

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08583

研究課題名(和文) Kir6.2チャンネル阻害作用を標的としたアルツハイマー病創薬研究

研究課題名(英文) Drug development of novel Kir6.2 channel inhibitor target for Alzheimer'ddisease

研究代表者

森口 茂樹 (Moriguchi, Shigeki)

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：70374949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは既存の認知症治療薬であるメマンチンの新しい作用機序として、KATPチャンネル抑制作用を発見した。そこで申請者らはKATPチャンネル発現細胞を用いて、メマンチンとは異なる構造を持つシーズ化合物(アダマンタン誘導体)をスクリーニングして、メマンチンに比べて強力にKir6.2チャンネルを抑制する化合物(本剤)を含む化合物群を創製した。本剤は、マウスによる実験で強力なKir6.2チャンネル抑制作用による認知機能改善効果(AD中核症状)に加えてKir6.1チャンネル抑制作用によるうつ症状・不安症状・攻撃症状などのAD周辺症状(BPSD)を改善することが確認された。

研究成果の概要(英文)：We recently discovered a novel mechanism of memory improvement by memantine via inhibition of ATP-sensitive K⁺ (KATP) channels. Inhibition of Kir6.2 channel by memantine improved brain insulin signaling. These results relate to brain diabetes theory causative for Alzheimer's disease. Therefore, we have searched the novel seed compounds among adamantane derivatives with blocking action of KATP channels. We successfully discovered novel adamantane derivative, TP-compound X targeting for KATP channels, which is more potent than memantine. In the pharmacological examination, we confirmed that TP-compound improves both cognitive deficits via Kir6.2 channel inhibition and behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) such as depressive-like behaviors, anxiety-like behaviors and aggressive-like behaviors via Kir6.1 channel inhibition in mice.

研究分野：神経薬理学

キーワード：メマンチン KATPチャンネル アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

日本では高齢化社会に伴いアルツハイマー病 (AD) 患者の増加は深刻な社会問題である。2013 年 6 月に厚生労働省が発表した「認知症有病率等調査」によると、65 歳以上の認知症有病率は 15% で、約 462 万人と推計されており、予備軍も約 400 万人いると言われている。経済産業省の技術戦略マップ 2010 においても、AD は糖尿病とがん に並ぶ重要疾患に位置付けられ、技術開発の一つの柱は「認知機能維持・回復のための治療」であり、新規作用機序を持つ医薬品の開発を挙げている。具体的には、AChE 阻害剤など対症療法、secretase 阻害剤や amyloid- β ・tau 免疫療法などの根本治療薬の開発である。最近の研究により AD 患者の脳内では amyloid- β の凝集・沈着が進行性神経変性疾患を惹起し、認知機能障害を誘発することが明らかになった。一方、進行性神経変性疾患に注目した研究として、ACh 神経系の機能低下に注目した ACh 賦活化作用をもつ AChE 阻害剤が開発され、donepezil、rivastigmine および galantamine が承認を受けた。また、神経細胞保護効果に注目した NMDA 受容体阻害剤である memantine も同様に承認を受けた。日本では最近、rivastigmine、galantamine および memantine が新たに承認を受けたが、長年、donepezil のみが利用可能な状況が続き、欧米に遅れを取っている状況である。しかしながら、これらの治療薬の効能は十分ではなく、悪心、嘔吐、下痢等の副作用も認められ、AD 患者の quality of life (QOL) と症状を長期に改善する治療薬は存在していない。

2. 研究の目的

本研究では、「**ATP 感受性カリウムチャネル (Kir6.2) 阻害による AD 創薬**」を目標とする。申請者は、memantine のマウスへの急性適応では NMDA 受容体阻害作用を強く発現するが、逆に、慢性適応では

Kir6.2 チャネル阻害による神経細胞膜の閾値上昇を介して細胞内カルシウム流入を促進し、CaM kinase II の活性上昇により認知機能を改善することについて AD モデルマウス (APP23 マウス) を用いて明らかにした (Moriguchi et al., Mol. Psychiatry 2018)。本研究課題では、岩淵好治教授 (東北大学) により作製した memantine の構造異性体 (47 種類) の新規アダマンタン誘導体の中から **カルシウムイメージング法による細胞内カルシウム濃度の上昇効果**、および **whole-cell patch-clamp 法による Kir6.2 チャネルを介する細胞内カリウム電流の阻害効果** を指標として Kir6.2 選択的シード化合物を同定する。さらに、APP23 マウスの認知機能障害に対する改善効果について行動薬理学、電気生理学、生化学的手法により解析してアダマンタン誘導体の作用機序を解明する。

3. 研究の方法

1) Kir6.2 チャネル過剰発現 Neuro2A 細胞によるカルシウムイメージング解析

本研究課題では、新規アダマンタン誘導体 (47 種類) の中より、Kir6.2 チャネルの過剰発現 Neuro2A 細胞を用いて、カルシウムイメージング法により細胞内カルシウム濃度の上昇効果を有する化合物を同定する。

2) Kir6.2 チャネル過剰発現 Neuro2A 細胞による whole-cell patch-clamp 解析

Kir6.2 チャネルの過剰発現 Neuro2A 細胞を用いた memantine による whole-cell patch-clamp 解析の結果、memantine は Kir6.2 チャネルを介するカリウム電流を阻害することを明らかにした本研究課題では、新規アダマンタン誘導体 (47 種類) の中より、Kir6.2 チャネルの過剰発現 Neuro2A 細胞を用いて、whole-cell patch-clamp 法により Kir6.2 チャネル阻害作用を有する化合物を同定する。

3) アダマンタン誘導体シード化合物の APP23 マウスを用いた行動薬理的解析

APP23 マウスは、amyloid- β の凝集、沈着

が認められる AD モデルマウスであり、12 ヶ月齢で有意な認知機能障害を惹起する。本研究課題では、アダマンタン誘導体シード化合物を慢性適応し、APP23 マウスにおける認知機能障害が有意に改善するかについて行動薬理的解析を行う。記憶学習行動の行動解析法として、Y-maze task、Novel object recognition task、Passive avoidance task、Barnes-maze task を用いる。

4) アダマンタン誘導体シード化合物の APP23 マウスを用いた電気生理学的解析

申請者は、APP23 マウス(12 ヶ月齢)の海馬 CA1 領域において記憶学習のシナプス可塑性の指標である LTP の有意な減弱を明らかにした (Moriguchi et al., Mol. Psychiatry 2018)。本研究課題では、アダマンタン誘導体シード化合物を慢性適応し、APP23 マウスにおいて減弱が認められている LTP 改善効果について電気生理学的解析 (whole-cell patch-clamp 法) を行う。さらに、Paired-pulse facilitation 法および input/output 解析法を用いて、シナプス前・後部における作用部位について明らかにする。

5) アダマンタン誘導体シード化合物の APP23 マウスを用いた生化学的解析

免疫プロット法を用いて、APP23 マウスにおける認知機能障害を改善するアダマンタン誘導体シード化合物の細胞内機序について解析する。Kir6.2 阻害作用により細胞内のカルシウム濃度上昇が考えられることから、記憶学習に関連するカルシウムシグナルに注目し、CaM kinase II、CaM kinase IV、ERK、Protein kinase B および Protein kinase C 等の活性化機構について明らかにする。

6) アダマンタン誘導体シード化合物の APP23 マウスを用いた免疫組織化学的解析

APP23 マウスの海馬 CA1 領域におけるアダマンタン誘導体シード化合物の細胞内

機序の解析後、活性化が確認された分子の局在について、免疫組織化学的手法により解析する。Kir6.2 は spine に局在が確認されているので、spine に共局在する分子の同定、および NMDA 受容体、AMPA 受容体および膜電位依存性カルシウムチャンネルとの共局在の可能性について明らかにする。

7) 各遺伝子欠損マウスを用いたアダマンタン誘導体シード化合物の作用機序の確認

APP23 マウスの解析によるアダマンタン誘導体シード化合物の細胞内機序の同定後、各種遺伝子欠損マウスを用いて、アダマンタン誘導体シード化合物により活性化する分子の同定を記憶学習に関連する行動解析、電気生理学的解析、免疫プロット法による生化学的解析により確認する。申請者は、Kir6.1 および Kir6.2 欠損マウス、CaM kinase II 欠損マウス、CaM kinase IV 欠損マウスを所有しており、本研究課題において上記のマウスを活用する。

