

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06766

研究課題名(和文)ハーブ精油成分の新機能に基づく認知症の先制医療に向けたアミロイドβの制御法の開発

研究課題名(英文) A new approach for the development of dementia prevention aiming at preemptive medicine based on the regulation of amyloid-beta levels by unused functions of biophenols and existing drugs

研究代表者

吉田 秀見 (Yoshida, Hidemi)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：40201008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト神経細胞モデル(SH-SY5Y細胞)において、胃炎・胃潰瘍治療剤レバミピドが、高毒性の外来Aβ₁₋₄₃(Aβ₄₃)ペプチドによるcell viabilityの低下を改善することを見いだした。また、レバミピドは内因性Aβ₁₋₄₂(Aβ₄₂)の産生を抑制した。

次に、天然由来バイオフィフェノールのグネチンCが、同じくトランスレスベラトロール二量体である-ピニフェリンやレスベラトロール単量体に比べ、より効果的に内因性Aβ₄₂産生を抑制し、さらに外来Aβ₄₂によるcell viabilityの低下を改善することを明らかにした。

以上の成果はアルツハイマー型認知症の予防につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that rebamipide, a gastrointestinal protective drug, partially ameliorated the reduced cell viability observed after the treatment of Aβ₁₋₄₃ (Aβ₄₃; a higher neurotoxic Aβ peptide) in a cultured model of human neurons (SH-SY5Y human neuroblastoma cells). In addition, rebamipide reduced endogenous Aβ₁₋₄₂ (Aβ₄₂) secretion.

Next, we found that gnetin C, a trans-resveratrol dimer isolated from melinjo, efficiently reduced Aβ₄₂ production. The effect of gnetin C was higher than that of -viniferin (a trans-resveratrol dimer isolated from grape vine) or resveratrol monomer. Furthermore, gnetin C significantly ameliorated the exogenous Aβ₄₂-lowered cell viability.

These results may lead to the development of means for preventing Aβ-mediated diseases, particularly Alzheimer's disease.

研究分野：脳神経血管病態学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイドβ レバミピド グネチンC レスベラトロール二量体 -ピニフェリン
レスベラトロール 認知症予防

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病の発症機構として、「アミロイドカスケード仮説」、「オリゴマー仮説」、「タウ仮説」などが提唱されている(引用文献)。近年、脳実質内でアミロイド(A)が可溶性オリゴマーを形成・集積し、それが老人斑の形成とは無関係に神経細胞を傷害することがわかってきた(引用文献)。この事実は「オリゴマー仮説」の重要性を示している。

(2) Aペプチドはアミロイド前駆体タンパク質(APP)が部位と部位でそれぞれの切断酵素及びセクレターゼにより断片化されて生成する(図1)。一方、A内部の部位を切断するセクレターゼがセクレターゼより優位にAPPに作用すればAの減少につながる。

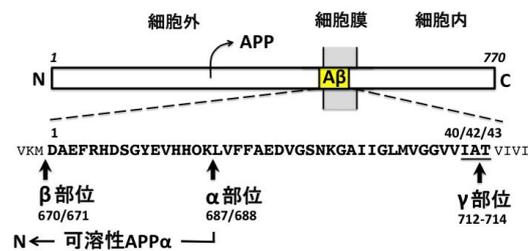


図1 アミロイド前駆体タンパク質(APP)とAβ

(3) 認知症の内訳はアルツハイマー病が約60%、脳血管性認知症が20%を占める。また、アルツハイマー病の40%で脳血管病変の合併がみられ、脳血管性認知症の40%で剖検脳にアルツハイマー病変が認められる(引用文献)。両病変は近縁の病態を相互に悪化させるため、同時対応も視野に入れておく必要がある。

(4) 脳卒中への対応に関して、脳梗塞急性期の脳保護薬エダラポンは、実験的脳虚血において、フリーラジカルのなかで特に細胞傷害性の高いヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)を減少させる。私たちは低酸素で培養したアストロサイトにおいて、エダラポンが脳浮腫の一因ともなる血管内皮増殖因子 VEGF の発現増加を中等度に抑制すること(引用文献)。さらに、神経細胞の生存に必須の神経成長因子 NGF の発現を誘導することを明らかにした(引用文献)。つまり、エダラポンはラジカル消去作用とは別の新しい機能として、増殖・成長因子の発現を脳保護的に制御することが初めて示された。このように、既存薬には予想外の有用な機能が知られずにいる場合がある。

(5) 認知機能障害への対応に関して、私たちは、ハーブ油に含まれるカルノシン酸による転写因子 Nrf2 の活性化がアストロサイトの NGF を発現誘導すること(引用文献)。カルノシン酸がエダラポンとの併用で NGF の分泌を相乗的に高めること(引用文献)。さら

には、カルノシン酸がヒト神経細胞モデルとアストロサイトの内因性 A 分泌を抑制することを見出した(引用文献及び)(図2はアストロサイトの例)。

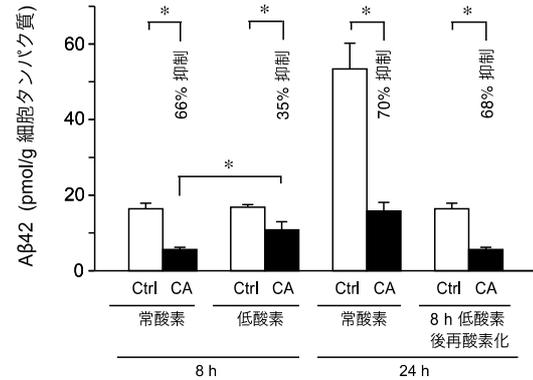


図2 カルノシン酸(CA)によるAβ分泌抑制

(6) 特に注目した点は、両神経系細胞における内因性 A 分泌の抑制がカルノシン酸によるセクレターゼの活性化によること(引用文献及び)、並びに、アストロサイトでは、低酸素・再酸素化でも A 分泌の抑制が保たれることである(引用文献)。この A 抑制が酸素条件に影響されないことは、脳血管性も含めた認知症の多様な病態に対応できる点で有利である。また、親油性のカルノシン酸が血液脳関門を通過して脳実質内に移行することも応用に適している。カルノシン酸のように、日常生活で摂取可能な天然有機成分には A 抑制機能をもつものがあり、その有効な活用法を開発することが期待される。

(7) 興味深いことに、私たちは培養神経細胞モデルを用いた予備実験において、カルノシン酸や長寿遺伝子 Sirt1 誘導剤、既存の胃潰瘍・胃炎治療薬などとエダラポンとの組み合わせによる A 分泌抑制が、カルノシン酸単独による効果を上回る場合があることを見出した(未発表)。そこで本研究を進めていくための作業仮説(図3はその一部)を立てるに至った。

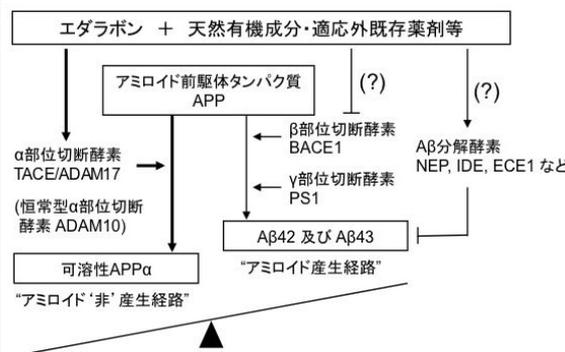


図3 Aβ産生の制御機構(仮説)

