレハロース類の大量生産法の検討と新規トレハロース類縁体化合物の探索と開発：

まず、十数種類の基礎培地より生産菌の培養条件検討を行い、徐々に組成を改良した。また有機合成による、レンツトレハロース類や、よりシンプルな構造の誘導体化合物の合成を試みた。さらに、所属機関所有の微生物培養抽出物および精製代謝産物より、新たなトレハロース類縁体化合物および神経変性疾患治療薬候補化合物の探索を培養細胞への影響を評価するスクリーニング系を用いて行った。

(2) オートファジー誘導機構の検討：

レンツトレハロース B をオゾン分解して得られたレンツトレハロースアルデヒド体にピオシチンを結合させて還元し合成したピオチン化レンツトレハロース B と市販のストレプトアビジン結合ビーズを用い、ヒト培養細胞抽出液より結合するタンパク質の探索を行うことからオートファジー誘導機構の解明を試みた。また、細胞培養液中のトレハロースおよびグルコース濃度の測定を行い、糖代謝の角度からオートファジー誘導機構の検証を試みた。

(3) マウスでの治療効果の評価：

各種トレハロース類縁体化合物の神経変性疾患治療薬としての開発のため、各種疾患モデルマウスの導入と利用法の検討を行った。まず薬剤投与によりマウスを作出することで簡易と思われた MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスの作製を検討した。一方、遺伝子変異マウスの導入を考えた場合、飼育維持や実験評価が可能でマウスの種類には限りがあるため、新薬の必要性が最も高いアルツハイマー病のマウスを導入し、治療効果を調べることにした。アルツハイマー病モデルマウスは、入手可能なものがいくつかあるが、理化学研究所西道博士、斉藤博士らにより開発された第 3 世代のアルツハイマー病モデルマウスが病状発現の時期が早く、ヒトの患者に近い症状を表すことが知られていたため、これを導入した。これを用いて、トレハロースを餌に混ぜて投与した場合の治療効果の

検討を行った。また文部科学省科学研究費新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォームの生理機能解析支援サービスを利用し、藤田保健衛生大学 宮川剛教授の研究室でトレハロースと TRH-X によるアルツハイマー病モデルマウスへの治療効果を調べる実験を行った。

4. 研究成果

(1) レンツトレハロース類の発見と生物学的利用能の検討：

レンツトレハロース B, C について、構造を決定し、レンツトレハロース B が抗酸化作用をもつことを新たに明らかとした。また、レンツトレハロース A-C はいずれもトレハロースと同程度のオートファジー誘導活性を示すことが明らかとなった(発表論文欄 6)。レンツトレハロース類はどれもトレハロースに分解されず、各種の微生物による分解も見られないことが明らかとなった。また、トレハロースはマウスに経口投与すると速やかに分解され、血中濃度が上昇せず、分解産物であるグルコースによる血糖値の上昇が見られたが、レンツトレハロース類では経口投与後短時間で血中移行が確認され、血糖値の明確な上昇は見られなかった。このため、トレハロース類縁体を医薬品として開発していくにあたって、レンツトレハロース類は生物学的利用能が高い化合物として有望な検討対象となることが期待された(発表論文欄 5)。

(2) 酵素安定型トレハロース類縁体化合物の探索、開発と大量生産法の検討：

最初の開発対象化合物として、レンツトレハロース類の大量生産法の検討を行った。最も生産量の高いレンツトレハロース A は、生産菌の発酵生産により原材料の 0.1% 程度の精製物が得られるようになった。これは通常の放線菌代謝産物と比較すると高い生産量であったが、将来的な実用化や開発時の必要量を考慮すると不十分な量であり、精製も多少煩雑であるため、結果として 10 g 程度の精製物を得るにとどまった。一方、有機合成法の検討も行い、レンツトレハロース A および B については有機合成が可能となった(発表論文欄 7)。ただし、これに関しても生産コストの削減が出来ず、発酵生産同様、現状では以降の開発が困難な状況であった。その後、新たなトレハロース類縁体発酵産物の探索や、構造がよりシンプルな類縁体化合物の合成を検討した。その結果、大量生産可能な化合物として TRH-X(特許出願予定のため仮名)を発見した。生産条件検討を重ねた結果、現在では、TRH-X は原料物質の 5% 程度の精製物が得られ、食品原料として販売されている各種の糖にも匹敵する生産効率が得られている。また、TRH-X はレンツトレハロース B と同様、更なる誘導体物質を合成するための原料物質としての適性も高い。現在までに

TRH-X を原料とした誘導体化合物を数十種合成している。また新たな発酵生産物探索、開発の過程で副産物的に新規天然化合物を数種類発見し、論文発表した(発表論文欄 1,3,4)。