4. 研究成果

Memantine が Kir6.2 チャンネル抑制作用により脳インスリンシグナルを賦活化するという発見は、アルツハイマー病 (AD) の脳糖尿病仮説を実証する最初の報告である。そこで申請者らは Kir6.2 チャンネル発現細胞を用いて、メマンチンとは異なる構造を持つシーズ化合物 (アダマンタン誘導体) をスクリーニングして、メマンチンに比べて強力に Kir6.2 チャンネルを抑制する化合物 (本剤) を含む化合物群を創製した。物質特許を取得するために、2017 年 1 月 26 日 (PCT/JP2017/002760) に PCT 出願した。本剤は、マウスによる実験で強力な Kir6.2 チャンネル抑制作用による認知機能改善効果 (AD 中核症状) に加えて Kir6.1 チャンネル抑制作用によるうつ症状・不安症状・攻撃症状などの AD 周辺症状 (BPSD) を改善することが確認された。さらに本剤は、神経

伝達作用もしくは $A\beta$ を標的とした薬剤ではないにも関わらず、 $A\beta$ 蓄積を抑制することが確認された。本剤は 1nM 以上の非常に低濃度の作用により Kir6.2 チャネル抑制作用を介して細胞内 Ca^{2+} 流入を促進し認知機能改善効果を示すことから、低用量での薬効が期待できる。特に、memantine では 10 μ M 以上において培養神経細胞における神経細胞死が観察されるが、本剤では 100 μ M の濃度において神経細胞死は確認されず、非常に安全な化合物である。また、本剤には memantine と異なり、NMDA 受容体阻害作用は認められない。本剤は既に構造活性相関の検討を行い、化合物の構造最適化が終了しており、採択後は大量合成方法の検討に入ることが可能である。本プロジェクトにおいて、本剤による新規の作用機序 (Kir6.1/6.2 チャネル抑制作用) による新しい認知症の創薬が可能となれば、既存薬に取って代わる画期的新薬になる。AD に代表される認知症の認知機能改善効果に加えて、うつ症状、不安症状・攻撃症状、徘徊などの AD 周辺症状を改善する治療薬が期待できる。本剤は AD の脳インスリンシグナルを改善する世界初の疾患修飾薬となり得る可能性がある。

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 9 件)

1. Shigeki Moriguchi, Satomi Kita, Masahiro Fukaya, Makoto Osanai, Ryo Inagaki, Yuzuru Sasaki, Hisanao Izumi, Kyoji Horie, Junji Takeda, Takashi Saito, Hiroyuki Sakagami, Takaomi C Saido, Takahiro Iwamoto and Kohji Fukunaga: Reduced expression of Na^+/Ca^{2+} exchanges is associated with cognitive deficits seen in Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology* 131, 291-303 (2018) doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.037. (査読あり)
2. Shigeki Moriguchi, Satomi Kita, Yasushi Yabuki, Ryo Inagaki, Hisanao Izumi, Yuzuru Sasaki, Hideaki Tagashira, Kyoji Horie, Junji Takeda, Takahiro Iwamoto and Kohji Fukunaga: Reduced CaM kinase II and CaM kinase IV activities underlie cognitive deficits in NCKX2 heterozygous mice. *Mol. Neurobiol.* 55(5), 3889-3900 (2018) doi: 10.1007/s12035-017-0596-1. (査読あり)
3. Shigeki Moriguchi, Toru Ishizuka, Yasushi Yabuki, Norifumi Shioda, Yuzuru Sasaki, Hideaki Tagashira, Hiromu Yawo, Jay Z Yeh, Hiroyuki Sakagami, Toshio Narahashi and Kohji Fukunaga: Blockade of the K_{ATP} channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy. *Mol. Psychiatry* 23 (2), 211-221 (2018) doi: 10.1038/mp.2016.187. (査読あり)
4. Yasushi Yabuki, Kazuya Matsuo, Kohga Hirano, Yasuharu Shinoda, Shigeki Moriguchi and Kohji Fukunaga: Combined memantine and donepezil treatment improves behavioral and psychological symptoms of dementia-like behaviors in olfactory bulbectomized mice. *Pharmacology* 99 (3-4), 160-171 (2017) doi: 10.1159/000452839. (査読あり)
5. Kohji Fukunaga and Shigeki Moriguchi: Stimulation of the sigma-1 receptor and the effects on neurogenesis and depressive behaviors in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.* 964, 201-211 (2017) doi: 10.1007/978-3-319-50174-1_14. (査読あり)
6. Ji-Yun Huang, Yun Tian, Hui-Juan Wang, Hong Shen, Huan Wang, Sen Long, Mei-Hua Liao, Zhi-Rong Liu, Ze-Ming Wang, Dan Li, Rong-Rong Tao, Tian-Tian Cui, Shigeki Moriguchi, Kohji Fukunaga, Feng Han and Ying-Mei Lu: Functional genomic analyses identify pathways dysregulated in animal model of autism. *CNS Neurosci. Ther.* 22 (10), 845-853 (2016) doi: 10.1111/cns.12582. (査読あり)
7. Kenta Murata, Yuta Yoshino, Kazuhiro Tsuruma, Shigeki Moriguchi, Atsushi Oyagi, Hirotaka Tanaka, Mitsue Ishisaka, Masamitsu Shimazawa, Kohji Fukunaga and Hideaki Hara: The extracellular fragment of GPNMB (Glycoprotein nonmelanosoma protein B, osteoactivin) improves memory and increases hippocampal GluA1 levels in mice. *J. Neurochem.* 132 (5), 583-594 (2015) doi: 10.1111/jnc.13010. (査読あり)
8. Shigeki Moriguchi, Hiroyuki Sakagami,

Yasushi Yabuki, Yuzuru Sasaki, Hisanao Izumi, Chen Zhang, Feng Han and Kohji Fukunaga: Stimulation of sigma-1 receptor ameliorates depressive-like behaviors in CaMKIV null mice. *Mol. Neurobiol.* 52 (3), 1210-1222 (2015) doi: 10.1007/s12035-014-8923-2. (査読あり)

9. Shigeki Moriguchi, Miyuki Nishi, Yuzuru Sasaki, Hiroshi Takeshima and Kohji Fukunaga: Aberrant behavioral sensitization by methamphetamine in junctophilin deficient mice. *Mol. Neurobiol.* 51 (2), 533-542 (2015) doi: 10.1007/s12035-014-8737-2. (査読あり)

[学会発表](計 22件)

1. Demonstration of brain diabetes theory of Alzheimer's disease

森口茂樹、福永浩司 (第47回日本神経精神薬理学会年会(シンポジウム) 9/28-30/2017 札幌)

2. Dysregulation of amygdala-dependent fear memory in corticosterone-treated mice

稲垣良、森口茂樹、福永浩司 (第47回日本神経精神薬理学会年会 9/28-30/2017 札幌)

3. Abnormal amygdala-dependent fear memory in corticosterone-treated mice

稲垣良、森口茂樹、福永浩司 (第60回日本神経化学学会大会 9/7-9/2017 仙台)

4. Memantine improves cognitive deficits in APP23 mice via K_{ATP} channel inhibition

森口茂樹、矢吹梯、福永浩司 (第60回日本神経化学学会大会 9/7-9/2017 仙台)

5. K_{ATP} チャネルを標的としたアルツハイマー病脳糖尿病仮説の実証

森口茂樹、福永浩司 (医療薬学フォーラム 2017 (シンポジウム) 7/1-2/2017 鹿児島)

6. カルシウム恒常性破綻による難治性うつ症状とその治療法

森口茂樹、福永浩司 (第90回日本薬理学会年会(シンポジウム) 3/15-17/2017 長崎)

7. $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化によるCaMKIV欠損マウスのうつ様症状の改善効果

稲垣良、森口茂樹、阪上洋行、福永浩司 (第90回日本薬理学会年会 3/15-17/2017 長崎)

8. Reduced CaM kinase II and CaM kinase IV activities mediate cognitive deficits in NCKX2 heterozygous mice

森口茂樹、喜多紗斗美、矢吹梯、堀江恭二、竹田潤二、岩本隆宏、福永浩司 (第59回日本神経化学学会大会 9/7-9/2016 福岡)

9. 難治性うつ病の新たな治療展開

森口茂樹、福永浩司 (第18回応用薬理シンポジウム 8/5-6/2016 名古屋)

10. リチウムによるDGK β KOマウスの記憶及び感情障害の改善には、PIP2の減少とPKC γ の活性抑制が関与している

沖本航、中井寛子、石坂光絵、中西広樹、森口茂樹、上田修司、山之上稔、福永浩司、佐々木雄彦、原英彰、白井康仁 (第58回日本脂質生化学会 6/9-10/2016 秋田)

11. Reduction of PIP2 and subsequent normalization of PKC γ activity are involved in the lithium-induced recovery of memory and emotional impairments in DGK β KO mice.

Wataru Okimoto, Mitsue Ishisaka, Hiroki Nakanishi, Shigeki Moriguchi, Shuji Ueda, Minoru Yamanoue, Kohji Fukunaga, Takehiko Sasaki, Hideaki Hara and Yasuhito Shirai. (LIPID MAPS Annual Meeting 2016 5/17-18/2016 La Jolla USA)

12. CaMキナーゼII賦活化による新しい記憶学習機構

森口茂樹、福永浩司 (第89回日本薬理学会年会(シンポジウム) 3/9-11/2016 横浜)

13. Sigma-1 receptor stimulation improves depressive-like behaviors and adult hippocampal neurogenesis in CaMKIV null mice.

Shigeki Moriguchi, Hiroyuki Sakagami and Kohji Fukunaga. (*Neuroscience* 2015 (45th. Society for Neuroscience) 10/17-21/2015 Chicago USA)

14. カルシウム恒常性破綻による認知・精神機能障害に関する神経精神薬理学的研究(学術奨励賞受賞講演)

森口茂樹 (第45回日本神経精神薬理学会年会 9/24-26/2015 東京)

15. Abnormal fear memory via enhancement of CaM kinase II and IV activities in Na^+/Ca^{2+} exchanger type-1 heterozygous mice

森口茂樹、泉久尚、喜多紗斗美、阪上洋行、岩本隆宏、福永浩司 (第45回日本神経精神薬理学会年会 9/24-26/2015 東京)

16. NCKX2欠損マウスにおける認知機能障害の細胞内機序

森口茂樹、喜多紗斗美、矢吹梯、泉久尚、堀

江恭二、竹田潤二、岩本隆宏、福永浩司 (第66回日本薬理学会北部会 9/18/2015 富山)

17. Dysregulation of fear memory and CaM kinase II activity in NCX1 heterozygous mice
森口茂樹、泉久尚、喜多紗斗美、阪上洋行、岩本隆宏、福永浩司 (第58回日本神経化学会大会 9/11-13/2015 大宮)

18. Sigma-1 receptor agonist and fluvoxamine rescue depressive behaviors in CaMKIV null mice.
Kohji Fukunaga, Hiroyuki Sakagami and Shigeki Moriguchi (Experimental Biology 2015 3/28-4/2/2015 Boston)

19. アルツハイマー病モデルマウスにおける NCX 輸送体の機能障害
森口茂樹 (日本薬学会第135年会(シンポジウム) 3/25-28/2015 神戸)

20. NCX ヘテロマウスのうつ様行動と海馬における神経新生障害
泉久尚、森口茂樹、佐々木譲、喜多紗斗美、阪上洋行、岩本隆宏、福永浩司 (日本薬学会第135年会(大学院生シンポジウム) 3/25-28/2015 神戸)

21. Sigma-1 受容体賦活化によるミトコンドリア機能制御とうつ病治療法の確立
森口茂樹、福永浩司 (第88回日本薬理学会年会(シンポジウム) 3/18-20/2015 名古屋)

22. Depression-like behaviors in NCX hetero-deficient mice.
Hisanao Izumi, Shigeki Moriguchi, Satomi Kita, Takahiro Iwamoto and Kohji Fukunaga (12th Korea-Japan joint symposium of brain sciences, and cardiac and smooth muscle sciences 1/22-25/2015 Yongin Korea) YIA 受賞

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

1. 名称: アダマンチルメチルアミン誘導体およびその医薬としての使用
発明者: 森口茂樹、福永浩司、岩淵好治
権利者: 国立大学法人 東北大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2018/13853
出願年月日: 2018年3月30日
国内外の別: 国外

2. 名称: アダマンチルメチルアミン誘導体およびその医薬としての使用
発明者: 森口茂樹、福永浩司、岩淵好治
権利者: 国立大学法人 東北大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-150290
出願年月日: 2017年8月2日
国内外の別: 国内

3. 名称: アダマンタン誘導体およびその使用
発明者: 森口茂樹、福永浩司、岩淵好治
権利者: 国立大学法人 東北大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2017/002760
出願年月日: 2017年1月26日
国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakuri/yakuri_top.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
森口茂樹 (Moriguchi, Shigeki) (東北大学・大学院薬学研究科・講師)

研究者番号: 70374949

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
福永浩司 (Fukunaga, Kohji) (東北大学・大学院薬学研究科・教授)

研究者番号: 90136721

(4) 研究協力者 ()