2. 研究の目的

(1) アルツハイマー病の主な原因とされる

脳内 A の集積による神経細胞毒性の抑制法を開発することを目的とする。そのために、独自研究の“ハーブ油成分（カルノシン酸）のもつアミロイド非産生経路への誘導機能に基づく A 産生の抑制法”を発展させ、既存脳保護薬とともに協調作用をもつ天然有機成分や適応外既存薬の単独・併用効果を細胞レベルで検討する。

(2) それにより、細胞からの A モノマーの分泌とオリゴマー化、並びに、それがもたらす神経細胞毒性の抑制について、安全で効率的な最適条件を見つける。さらに、その効能の裏付けとなるメカニズムを解明し、遺伝的背景に依らない認知症に対する先制医療への応用につなげるための基礎データを得る。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞のモデルとして、先行研究でデータの蓄積があり、入手・培養が容易な培養 SH-SY5Y ヒト神経芽腫細胞株（図 4）を用いた（雑誌掲載論文 及び ）。この細胞は

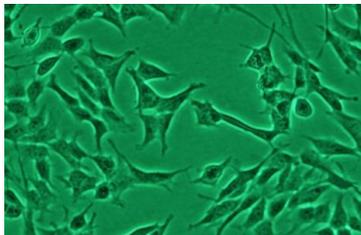


図4 SH-SY5Yヒト神経芽腫細胞

SK-N-SH ヒト神経芽腫細胞のサブラインのひとつであり、その特徴として、ドパミン ヒドロキシラーゼ活性を持ち、グルタミン酸を アミノ酪酸 GABA に変換できる。

(2) 薬剤や天然有機成分、A による細胞毒性の指標として cell viability を解析するために MTT 法を用いた。

(3) mRNA の発現解析には定量 PCR 法を、A モノマー及びオリゴマー、その他のタンパク質の解析には ELISA 法や Western blot 法を用いた。

(4) 薬剤誘導による遺伝子発現の検証のために RNA 干渉法を用いた。

4. 研究成果

(1) アミノ酸残基数が 43 の A₁₋₄₃ (A₄₃) は神経細胞への毒性が A₁₋₄₂ (A₄₂) と同等以上に高い。研究開始当初に注目した既存薬の中で、中枢神経系への影響が未検討だった胃炎・胃潰瘍治療剤レバミピドが、30~100 nM の濃度で、A₄₃ 処理 (10 μM) による培養神経細胞モデルの cell viability 低下を改善することを見いだした。加えて、レバミピドは細胞からの内因性 A₄₂ の産生を抑制するという新知見も得られた。A₄₂ は細胞毒性が A₄₃ に近いにもかかわらず A₄₃ の約 10 倍の量が神経系細胞から定常的に

産生されている。このように、レバミピドはこれまで知られていなかった機能として、細胞自身が産生する A と外来 A による細胞毒性の両方を抑制する効果をもつことが明らかにされた。その機序として、レバミピドは、外来 A₄₃ の細胞内オリゴマー化を抑制するとともに、セクレターゼ TACE や A 分解酵素 neprilysin、同酵素 MMP-14 の発現を増強することが分かった（図 5：雑誌論文欄の ）。

