

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790194
 研究課題名（和文） 新規アミロイド低下剤 KM3558 の作用機序の解明とマウスにおける効果の測定
 研究課題名（英文） Analysis of the mechanism action of a novel A β -lowering reagent KM3558 and administration of KM3558 to mice
 研究代表者 浅井 将（ASAI MASASHI）
 埼玉医科大学・医学部・助教
 研究者番号：90383223

研究成果の概要：

アルツハイマー病の根本的治療には、脳内に沈着するアミロイド（A β , amyloid-peptide）を減少させることが必要であり、産生抑制、分解促進、沈着抑制ならびに沈着 A β の溶解などを標的とした薬剤の開発が行われている。対処療法しかないアルツハイマー病に対し、新規治療薬候補を探索するために培養細胞を用いて A β 量を減少させる化合物をスクリーニングしたところ、分子量 200 程度の新規化合物である KM3558 を見出した。KM3558 は濃度依存的に A β 産生を有意に低下させた。しかしながら、いくつかの培養細胞において毒性を示した。そこで、KM3558 が有する官能基を修飾した化合物を合成したところ、細胞毒性が低減する化合物 KM3558A を得られた。また、KM3558 と同程度の A β 産生を抑制する効果を持つ化合物 KM3558A を経口投与すると、体内で KM3558 に代謝されて約 50% の生物学的利用能を有していた。KM3558A は経口投与が可能なアルツハイマー病治療に対する有用な薬剤候補として考えられた。近年、KM3558 を修飾した化合物がメラニンを産生する酵素であるチロシナーゼを阻害する作用を有していることが報告された。APP およびチロシナーゼも I 型膜蛋白質で セクレターゼの基質となることから、KM3558 が セクレターゼ活性を阻害することが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	330,000	3,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：中枢・抹消神経

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた現代において、アルツハイマー病の治療薬の開発は早急な課題となっている。アルツハイマー病は、脳内にアミロイド（A β , amyloid-peptide）が沈着することから始まり、老人斑や神経原線維変化が形成されて、やがて認知症へと移行していく。アルツハイマー病の根本的治療に

は、脳内に沈着する A β を減少させることが必要であり、産生抑制、分解促進、沈着抑制ならびに沈着 A β の溶解が標的となっている。A β は、その前駆体である膜タンパク質 APP（amyloid precursor protein）から セクレターゼと セクレターゼによる二段階の切断で産生される。一方、多くの APP は A β の内部で切断が起こる セクレターゼによ

って代謝されるため、A が産生されない。

私はこれまでに、セクレターゼ活性が ADAM (a disintegrin and metalloprotease) ファミリーに属するプロテアーゼ群によって構成されていること、セクレターゼとして機能する BACE1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) のプロテアーゼ活性に複数の分子が作用していること、また AD の治療という観点から、新規 BACE1 阻害剤 KMI-429 が *in vivo* で A 産生を抑制することを報告してきた。BACE1 阻害剤として、KMI-429 が世界で初めてアルツハイマー病モデルマウスおよび野生型マウスの脳内 A 量を低下させることに成功した。しかしながら、KMI-429 はペプチド骨格を有しているため経口投与では同様の効果を期待できず、分子量が 700 以上であることから血液脳関門の通過も困難であることが予想された。

長期にわたるアルツハイマー病治療を考慮すると、経口による投薬方法が最も適していると考えられる。根本的な治療薬がないアルツハイマー病の経口薬の開発は世界的な急務である。

2. 研究の目的

アルツハイマー病に対する経口治療薬の薬候補物質には以下に挙げる条件が必須である。

- ・ A 量を低下させる
- ・ ペプチド骨格を持たない
- ・ 分子量が 500 以下である
- ・ 細胞毒性を示さない

そこで、これらの条件を満たしうる新規化合物をスクリーニングし、培養細胞および動物での A に対する効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アルツハイマー病治療薬のスクリーニングをするために A を過剰に産生する培養細胞を作製する。ヒトニューログリオーマ由来 H4 細胞にスウェーデン型 APP (セクレターゼによる切断が増加する変異型) を導入し、安定形質的に発現する細胞株を樹立する。

