

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590260

研究課題名(和文) アルツハイマー病進行抑制薬候補ベルベリン

研究課題名(英文) Berberine, a candidate drug to control the development of Alzheimer's disease

研究代表者

丸山 敬 (MARUYAMA KEI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30211577

研究成果の概要(和文): アルツハイマー病治療薬として、すでに臨床使用されている薬物から A β を減少させるものを培養細胞でスクリーニングし、KM2309(特許申請考慮のためコード番号)を同定した。その作用機序は γ -セクレターゼ阻害と A β 分解酵素ネプリライシンの活性化であった。既報のベルベリンと KM2309 は相乗作用を発揮した。KM2309 は臨床的に長期服用でも副作用が軽微であり、神経防護作用や抗炎症作用なども報告されている。アルツハイマー病の治療薬候補と結論した。

研究成果の概要(英文): The substances for the treatment of Alzheimer's disease, which decreased A β levels, were screened from clinically approved drugs. We identified KM2309 (code name, because of patent application). It inhibited γ -secretase and up-regulated a major A β -degrading enzyme neprilysin. Since it has been reported that KM2309 crosses the BBB and it has neuronal protective effect, KM2309 would be a novel drug candidate with safety for Alzheimer's disease.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アルツハイマー病、アミロイド、認可薬剤

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病は代表的な認知症であり、高齢化社会における対処すべき重要な課題となっている。アルツハイマー病の根本的な治療には、脳内に沈着するアミロイド (amyloid-peptide, A β) を減少させることが必要であり、産生抑制、分解促進、沈

着抑制ならびに沈着 A β の除去を標的とした治療薬の開発が行われている。

新薬の開発には膨大な時間と費用を要する。一方、すでに臨床使用されている薬剤であれば、安全性の検証はほぼ終了している。また、開発費用の著しい軽減も期待できる。

アルツハイマー病の治療では、長期に亘る服

薬が予想されるので、薬剤の安全性の確立は非常に重要な問題である。

(2) すでに臨床使用されている薬剤に対して、A の産生抑制効果を有するか培養細胞を用いてスクリーニングを行った結果、漢方成分であるベルベリンを見出し、論文発表を行った (Asai et al., (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 498-502)。

2. 研究の目的

(1) ベルベリンの安全性は確立されているものの、ベルベリン単独での長期服用では副作用が懸念される。そこで、ベルベリンと併用できる薬剤がないか、培養細胞を用いて A の産生抑制効果を有する薬剤のスクリーニングを行う。

(2) スクリーニングの結果、同定された薬剤の作用機序を詳細に検討する。

(3) ベルベリンと併用した場合、相乗、または相加的な効果が認められるか検討する。

3. 研究の方法

(1) A 過剰産生培養細胞の樹立

A は、その前駆体である APP (amyloid precursor protein) から、およびセクレターゼによって二段階の切断によって産生される。APP はコピキタスに発現しているが、A やセクレターゼで切断された APP の断片の検出を容易にするために、APP を過剰に発現する細胞を 2 種類樹立した。発現細胞のセレクションには、hygromycin B を使用した。

ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にヒト APP695 (ロンドン型変異) が過剰発現する APP_L-HEK293 細胞

ヒトニューログリオーマ由来 H4 細胞にヒト APP695 (野生型) が過剰発現する APP_{WT}-H4 細胞

APP_L-HEK293 細胞、および APP_{WT}-H4 細胞は 10% FBS を含有した DMEM で培養した。

(2) 培養細胞への薬剤処理

APP_L-HEK293 細胞、または APP_{WT}-H4 細胞を 80-100% コンフルエントまで培養し、トリプシン処理後、24 時間培養した。

培養後、薬剤を含む培地に交換し、さらに 24 時間、または 48 時間培養した。

培地は、一度チューブに回収し、低速で遠心して死細胞などを沈殿させた。上清を別のチューブに移し、使用時まで -80 で保存した。細胞は、氷冷した PBS で 2 度洗浄し、セルリフターでディッシュからかきとった。チューブに移して低速で遠心し、上清を除いて、使用時まで -80 で保存した。

(3) サンプルの調製

-80 で保存しておいた細胞を 10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.5% Triton X-100 (プロテアーゼ阻害剤を含む) に懸濁し、凍結融解を 3 回繰り返して可溶化した。13000 ×g で遠心し、上清を別のチューブに移して western blot 用サンプルとした。

(4) Western blot

等量のサンプル SDS-PAGE で分離し、その後 PVDF 膜に転写反応を行った。転写した膜を 0.5% casein でブロッキングし、一晩 4 で一次抗体と反応させた。一次抗体反応後、二次抗体反応を 1 時間室温で行い、その後、化学発光反応を行ってバンドを検出した。同じ膜上にあるスタンダードで検量線を作成し、サンプルに含まれる目的のタンパク質を定量した。

(5) A sandwich ELISA

培地中に含まれる A₄₀、および A₄₂ は市販のキットを用いて定量した。

(6) ネプリライシン活性測定

ネプリライシンの活性には人工蛍光基質である Suc-Ala-Ala-Phe-AMC を用いた。APP_{WT}-H4 細胞を 96 穴プレートに蒔き、24 時間培養した。薬剤を含む培地に交換し、48 時間培養した。培地を除き、細胞を氷冷した PBS で洗浄した。0.1 M MES (pH 6.5)、0.1% Triton X-100、1 μM Z-LLL-CHO、1× complete EDTA-free を加え、5 分間 37 で静置した。100 μM Suc-Ala-Ala-Phe-AMC を加え、60 分間 37 で静置した。LAP/Phosphoramidon 溶液を加え、30 分間 37 で静置した。EDTA を加えて反応を止め、蛍光強度を励起波長 390 nm・蛍光波長 460 nm で測定した。ネプリライシン阻害剤 Thiorphan 添加群の蛍光強度を引いた値を実際の値とした。

(7) 細胞増殖試験

薬剤の毒性を調べるために MTT assay を行った。測定には市販のキットを用いた。

4. 研究成果

(1) APP_L-HEK293 細胞、および APP_{WT}-H4 細胞の A 産生

APP_L-HEK293 細胞、および APP_{WT}-H4 細胞は野生型の HEK293 細胞、および H4 細胞と比較して A 産生がそれぞれ増加していた。また、APP_L-HEK293 細胞では、A₄₂/A₄₀ の割合も野生型の HEK293 細胞と比較して増えていた。

(2) APP_{WT}-H4 細胞を用いた A 産生抑制薬剤のスクリーニング

APP_{WT}-H4 細胞を用いて A 産生抑制効果を有

する薬剤のスクリーニングを行った結果、すでに広く臨床使用されている KM2309(特許の可能性からコード名とする)を同定した。

(3) KM2309 と類似化合物の細胞毒性
KM2309 には類似化合物が 4 種類存在する。これらについて、MTT assay を行った。その結果、5 種類とも vehicle と有意な差は認められず、細胞に対する毒性はない、もしくは極めて少ないと考えられた。

(4) APP_{WT}-H4 細胞における KM2309 と類似化合物の A 産生抑制効果
MTT assay と同様に、5 種類の化合物について、A 産生抑制効果を検討した。その結果、5 種類の中で KM2309 のみ有意に A 産生を抑制した。

(5) APP_L-HEK293 細胞における KM2309 と類似化合物の A 産生抑制効果
さらに、5 種類の化合物について、APP_L-HEK293 細胞において A 産生抑制効果を検討した。その結果、5 種類の中で KM2309 のみ有意に A 産生を抑制した。

(6) KM2309 の、セクレターゼに対する影響
KM2309 の A 産生抑制に対する作用機序を検討するために、APP_{WT}-H4 細胞を用いて、およびセクレターゼ活性を測定した。培地中に含まれる sAPP 量を western blot で定量した結果、有意な差は認められなかった。さらに、セクレターゼとして機能する ADAM10、BACE1 のタンパク質量も有意な差は認められなかった。KM2309 は、およびセクレターゼ活性には影響を与えないと考えられた。

(7) KM2309 のセクレターゼに対する影響
KM2309 の A 産生抑制に対する作用機序を検討するために、APP_{WT}-H4 細胞を用いて、セクレターゼ活性を測定した。細胞懸濁液中に含まれる CTF 量を western blot で定量した結果、セクレターゼによって切断された断片 CTF が有意に増加していた。CTF については、検出限界以下に近く、定量するには至らなかった。KM2309 がセクレターゼ活性を抑制していることが示唆された。

(8) KM2309 のネプリライシンに対する影響
KM2309 の A 産生抑制に対する作用機序を検討するために、APP_{WT}-H4 細胞を用いて、ネプリライシンのタンパク質量、およびプロテアーゼ活性を測定した。ネプリライシンは脳内の主要な A 分解酵素である。細胞懸濁液中に含まれるネプリライシンを western blot で定量した結果、有意に増加していた。また、

人工基質を用いたプロテアーゼ活性も有意に増加していた。

(9) ベルベリンと KM2309 の併用効果
ベルベリンと KM2309 の併用によって、A 産生が相乗・相加的に抑制されるか APP_{WT}-H4 細胞を用いて検討した。その結果、単独投与と比較して、その効果に増強傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Sun X, Iida S, Yoshikawa A, Senbonmatsu R, Imanaka K, Maruyama K, Nishimura S, Inagami T, Senbonmatsu T, Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely, *Hypertens Res*, 査読有, in press
Durairajan SS, Liu LF, Lu JH, Koo I, Maruyama K, Chung SK, Huang JD, Li M, Stimulation of Non-Amyloidogenic Processing of Amyloid- Protein Precursor by Cryptotanshinone Involves Activation and Translocation of ADAM10 and PKC- δ , *J Alzheimers Dis*, 査読有, in press

Asai M, Iwata N, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K, Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- peptide for Alzheimer's disease, *J Neurosci Res*, 査読有, 88, 2010, 3588-3597

Aizaki Y, Maruyama K, Nakano-Tetsuka M, Saito Y, Distinct roles of the DRY motif in rat melanin-concentrating hormone receptor 1 in signaling control, *Peptides*, 査読有, 30, 2009, 974-981

[学会発表](計6件)

浅井将, 丸山敬等: 認可薬剤 KM2309 の APP 代謝および A 分解に対する影響. 第 84 回日本薬理学会年会(2011年3月、震災により Web 会議)

浅井将, 丸山敬等: 臨床使用されている薬物 KM2309 の APP 代謝および A 分解に対する影響. BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)(2010年12月7日)神戸

浅井将, 丸山敬等: 臨床使用されている薬物 KM2309 の APP 代謝および A 分解に対する影響. 第 29 回日本認知症学会学術集会(2010年11月5日)名古屋

浅井将, 丸山敬等: カテプシン B 阻害剤 CA-074Me は APP C 末端断片の蓄積をもたらす. 第 82 回日本生化学会大会(2009年10月21日)神戸

浅井将, 丸山敬等: Cathepsin B による APP

C 末端断片の代謝制御 . 第 14 回日本病態
プロテアーゼ学会 (2009 年 8 月 21 日) 大
阪

Asai M & Maruyama K et al. Cathepsin B
inhibitor CA-074Me causes the
alteration of APP catabolism
independently of secretase activities.
11th International Symposium on
Proteinase Inhibitors and Biological
Control, Portorož (Slovenia) (2008 年
8 月 30 日) スロベニア

[図書] (計 8 件)

石崎泰樹, 丸山敬 (編集, 翻訳) 講談社、
カラー図解 アメリカ版 大学生物学の教
科書 (細胞生物学) 2010 (318 総ページ)
石崎泰樹, 丸山敬 (編集, 翻訳) 講談社、
カラー図解 アメリカ版 大学生物学の教
科書 (分子遺伝学) 2010 (422 総ページ)

石崎泰樹, 丸山敬 (編集, 翻訳) 講談社、
カラー図解 アメリカ版 大学生物学の教
科書 (分子生物学) 2010 (402 総ページ)
遠藤實 (監修), 丸山敬, 淡路健雄 (編集)、
恒心社出版、MR 薬理学、2010 (286 総ペ
ージ)

丸山敬 (監訳), 田中敦子 (訳) ウェッ
ジ、私が何を忘れたか、思い出せない、
2009 (361 総ページ)

丸山敬, その他 (翻訳) 丸善、実技試験
攻略のための基本的臨床技能、2009 (255
~ 429 ページ担当)

丸山敬, その他 (編集・翻訳) 丸善、カ
ツンク薬理学、2009 (1237 総ページ)

丸山敬, 他 (編集・翻訳) 丸善、イラス
トレイテッド生化学 原書 4 版、2008 (619
総ページ)

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/yakuri/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 敬 (MARUYAMA KEI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30211577