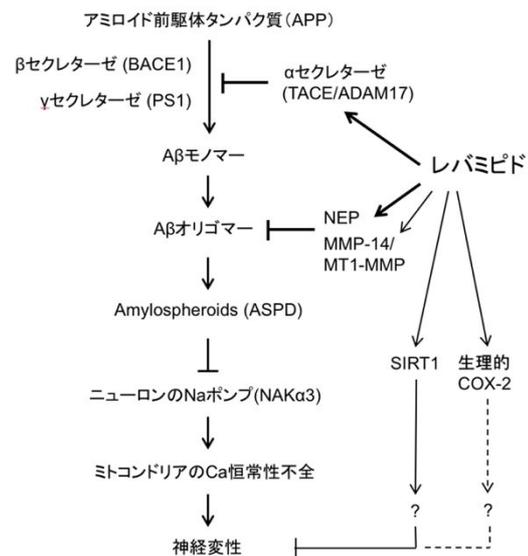


図5 レバミピドによる神経毒 A β の抑制機序

私たちは、A が脳細胞から産生される出発点と引き続いて起こる A オリゴマー化の初期段階に焦点を当て研究を進めてきた。1 で述べた中でも特に、私たちはハーブ油成分（カルノシン酸）の新機能、すなわち、“セクレターゼの発現誘導により セクレターゼを相対的に抑制し A 産生を抑制する機能”（引用文献 及び ）並びに、“外来 A による細胞毒性を細胞内オリゴマー化抑制により軽減する機能”（引用文献 ）に着目した。本研究は、それらの機能を適応外既存薬レバミピドにも見いだした点が斬新である。

レバミピド錠 100 mg を経口投与した場合の血漿における最高濃度は 216 μg/L (582 nM) である。また、動物実験データによると、血漿中の 40.7% に相当する濃度のレバミピドが脳実質で認められることから、脳実質でのレバミピドの最高濃度は 237 nM と見積もることができる。これは 4 . (1) の結果に照らして、レバミピドによる A 産生抑制や A 毒性軽減が脳内でも機能し得るレベルであることを意味する。したがって胃炎・胃潰瘍治療剤という適応外既存薬の服用がアルツハイマー病の予防につながる可能性が開かれたと言える。

(2) 培養神経細胞モデルにおいて天然由来

レスベラトロール二量体であるグネチンCが、同じくトランスレスベラトロール二量体である -ピニフェリンやレスベラトロール単量体に比べ、より効果的に A₄₂ 産生を抑制し、さらに外来 A₄₂ モノマー (10 μM) による cell viability の低下を改善することを明らかにした。その効果は、これまで取り上げてきたハーブ油成分(カルノシン酸)レスベラトロール、エダラボン、レバミピドの単独及び協調効果を上回った。A₄₂ 産生の抑制においてグネチンCは、A₄₂ 産生を担う酵素である BACE1 (セクレターゼ) の発現を抑制し、高濃度 A₄₂ の細胞への曝露においては A₄₂ の細胞内への移行及びその細胞内オリゴマー化を抑制した。同時に、グネチンCは A₄₂ 曝露の有無によらず、A₄₂ 分解酵素の一つである MMP-14 の発現を増強した(図6:雑誌論文欄の)。

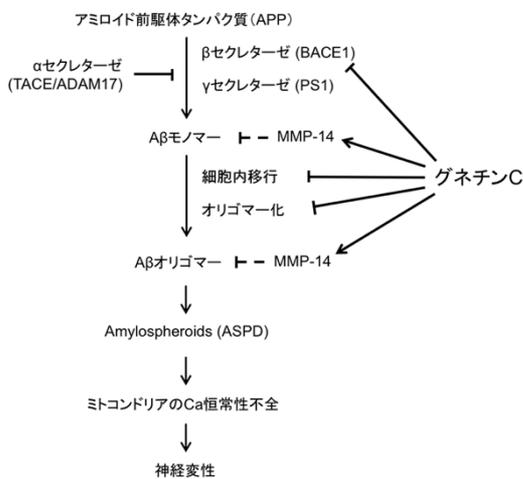


図6 グネチンCによる神経毒A_βの抑制機序

内因性 A₄₂ の産生抑制におけるグネチンCの作用機序は、セクレターゼの発現誘導ではなくセクレターゼの抑制を介する点で、カルノシン酸(引用文献及び)やレバミピド(図5:雑誌論文欄の)による抑制機序とは異なっている。一方、A₄₂ 分解酵素 MMP-14 の発現を増強する点で、レバミピドと類似性をもつ。注目すべきことに、外来 A₄₂ の細胞内オリゴマー化を抑制する働きは、カルノシン酸やレバミピドと同様にグネチンCにも備わっており、しかも、その効果は外来 A₄₂ の細胞内への移行を抑制する働きと相まってより強力である。