(3) オートファジー誘導機構の検討：

トレハロース類による培養細胞へのオートファジー誘導効果について、当初の予定どおり、レンツトレハロース B より合成したピオチン化レンツトレハロース B により結合タンパク質の探索を行った。しかしながら特異的に結合が見られるタンパク質は見つからなかった。トレハロースは通常、細胞内には取り込まれないため、レセプターとなるタンパク質は膜タンパク質であることが考えられるが、膜タンパク質は構造を保ったまま抽出することが困難であることや、トレハロースの有効濃度が非常に高いことを考えるとトレハロースとレセプタータンパク質との結合が弱いことが考えられ、それらが原因であるものと推測された。一方、本研究中に米国のグループが、トレハロースがグルコーストランスポーターを抑制し、細胞を飢餓状態にしてオートファジーを誘導する、という論文を発表した(DeBosch *et al.*, *Sci Signal*, 2016 Feb 23;9(416):ra21.)。我々の観察でも、トレハロースおよびレンツトレハロース類存在下で培養細胞へのグルコースの取り込みが落ちることを確認していたため、この説は正しいものと考えられた。現在は、この培養細胞でのグルコース飢餓からのオートファジー誘導が生体での神経変性疾患治療効果につながるのか、あるいは、治療効果は別の機構によるものか、という点に興味もたれ、検討を継続中である。また、上で述べた新たに開発した TRH-X 誘導体化合物の中には、これまでに知られているトレハロース類化合物に比べて格段に強いオートファジー誘導活性を示すものが幾つかみられた。今後はオートファジー誘導機構や神経変性疾患治療機構の解明のために、これらを試薬的に活用していく。また、オートファジー誘導により治療効果が期待できる各種の神経変性疾患の治療薬として、開発を進めていく。

(4) 各種疾患モデルマウスの導入と治療効果の評価：

MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスの作製を試みたが、マウスの病状にばらつきが多く、実験に利用しにくいものであった。浸透圧ポンプの利用を始め、病状均一化のための工夫が考えられたが、他のモデルマウスの導入を優先すべきと考え、現在は検討を中断している。一方、理化学研究所より入手したアルツハイマー病モデルマウスは、所属機関動物施設において繁殖、保管に成功し、定期的に化合物による治療効果の評価実験が出来る状態となった。ただし、研究期間最初の 2 年間は、動物実験のために大量に使用でき

るトレハロース誘導体化合物が無かったので、まず、トレハロース自体によるアルツハイマー病治療効果を検討することにした。海外の幾つかのグループが、トレハロースによりアルツハイマー病モデルマウスの病状が改善されたと報告しているが (Schaeffer *et al.*, Brain. 2012,135, 2169-2177.; Du *et al.*, J Pharm Pharmacol. 2013, 65,1753-6.; Portbury *et al.*, J Alzheimers Dis. 2017, 60,549-560.)、いずれも短期間での評価で、また、信憑性にも多少の疑問がもたれるものもあったため、自所での確認が必要と考えられた。発症し始めたマウスと発症後2か月経過したマウスの餌にトレハロースをまぜ、3か月間与えたところ、少なくとも、発症し始めのマウスに1か月間トレハロースを与えた場合では、認知行動と脳内でのアミロイド斑の蓄積に有意な改善が見られた。その一方で、発症後投与が遅れた場合や、3か月間投与を行った後では効果があまり見られなかった。現在、その再現性を調べている。また、最終年度には、TRH-X が動物実験に十分な量得られるようになり、研究期間最後の3か月間で、先端モデル動物支援プラットフォームの生理機能解析支援サービスを利用し、トレハロースとTRH-Xによるアルツハイマー病モデルマウスへの治療効果を調べる実験を行った。これについては現在結果の解析中である。

(5) 総括:

TRH-Xの発見により、その誘導体を中心として新たに多数のトレハロース類縁体化合物を発見、合成した。これらのうちのいくつかは、既存のトレハロース類化合物に比べて格段に強いオートファジー誘導活性を示したため、異常タンパク質の凝集解消を目的とした神経変性疾患治療薬としての開発が期待される。また、依然謎の多い、トレハロース誘導性のオートファジーや一般的なオートファジー誘導機構の解明のための試薬としての利用も期待される。

動物実験において、トレハロースのアルツハイマー病治療効果を確認したが、今後のスクリーニング評価により、幾つかの誘導体化合物について、まずアルツハイマー病治療薬としての開発を行っていきたい。

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7件)

1. Valgamicin C, a novel cyclic depsipeptide containing the unusual amino acid cleonine, and related valgamicins A, T and V produced by *Amycolatopsis* sp. ML1-hF4.

H. Hashizume, K. Iijima, K. Yamashita, T. Kimura, S. Wada, R. Sawa, M. Igarashi. J Antibiot. 査読有り 71, 129-134. (2018)
DOI:10.1038/ja.2017.135

2. Novel approaches for identification of anti-tumor drugs and new bioactive compounds.

M. Kawada, S. Atsumi, S. Wada, S. Sakamoto. J Antibiot. 査読有り 71, 39-44. (2018)
DOI:10.1038/ja.2017.97

3. ATP Depletion Assay Led to the Isolation of New 36-Membered Polyol Macrolides Deplelides A and B from *Streptomyces* sp. MM581-NF15.