(2) (1) で樹立した細胞株を用いて、培地中に分泌される A 量を低下させる化合物をスクリーニングする。A 量の定量には、Sandwich ELISA 法で測定する。

(3) (2) のスクリーニングでヒットした化合物について、培養細胞における毒性を検討する。細胞毒性は、LDH 法で測定する。

(4) (2) のスクリーニングでヒットした化合物について、動物における体内動態および A 量を検討した。

4. 研究成果

(1) アルツハイマー病治療薬のスクリーニングをするために A を過剰に産生する培養細胞を作製した (図 1)。ヒトニューログリオーマ由来 H4 細胞にスウェーデン型 APP が安定形質的に発現する細胞株 (APP-H4 細胞) を樹立した。野生型 H4 細胞と比較して、過剰に APP が発現していた。また、培地中に分泌される A を western blotting 法でも容易に検出できることがわかった。

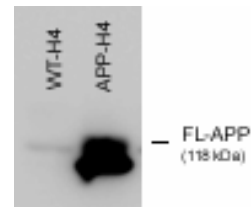


図 1 APP-H4 細胞における APP の発現

(2) (1) で樹立した APP-H4 細胞を用いて、培地中に分泌される A 量を指標に、条件を満たす化合物を Sandwich ELISA 法でスクリーニングした (図 2)。その結果、KM3558 が有意に A 量を低下することがわかった。KM3558 の分子量はどちらも 200 程度である。

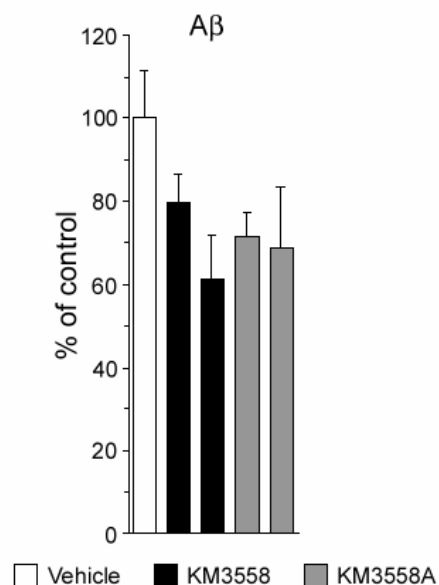


図 2 A 量に対する KM3558 と KM3558A の効果

(3) (1) で樹立した APP-H4 細胞を用いて、培地中に分泌される LDH 量を指標に、KM3558 の細胞毒性を測定した。その結果、KM3558 は APP-H4 細胞において細胞毒性を示さなかった。また、顕微鏡における細胞の状態も対照と比較して変化を示さなかった。し

かし、H4 細胞以外では細胞毒性を示すものもあつた。そこで、KM3558 が有する官能基を修飾した化合物を合成したところ、細胞毒性が低減する化合物 KM3558A を得られた。