(3) レバミピドやグネチンCで今回見つけた機能(図5及び6)は、既存の認知症治療薬であるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体阻害薬等のそれとは標的分子や作用機序が全く異なる。また、細胞間隙の A₄₂ はアストロサイトやミクログリアに取り込まれ、血中にも排出されるが、本研究はそのような A₄₂ クリアランスシステムからのア

プローチとも異なる。アルツハイマー病の90%以上は遺伝子変異を伴わない孤発例である。したがって、以上の研究成果は遺伝的背景に依らない点で応用可能な対象範囲が広い。神経毒 A₄₂ の形成・集積に対するより安全で有用な抑制法開発につながる事が期待される。

(4) 当初の立案では、適応外既存薬や天然有機成分等の単独での検討に加えて、既存のフリーラジカル消去剤の新しい脳保護機能も活用し、それを他剤と協調的に併用して最大の効能を引き出すという戦略を掲げた。今回、A₄₂ 産生を抑制し A₄₂ 細胞毒性を抑制するような、エダラボンを含む数種類の薬剤群の協調効果について、培養神経細胞モデルにおいて至適条件をほぼ絞り込んだものの、機序の解明に至らなかった。それを上回るグネチンCの効果を途中で発見し、方策を切り替えたことによる。

しかしながら、1.の(3)で触れたように認知症にはアルツハイマー病と脳血管障害の合併が少なくないことから、それを念頭にいた脳保護薬(エダラボン)と他剤(グネチンCなどの天然有機成分も含めて)との協調効果の追究にも依然として意義があると考える。高齢者への多剤併用(ポリファーマシー)対策を弱めない範囲で、今後の検討課題となり得るだろう。

天然有機成分を用いての A₄₂ 毒性緩和に関する基礎研究は、私たちの研究を含めていくつか散見される。しかし、認知症における複合的病態をも視野に入れた、薬剤と天然有機成分との併用に関する研究は少ない。厚生労働省の予測では、国内の認知症患者は、2012年の約462万人から2025年には700万人まで増加し、うち90%をアルツハイマー病が占めるといふ。その予防と治療への対策の重要性は、高齢化の急進に伴い増している。アルツハイマー病及び脳血管性認知症の回避・軽減につながり、しかも遺伝的背景に依らず汎用性の高い予防法開発の進展が引き続き期待される。

<引用文献>

- 若林孝一, 三木康生. アミロイドの神経病理. 「脳への沈着」と「脳からの排出」. BRAIN and NERVE, 2013; 65: 1433-1444.
- Tomiyama T, *et al.* A mouse model of amyloid oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss *in vivo*. J Neurosci, 2010; 30: 4845-4856.
- Skoog I, *et al.* Vascular factors and Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1999; 13 (Suppl 3): S106-S114.
- Ishikawa A, *et al.* Edaravone inhibits the expression of vascular endothelial

growth factor in human astrocytes exposed to hypoxia. *Neurosci Res*, 2007; 59: 406-412.

Yoshida H, *et al.* Edaravone improves the expression of nerve growth factor in human astrocytes subjected to hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res*, 2010; 66: 284-289.

Mimura J, *et al.* Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes. *J Biochem*, 2011; 150: 209-217.

Yoshida H, *et al.* Edaravone and carnosic acid synergistically enhance the expression of nerve growth factor in human astrocytes under hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Res*, 2011; 69: 291-298.

Meng P, *et al.* Carnosic acid suppresses the production of amyloid-1-42 by inducing the metalloprotease gene TACE/ADAM17 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res*, 2013; 75: 94-102.

Yoshida H, *et al.* Carnosic acid suppresses the production of amyloid-1-42 and 1-43 by inducing an -secretase TACE/ADAM17 in U373MG human astrocytoma cells. *Neurosci Res*, 2014; 79: 83-93.

Meng P, *et al.* Carnosic acid attenuates apoptosis induced by amyloid-1-42 or 1-43 in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res*, 2015; 94: 1-9.

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 18 件)

Seino S, Kimoto T, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Hayakari R, Seya K, Kawaguchi S, Tsuruga K, Tanaka H, Imaizumi T. Gnetin C, a resveratrol dimer, reduces amyloid-1-42 (A₄₂) production and ameliorates A₄₂-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomed Res (Tokyo)*, 査読有, 2018; 39(3), 105-115. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres/-char/en> Imaizumi T, Arai A, Kawaguchi S, Hayakari R, Matsumiya T, Seya K, Yoshida H, Tanaka H. Retinoic acid-inducible gene-1, melanoma differentiation-associated gene 5 and CXCL10 are induced by a TLR3 agonist in human brain microvascular endothelial cells. *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有,

2018; in press.

吉田秀見, 今泉忠淳, 松宮朋穂, 瀬谷和彦. Lp-PLA₂の遺伝子多型と疾患. *臨床化学*, 査読無, 2018; 47(2): 122-127. http://jscc-jp.gr.jp/?page_id=3053#47_02

Arai A, Yoshida H, Hayakari R, Matsumiya T, Kawaguchi S, Seya K, Tanaka H, Imaizumi T. Expression of CCL5 is induced by polyinosinic-polycytidylic acid in cultured hCMEC/D3 human brain microvascular endothelial cells. *Clin Exp Neuroimmunol*, 査読有, 2017; in press.

Imaizumi T, Hayakari Y, Watanabe S, Aizawa T, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Kawaguchi S, Tanaka H. Cylindromatosis (CYLD), a deubiquitinase, attenuates inflammatory signaling pathway by activating Toll-like receptor 3 in human mesangial cells. *Kidney Blood Press Res*, 査読有, 2017; 42(5): 942-950. doi: 10.1159/000485084

Shimada T, Imaizumi T, Shirai K, Tatsuta T, Hayakari R, Yoshida H, Matsumiya T, Kimura T, Kijima K, Mizukami H, Hakamada K. CCL5 is induced by TLR3 signaling in HuCCT1 human bile duct carcinoma cells: possible involvement in the pathogenesis of biliary atresia. *Biomed Res (Tokyo)*, 査読有, 2017; 38(5): 269-276. doi: 10.2220/biomedres.38.269

Fukui K, Yachi K, Yoshida H, Tanji K, Matsumiya T, Hayakari R, Tsuruga K, Tanaka H, Imaizumi T. Rebamipide reduces amyloid-1-42 (A₄₂) production and ameliorates

A₄₃-lowered cell viability in cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurosci Res*, 査読有, 2017; 124: 40-50. doi: 10.1016/j.neures.2017.05.005

Tsugawa K, Imaizumi T, Watanabe S, Tsuruga K, Yoshida H, Tanaka H. Clarithromycin attenuates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 by activating Toll-like receptor 4 in human mesangial cells. *Clin Exp Nephrol*, 査読有, 2017; 21(4): 573-578. doi: 10.1007/s10157-016-1333-1

Hayakari R, Matsumiya T, Xing F, Yoshida H, Hayakari M, Imaizumi T. Critical role of IRF-3 in the direct regulation of dsRNA-induced retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) expression, 査読有, *PLoS One*, 2016;

11(9): e0163520. doi: 10.1371/journal.pone.0163520

Imaizumi T, Yano C, Numata A, Tsugawa K, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35), a type I interferon-dependent transcript, upregulates inflammatory signaling pathways by activating Toll-like receptor 3 in human mesangial cells. *Kidney Blood Press Res*, 査読有, 2016; 41(5): 635-642. <https://www.karger.com/Article/FullText/447932>

