

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590084

研究課題名(和文) 分子シャペロンに注目した、アルツハイマー病に対する創薬基盤研究

研究課題名(英文) Drug discovery research for Alzheimer's disease focused on molecular chaperone

研究代表者

星野 竜也 (Hoshino, Tatsuya)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：70457589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はHeat Shock Protein (HSP)の誘導剤であるgeranylgeranylacetone (GGA)を変異型APP過剰発現マウスに長期投与し、アルツハイマー病様症状の進行に対する効果を検討した。その結果、GGAを長期投与したマウスでは認知機能の改善が観察された。また、GGAを長期投与したマウスの脳ではアミロイド量、oligomer量、及びアミロイド斑が減少していることを見いだした。さらに変異型APP過剰発現による神経変性が抑制されていることが観察された。これらの結果はGGAがHSP誘導を介してアルツハイマー病の症状を抑制することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We here examined the effect of geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock protein (HSP) 70 expression, on the Alzheimer's disease (AD)-related phenotypes. Repeated oral administration of geranylgeranylacetone to APP23 mice for 9 months not only improved cognitive function but also decreased levels of amyloid- β peptide ($A\beta$), $A\beta$ plaque deposition and synaptic loss. These outcomes were similar to those observed in APP23 mice genetically modified to overexpress HSP70. Although the repeated oral administration of geranylgeranylacetone did not increase the level of HSP70 in the brain, a single oral administration of geranylgeranylacetone significantly increased the level of HSP70 when $A\beta$ was concomitantly injected directly into the hippocampus. Since geranylgeranylacetone has already been approved for use as an anti-ulcer drug and its safety in humans has been confirmed, we propose that this drug be considered as a candidate drug for the prevention of AD.

研究分野：薬理学

キーワード：アミロイド アルツハイマー 分子シャペロン Heat shock protein

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は老人性認知症の主な原因であり、社会の高齢化に伴いその患者数が急増している。しかしながら現在使われている治療薬は何れも対症療法的なものであり、根本的な治療薬はない。従ってアルツハイマー病の進行を抑制する因子(蛋白質など)を発見し、それを利用してこの疾患の根本的な治療薬を開発することは極めて重要である。

アルツハイマー病の主な原因は、アミロイドという蛋白質が過剰に産生・蓄積・変性・凝集することにより、神経細胞の機能が低下することである。アルツハイマー病の病理学的な特徴の一つである老人班はアミロイドが凝集したものである。アミロイドは膜タンパク質であるアミロイド前駆体蛋白質(APP)がセクレターゼ、及びセクレターゼにより分解されることにより産生される。APPの代謝異常、遺伝子変異などにより脳内のアミロイドが増加し、アミロイドの凝集・蓄積が促進されることにより、神経変性や神経機能異常が起き、AD発症・進行につながると考えられている。従って、アミロイドの産生、分解、もしくは凝集に関与する因子、及びアミロイドによる神経細胞毒性・障害を抑制する因子はAD治療薬開発のターゲットとなりうる。

Heat shock protein (HSP)などの分子シャペロンは、蛋白質が正しい構造を取るのを助ける一群の蛋白質である。HSP70は折り畳みが不完全な蛋白質のrefoldingを行ったり、異常蛋白質をユビキチン・プロテアソーム系を介して分解したりして、細胞内のタンパク質の品質管理を行っている。また、HSP70は抗炎症作用を持ち、これにより種々の炎症性疾患を抑制することが報告されている。従って分子シャペロンがアミロイドの変性・凝集を抑制するだけでなく、抗炎症作用により神経を保護することなど、多様な作用によりア

ルツハイマー病の発症・進行を抑制することが考えられる。

最近我々は、アルツハイマー病モデルマウス(変異型APPを過剰発現しているマウスで、

アミロイドの過剰産生、老人班の形成、記憶学習能力の低下などアルツハイマー病とよく似た症状を示す)とHSP70の発現を亢進したマウスを掛け合わせると、アルツハイマー病様症状の進行(アミロイド蓄積、老人班の形成、記憶学習能力の低下)が顕著に抑制されることを見出した(Hoshino *et al.* *J Neurosci* 2011)。これらの結果は、分子シャペロン、特にHSP70がアルツハイマー病治療のターゲットとなりうる事を示唆している。また、HSP70によるアルツハイマー病様症状抑制機構は、これまでに開発されたセクレターゼ阻害剤、アミロイド凝集阻害剤とは全く異なる機構である。しかし、これらの結果はHSP70を遺伝子改変により恒常的に発現亢進したマウスにおける結果であり、HSP70の発現を誘導する薬剤がアルツハイマー病様症状の進行を抑制し、アルツハイマー病治療薬の候補となりうるかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究で我々は分子シャペロンの誘導剤がアルツハイマー病治療薬として応用できるかを *in vivo* で評価する。

Geranylgeranylacetone (GGA)は臨床現場において長年胃粘膜保護薬として用いられてきた既承認薬である。GGAは毒性無くHSPを誘導することが知られている。また我々はこれまでにGGAがHSP70を誘導することにより種々のストレス性疾患動物モデル(胃潰瘍、小腸潰瘍、間質性肺炎)の病態を改善することを報告してきた。また、消化管以外の疾患においてもGGAが種々のストレス性疾患モデルを抑制することが報告されている。

我々は本研究においてGGAをHSP誘導剤として用いることにより、アルツハイマー病の

症状が抑制されるかを、行動実験、組織学および生化学的実験を用いて検討する。

一方、GGA 以外にも新たなアルツハイマー病治療薬候補を見出すために、我々が独自に入手した生薬から分子シャペロンを誘導する生薬を検索する。有用な生薬を発見した場合、その有効成分の単離・同定を行う。有効成分の HSP 誘導機構を解析し、生薬、有効成分のアルツハイマー病モデルに対する効果を検討する。

3. 研究の方法

アルツハイマー病モデルマウスである APP23 に 1%GGA を含む餌を 9 ヶ月間与え、GGA を長期投与した。マウスの認知機能を調べるために、モーリス水迷路法を用いて空間学習記憶能力を調べた。また、アミロイドの産生、代謝、蓄積に対する効果を調べるために、マウス脳におけるアミロイド量、及び oligomer 量を ELISA により、アミロイド斑の形成を Thioflavin S 染色法により調べた。さらに、神経変性を免疫染色法により検討した。HSP70 の発現はウェスタンブロット法により調べた。

生薬ライブラリーから分子シャペロン誘導生薬のスクリーニングを行った。MTT 法により、細胞毒性を持たない生薬濃度を決定した後、ウェスタンブロット法により HSP の発現を調べた。また、誘導能をもつ成分を同定するために、HSP 誘導生薬を分画し、各画分の誘導能を調べた。最終的に化合物の単離を HPLC 等を用いて行い、NMR により誘導成分の構造を決定した。

4. 研究成果

我々はモーリス水迷路の結果から、GGA の長期投与により APP23 に生じる認知機能の低下が抑制されることを見出した。また、GGA 投与により脳内のアミロイド量、oligomer 量、及びアミロイド斑も減少した。さらに変

異型 APP 過剰発現による神経細胞、及びシナプスの減少（神経変性）も GGA 投与により抑制された。また、HSP70 過剰発現マウスで得られて結果と同様に GGA はアミロイド代謝酵素や TGF- β 1 の発現を亢進した。一方、GGA を投与した後、アミロイドを脳内投与すると HSP70 の発現が亢進した。これらの結果は、GGA が HSP70 誘導を介してアミロイドの凝集を抑制すること、及びアミロイドの代謝を促進することで脳内のアミロイド量を減らし、神経に対する毒性が低下したことにより認知機能を改善したことを示唆している。

以上の結果は GGA が HSP 誘導作用によるアルツハイマー病治療薬となりうることを示唆している。GGA による HSP を介したアルツハイマー病様症状の改善は開発されたセクレターゼ阻害剤、アミロイド凝集阻害剤とは異なる機構である。また、GGA は既に臨床で使用されている医薬品のため、人における動態や安全性が確保されている。そのため、今回の成果はすぐにでも臨床応用可能であり、有望な新規アルツハイマー病治療法として期待できる。

また、スクリーニングの結果より、HSP 誘導生薬としてヤバツイ、アルニカを見いだした。さらにその HSP 誘導成分として eupalinolide、AM-2 をそれぞれ同定した。また eupalinolide は *in vivo*、*in vitro* においてストレスによる傷害を抑制することを見いだした。アルニカ、および AM-2 の詳細な HSP 誘導機構を解析中である。今後はこれらの生薬、及び化合物が新規アルツハイマー病治療薬として応用可能であるかを細胞レベル、動物レベルで検討する。

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3件)

Usui K., Ikeda T., Horibe Y., Nakao M., Hoshino T., Mizushima T. Identification of HSP70-inducing activity in Arnica montana extract and purification and characterization of HSP70-inducers. *J. Dermatol. Sci.* 78,67-75 (2015) (査読有)
DOI:10.1016/j.jdermsci.2015.01.014.

Hoshino T., Suzuki K., Matsushima T., Yamakawa N., Suzuki T., and Mizushima T. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by geranylgeranylacetone in mice. *PLoS One.* 8, e76306 (2013) (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0076306.

Yamashita Y., Ikeda T., Matsuda M., Maji D., Hoshino T., and Mizushima T. Purification and characterization of HSP-inducers from Eupatorium lindleyanum. *Biochem. Pharmacol.* 83, 909-922. (2012) (査読有)
DOI: 10.1016/j.bcp.2011.12.040.

〔学会発表〕(計5件)

星野竜也, 水島徹: テブレノンの HSP 誘導作用に着目した DR, 日本薬学会 第134 年会 (熊本), 2014 年 3 月.

星野竜也, 水島徹: アルツハイマー病とうつ病における HSP70 の役割, 日本ストレス学会 (徳島), 2013 年 11 月.

星野竜也, 水島徹: HSP70 によるアルツハイマー病の進行抑制, GGA・HSP 勉強会 (東京), 2013 年 8 月

星野竜也, 水島徹: HSP 誘導剤,

geranylgeranylacetone によるアルツハイマー病の抑制, 日本薬学会 第 133 年会 (横浜), 2013 年 3 月.

星野竜也, 水島徹: HSP70 によるアルツハイマー病の抑制, 第7回 臨床ストレス応答学会大会 (東京), 2012 年 11 月.

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 竜也 (HOSHINO TATSUYA)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号: 70457589