

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590092

研究課題名（和文）胎児由来化合物によるニューロン保護機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of neuroprotective mechanisms of the substances derived from fetus

研究代表者

久米 利明（KUME TOSHIAKI）

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10303843

研究成果の概要（和文）：ウシ胎仔血清より単離した低分子量化合物であるセロフェンド酸の薬理作用を検討したところ、アミロイドβタンパクによって誘発される毒性に対して保護作用を有すること、ラット心筋梗塞モデルにおいてセロフェンド酸が有意に梗塞単体積を減少させることを明らかにした。胎仔組織由来新規神経保護物質の探索を進めるために抗酸化応答配列（ARE）に注目し、ARE 活性化物質の探索を目的としてスクリーニング系の開発を行った。

研究成果の概要（英文）：We examined the pharmacological effects of serofendic acid, a low molecular weight substances isolated from fetal bovine serum. We revealed that serofendic acid had a protective effect against toxicity induced by amyloid β protein and serofendic acid significantly reduced infarct volume in rat myocardial infarction model. In order to explore the novel neuroprotective substances derived from fetal tissues, we focused on the antioxidant response element (ARE). We established the in vitro screening system to explore the activator of ARE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：低分子量化合物、生理活性物質、薬理学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患に伴うニューロン死に関連した機能分子の探索は、神経栄養因子の解析やアポトーシス関連遺伝子産物をはじめとする諸種タンパク群の解析を中心に多くの研究が進められているが、細胞障害性に働くラジカル種や興奮性神経毒性を制御する低分子量化合物の解析はほとんど進んでいない。本研究の検討課題の中心となるセロフ

エンド酸をはじめとするウシ胎仔血清由来神経保護活性化化合物の発見は世界に先駆けて申請者が報告した(Kume et al. PNAS 99: 3288-3293, 2002)。諸種ストレス環境下において生体内機構として機能し、ニューロンの生存を促進する低分子量化合物の解析を推進することにより、神経変性疾患の病態の解明と治療法の探索を目的とした研究分野で新しい概念を提出できる可能性が高い。

申請者は、グルタミン酸神経毒性の保護因子の解明によってニューロン死を標的とした難治性神経疾患治療薬の探索に重要な基礎的資料を提供できるとの考えに基づき、グルタミン酸により誘発される神経毒性を制御する内在性因子に関する研究を行ってきた。その結果、グルタミン酸受容体刺激による細胞死の主要な要因としてNOと活性酸素の関与するラジカル連鎖反応に注目し、ニューロン死を制御する内在性保護因子の機能の解明を計画するに至った。本研究では、これまで報告してきた内在性神経保護因子(Kume et al. Biol Pharm Bull 27: 964-967, 2004)のうち、セロフェンド酸に注目し、脳保護機構における役割について検討を進める。

申請者はこれまで、グルタミン酸神経毒性を制御する内在性因子に関する研究を行ってきた。動物細胞の培養に頻用されるウシ胎仔血清中にグルタミン酸およびNO神経毒性を強力に抑制する保護活性成分が存在することを発見し、その精製・単離に着手した結果、新規化合物セロフェンド酸の同定に成功した(Kume et al. PNAS 99: 3288-3293, 2002)。セロフェンド酸はグルタミン酸やNOの神経毒性を強力に抑制するが、グルタミン酸受容体やNOラジカルとは直接反応しないこと、また、グルタミン酸により誘発されるミトコンドリアの脱分極を抑制することにより、その後引き起こされるcaspase-3の活性化を抑制することが明らかとなっている(Kume et al. EJP 542: 69-76, 2006)。しかしながら、セロフェンド酸が直接作用する機能分子は明らかとなっていない。神経保護作用の機序に関わる細胞内シグナル伝達系やターゲット分子を明らかにすることにより、内在性神経毒の制御に重要なブレークスルーをもたらすことが期待される。また、胎仔血清や胎盤のような胎仔組織中にはセロフェンド酸以外にも複数の神経保護活性化合物が含まれていることを示す知見を得ており、さらに新規の化合物の同定が可能と考える。

2. 研究の目的

脳は身体の諸器官の中で最も脆弱な組織であり、諸種難治性神経変性疾患および脳虚血をはじめとする様々なストレスによるニューロンの損傷に対する保護、修復メカニズムを明らかにすることは、脳の機能維持の理解のうえできわめて重要な課題である。本研究では、これらの脳疾患に対して、機能しうる生体内低分子量化合物による中枢ニューロンの保護メカニズムを解明することを目的とする。ニューロン死を制御する内在性生体機能分子として、セロフェンド酸を代表とする胎児由来低分子量化合物を中心に、その保

