

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390082

研究課題名(和文)塩誘導性キナーゼ2(SIK2)による神経生存制御機構の解明と応用

研究課題名(英文)Mechanisms and applications of SIK2-regulation for neuro-protection

研究代表者

竹森 洋(Takemori, Hiroshi)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90273672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)： SIK2-K0マウスの解析から、SIK2阻害が神経保護に作用することが示唆された。また、SIK2-K0を毛色が薄い遺伝的背景のマウスへ導入すると、そのマウスの毛色が濃くなる。そこで、これら表現型を利用して新たな脳梗塞・再灌流障害や認知症へ応用可能な低分子化合物の評価に応用することを目指した。その結果、フラボノイドのフィセチンがSIK2を阻害し、メチル化フィセチン(4MF)はより強力であった。4MF及びその誘導体はグルタミン酸による初代培養神経細胞に対する毒性を減弱させ、マウスの記憶試験でも、フィセチンが記憶を亢進させる結果を得た。また、他の作用機序の異なる神経保護作用物質の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)： We reported that SIK2-K0 mice showed neuro-protective phenotypes after the ischemia-reperfusion operation. In addition, SIK2 regulates hair color by inhibiting melanogenesis. By using these phenotypes, we tried to identify new compounds that are helpful to care ischemia-reperfusion damage in the brain. We screened compounds by an in vitro kinase assay and identified fisetin as a candidate for the SIK2 inhibitor. However, fisetin did not inhibit SIK2 actions in cultured cells. Interestingly, fisetin changed mouse hair color, and we found methoxy-fisetin in mouse feces. The synthesized methoxy-fisetin (4MF) inhibited SIK2 and acted as a neuro-protector after the glutamate treatment in primary neurons. 4MF-treated mice showed enhanced memory capacity. In addition to 4MF, we obtained some compounds that showed neuro-protective activities in an SIK2 dependent or independent manners.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：SIK CREB 転写 神経保護 フラボノイド

1. 研究開始当初の背景

近年、いかに健康年齢を延長させるかが急務となっている。薬による血圧コントロールが可能となり、脳梗塞・心筋梗塞などの心血管性疾患の死亡原因に占める割合こそ減少しているものの、高齢者人口の急増に伴って患者数は急増している。特に脳梗塞を含む脳卒中は、寝たきり原因の1位であり、医療・介護費用の圧迫は当然のことながら、患者を支える家族の時間および経済的損失は測りしえない。しかし、現状では脳梗塞・再灌流後の神経障害を防止する有効な薬は存在しない。

代表研究者らは塩誘導性キナーゼ 2(SIK2) のノックアウトマウスが虚血・再灌流障害に耐性を示す事実を得た (*Neuron* 2011 169:106-19)。また、SIK2 はマウスの毛色を支配 (*Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 23:809-19) しており、SIK2 阻害化合物投与で毛色を変化させることにも成功しつつあった。SIK2 の作用は、転写因子 CREB の共役因子 CRTC (TORC) の抑制が主な作用である。SIK2 でリン酸化された CRTC は、CREB を活性化できないため、CRE 依存的な転写の低下をまねく。神経において、CREB-CRE は生存シグナルに重要であり、SIK2 活性は神経生存には不利となる。SIK2-KO マウスが脳梗塞・再灌流後の障害が少ない点は、CREB-CRE シグナルが活性化しやすいためと考えられる。

本研究においては、生体レベルで有効な SIK2 阻害剤を取得すれば、脳梗塞・再灌流後に有用な低分子のリード化合物として活用できることが期待される。

2. 研究の目的

65 歳以上の寝たきりの原因の約半数は神経疾患に分類される脳卒中や認知症である。患者数はこの 10 年で 5 倍の 170 万人を超し 2025 年には 300 万人近くに達すると予想され、患者や家族のみならず社会の負担も限界に近づきつつある。本研究では、SIK2 の虚血障害における役割をさらに解明するとともに、低分子化合物をマウス毛色で評価・スクリーニングし、実際に *in vivo* で効果の高い構造へと修飾する。そして、脳梗塞後の神経保護薬やリハビリ効率促進薬・認知症薬の創薬基盤 (評価系とリード化合物の取得) の構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) SIK2 阻害性低分子のスクリーニングのために、植物成分ライブラリーの構築を行った。また、スタンダードキナーゼ阻害剤ライブラリーを BioMol 社から購入した。スクリーニングには、バキュロウイルスで発現させた GST-SIK2 タンパクに、CRTC2 (SIK2 の基質で転写因子 CREB の共役因子) ペプチドを基質とし、pCRTC2 抗体 (特許 456802 号) を利用した。培養細胞内での効果は、HEK293 細胞に SIK2 を強制発現させ、SIK2 による CRTC2 の転

写共役抑制活性の結果、阻害される CRE-Luc の活性を指標として評価した。

(2) *vivo* での評価は、SIK2-KO マウスのヘテロ状態を Ay マウス (日本 SLC 社) へ導入し、SIK2 阻害で毛色変化を起こしやすいマウスを作成し、そのマウス (4 週齢) へ被検査物質を餌に 0.1% の濃度になるように調製し、経口摂取させた。最初の毛が抜け換わった状態での毛色を観察し、SIK2 阻害度合いを評価した。

(3) 神経培養細胞は、マウス胎児 (E17) から大脳皮質の神経を初代培養した。培養後 10 日前後で、グルタミン酸処理 (虚血・再灌流障害モデル) を行い、CRTC1 (神経特異的 CRTC アイソフォーム) 抗体及び MAP2 抗体 (Cell Signaling 社) の染色により判定した。また、神経毒性定量評価指標としてミトコンドリアでの酸素消費量を測定し効果判定を行った。酸素消費量の測定には Seahorse 社の XF-24e を利用した。

(4) マウスの記憶試験には、餌の場所を覚えるまでの時間を測定した。8 週齢の♂マウスに被検査薬を 2 週間投与し、その後、3 日間のトレーニング (餌の場所を覚え込ませる) を行い、2 日間の無処理期間後に、再度、3 日間の試験を行った。餌を見つけ出す時間が短ければ 5 点として、30 秒ごとに減点することでスコア化した。

4. 研究成果

(1) 神経保護剤の候補としての SIK2 阻害性低分子の探索は、*in vitro* キナーゼアッセイで進めた。BioMol 社の約 80 種のキナーゼ阻害剤を検討した結果、既に SIK 阻害効果が予測された GW-5074 が候補として挙げられた (図 1)。

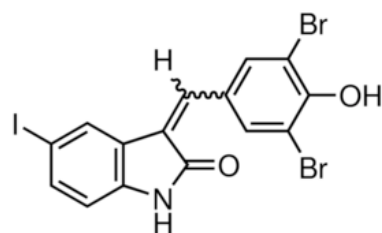


図 1 : GW-5074

GW-5074 は Raf-1 の阻害剤であり、Raf-1 経路の阻害は細胞障害を引き起こすため神経保護剤には適さない。次に候補として検索できたものはフラボノイドのロビネチンであった (図 2)。

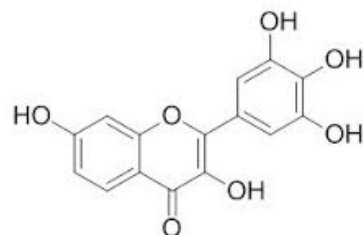


図 2 : ロビネチン

GW-5074 及びロビネチンが平面構造をとっ

ていることから、ロビネチンの類似のフラボノイドを再度網羅的にスクリーニングすることにした。その結果、水酸基の分散状態に偏りがあるフラボノイドが SIK2 をより阻害することが判明した。特にフィセチンが SIK2 阻害活性が高いことが判明した (図 3)。

次に、培養細胞でもフラボノイド類が SIK2 を阻害するかを検討したところ、フィセチンやロビネチンは SIK2 を阻害できなかった。一方で、*in vitro* で阻害活性が高いフラボノイドの 4'-位か 6-位がメチル化されていると、SIK2 による CRE-Luc の抑制活性を 10-25 μ M 程度の濃度で阻害することも判明した (図 3)。これらの違いは、フラボノイドの細胞膜透過性が影響した可能性がある。

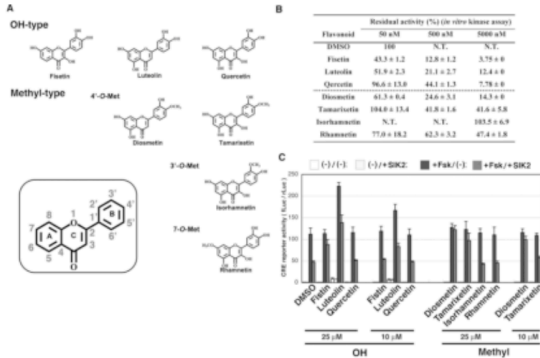


図 3: SIK2 阻害性フラボノイド。A, 構造。B, *in vitro* キナーゼアッセイ。C, 293 細胞での CRE-Luc 抑制活性。拡大図は成果論文 14: Open access)に記載されている

(2) SIK2 を低濃度で阻害するフラボノイドが存在することが明らかとなった一方で、細胞膜透過性の問題が発生した。そこで、簡単に *in vivo* で効果を判定できる系の構築を行った。既に、SIK2 が毛色を決定していることを明らかにしていたので、毛色を活用することにした。Ay マウスはメラノサイトでの cAMP シグナルが弱いため、黒メラニン合成できず、黄色の毛になるマウスである。SIK2-KO の遺伝的背景の Ay マウスは、cAMP シグナル無しでメラニン合成遺伝子を誘導できるため茶色の毛色になる。SIK2 をあらかじめヘテロ欠損にした Ay マウスは黄色であるが、SIK2 阻害剤の影響を受けやすいと仮定し、各種フラボノイドを経口摂取させた。その結果、4'-位メチル化フラボノイドのダイオスメチン以外でもフィセチンがマウスの毛色を茶色にした (図 4)。

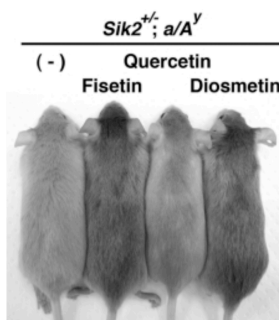


図 4: SIK2-ヘテロ KO; Ay マウスによる *in vivo* 試験系

フィセチンは培養細胞では効果は無いことから、マウス体内で 4'-位がメチル化された可能性が示唆された。実際、マウスの糞中にメチル化された可能性のあるフラボノイドが存在していた。4'-メチルフィセチンは市販されていないため、有機合成により作成した。4'-メチルフィセチンは CRE-Luc を高い活性のまま保ち、メラニン合成誘導を促進することが示された (図 5)。

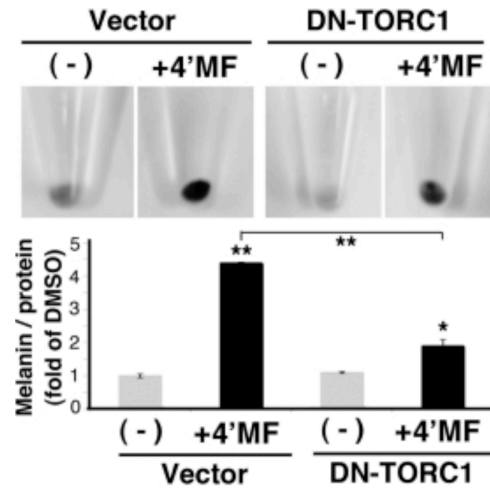


図 5: 4'-メチルフィセチン (4' MF) による B16 細胞でのメラニン誘導。TORC1 は CRTC1 と呼ばれ、CRTC2 のアイソフォームである。DN: ドミナントネガティブ-CRTC1 は 4' MF の効果を低下させることから、4' MF は CRTC1 の活性化剤として機能する。

(3) 4'-メチルフィセチン以外にも、複数の SIK2 阻害剤の候補の同定に成功した。一方で、マウス毛色変化と神経保護効果 (初代培養神経細胞による細胞毒性試験) に必ずしも相関が存在しなかった。従来の神経毒性評価系が極端に高い毒性しか評価できないことから、僅かな神経毒性でも経時的に評価可能な試験系の構築を行うことにした。神経細胞は他の細胞と異なり、少量の呼吸毒でも細胞死に繋がる。細胞の呼吸はミトコンドリアで行われており、ATP の産生に伴って酸素が消費される。そこで、酸素消費を測定することで、ミトコンドリア毒性から神経細胞毒性評価系を作成した (図 6, 7)。