T. Takeuchi, M. Hatano, M. Umekita, C. Hayashi, S. Wada, M. Nagayoshi, R. Sawa, Y. Kubota, M. Kawada, M. Igarashi, M. Shibasaki. Org Lett. 査読有り 19, 4207-4210. (2017)
DOI:10.1021/acs.orglett.7b01807

4. Structures and biological activities of novel 4'-acetylated analogs of chrysomycins A and B.

S. Wada, R. Sawa, F. Iwanami, M. Nagayoshi, Y. Kubota, K. Iijima, C. Hayashi, Y. Shibuya, M. Hatano, M. Igarashi, and M. Kawada. J. Antibiot. 査読有り 70, 1078-1082. (2017)
DOI:10.1038/ja.2017.99

5. Stability and bioavailability of lentsztrehaloses A, B, and C as replacements for trehalose.

S. Wada, R. Sawa, S. Ohba, C. Hayashi, M. Umekita, Y. Shibuya, K. Iijima, F. Iwanami, and M. Igarashi. J. Agric. Food Chem. 査読有り 64, 7121-7126. (2016)

DOI:10.1021/acs.jafc.6b02782

6. Novel autophagy inducers lentztrehaloses A, B and C.

S. Wada, Y. Kubota, R. Sawa, M. Umekita, M. Hatano, S. Ohba, C. Hayashi, M. Igarashi, and A. Nomoto. J. Antibiot. 査読有り 68, 521-529. (2015)

DOI:10.1038/ja.2015.23

7. Synthesis and determination of absolute configuration of lentztrehalose A. M.

Zhang, S. Wada, F. Amemiya, T. Watanabe, and M. Shibasaki. Chem. Pharm. Bull. 査読有り 63, 961-966. (2015)

DOI:10.1248/cpb.c15-00600

〔学会発表〕(計 6 件)

1. ATP 枯渇活性を有する 36 員環マクロライド deplelideA 及び B の単離・同定
竹内倫文, 波多野和樹, 梅北 まや, 林千草, 和田俊二, 永吉美穂, 澤竜一, 久保田由美子, 川田学, 五十嵐雅之, 柴崎正勝
日本薬学会 第 138 年会 (金沢) 2018 年 3 月 26 日 口頭発表

2. 希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. ML1-hF4 株の生産する新規化合物 pargamicins A, B, C, D の構造解析および生物活性
橋爪 秀樹, 山下 和真, 久保田 由美子, 林千草, 和田俊二, 原田 滋子, 澤竜一, 五十嵐 雅之
2017 年度日本放線菌学会大会 (長野) 9 月 7 日、8 日 ポスター発表

3. 新規 4'-acetyl-chrysomycin A, B の構造と生物活性
和田俊二, 澤竜一, 岩波史樹, 永吉美穂, 久保田由美子, 飯島希昌子, 林千草, 渋谷優子, 波多野和樹, 五十嵐雅之, 川田学
2017 年度日本放線菌学会大会 (長野) 9 月 7 日、8 日 ポスター発表

4. *Lentzea* 属放線菌由来新規 trehalose 類縁体 lentztrehalose 類の構造と生物活性

和田俊二, 澤竜一, 大庭俊一, 波多野和樹, 染野哲也, 久保田由美子, 梅北まや, 林千

草, 飯島希昌子, 渋谷優子, 川田学, 五十嵐雅之

2017 年度日本農芸化学会大会 (京都) 3 月 17 日-3 月 20 日 口頭発表

5. *Lentzea* 属放線菌由来 lentztrehalose 類の trehalose 改良品としての安定性評価
和田俊一, 澤竜一, 大庭俊一, 林千草, 梅北まや, 渋谷優子, 飯島希昌子, 五十嵐雅之

2016 年度日本放線菌学会大会 (東京) 9 月 8 日、9 日 口頭発表

6. *Lentzea* 属放線菌由来 trehalose 類縁体 lentztrehalose 類の構造と生物活性
和田俊二, 澤竜一, 大庭俊一, 染野哲也, 久保田由美子, 波多野和樹, 梅北まや, 張明, 渡辺匠, 林千草, 川田学, 五十嵐雅之, 柴崎正勝
2015 年度日本放線菌学会大会 (富山) 9 月 7 日、8 日 ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: レンツトレハロース A の製造方法、並びに前記製造方法に有用な化合物及びその製造方法
発明者: 渡邊匠、和田俊一、五十嵐雅之、張明
権利者: 公益財団法人微生物化学研究会
種類: 特許
番号: 特願 2015-118218 号
出願年月日: 2015 年 6 月 11 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 新規化合物レンツトレハロース、その製造方法、及びその用途、並びに、新規微生物
発明者: 和田俊一、大庭俊一、染野哲也、波多野和樹
権利者: 公益財団法人微生物化学研究会
種類: 特許
番号: 特許第 6130224 号
取得年月日: 2017 年 4 月 21 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/ontology/summary.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田俊一 (WADA Shun-ichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：40450233