護作用メカニズムの解明を目指した研究を実施する。

本研究は、諸種難治性中枢神経疾患や脳虚血障害時における重要な危険因子としてグルタミン酸神経毒性に注目し、グルタミン酸/ラジカルストレスによるニューロン死に対する生体内防御機構を解明することを目的とする。ニューロン死を制御する内在性保護因子として、ウシ胎仔血清由来神経保護活性化合物を中心に研究を実施する。

(1) セロフェンド酸の保護作用機構の解明：セロフェンド酸の保護作用を媒介する標的分子の同定、in vivoでの細胞/組織保護作用の検討を行い、治療薬としての応用の可能性について追求する。

(2) 胎仔組織由来神経保護活性成分の探索：カスパーゼ阻害活性および抗ラジカル活性を指標として、胎仔血清や胎盤をはじめとする胎仔組織に含まれる新たな神経保護活性化合物の同定を目指す。

本研究は、ニューロン死を制御するタンパクとラジカルという分子量、機能が非常に異なる物質の間をつなぐ新しいカテゴリーの機能分子の存在と生体における役割を明らかにするものである。神経変性疾患の予防・治療を目的とした薬物の創製に重要な基礎的資料を提供することにより、高齢化社会におけるクオリティ・オブ・ライフの改善を目的とした医療に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

グルタミン酸、活性酸素、NOにより惹起されるニューロン死を制御する内在性保護因子の作用を検討する。これまでの研究成果に基づいて、申請者らの発見した内在性神経保護化合物セロフェンド酸の作用の解析を実施する。さらに、胎仔組織からの新たな神経保護化合物の探索と同定にも着手する。

(1) セロフェンド酸の保護作用機序の解明

① セロフェンド酸結合タンパクの同定

・セロフェンド酸が神経保護作用を発揮する際のターゲットとなる細胞内分子を探索するために、セロフェンド酸を担体に結合させたアフィニティーカラムを作成し、これを用いて脳あるいは培養ニューロン中のセロフェンド酸結合タンパクを精製・単離し、同定を行う。

・精製したタンパクの体内発現分布の検討や発現細胞種を同定し、初代培養細胞にラジカルストレスを適用した際のその発現変化についても検討する。

② セロフェンド酸の定量法の確立

・セロフェンド酸には紫外吸収がなく、これ

までマスマスペクトルにより半定量的な方法で定量を行ってきたが、生体内分布の検討や薬物動態的な観点においても定量法の確立は不可欠である。これまでに、新たな検出器として蒸発型光散乱検出器を導入し定量法の確立を進めているが、生体試料からの定量は困難な状況である。したがって、本年度は生体試料からの定量を目指し、セロフェンド酸の抽出方法を検討する。また、タンパクとの非特異的結合も考えられるため除タンパク法についても合わせて検討し、セロフェンド酸の定量法を確立する。

③ セロフェンド酸の細胞内ターゲット分子の解析

- ・セロフェンド酸およびセロフェンド酸結合タンパクの細胞内局在ならびにウシおよびラットの生体内分布を解析する。
- ・セロフェンド酸結合タンパクのタンパク質としての機能を解析し、セロフェンド酸の生理的役割、セロフェンド酸と同様の役割を果たす他の物質の探索についても検討する。

④ In vivo 虚血障害モデルでの作用の解析

- ・中大脳動脈閉塞モデルにおけるセロフェンド酸とその誘導体の作用を検討する。特に、組織化学的にグリア細胞の活性化、サイトカインの産生への作用を検討し、グリア細胞へのセロフェンド酸の作用を明らかにする。
- ・心臓ならびに腎臓といった末梢組織の虚血再灌流障害時にもフリーラジカルの関与が示唆されているので、これらの臓器での虚血モデルにおけるセロフェンド酸の作用を検討する。

(2) 胎仔組織由来新規神経保護物質の探索

①カスパーゼ阻害活性を指標とした新規化合物の探索

- ・無細胞系において caspase-3 阻害活性を指標として、胎仔組織（ウシ胎盤、ウシ胎仔血清など）の有機溶媒抽出物の HPLC 画分のスクリーニングを行う。2 段階以上の HPLC で分画することにより、単一化合物を含む阻害活性の高い画分を同定する。同様の検討を他のカスパーゼについてもを行い、活性画分を同定する。

②生体内抗酸化機構賦活物質の探索

- ・申請者は、抗酸化応答配列 (ARE) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の上流に結合させたプラスミドを安定発現した細胞を作製し、ARE 活性を効率的に測定できるスクリーニング系を確立している。この系を用いて胎仔組織の有機溶媒抽出物の ARE 活性化物質の探索を行う。