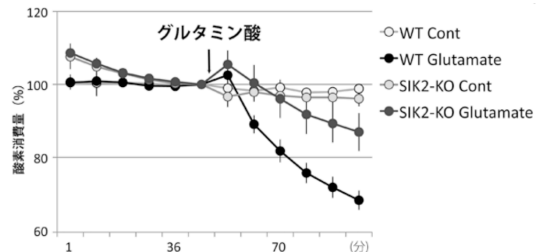


図 6: 酸素消費量を利用した神経毒性評価系。SIK2-KO マウス由来の神経細胞は、グルタミン酸毒性に耐性を示した。

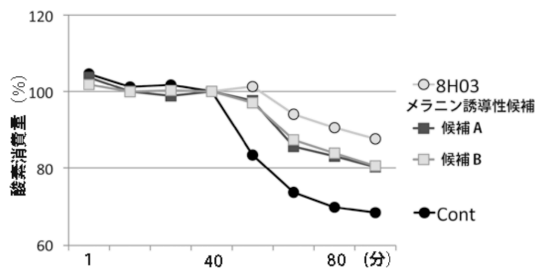


図 7：酸素消費量を利用した神経保護剤の評価系。8H03 はフェセチンの誘導体でメラニン合成促進作用が *in vivo* でも認められた。

(4) 実際に SIK2 阻害性低分子化合物が、*in vivo* の神経毒性に有効か、そして、それが認知症に対する有効効果を発揮するかを検証することにした。虚血・再灌流モデルは、虚血時に薬剤が標的部位に届かない。また、再灌流後は、効果が発揮されるまでに殆どの神経細胞が死滅する。そこで、虚血処理 3 日前から、被検薬を経口摂取 (餌重に対して 0.1%: フィセチン) もしくは、腹腔内投与 (30mg/kg: その他候補低分子化合物) した。しかし、虚血・再灌流では顕著な有効性は検出できなかった。可能性として、被検薬の脳内有効濃度帯が皮膚 (毛色判定) よりも高い可能性が示唆される。また、SIK2-KO マウスの状態は、SIK2 が慢性的に欠損している状態にあり、今回の検討では慢性状態を評価できていない可能性が高い。そこで、2 週間のフィセチン摂取の後、記憶試験で評価を行うことにした。記憶には餌の場所を覚え込ませる試験を行ったため、食欲に影響の出る Ay の遺伝的背景は使用しなかった。試験開始前に 3 回 (3 日間) のトレーニングを行い、2 日間の間隔を開けた後に、3 日間の試験を行った。その結果、試験後 3 日目でフィセチン処理群 (n=20) で有意な記憶スコアの上昇を得た (図 8)。

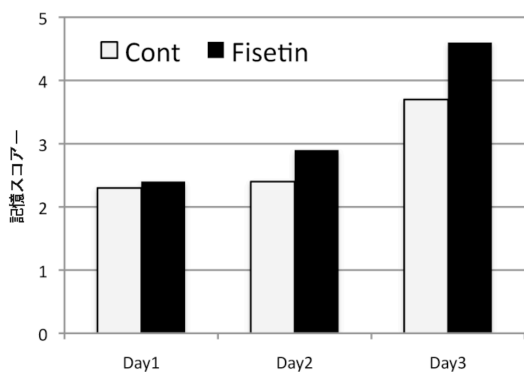


図 8：フィセチン摂取させたマウスの記憶能の上昇作用。

本試験は被検薬が 1g 以上必要となることから、フィセチンでのみ評価できたが、神経細胞のミトコンドリア機能保護に働いた他の低分子化合物 (図 7) にも記憶促進が期待

される。これらの低分子評価系を活用して、これまでに、SIK2 阻害剤以外でも虚血・再灌流試験および記憶試験で、認知症のリード化合物になりうる物質を同定できた。今後、作用機序の解明と再度、虚血・再灌流障害にも効果があるのかを検討を行う予定である。

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 16 件)