(4) KM3558 と KM3558A を 100 mg/kg で経口投与した結果、それぞれ図 3 a と b に表わされるような体内動態を示した。

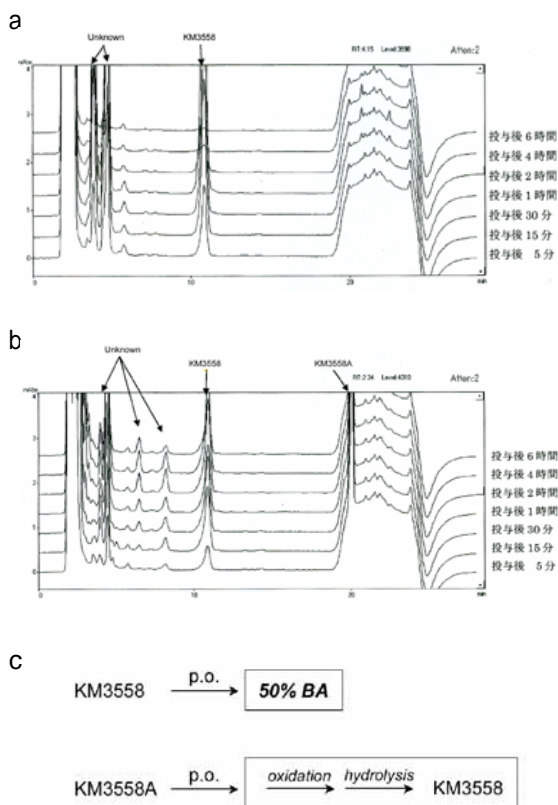


図 3 KM3558 と KM3558A の体内動態

新規化合物 KM3558 の生物学的利用率 (bioavailability, BA) は約 50%であつた(図 3)。細胞毒性が低減された KM3558A は、KM3558 の水酸基を極性のない官能基に置換した化合物で、体内で酸化的に代謝され、さらに加水分解を受けて KM3558 として体内に存在することがわかつた(図 3c)。これらのことは、KM3558A は KM3558 のプロドラッグとしても、A 低下剤としても期待できる(図 2)。

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)

浅井将、西道隆臣、丸山敬、岩田修永、
-セクレターゼ阻害剤 (KMI-429)、アルツハイマー病-基礎研究から予防・治

療の新しいパラダイム-(日本臨床増刊 1) 66、488-492、2008、査読無

Tanabe C., Ebina M., Asai M., Futai E., Sasagawa N., Katano K., Fukami H. and Ishiura S.,

1,3-Capryloyl-2-arachidonoyl glycerol activates α -secretase activity and suppresses A β 40 secretion in A172 cells, *Neurosci. Lett.*, 450, 324-326, 2009, 査読有り

[学会発表](計 10 件)

Ebina M., Tanabe C., Hattori C., Asai M., Sasagawa N., Futai E., Kiso Y. and Ishiura S., Influence of BACE1 inhibitors on the localization of BACE1 in lipid rafts, Xth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Portorož (Slovenia), 2007/6/24.

Asai M., Iwata N., Ishiura S., Saido T.C. and Maruyama K., Berberine controls secretase activities to decrease A β secretion, Xth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Portorož (Slovenia), 2007/6/24.

浅井将、岩田修永、西道隆臣、丸山敬、多剤併用療法による培養細胞におけるアミロイド ペプチド産生の変化、第 12 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会、豊中、2007 年 8 月 3 日

浅井将、岩田修永、西道隆臣、丸山敬、多剤併用療法による培養細胞における A β 産生の変化、BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会) 横浜、2007 年 12 月 14 日

浅井将、岩田修永、西道隆臣、丸山敬、多剤併用療法による培養細胞における A β 産生に対する効果、第 81 回日本薬理学会年会、横浜、2008 年 3 月 19 日

浅井将、岩田修永、西道隆臣、丸山敬、既存薬物によるアルツハイマー病への応用、第 118 回日本薬理学会関東部会、品川、2008 年 6 月 8 日

Asai M., Yagishita S., Iwata N., Saido T.C., Ishiura S. and Maruyama K., Cathepsin B inhibitor CA-074Me causes the alteration of APP catabolism independently of secretase activities, 11th International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control, Portorož (Slovenia), 2008. Asai M., Yagishita S., Iwata N., Saido T.C., Ishiura S. and Maruyama K.,

Cathepsin B inhibitor CA-074Me causes the alteration of APP catabolism independently of secretase activities, The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo (Japan), 2008/9/1

浅井将、柳下聡介、岩田修永、西道隆臣、石浦章一、丸山敬、カテプシン B 阻害剤 CA-074Me 処理によるアミロイド前駆体蛋白質の代謝機構の変化、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、神戸、2008 年 12 月 10 日

浅井将、柳下聡介、岩田修永、西道隆臣、石浦章一、丸山敬、カテプシン B 阻害剤 CA-074Me 処理による APP 代謝および A 分解の変化、第 82 回日本薬理学会年会、横浜、2009 年 3 月 16 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅井 将 (ASA I MASASHI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：90383223

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし