

令和 5 年 3 月 10 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18384

研究課題名(和文)新規軸索保護化合物を用いた軸索維持・破壊機構の解明

研究課題名(英文)The discovery and mechanism of action of novel axon-protective nicotinamide derivatives

研究代表者

徳永 慎治(Tokunaga, Shinji)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・流動研究員

研究者番号：50644621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：様々な神経疾患において、細胞死に先立ち神経軸索の機能・構造の消失(軸索変性)が観察され、症状形成に深く関与している。申請者は以前に一部のニコチンアミド類縁化合物が軸索変性を著名に遅延することを発見した。本研究では当該化合物群をさらに改良し、*in vitro*の軸索変性モデルにおいて、既知の軸索変性遅延化合物と比較してより長期に渡る遅延活性を有する化合物の開発に成功した。また、*in vivo*軸索変性モデルに対する経口投与によって著明な神経保護活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究によってビタミンB3による神経保護効果は報告されていたが、*in vivo*疾患モデルあるいはワーカー変性モデルに対する神経保護効果は限定的であった。本研究はマウスの後根神経節神経細胞から伸展する軸索に対する保護活性を指標として、ニコチンアミド類縁化合物の構造活性相関を展開し、より軸索保護活性が強く *in vivo*モデルでの治療的効果が期待できる化合物群の開発に成功した。今後の研究進展により、神経変性疾患に対する創薬シーズの発見が期待される。

研究成果の概要(英文)：Axonal degeneration (the loss of structure or function of axons) precedes the appearance of neuronal cell death and contributes to the formation of the symptoms in various neurological disorders. Recently the applicant has found some nicotinamide derivatives delays axonal degeneration. In this study, we succeeded in developing improved versions of these compounds, which exhibit ability to block axonal degeneration for longer duration than already-known axon protective compounds do. We also found that these compounds display significant neuroprotective efficacy when administered orally to an experimental axonal degeneration mouse model. Furthermore, our data show the mechanism by which nicotinamide derivatives delay axonal degeneration involve preservation of mitochondrial function.

研究分野：神経科学

キーワード：NAD代謝 神経変性 創薬 ニコチンアミド

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、ポリグルタミン病、緑内障など数多くの神経変性疾患、あるいは抗癌剤投与による末梢神経障害や糖尿病性神経障害において、症状の形成に軸索変性が深く関与している (Conforti et al., *Nat. Neurosci.* 2014)。近年、ワーラー変性が著明に遅延する自然発症変異マウス (*wld<sup>Δ</sup>*) を用いた神経疾患モデルの解析を通じて、ワーラー変性過程および神経疾患において観察される軸索変性過程の間に、共通した細胞内情報伝達機構が存在すると考えられている。さらに、少なくとも実験モデルにおいて観察される軸索変性過程は、プログラム細胞死に匹敵するほど高度に調節され能動的に進行する自己破壊プログラムであることが明らかとなってきた (Wang and Barres, *Current Biol.* 2012)。

様々な原因の軸索変性過程が著明に遅延する *wld<sup>Δ</sup>* マウスの表現型は、生体内の補酵素として重要な NAD の合成および分解活性を持つ Nmnat の酵素活性が軸索中において亢進した結果であることが明らかになっている (Araki et al. *Science* 2004)。しかしながら、Nmnat 活性に影響を受ける軸索制御因子は明らかになっていない。また、様々な神経変性疾患に対して、軸索変性を標的とする治療戦略の有効性を評価できるツール化合物は開発されていなかった。そのような背景の中、研究代表者は予備的なデータとして、NAD の前駆物質の1つであるニコチンアミド (Nam) に着目し、Nam 類縁化合物の中に軸索変性遅延化合物が含まれることを明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

軸索変性の分子機構の解明、軸索変性遅延化合物投与による神経変性疾患治療モデルの確立を目的として、新たな Nam 類縁化合物の開発、当該化合物を用いた作用機序解析、およびマウス投与実験を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) 軸索変性遅延効果を持つ市販化合物を探索するための *in vitro* フェノタイプスクリーニング