- 1) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S. Prostaglandin E promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase. *Nat Commun.* (2013) 4:1685
- 2) Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY. LKB1 tumor suppressor and salt-inducible kinases negatively regulate human T-cell leukemia virus type 1 transcription. *Retrovirology.* (2013) 10: 40
- 3) Horibe I, Satoh Y, Shiota Y, Kumagai A, Horike N, Takemori H, Uesato S, Sugie S, Obata K, Kawahara H, Nagaoka Y. Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells. *J Nat Med.* (2013) 67: 705-10
- 4) Yu J, Hu X, Yang Z, Takemori H, Li Y, Zheng H, Hong S, Liao Q, Wen X. Salt-inducible kinase 1 is involved in high glucose-induced mesangial cell proliferation mediated by the ALK5 signaling pathway. *Int J Mol Med.* (2013) 32: 151-157
- 5) 伊東祐美、竹森 洋 注目される病態関連分子 AMPK 分子脳血管学 (2013) 12: 54-58
- 6) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. *PLoS One* (2012) 7: e37803 (査読有)
- 7) Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi S, Itoh H. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. *EMBO J.* (2012) 31: 2275-95
- 8) Popov S, Venetsanou K, Chedrese PJ, Pinto V, Takemori H, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Mochizuki N, Soares-da-Silva P, Bertorello AM. Increases in

intracellular sodium activate transcription and gene expression via the salt-inducible kinase 1 network in an atrial myocyte cell line. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2012) 303: H57-65

9) Sasagawa S, Takemori H, Uebi T, Ikegami D, Hiramatsu K, Ikegawa S, Yoshikawa H, Tsumaki N. SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development* (2012) 139: 1153-63

10) Liu Y, Poon V, Sanchez-Watts G, Watts AG, Takemori H, Aguilera G. Salt-inducible kinase is involved in the regulation of corticotropin-releasing hormone transcription in hypothalamic neurons in rats. *Endocrinology* (2012) 153: 223-33

11) Dietrich JB, Takemori H, Grosch-Dirrig S, Bertorello A, Zwiller J. Cocaine induces the expression of MEF2C transcription factor in rat striatum through activation of SIK1 and phosphorylation of the histone deacetylase HDAC5. *Synapse* 2012 66: 61-70

12) Jefcoate CR, Lee J, Cherradi N, Takemori H, Duan H cAMP stimulation of STAR expression and cholesterol metabolism *Mol Cell Endocrinol* (2011) 336: 53-62

13) Popov S, Silveira A, Wågsäter D, Takemori H, Oguro R, Matsumoto S, Sugimoto K, Kamide K, Hirose T, Satoh M, Metoki H, Kikuya M, Ohkubo T, Katsuya T, Rakugi H, Imai Y, Sanchez F, Leosdottir M, Syvänen AC, Hamsten A, Melander O, Bertorello AM. Salt-inducible kinase 1 influences Na(+),K(+)-ATPase activity in vascular smooth muscle cells and associates with variations in blood pressure. *J Hypertens* (2011) 29: 2395-403

14) Kumagai A, Horike N, Satoh Y, Uebi T, Sasaki T, Itoh Y, Hirata Y, Uchio-Yamada K, Kitagawa K, Uesato S, Kawahara H, Takemori H* Nagaoka Y. A potent inhibitor of SIK2, 3, 3', 7-trihydroxy-4'-methoxyflavon (4'-O-methylfisetin), promotes melanogenesis in B16F10 melanoma cells. (* corresponding) *PLoS One* (2011) 6: e26148

15) Peeters A, Fraisl P, van den Berg S, Ver Loren van Themaat E, Van Kampen A, Rider MH, Takemori H, van Dijk KW, Van Veldhoven PP, Carmeliet P, Baes M. Carbohydrate metabolism is perturbed in peroxisome-deficient hepatocytes due to mitochondrial dysfunction, AMP-activated protein kinase (AMPK) activation, and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) suppression. *J Biol Chem* (2011) 286: 42162-79

16) Eneling K, Chen J, Welch LC, Takemori H, Sznajder JI, Bertorello AM. Salt-inducible kinase 1 is present in lung alveolar epithelial cells and regulates active sodium transport. *Biochem Biophys Res Commun* (2011) 409: 28-33

[学会発表] (計 12 件)

1) Ito Y, Sanosaka M, Kumagai A, Takemori H, Fuchino H, Kawahara N, Doi J, Ota M. Effects of Pterosin B from Pteridium Aquilinum on the blood glucose level in db/db mice. The EMBO meeting 2013 年 9 月 22 日 (AMSETDAM)

2) 川村知裕, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 新谷康, 井上匡美, 澤端章好, 南 正人, 杉村康司, 飯田修, 澁野裕之, 川原信夫, 竹森洋, 奥村明之進

カルノソール・カルノソール誘導体による酸化ストレスに対する臓器保護
第 194 回近畿外科学会 2013 年 11 月 9 日 (大阪)