Xing F, Matsumiya T, Shiba Y, Hayakari R, Yoshida H, Imaizumi T. Non-canonical role of IKK in the regulation of STAT1 phosphorylation in antiviral signaling. *PLoS One*, 査読有, 2016; 11(12): e0168696. doi: 10.1371/journal.pone.0168696

Shirai K, Shimada T, Yoshida H, Hayakari R, Matsumiya T, Tanji K, Murakami M, Tanaka H, Imaizumi T. Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35) negatively regulates IFN- γ -phosphorylated STAT1-RIG-I-CXCL10/CCL5 axis in U373MG astrocytoma cells treated with polyinosinic-polycytidylic acid. *Brain Res*, 査読有, 2017; 1658: 60-67. doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.018

Imaizumi T, Hayakari R, Matsumiya T, Yoshida H, Tsuruga K, Watanabe S, Kawaguchi S, Tanaka H. Chloroquine attenuates TLR3/IFN- γ signaling in cultured normal human mesangial cells: a possible protective effect against renal damage in lupus nephritis. *Mod Rheumatol*, 査読有, 2017; 27(6): 1004-1009. doi: 10.1080/14397595.2017.1289646

Xing F, Matsumiya T, Hayakari R, Yoshida H, Kawaguchi S, Takahashi I, Nakaji S, Imaizumi T. Alteration of antiviral signalling by single nucleotide polymorphisms (SNPs) of mitochondrial antiviral signalling protein (MAVS). *PLoS One*, 査読有, 2016; 11(3): e0151173. doi: 10.1371/journal.pone.0151173

Imaizumi T, Shimada T, Matsumiya T, Yoshida H, Watanabe S, Tsuruga K, Kawaguchi S, Murakami M, Joh K, Tanaka H. Interferon-stimulated gene 15, a type I interferon-dependent transcript, is involved in a negative feedback loop in innate immune reactions in human mesangial cells.

Nephron, 査読有, 2016; 132(2):

144-152. doi: 10.1159/000443934

Imaizumi T, Yoshida H, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Kawaguchi S, Murakami M, Tanaka H. Interferon-stimulated gene (ISG) 60, as well as ISG56 and ISG54, positively regulates TLR3/IFN- γ /STAT1 axis in U373MG human astrocytoma cells.

Neurosci Res, 査読有, 2016; 105: 35-41. doi: 10.1016/j.neures.2015.09.002

Tsuruga K, Aizawa T, Watanabe S, Tsugawa K, Yoshida H, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H. Expressions of mRNA for innate immunity-associated functional molecules in urinary sediment in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 査読有, 2015; 20(12): 916-921. doi: 10.1111/nep.12533

Chiba Y, Matsumiya T, Satoh T, Hayakari R, Furudate K, Xing F, Yoshida H, Tanji K, Mizukami H, Imaizumi T, Ito E. Retinoic acid-inducible gene-I-like receptor (RLR)-mediated antiviral innate immune responses in the lower respiratory tract: roles of TRAF3 and TRAF5. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 2015; 467(2): 191-196. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.010

〔学会発表〕(計2件)

吉田 秀見, 松宮 朋穂, 早狩 亮, 柴 祐子, 今泉 忠淳. 天然ハーブ成分等による認知症発症因子の低減作用. 第11回青森神経科学談話会, 2016年7月2日(土), 弘前商工会議所(青森県弘前市).
吉田 秀見, 丹治 邦和, 松宮 朋穂, 早狩 亮, 三村 純正, 伊東 健, 今泉 忠淳. カルノシン酸はアミロイドの細胞内オリゴマー化抑制により神経細胞毒性を低減する. 日本生化学会東北支部 第82回例会, 2016年5月21日(土)-22日(日), 弘前大学医学部(青森県弘前市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://vascularbiology.web.fc2.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 秀見 (YOSHIDA, Hidemi)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号: 40201008

(2) 研究分担者

丹治 邦和 (TANJI, Kunikazu)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号: 10271800