③カスパーゼ阻害活性物質および生体内抗

酸化機構賦活物質の同定

- ・構造決定に必要なサンプル量を確保するために、large-scale での抽出・分離を行い、得られた検体をマスマスペクトル解析あるいは核磁気共鳴スペクトル解析に供して化学構造を決定する。同定した活性化化合物について化学合成品を調製し、その細胞保護作用について培養ニューロンを用いて確認する。カスパーゼ阻害活性の有無についても無細胞系および培養細胞にて検討する。さらに、グルタミン酸受容体やラジカルとの相互作用の有無についても検討する。

4. 研究成果

(1) セロフェンド酸の保護作用機序の解明

- ・セロフェンド酸の細胞保護作用機序の詳細なメカニズムの解明のために、セロフェンド酸が直接相互作用するセロフェンド酸結合タンパク質の探索を進めた。セロフェンド酸を磁性ビーズに結合させたセロフェンド酸ビーズを作製し、細胞溶解液と混合することにより、いくつかの特異的結合を有するタンパクが得られた。

- ・セロフェンド酸の定量法の確立を目指すため、セロフェンド酸の抽出方法について検討を進めた。有機溶媒抽出やタンパク分解酵素との反応により除タンパクを行い、セロフェンド酸の定量を行ったが検出感度の上昇は見込めなかった。

- ・セロフェンド酸がアミロイドβタンパク質毒性に対して保護作用を有するか検討を行った。セロフェンド酸は 24 時間前投与することによりアミロイドβタンパク質の毒性を有意に抑制した。

- ・心臓におけるセロフェンド酸の作用を in vivo で検討する目的で、ラット心筋梗塞モデルを用いてセロフェンド酸の作用を検討した。セロフェンド酸は虚血開始 15 分前と虚血開始 5 分後に投与することにより有意に梗塞巣体積を減少させた。これらの結果より、グルタミン酸神経毒性が大きく関わる脳梗塞のみでなく、アルツハイマー病や虚血性心疾患においてもセロフェンド酸の臨床応用の可能性が示唆される重要な基礎的知見を明らかにした。

- ・これまでにアミロイドβタンパク質の細胞毒性に対する検討を行う目的で、アミロイドβタンパク質の変異体を用いた系を確立した。アミロイドβタンパク質の変異体のうち 22 番目のグルタミン酸と 23 番目のアスパラギン酸においてターン構造を取る毒性コンフォマーの存在がその毒性に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、その毒性発現にはアミロイドβタンパク質の凝集とラジカルの産生が重要であることを見出した。さらに、この神経毒性に対するセロフェンド酸の保護作用の検討を行った。野生

型と同様にセロフェンド酸は 24 時間の前投与によって、有意な保護作用を発現した。

(2) 胎仔組織由来新規神経保護物質の探索
・抗酸化応答配列 (ARE) をレポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の上流に結合させたプラスミドを安定発現した細胞を作製し、ARE 活性を効率的に測定できるスクリーニング系を用いて、胎仔組織の有機溶媒抽出物の ARE 活性化物質の探索を行う目的で、ウシ胎盤からの有機溶媒抽出を行い、抽出物を得た。

・ARE をレポーター遺伝子の上流に結合させたプラスミドを安定発現した細胞を用いて ARE 活性を測定するために、ウシ胎仔血清およびウシ胎盤の有機溶媒抽出を行ない、抽出物を得た。その後 ARE 活性を測定したところ、ウシ胎仔血清のエーテル抽出物に ARE 活性化物質の存在が示唆された。これらの結果より胎児期組織には酸化ストレスに対して有用な役割を果たす化合物が含まれていることが期待される。

・ARE 活性を効率的に測定できるスクリーニング系を用いてウシ胎仔血清の有機溶媒抽出物の ARE 活性化物質の探索を行ったところ ARE 活性化物質の存在が示唆された。さらにウシ胎仔血清のエーテル抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけたところいくつかスポットが確認された。これらの結果より胎児期組織には酸化ストレスに対して有用な役割を果たす化合物が含まれていることが期待される。

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 4 件)

- ① Kurokawa Y, Sekiguchi F, Kubo S, Yamasaki Y, Matsuda S, Okamoto Y, Sekimoto T, Fukatsu A, Nishikawa H, Kume T, Fukushima N, Akaike A, Kawabata A. Involvement of ERK in NMDA receptor-independent cortical neurotoxicity of hydrogen sulfide. *Biochem Biophys Res Commun.*、査読有、vol. 414、2011、pp. 727-732、DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.144
- ② Wang P.-L., Niidome T., Kume T., Akaike A., Kihara T., and Sugimoto H. Functional and molecular interactions between Rac1 and FE65. *Neuroreport*、査読有、vol. 22、2011、pp. 716-720、DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834aca9d
- ③ Ohnishi M., Katsuki H., Fukutomi C., Takahashi M., Motomura M., Fukunaga M., Matsuoka Y., Isohama Y., Izumi Y., Kume