3) 伊東祐美, 佐野坂真人, 熊谷彩子, 竹森洋

SIK3 によるクラス II-HDAC 制御がコレステロール-胆汁酸代謝へ与える影響
第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 16 日 (福岡)

4) 熊谷彩子, 堀家なな緒, 伊東祐美, 長岡康夫, 竹森洋
塩誘導性キナーゼ 2 (SIK2) の新規メラニン合成調節機構について

第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 16 日 (福岡)

5) 佐野坂真人, 伊東祐美, 藤本穰, 大河原知治, 仲哲治, 竹森洋

SIK3 はマクロファージにおける炎症性サイトカインの発現を制御する
第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 16 日 (福岡)

6) 坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫, 大西健

植物由来フラボノイド A に新規に見出されたがん細胞優位な放射線増感作用

第 71 回日本癌学会 2012 年 9 月 20 日 (札幌)

7) 大西健, 坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫

フラボノイド 3,5,7-Trihydroxy-3,4'-Dimethoxyflavone に新規に見出されたがん細胞優位な細胞致死作用

第 71 回日本癌学会 2012 年 9 月 20 日 (札幌)

8) 伊東祐美, 大西智子, 田村淑恵, 藤川和平, 土居純子, 竹森洋, 片倉啓雄, 河原秀久

新たなエノキ素材による体重減少と胆汁酸代謝亢進作用について

第 51 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 2012 年 10 月 20 日 (宝塚)

9) 伊東祐美, 上尾達也, 熊谷彩子, 竹森洋, 土居純子

塩誘導性キナーゼ SIK3 はコレステロール、胆汁酸代謝に重要である
第 66 回日本栄養食料学会 2012 年 5 月 19 日 (仙台)

10) 津田正明、福地守、桑名由紀、井上南、越智雄基、市村美奈、高崎一朗、竹森 洋、田淵明子

GPCR を介した神経活動依存的な遺伝子発現制御に関する解析

第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 18 日 (名古屋)

11) 佐々木勉、北川一夫、寺崎泰和、大山直紀、杉山幸生、八木田佳樹、竹森 洋、望月秀樹

ニコチンによる神経保護効果における CREB-CRTC シグナルの意義

第 35 回日本神経科学学会 2012 年 9 月 18 日 (名古屋)

12) 佐々木勉、竹森 洋、大山直紀、由上登志郎、渡邊彰弘、八木田佳樹、望月秀樹、北川一夫

ニコチンによる CREB-CRTC 活性化を介した神経保護機構の検討

第 24 回日本脳循環代謝学会 2012 年 11 月 8 日 (広島)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称:カスパーゼ 1 活性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及びカスパーゼ 1 活性化阻害剤の評価方法

発明者: 竹森 洋、佐野坂真人、伊東祐美、淵野裕之、川原信夫

権利者: 独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館

種類: 特許

番号: 特願 2013-094995

出願年月日: 平成 25 年 4 月 30 日

国内外の別: 国内

名称: プテロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤

発明者: 妻木範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫

権利者: 国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-135040

出願年月日: 平成 25 年 6 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: チロシナーゼ誘導抑制剤及びメラニン合成抑制剤

発明者: 竹森 洋、熊谷彩子、森田純子、淵野裕之、川原信夫、飯田 修、杉村康司、志賀幸生、鎌田 文広、香月茂樹、河原秀久、長岡康夫

権利者: 株式会社桃谷順天館

種類: 特許

番号: 特願 2012-249917

出願年月日: 平成 24 年 11 月 24 日

国内外の別: 国内

名称: PPARd 活性化剤および PPARd 活性化剤の製造方法

発明者: 河原秀久、長岡康夫、竹森 洋、小出芳栄

権利者: 学校法人関西大学、独立行政法人医薬基盤研究所、有限会社一栄

種類: 特許

番号: 特願 2011-250865

出願年月日: 平成 23 年 11 月 16 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹森 洋 (TAKEMORI HIROSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号: 90273672

(2) 研究分担者

秦野 修 (HATANO OSAMU)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40164850

(3) 研究分担者

北川一夫 (KITAGAWA KAZUO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70301257

(4) 研究分担者

長岡康夫 (NAGAOKA YASUO)

関西大学・工学部・教授

研究者番号: 90243039

(5) 連携研究者

熊谷彩子 (KUMAGAI AYAKO)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号: 20455869