

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790540

研究課題名(和文)新規クルクミン誘導体CNB-001のCaMK活性化および記憶力向上効果

研究課題名(英文)CNB-001, a synthesized derivative of curcumin, activates CaMKII and enhances memory

研究代表者

赤石 樹泰(AKAISHI, TATSUHIRO)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：90386384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミン誘導体CNB-001には、経口で正常ラットの記憶力を高める効果が見出されたため、アルツハイマー病治療薬開発のリード化合物として注目されている。

本研究では、主に海馬スライス標本を用いた電気生理学的検討により、その作用機序の解明を試みたところ、CNB-001はMAPキナーゼやPKC経路には影響せず、NMDA受容体ならびにCaMK依存性機構により、海馬における記憶形成の分子過程である長期増強現象(LTP)を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have recently demonstrated that oral administration of CNB-001, a synthesized pyrazole derivative of curcumin, enhances memory in a rat object recognition test. CNB-001 could be useful in the development of therapeutic drugs for senile dementia.

This study investigated mechanisms underlying the memory-enhancing effect of CNB-001, and found that CNB-001 promoted NMDA receptor- and CaMKII-dependent long-term potentiation (LTP) of rat hippocampal slices, not via the MAP kinase or PKC cascade.

研究分野：応用薬理学

キーワード：クルクミン 海馬 長期増強 記憶 CaMK

1. 研究開始当初の背景

深刻な人口の高齢化が進んだ我が国では、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) の急増が社会問題となっており、その対策は緊急の課題である。しかし、現在アルツハイマー病に適用可能な薬物はわずかに4つ (ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン、メマンチン) のみであり、その効果も十分ではないため、確実な治療薬の開発が望まれている。

アルツハイマー病では、アミロイドタンパク質 (A β) が不溶性・凝集して脳内に蓄積することが引き金となり、神経におけるタウ蛋白の過剰リン酸化および構造異常が引き起こされ、その結果として神経の変性や脱落が起こると考えられている。この神経変性・脱落が、記憶形成に重要な脳部位である海馬周辺を中心に生じるため、アルツハイマー病患者の主症状として、ほぼ確実に記憶障害を発症する。

海馬における記憶形成のメカニズムは、長期増強 (long-term potentiation; LTP) という現象によって説明される。海馬神経系において、シナプス前線維に実験的に高頻度刺激を与えると興奮性シナプス伝達効率が数時間以上にわたって持続的に増大する現象 (LTP) が報告されている。LTP は、記憶すべき情報を選択・強化して、短期記憶を長期記憶へと定着させる役割を担うと考えられる。

海馬の中で最も分子機序の研究が進んでいる CA1 領域の LTP は、シナプス後細胞における NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化が引き金となって誘導される。NMDA 受容体を介した細胞内 Ca $^{2+}$ 流入は Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) などの細胞内シグナル伝達分子を活性化し、シナプス後細胞における AMPA 型グルタミン酸受容体の活性や受容体数を増加させてシナプス伝達効率増大を導く。これと並行して、細胞内シグナル伝達分子 extracellular signal-regulated kinase (ERK) や転写因子 cAMP-responsive element binding protein (CREB) なども活性化され、タンパク質合成を介したスパインの形態変化が誘導され、さらに長期間持続する LTP が生じると考えられている。

以上より、アルツハイマー病の主症状を改善するためには、海馬における記憶の分子メカニズムに直接はたらきかけて、記憶形成を促進する薬物を発見することが重要と思われる。

2. 研究の目的

天然のウコンに含まれるポリフェノールの1つとして知られるクルクミンには、アルツハイマー病の主な原因と考えられている A β の凝集を阻止し、A β による神経細胞死を抑制するなどの薬効が報告されたことから、アルツハイマー病の予防や病態進行の阻止

に対する有効性が注目されていた。しかし、クルクミンには記憶向上効果が認められなかった。

私は、米国 Salk 研究所の David Schubert 教授と Pamela Maher 博士の協力によって種々の新規クルクミン誘導体の提供を受け、その薬理作用を詳細に検討したところ、ピラゾール骨格を有する新規化合物 CNB-001 に記憶向上効果を発見することに成功した。すなわち、健常な成体ラットに CNB-001 (10 mg/kg) を単回経口投与すると、再認記憶が有意に増大することを見出した。

CNB-001 は、アルツハイマー病治療薬開発のリード化合物として注目されたが、その作用機序については殆ど分かっていなかった。そこで本研究では、主に電気生理学・生化学的手法を用いて、CNB-001 の記憶向上効果を担う分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質神経細胞の培養

妊娠 18 日目のラットより胎児の大脳皮質を摘出し、酵素処理とピペッティング操作により細胞を分散させた後、培養シャーレまたは培養プレートに細胞を播種した。3 日おきに培地交換を行いながら、約 1 週間 10% ウシ胎児血清を含有した基本培地中で神経細胞を育てると、細胞間でシナプスを形成した成熟神経細胞が得られた。

(2) 海馬スライス標本

5~7 週齢の Wistar 系雄性ラットより大脳を摘出し、マイクロスライサーを用いて厚さ 400 μ m の急性脳スライスを作製した後、ピンセットおよびメスを用いて海馬のみを切り出した。このようにして得た海馬スライス標本は、95% O $_2$ -5% CO $_2$ で通気し、30 $^{\circ}$ C に温めた人工脳脊髄液 (ACSF) 中で 1 時間以上維持してから実験に供した。

(3) in vitro における LTP の解析

海馬 CA1 領域への入力線維である Schaffer 側枝に双極性刺激電極を刺入してテスト刺激 (100 μ s の単一矩形波) を与え、CA1 放線層において誘発される興奮性シナプス後電位 (fEPSP) を細胞外記録した。安定した fEPSP が記録されたら、Schaffer 側枝に弱いテタヌス刺激 (100 Hz で 15 発) を適用した。対照群のスライスに弱いテタヌス刺激を与えると、一過性の fEPSP の増強が認められるが、30 分以内にベースラインに戻ったため、薬物による LTP 形成促進効果の有無を解析できた。薬物は ACSF に溶解して海馬スライスに直接灌流適用した。

(4) 細胞内シグナル伝達分子の解析

培養細胞または海馬スライスに薬物を処置した後、細胞溶解液を回収した。サンプル中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE により分離し、抗リン酸化 CaMK 抗体および抗 total CaMK 抗体を用いたウエスタンブロットを行い、薬物処置によってリン酸化

CaMK および total CaMK がどう変化するのか検討した。

また、市販のキット（プロメガの The SignaTECT® CaMK Assay System）を用いてサンプルの CaMK 活性の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 研究初年度（平成 24 年度）は、主に大脳皮質の培養神経細胞ならびに海馬の急性スライス標本を用いた生化学的検討を行い、記憶形成に重要と考えられる細胞内シグナル伝達分子（CaMK、cAMP など）に対する CNB-001 の効果を解析した。

大脳皮質の神経細胞または海馬スライスに CNB-001（1 μM）を処置し、ウエスタンブロットにより、リン酸化 CaMK および total CaMK 量を定量したところ、CNB-001 は神経における CaMK のリン酸化を促進することが明らかとなった。また、市販のキットで CaMK の活性を測定したところ、CNB-001 は CaMK 活性を増強することも確認された。これに対し、海馬スライスに CNB-001（1 μM）を適用しても、cAMP の濃度の増減は認められなかった。よって、CNB-001 は cAMP 経路には影響せずに CaMK のシグナル伝達経路を活性化することにより、海馬の記憶形成を促す可能性が示唆された。

(2) 前年度の結果を受けて、平成 25 年度および 26 年度は、主に海馬スライス標本を用いた電気生理学的検討により、記憶形成の基礎過程 LTP を測定して、CNB-001 の記憶向上効果の分子メカニズム解明にアプローチした。

まず、通常のシナプス伝達に対する CNB-001 の効果をチェックした。CNB-001（1 μM）を灌流液に溶解して海馬スライスに適用すると、fEPSP に変化は認められなかった。次に、LTP 形成に対する CNB-001 の効果について検討した。対照群のスライスの Schaffer 側枝に弱いテタヌス刺激（100 Hz で 15 発）を与えると、テタヌス刺激後に一過性の fEPSP 増強が認められたが、その後 30 分以内にベースラインに戻った。すなわち、対照群のスライスでは LTP は誘導されなかった。これに対し、CNB-001（1 μM）共存下において、標本に弱いテタヌス刺激を適用したところ、テタヌス刺激後に著しい fEPSP 増大が認められ、さらにこの増大が 1 時間以上持続することが確認された。したがって、CNB-001 は海馬 LTP を促進することが確認された。

(3) LTP の誘導や維持に重要と考えられる受容体やシグナル分子の遮断薬もしくは阻害薬を用いた薬理実験により、CNB-001 の LTP 促進効果の作用機序解明にアプローチした。

NMDA 受容体の選択的遮断薬である 2-amino-5-phosphonovalerate (APV, 50 μ

M) 共存下で CNB-001（1 μM）を海馬スライスに適用し、弱いテタヌス刺激を与えたところ、CNB-001 の LTP 促進効果は観察されなかった。さらに、CaMK の阻害薬である KN-93（10 μM）をスライスに共存させても、CNB-001 による LTP 促進は完全に抑制された。

LTP の誘導・維持には、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ、protein kinase C (PKC) などの分子も重要な役割を担っていることが明らかとなっているので、これらの関与についても検討した。MAP キナーゼキナーゼの阻害薬である U0126（20 μM）を標本に共存させても、CNB-001 による LTP 促進は抑制されなかった。同様に、PKC 阻害薬 Ro 31-8220（10 μM）共存によっても CNB-001 の効果は影響を受けなかった。

以上より、CNB-001 は PKC 経路や MAP キナーゼ経路には影響を及ぼさず、NMDA 受容体および CaMK 依存性機構により、海馬 LTP を促進することが明らかとなった。

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）

- (1) Akaishi T. Memory-enhancing drugs. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2014;143:260-261. 査読あり
<http://doi.org/10.1254/fpj.143.260>
- (2) Ushikubo H, Tanimoto Y, Abe K, Asakawa T, Kan T & Akaishi T. 3,3',4',5'-Tetrahydroxyflavone induces formation of large aggregates of amyloid β protein. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37:748-754. 査読あり
<http://doi.org/10.1248/bpb.b13-00709>

〔学会発表〕（計 3 件）

- (1) 赤石樹泰、青木駿、本村友紀、高橋利昌、佐藤嘉高、Schubert, David、阿部和穂
クルクミン誘導体 CNB-001 は初代培養ミクログリア細胞のリポポリサッカライド誘発 NO 産生を抑制する
第 88 回日本薬理学会年会
平成 27 年 3 月 19 日
名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）
- (2) 赤石樹泰、Maher, Pamela、Schubert, David、阿部和穂
クルクミン誘導体 CNB-001 は NMDA 受容体および CaMK 依存的に海馬長期増強を促進する

第 87 回日本薬理学会年会

平成 26 年 3 月 21 日

東北大学百周年記念会館川内萩ホール、
仙台国際センター（宮城県・仙台市）

(3) 赤石樹泰、Maher, Pamela、Schubert,
David、阿部和穂

新規神経保護薬 J147 は海馬長期増強を
促進する

第 86 回日本薬理学会年会

平成 25 年 3 月 22 日

福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.musashino-u.ac.jp/yakugaku/yakuri/m-yakuri-home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤石 樹泰 (AKAISHI TATSUHIRO)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：90386384

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：