(2) 高活性の化合物を得るための構造活性相関に関する情報を活用した新規化合物の開発

(3) 作用機序に関する知見を得るための NAMPT 阻害活性の評価

(4) 座骨神経切断による *in vivo* 軸索変性マウスモデルを用いた薬効評価

## 4. 研究成果

(1) 市販されている Nam 類縁化合物を用いて軸索変性遅延活性を有する化合物の探索を実施した。評価系として、*in vitro* ワーラー変性モデルを用いた (図1)。25種類の Nam 類縁化合物を評価した結果、一部の化合物が Nam と比較してより低濃度の投与で軸索変性遅延活性を示すことが明らかとなった (表1)。また、興味深いことに、培養液中に含まれる Nam を除いた場合に、その活性は約1000倍向上した。

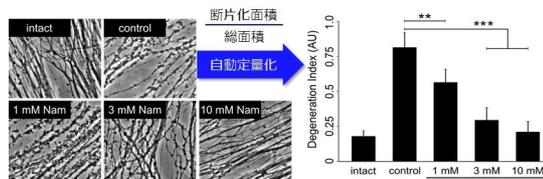


図1: *in vitro* ワーラー変性モデル

表1: 市販化合物を用いた *in vitro* ワーラー変性モデルに対する軸索変性遅延効果  
\*有効濃度とは、切断から24時間経過した時点で未切断の軸索と有意な差がない濃度

Nam類縁体	有効濃度	最長遅延効果 (日: 変性時期)
培養液中に含まれるNamを除かない場合(30 μM)		
Nam (ニコチンアミド)	≥ 3 mM	1~2
ニコチンアミドリボシド	≥ 3 mM	1~2
市販化合物A	≥ 1 mM	3
市販化合物B	≥ 10 mM	3~4
市販化合物C	≥ 30 mM	1~2
市販化合物D	遅延活性なし	
培養液中に含まれるNamを除いた場合		
ニコチンアミドリボシド	≥ 3 mM	1~2
市販化合物A	≥ 1 μM	3
市販化合物B	≥ 3 μM	4~5
市販化合物C	≥ 30 μM	1~2
市販化合物D	≥ 30 μM	1~2

(2)(1)の結果から、Namを基本骨格として、2つの部分について、合成展開が可能だと考えられた。そこで、東京薬科大学伊藤久央教授の研究グループに合成を依頼し様々な官能基で置換した Nam 類縁化合物から開発し、構造活性相関に基づく改良を重ねた。その結果、Namと比較して100万倍低濃度で、より長期間軸索変性が遅延する化合物の創出に成功した。

表 2 : 構造活性相関データを用いた新規軸索変性遅延化合物の開発

Nam類縁体	有効濃度	可溶性 (水)	最長遅延効果 (日: 変性時期)
培養液中に含まれるNamを除かない場合(30 μM)			
Nam	≥ 3 mM	≥ 1M	2~3
SYK-1-2	≥ 30 μM	難溶性	3~4
SYK-1-15	≥ 30 nM	難溶性	2~3
SYK-1-19	≥ 3 mM	≥ 1M	3~4
SYK-1-21	≥ 10 μM	100 mM	3~4
SYK-1-28	≥ 10 μM	20 mM	3~4
SYK-1-37	≥ 10 μM		3~4
培養液中に含まれるNamを除いた場合			
SYK-1-2	≥ 100 nM	上記の通り	4~5 (≥ 1 μM)
SYK-1-15	≥ 30 pM	上記の通り	2~3
SYK-1-19	≥ 300 nM	上記の通り	5~6 (≥ 1 μM)※1
SYK-1-21	≥ 30 nM	上記の通り	4~5 (≥ 300 nM)
SYK-1-28	≥ 3 nM	上記の通り	4~5 (≥ 30 nM)※2
SYK-1-37	≥ 10 nM※3	上記の通り	4~5 (≥ 30 nM)※2

(3) 近年、NAD サルベージ経路の律速酵素である NAMPT の阻害剤が軸索変性を遅延させることが複数のグループから報告されている。本研究で開発した化合物群が NAMPT の酵素活性に影響するか検証した結果、軸索変性の遅延活性と NAMPT 阻害活性との間に相関性は見出せなかつた。この結果から、本研究により開発された化合物は NAMPT と異なる作用点を介して軸索変性を遅延することが示唆された。NAMPT 阻害剤に共通した、長期投与による細胞生存率の低下も、本研究で開発した一部の Nam 類縁化合物群は示さなかつた。

表 3 : 軸索変性遅延活性および NAMPT 阻害活性の比較

Nam類縁体	軸索変性遅延活性	Nampt阻害活性 (EC 50)
FK-866	≥ 10 nM	5.38 nM
SYK-1-2	≥ 30 μM	13.8 μM
SYK-1-16	≥ 30 μM	374 μM
SYK-1-19	≥ 3 mM	> 10 mM
SYK-1-68	≥ 100 μM	> 3 mM

(4) これまでに、マウス個体に投与して 1 日以上 of 明らかな軸索変性遅延活性を示す化合物は報告されてこなかつた。そこで、本研究で開発した Nam 類縁化合物の一部を経口投与、あるいは腹腔内注射による投与を行い、座骨神経切断による軸索変性に対する影響を調べた結果、Nam と比較して明らかな変性遅延活性を確認した。

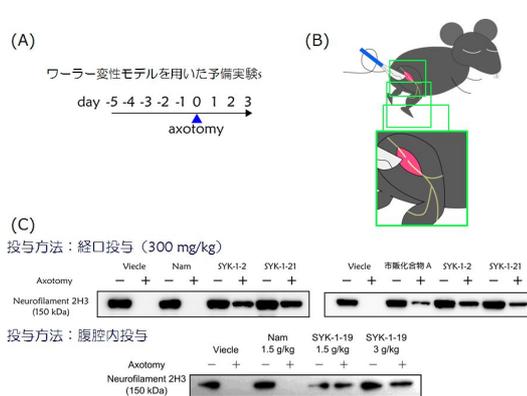


図 2 : *in vivo* 投与による軸索変性遅延 (A) 化合物投与および切断から解析までのスケジュール。(B) 座骨神経切断方法の模式図。(C) 経口投与および腹腔内投与による Nam 類縁化合物による軸索変性遅延効果を検証した western blot 像。

これらの結果から、本研究によって開発された Nam 類縁化合物は既知の作用機序とは異なり、より低毒性かつ著明に強力な軸索変性遅延活性を有することが明らかとなった。今後、本研究を土台として、軸索変性を標的とした治療薬シーズが開発されることが強く期待される。

#### 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 2 件)

Shuji Wakatsuki, Shinji Tokunaga, Megumi Shibata and Toshiyuki Araki., GSK3B-mediated phosphorylation of MCL1 regulates axonal autophagy to promote Wallerian degeneration, *The Journal of Cell Biol.*, 216 (2), 2017, DOI: 10.1083/jcb.201606020, 査読有

Fuminori Saitoh, Shuji Wakatsuki, Shinji Tokunaga, Hiroki Fujieda and Toshiyuki Araki., *Scientific Reports* 6:29856, 2016, doi:10.1038/srep29856, 査読有

[学会発表](計 3 件)

Shinji Tokunaga and Tosyuki Araki, NADH diphosphatase activity promotes injury-induced axonal degeneration, 6<sup>th</sup> Molecular Mechanisms of Axon Degeneration Meeting, 2016.9.27, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

徳永 慎治, 荒木 敏之, NADH ジホスファターゼ活性は傷害後軸索変性を促進する, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015.12.1, 神戸

川岸 理紗, 金成 広樹, 徳永 慎治, 荒  
木 敏之, 神経系におけるユビキチンリ  
ガーゼ ZNRF2 の基質同定, 第 38 回日  
本分子生物学会年会, 2015.12.1, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 慎治 (TOKUNAGA Shinji)

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究  
センター・神経研究所 疾病研究第 5 部・科  
研費研究員

研究者番号: 50644621