T., Inoue A., and Akaike A. HMGB1 inhibitor glycyrrhizin attenuates intracerebral hemorrhage-induced injury in rats. *Neuropharmacology*、査読有、vol. 61、2011、pp. 975-980、DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.06.026,

- ④ Oda, T., Kume, T., Izumi, Y., Ishihara, K., Sugimoto, H., Akaike, A., Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors inhibit neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.*、査読有、vol. 116、2011、pp. 128-131、DOI: 10.1254/jphs.11011SC

[学会発表] (計 12 件)

- ① 泉安彦, 松村敦子, 脇田誓子, 福田宏之, 赤木謙一, 久米利明, 入江一浩, 橋本正, 赤池昭紀, 青ジソ抽出物からの Nrf2-ARE 経路活性化成分の単離および同定、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 31、北海道大学 (北海道)
- ② 高鳥悠記, 久米利明, 赤池昭紀、ニューロン保護におけるニコチン受容体シグナルの役割、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 16、国立京都国際会館 (京都府)
- ③ 泉尾直孝, 久米利明, 佐藤瑞穂, 村上一馬, 入江一浩, 泉安彦, 赤池昭紀、アミロイド β 誘発神経毒性における 22, 23 位でのターン構造の重要性、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 14、国立京都国際会館 (京都府)
- ④ 川畑伊知郎, 森田淳一, 田渕明子, 津田正明, 一瀬宏, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀, 山國徹、V-1 はアクチン重合を介した SRF 依存経路によりチロシン水酸化酵素遺伝子発現を制御する、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 14、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑤ Qand Agha Nazari, 泉安彦, 久米利明, 赤池昭紀、Protective effects of luteolin on oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice.、第 85 回日本薬理学会年会、2012. 3. 14、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑥ 大西正俊, 香月博志, 福富千温, 高橋円香, 本村美怜, 福永瑞季, 松岡康裕, 磯濱洋一郎, 泉安彦, 久米利明, 井上敦子, 赤池昭紀、グリチルリチンによる HMGB1 活性阻害を介した脳出血誘発トロンビン毒性の制御、第 120 回日本薬理学会近畿部会、2011. 11. 11、ホテルグランビア京都 (京都府)
- ⑦ 松村敦子, 泉安彦, 脇田誓子, 赤木謙一, 入江一浩, 久米利明, 橋本正, 赤池昭紀、Nrf2-ARE 経路活性化作用を有する食品由来成分の探索、第 120 回日本薬理学会近畿部会、2011. 11. 11、ホテルグランビア

- ア京都（京都府）
- ⑧ 泉安彦, 脇田誓子, 久米利明, 赤池昭紀、ドパミンニューロンによる線条体神経支配の in vitro 再構築とその機序解明、生体機能と創薬シンポジウム 2011、生体機能と創薬シンポジウム 2011、2011.9.2、日本薬学会長井記念ホール（東京都）
 - ⑨ 五百蔵忠明, 赤尾昌治, 久米利明, 井口守丈, 泉安彦, 赤池昭紀、In vivo 心筋虚血再灌流モデルにおけるセロフェンド酸の心筋保護作用、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011、2011.8.31、北里大学薬学部コンベンションホール（東京都）
 - ⑩ 泉尾直孝, 久米利明, 佐藤瑞穂, 村上一馬, 入江一浩, 泉安彦, 赤池昭紀、変異体を用いた A β 誘発神経毒性におけるターゲットの重要性の検討、第 119 回日本薬理学会近畿部会、2011.7.8、名古屋ウイックあいち・愛知県産業労働センター（愛知県）
 - ⑪ Takada-Takatori, Y., Kume, T., Izumi, Y., Fujii, T., Sugimoto, H. and Akaike, A., Mechanisms of neuroprotection by donepezil pretreatment via nicotinic acetylcholine receptor. 、International Receptor Symposium 2011、2011.4.1、京都大学（京都府）
 - ⑫ Unemura, K., Kume, T., Kondo, M., Izumi, Y. and Akaike, A.、Mechanism of inhibitory effect of glucocorticoids on astrocytic proliferation. 、International Receptor Symposium 2011、2011.4.1、京都大学（京都府）

6. 研究組織

(1)研究代表者

久米 利明 (KUME TOSHIAKI)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10303843

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし