

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08254

研究課題名(和文)ドラッグリポジショニングによる新規アルツハイマー病治療薬の開発

研究課題名(英文) Drug repositioning approaches for the development of new treatments for Alzheimer's disease

研究代表者

浦野 泰臣 (Urano, Yasuomi)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：00546674

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)：Acyl-coA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) 選択的阻害剤K-604が、アルツハイマー病(AD)発症に関わるアミロイド(A β)産生を減少させることや、脳特異的酸化脂質である24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) 誘導性の神経細胞死を抑制することを明らかにしてきた。本研究ではK-604がA β 産生酵素の基質特異的に切断を抑制することでA β 産生を減少させること、またK-604の脳移行性経鼻投与方法の開発に成功した。さらにACATにより産生される4種類の24S-OHCエステル体を同定し、小胞体の構造や機能に影響を及ぼすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のAD治療薬は記憶力の低下を遅らせる対症療法薬しか存在せず、根本治療薬の開発には成功していない。K-604によるACAT1の選択的阻害は、これまでのアプローチと全く異なる新たな視点から、AD病態に關与するA β 産生の抑制、さらに脂質誘導性細胞死の抑制という相乗的な効果をもつことが確認され、発症を予防且つ改善する治療薬の開発を目指す点において根本的な治療薬となる可能性をもつことが考えられた。またK-604は臨床試験まで進んだ実績から、安全性評価は高度に保証されており、本研究で開発した経鼻投与方法を応用したドラッグリポジショニングとしての観点に立てば、より実用化の可能性が優位と位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that acyl-coA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) specific inhibitor K-604 reduced Amyloid (A β) production and also suppressed the brain-specific oxysterol, 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)-induced neuronal cell death. In this study, we found that K-604 treatment inhibited A β production in a secretase substrate-specific manner. We also established the successful efficient delivery of a single dose of K-604 to the brain via the intranasal route. We further identified four long-chain unsaturated fatty acids with which 24S-OHC is esterified by ACAT. Accumulation of 24S-OHC esters affected the structure and function of endoplasmic reticulum, resulting in induction of neuronal cell death.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 脂質代謝 細胞死 ACAT (SOAT) ドラッグリポジショニング 24S-hydroxycholesterol オキシステロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が著しい日本社会において、アルツハイマー病(AD)の増加への対策は喫緊の課題である。しかしながら、その発症機構については未だ不明な点が多く、幾つかの仮説に基づいたアプローチにより治療薬が開発されているが、現行のAD治療薬はアリセプトに代表されるように記憶力の低下を遅らせる対症療法薬しか存在しない。ADの原因として支持されるアミロイド仮説によれば、アミロイド(A β)の増加、A β オリゴマー形成に伴う老人斑形成と、タウタンパク質の異常リン酸化による神経原線維変化が特徴的な発症イベントとして挙げられる。これらの除去、抑制は根本治療となる可能性があり、それぞれの機序仮説に基づく創薬開発が進められている。しかしながらアミロイド仮説に基づくA β 産生酵素(β 、 γ セクレターゼ)阻害剤はNotchタンパク質等のセクレターゼが認識する多くの基質の働きを抑えることによる副作用が生じ、期待される臨床試験結果には至っていない。また、タウ仮説による神経原線維変化の抑制剤や神経保護薬も未だ成功していない。その他、A β ワクチンなどの開発が進められているが、臨床試験で有効性が示されない例や副作用発現などの多くの困難が報告されている。よって、これまでと異なる作用機構によるAD治療薬の開発が期待されている。

Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT)は、コレステロールに脂肪酸をエステル結合させる酵素であり、ACAT1とACAT2の2つのアイソザイムが存在する。ACATは体内に過剰なコレステロールが蓄積されるのを抑制し、コレステロール代謝に重要な役割を果たす一方で、動脈硬化におけるマクロファージの泡沫化に寄与する。そのため、ACAT阻害剤は動脈硬化治療薬として開発が試みられてきたが、様々な困難により実用化に至っていない。興味深いことにACAT1ノックアウトマウスではA β の分解亢進や老人斑の減少が起き、認知機能減退を抑制出来る可能性を報告している。このようにACAT1はADの創薬標的として有望であるが、治療薬開発という点では進んでいない。そこで我々はACAT阻害剤のドラッグリポジショニングによるAD治療薬の開発を目指した。神経細胞には主にACAT1が発現していることから、興和株式会社が開発した世界で唯一のACAT1選択的阻害剤であるK-604に着目し、培養細胞を用いた解析により、K-604の濃度依存的にA β 産生が抑制されることを既に確認している。

コレステロールは血液脳関門を通過できないため、脳内で合成される。また、高濃度では神経毒性があるため、過剰なコレステロールの大部分は、血液脳関門を通過可能な24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)に変換されて脳内から排出される。24S-OHCは神経細胞特異的に発現しているcholesterol 24-hydroxylase(CYP46A1)によって酵素的に合成され、健常者の脳内において約30 μ M程度含まれている。つまりCYP46A1と24S-OHCは脳内のコレステロール恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。一方で過剰な24S-OHCは細胞毒性を示すことや、脳脊髄液中の24S-OHC濃度が健常者群と比較してAD患者群では約2.7倍に、軽度認知症患者群では約2倍に増加しているという報告がある。また、AD患者の脳内において、老人斑周辺でCYP46A1が高発現していることや、CYP46A1をコードするCYP46A1遺伝子の多型がAD発症の危険因子として働く可能性も報告されており、24S-OHCが神経変性疾患の発症や神経細胞死と関連することが示唆されている。これまで我々は、24S-OHCの神経細胞障害機構について解析を行い、過剰な24S-OHCは近年定義された新たな細胞死形態であるネクロトーンシ様の細胞死を誘導することを明らかにした。さらにその原因として24S-OHCがエステル化され、脂肪滴様の構造体が形成されることが細胞死誘導の重要なイベントであることを見出した。そこでK-604の効果を確認すると、24S-OHC誘導性脂肪滴はK-604により消失し、生存率もほぼ通常レベルにまで回復することを明らかにし、ACAT阻害剤が、神経細胞死の抑制剤として有用であることを示してきた。但し、創薬として脳内細胞を標的とする場合、血液脳関門を通過できるかどうかが大きな問題となるが、ラット経口投与実験ではK-604の脳内移行性はないと判断されている。そこで我々はK-604類縁体化合物ライブラリーを用いたスクリーニングとして、*in silico*解析により脳移行性の高い可能性があると示されたK-604類縁体を選別し、さらにK-604以上に細胞死抑制効果を示す類縁体を複数選出している。

2. 研究の目的

我々はACAT1の選択的な抑制がA β 産生や神経細胞死を抑制することを明らかにしたが、その作用機序の詳細は不明である。そこで本研究では以下の項目について明らかにすることを目標とする。

I) K-604やK-604類縁体によるA β 産生抑制の最適化を行い、さらに抑制機構を明らかにする。

II) 24S-OHCによる神経細胞死誘導機構とK-604による阻害機構を明らかにする。

これらの研究によりK-604のドラッグリポジショニングによるAD根本治療のためのマルチターゲット薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞としてヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞、ヒト野生型APPとNotchの β セクレターゼ基質部分(Notch E)が安定的に発現しているCHO細胞株(CHO-APP/Notch E)を用いた。細胞死判定法はWST-8法を用いた。

(2) A β の測定は、Tris-Tricine PAGE および特異的抗体 (82E1) により行った。
 (3) タンパク質発現は Immunoblot 法により解析した。RNA 発現量は real-time PCR 法により定量した。
 (4) *in vitro* による血液脳関門移行性の確認は Pharmacocell 社の BBB 再構成キットを用いて評価した。K-604 の定量や経鼻投与法の開発は興和株式会社との共同研究により行った。
 (5) 脂質の抽出には Folch 法を用いた。HPLC 解析には Inertsil ODS-3 column、UV-970 Intelligent UV/VIS detector を用い、展開溶液として acetonitrile/2-propanol/water, 43/53/4 を流速 1.0 ml/min で流すことにより分離した。DART-MS 解析には LCMS 2020 instrument に direct analysis in real time (DART)-SVP ion source を装備した質量分析機を用い、ヘリウムガスを 500 で用いた。

4. 研究成果

(1) 1000 種類以上の化合物から *in silico* ADME プログラムにより脳移行性を指標にスクリーニングを行い、さらに K-604 以上の強い細胞死抑制能を示した候補化合物 6 つについて、ヒト野生型 APP を定常的に発現する CHO 細胞株を用いて A β 産生に対する効果を確認した。その結果、K-604 よりも短時間で有意に A β 産生を抑制する化合物 Y および Z が選出された。その作用点として γ セクレターゼの基質である C99 が増加していたことから γ 切断を抑制した結果と考えられた。しかし(2)に記載の通り、選出された類縁体において血液脳関門移行性が期待できない結果が得られたことから、これらの構造と類似した構造をもち、水溶性の高い化合物をさらに 5 つ選出し、評価を進めた。その結果有意に A β 産生を抑制する化合物が 2 つ選出された。

また CHO-APP/Notch E 細胞を用いて K-604 の A β 産生抑制機構の解析を進めたところ、K-604 は濃度依存的に A β 産生を抑制するが、セクレターゼによる Notch E の切断には影響を及ぼさないこと、また APP 代謝産物でありセクレターゼの基質である C99 の量を減少させる効果があることを明らかにした。今後 K-604 による A β 産生抑制機構の解析をさらに進める。

(2) 脳移行性類縁体のスクリーニングとして、K-604 および K-604 類縁体について血液脳関門再構成キットを用いて評価した。ポジコンとして用いたカルバマゼピンは顕著な透過が認められたのに対し、類縁体は脂溶性が高く難溶性のため結晶が析出し易く評価困難であった。BSA 添加により化合物の溶解性を上げた場合においても、脳側への透過率は極めて低く、血液脳関門の透過性は期待できない結果となった。一方、透過性がないことが予想されていた K-604 は 10% 程度の透過性が確認された。そこで K-604 を用いた経鼻投与法による脳への DDS を検討した。水溶性の低い K-604 に対して、HCl や Hyaluronic acid、citric acid、D-gluconic acid 水溶液に溶解させることで溶解性を向上出来ることを明らかにした。そこでこれら K-604 含有水溶液を、1 日 1 回、7 日間マウスに経鼻投与を行うと、経口投与に比べて投与量換算で最大 90 倍の脳移行性を示すことが明らかになった。特に到達量の多かった citric acid 溶液条件と溶媒担体条件について、脳内のコレステロール量を測定したところ、脳内のコレステロールエステル量が 0.70 $\mu\text{mol/g}$ から 0.04 $\mu\text{mol/g}$ に減少していた(図 1)。すなわち効果的に K-604 が脳に移行した結果、ACAT 活性が抑制され、コレステロールエステル量が減少するという十分な薬効を示す新たな経鼻投与法の開発に成功したことから、特許出願(特願 2016-222605)および論文投稿を行った。

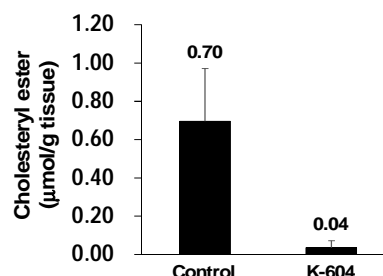


図1 マウス脳内のコレステロールエステル量

(3) 24S-OHC 誘導性神経細胞死の誘導機構について、細胞に蓄積する 24S-OHC のエステル体に着目して解析を行った。SH-SY5Y 細胞に 24S-OHC を 6 時間処理した細胞から脂質を抽出し、HPLC 法を用いて解析したところ、24S-OHC エステル体と考えられる 4 本のピークが観察された。これらのピークについてエステル結合すると予想された各種脂肪酸を添加してピークの増加を観察したところ、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、DHA の 4 種の長鎖不飽和脂肪酸を添加した場合、各ピークの特異的な増加が観察された。さらに DART-MS 法を用いて質量分析を行ったところ、上記 4 種の脂肪酸がエステル結合した 24S-OHC エステル体が同定された(図 2)。また、これら脂肪酸添加は 24S-OHC 誘導性細胞死を亢進することが示された。電子顕微鏡解析により得られていた異常な脂肪滴様構造の形成や小胞体の肥大化が、親水性部位と疎水性部位の両方を持つ 24S-OHC エステル体が増加

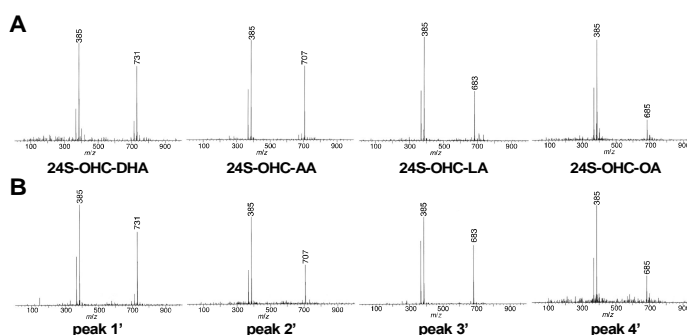


図2 DART-MS解析により得られたマススペクトル。
 (A) 合成標品、(B) HPLCで分取したサンプル

することが原因である可能性が示唆された。これらの内容をまとめた報告が、J Lipid Res(2016)に掲載された。また本解析で、酸化ステロールエステル体の合成法および DART-MS による酸化ステロールのエステル体の質量分析法の開発に成功したことから、特許出願（特開 2017-062135）と論文報告（Bioorg Med Chem, 2016）を行った。

さらに小胞体構造に着目して解析を進め、24S-OHC のエステル化依存的に PERK や IRE1 などの小胞体ストレスマーカーが活性化することを明らかにした。また小胞体に局在する mRNA の網羅的な分解が起きていることが確認された。さらに IRE1 の阻害剤は mRNA の分解を抑制するとともに細胞死も有意に抑制することを明らかにした。一方で、もう一つ重要な小胞体ストレスマーカーである ATF6 の活性化や IRE1 の下流に存在する Xbp-1 の活性化が認められないことから、小胞体ストレスによる細胞生存のための修復機能が正常に作動していないことが示された。さらに小胞体ストレス誘導性細胞死に関与することが知られている CHOP について、発現量の増加が認められたが、CHOP siRNA による発現抑制は細胞死を抑制しなかったことから、CHOP は 24S-OHC 誘導性細胞死に関与しないことが明らかとなった。これらの結果から 24S-OHC のエステル体の蓄積が小胞体に異常を来し、細胞死へと誘導する小胞体ストレスが起きていることが示された。今後小胞体ストレスの細胞死誘導に関与する下流シグナルの解析を行う予定である。

また計画以上の発見として 24S-OHC 誘導性神経細胞死に対してビタミン E である α や γ トコフェロールが抑制効果を示すことを明らかにした。また同族体であるトコトリエノールは効果を示さないことや細胞内で酸化ストレスが亢進していないことから、トコフェロールは抗酸化剤としての機能以外の効果により細胞死を抑制していることを明らかにし、論文報告を行った（Biochimie, 2018、J Steroid Biochem Mol Biol, 2017）。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kimura Y, Asa M, Urano Y, Saito Y, Nishikawa K, Noguchi N. Tocopherol suppresses 24(S)-hydroxycholesterol-induced cell death via inhibition of CaMKII phosphorylation., *Biochimie*, 153, 203-209, 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.biochi.2018.07.004
2. Urano Y, Mori C, Fuji A, Konno K, Yamamoto T, Yashirogi S, Ando M, Saito Y, Noguchi N. 6-Hydroxydopamine induces secretion of PARK7/DJ-1 via autophagy-based unconventional secretory pathway. *Autophagy*, 4, 1943-1958, 2018. 査読有
DOI: 10.1080/15548627.2018.1493043
3. Kotani R, Urano Y, Sugimoto H, Noguchi N. Decrease of Amyloid- Levels by Curcumin Derivative via Modulation of Amyloid- Protein Precursor Trafficking. *J. Alzheimers Dis.*, 56, 529-542, 2017. 査読有
DOI: 10.3233/JAD-160794
4. Nakazawa T, Miyanoki Y, Urano Y, Uehara M, Saito Y, Noguchi N. Effect of vitamin E on 24(S)-hydroxycholesterol-induced necroptosis-like cell death and apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 169, 69-76, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.003
5. Takabe W, Urano Y, Vo DH, Shibuya K, Tanno M, Kitagishi H, Fujimoto T, Noguchi N. Esterification of 24(S)-hydroxycholesterol induces formation of atypical lipid droplet-like structures, leading to neuronal cell death. *J Lipid Res.* 57, 2005-2014, 2016. 査読有
DOI: 10.1194/jlr.M068775
6. Shibuya K, Watanabe T, Urano Y, Takabe W, Noguchi N, Kitagishi H. Synthesis of 24(S)-hydroxycholesterol esters responsible for the induction of neuronal cell death. *Bioorg Med Chem.* 24, 2559-2566, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.024

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 木村勇輝、浦野泰臣、斎藤芳郎、野口範子、脂質が誘導する小胞体ストレスとビタミン E、第 30 回ビタミン E 研究会、2019
2. 木村勇輝、浦野泰臣、西川喜代孝、野口 範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性細胞死に対するビタミン E の効果、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
3. 高八美菜、浦野泰臣、杉本八郎、野口範子、Curcumin 誘導体 GT863 の A 産生抑制機構の解明、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
4. 浦野泰臣、野口範子、脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導における小胞体の関与、第 27 回日本 Cell death 学会学術集会、2018
5. 木村勇輝、浦野泰臣、野口範子、24S-ヒドロキシコレステロールが誘導する神経細胞死に対するビタミン E の抑制機構の解析、第 29 回ビタミン E 研究会、2018
6. 木村勇輝、浦野泰臣、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死に対するビタミン E の効果、ConBio2017、2017

7. 棒谷夏希、浦野泰臣、野口範子、一酸化炭素放出分子を用いた一酸化炭素による A 産生への影響の解析、ConBio2017、2017
8. 荒木宏文、浦野泰臣、Diep Khanh H Vo、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死への小胞体ストレスの関与、ConBio2017、2017
9. Noguchi N, Urano Y, Vo Ho D-K, Araki H, Kimura Y, ER stress plays important roles in 24S-hydroxycholesterol-induced neuronal cell death、7th ENOR Symposium、2017
10. 浦野泰臣、野口範子、脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導機構の解析、第 59 回日本脂質生化学会、2017
11. 木村勇輝、宮軒勇太、浦野泰臣、野口範子、24S-ヒドロキシコレステロールが誘導する神経細胞死に対するビタミン E 同族体の抑制作用のちがい、第 28 回ビタミン E 研究会、2016
12. 荒木宏文、浦野泰臣、Diep Khanh H Vo、野口範子、24S-Hydroxycholesterol 誘導性神経細胞死への IRE1 の関与、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：経鼻投与用医薬組成物

発明者：浦野泰臣、野口範子、渋谷公幸、森川 滋

権利者：学校法人同志社、興和株式会社

種類：特許

番号：特願 2016-222605

出願年：平成 28 年

国内外の別：国内、PCT

名称：ヒドロキシコレステロール脂肪酸エステルの検出方法

発明者：浦野泰臣、野口範子、北岸宏亮、高部稚子、丹野将貴、渋谷公幸、三宅祥元

権利者：学校法人同志社、興和株式会社

種類：特許

番号：特開 2017-062135

出願年：平成 27 年

国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：細胞死抑制剤

発明者：浦野泰臣、山中一哲、斎藤芳郎、野口範子

権利者：学校法人同志社

種類：特許

番号：特許第 6143435 号

取得年：平成 29 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://systemlifescience.wixsite.com/system-life-science>