

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05728

研究課題名(和文) 抗アルツハイマー病薬を目指す可溶性アミロイドオリゴマー形成阻害物質の開発と評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of soluble amyloid-beta oligomer formation inhibitors for anti-Alzheimer's disease drug

研究代表者

上井 幸司 (Uwai, Koji)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80347905

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)：アルツハイマー型認知症(AD)患者の脳内で異常に凝集し、神経細胞障害の原因となるアミロイドタンパク質の低分子オリゴマー形成を阻害する物質を天然植物から見出し、新しいAD予防薬の開発へと繋げることを目的とした。数百種の植物を対象としたスクリーニングの結果、複数の活性素材を見出した。これらから活性物質を精製し、複数の高い活性を示す化合物を単離することができた。例えば、ゲンノショウコからゲラニインが活性物質として単離されたが、種々の検討の結果、主に活性を担う物質はゲラニインそのものではなく、その加水分解物であることを明らかにした。また、活性物質の誘導化により、元の物質より高活性物質を創製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー型認知症(AD)は認知症の半数以上を占める。超高齢社会に伴う患者数の増加により早急な対応が望まれるが、現状は対処療法しかない。そこで、患者の脳内で異常凝集し、神経細胞を障害するアミロイド(A $\beta$ )、特に初期に生成する低分子オリゴマーの凝集阻害が注目されてきており、この早い段階での凝集を抑えることがAD予防の鍵となると考えられる。本研究では、天然植物からゲンノショウコをはじめとする複数のA $\beta$ オリゴマー凝集阻害物質を見出し、天然物質を上回る活性を示す物質を化学合成した。これらの物質やこれらを含む食品素材は、新しいAD予防・治療薬や食品に開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study was to find substances in natural plants that inhibits the formation of low-molecular-weight oligomers of amyloid protein, which aggregates abnormally in the brain of patients with Alzheimer's disease (AD) and causes neuronal damage, and to lead to the development of new AD preventive drugs. As a result of screening on hundreds of species of plants, we found multiple active materials. From these, the active substance could be purified and multiple compounds showing high activity was isolated. For example, geraniin was isolated from *Geranium thunbergii* as an active substance, but as a result of various studies, it was clarified that the substance mainly responsible for the activity is not geraniin itself but its hydrolyzate. In addition, on the basis of active substances, we created higher active substances than the original substances.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド オリゴマー 凝集阻害物質 構造活性相関

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

認知症に対する新たな治療法の確立は、現在喫緊の課題の一つと言える。世界の認知症患者数は、2015年では4680万人であったのに対し、2050年には1億3150万人に達し、それに伴いケアコストも8180億ドル(2015年)から2兆ドル(2030年)になると予想されている(世界アルツハイマー報告書, 2015年)。我が国の65歳以上の認知症患者数も462万人(2012年)から1154万人(2060年)と増加することが予想されている。このように、超寿命化と高齢者人口割合の増加による認知症の克服は、世界的にも社会的にも重要な課題である。

認知症のうち、約7割がアルツハイマー型認知症(AD)である(Plassmanら, Neuroepidemiology, 2017)。現状ではADに対する治療薬はコリンエステラーゼ阻害剤やグルタミン酸拮抗薬が用いられているが、神経伝達物質に作用する症状改善薬であり、根本的治療薬ではない。これに対して、ADを根本的に予防・治療できる可能性を持つ疾患修飾薬の開発が急務となっている。ADの病因、発生機序の一つとしてアミロイドβ(Aβ)からなる老人斑の生成により神経細胞の脱落が起きることが提唱されている。その病態発症機構は、Aβがその前駆体タンパク質から切り出され、それが無構造のAβモノマーからβ-シートへの構造変換を起こし、続いてオリゴマーが形成され、プロトフィブリル、成熟繊維が形成される異常凝集することで神経細胞を障害する(アミロイド仮説(Hardyら, Science, 2002))。これに基づき、これまで世界的にAβ凝集阻害物質の探索とその機構の解明が精力的に行われて来ており、Aβ凝集阻害作用を示すロスマリン酸がADモデルマウスで効果を発揮すること(Hamaguchiら, Am. J. Pathol, 2009)、Aβ凝集体を標的とした抗体(aducaumab)が軽度認知症患者に対して効果を発揮すること(Sevignyら, Nature, 2017)などが明らかになった。我々も、これまで数百種類の天然資源のAβ凝集阻害活性を評価した結果、フウソウ科、シソ科植物が高い活性を示し、シソ科の活性本体がロスマリン酸であることを明らかにした(Ishigakiら, PlosOne (2013), 特願2014-264387)。

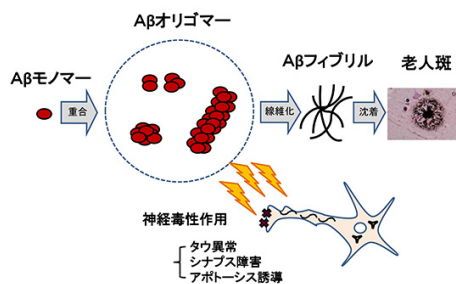


図1: 発症因子としてのAβオリゴマー

ところが、従来は脳に蓄積する不溶性のAβ線維が神経毒性を発揮すると考えられていたが、「Aβの凝集を阻害する物質」のなかでも神経細胞毒性を緩和できなかつたり、動物試験で効果が見られない物質もある。そこで、近年では成熟した線維よりもより毒性の強い凝集体として可溶性オリゴマーに注目が集まっており(オリゴマー仮説。例えば, Violaら, Acta Neuropathol, 2015), ダイマー, トリマー, テトラマーがモノマーに比べて細胞毒性が増加し、特にモノマーからダイマーへの過程がADの重要な治療ターゲットとなることが示唆されている(Onoら, PNAS, 2009, Watanabe-Nakayamaら, PNAS, 2016)。我々も、ロスマリン酸誘導体の活性評価から構造により阻害機構が異なることを見出した(Taguchiら, EJMC (2017), 日本薬学会北海道支部143例会学生優秀発表賞)。しかしながら、これら「可溶性オリゴマー形成を阻害する物質」がこれまで報告されてきた「Aβ凝集阻害物質」よりもAβによる神経細胞毒性や認知機能改善に有効であるという明確なデータはない。

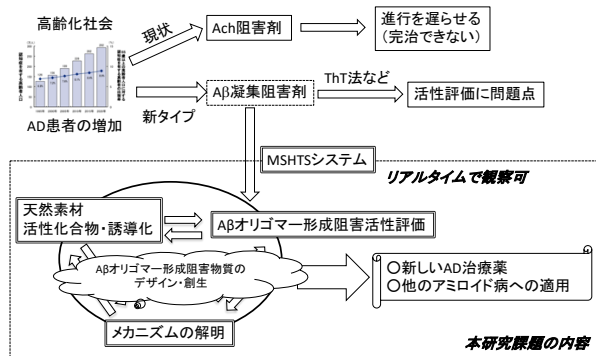


図2 本研究の学術的背景、研究概略

### 2. 研究の目的

アルツハイマー型認知症(AD)は認知症の半数以上を占める。超高齢社会に伴う患者数の増加が予想され早急な対応が望まれるが、現状は対処療法しかない。そこで、AD患者の脳内で異常凝集し、神経細胞を障害するアミロイドβ(Aβ)の凝集阻害が注目されてきた。我々は、数百種類の天然資源のAβ凝集阻害活性を評価し、シソ科植物が高い活性を示し、活性本体がロスマリン酸であることを明らかにした。また、その誘導体の活性評価から構造により阻害機構が異なることを見出した。最近、Aβ凝集過程の初期に生成する低分子オリゴマーがより高毒性の凝集体として注目されており、Aβ凝集を阻害するだけでなく、オリゴマー形成を阻害する物質を見出し、その有効性を検討する必要がある。本研究では、新規AD予防・治療薬の開発を目的に、天然資源のAβオリゴマー化阻害のスクリーニングと活性物質の探索、誘導体化と阻害機構の解析を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、①数百種類の粗抽出物ライブラリーを対象に Aβ 凝集阻害活性、特に可溶性オリゴマー形成阻害についてのスクリーニング、②活性物質の同定と③誘導化を行い、Aβ オリゴマー形成阻害機構の解明と、それに基づく新しい阻害物質の創製・活性評価により AD 予防・治療薬の開発へと繋げる。

### 4. 研究成果

#### ①スクリーニング法の確立と数百種類の粗抽出物ライブラリーを対象とした Aβ 凝集阻害活性

はじめに、PICUP 法を用いて Aβ オリゴマーを安定化した状態としたのち、SDS-PAGE に付し、スクリーニング法を確立し、モノマーからヘプタマーまでの 7 種の可溶性オリゴマーをゲル上で区別し、画像解析により定量することが可能となった(図 3)。

そこで、これまで評価してきた約 200 種の植物粗抽出物ライブラリーに加え、対象をさらに天然資源(100 種)追加し、Aβ 凝集阻害活性を ThT 法と当研究室独自の MSHTS 法で一次評価した。その結果、北海道の天然植物および食品抽出エキスから複数の活性資源を見出した。ここで活性を示した資源について、Aβ 可溶性オリゴマー形成阻害活性をスクリーニングした。PICUP 法を用いて Aβ オリゴマーを安定化した状態としたのち、SDS-PAGE に付し、さらに MALDI-TOF MS により評価することにより、可溶性オリゴマー形成阻害資源を絞り込んだ(2 次スクリーニング)。MSHTS および ThT 法で比較的強い Aβ 凝集阻害活性 (EC<sub>50</sub> = 0.1 mg/mL 以下)を示す抽出物は、これまでの結果と合わせて 20 種類以上見出されたが、可溶性オリゴマー形成阻害を示した資源は 2 種に留まった。この可溶性オリゴマー形成阻害活性を有する素材から PICUP 法-SDS-PAGE を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して分画した。その結果、2 つの高い活性を示す化合物を単離することができた。これらの化合物は物質としては既知の化合物であったが、可溶性オリゴマー形成阻害活性としては新規な機能性の報告となる。

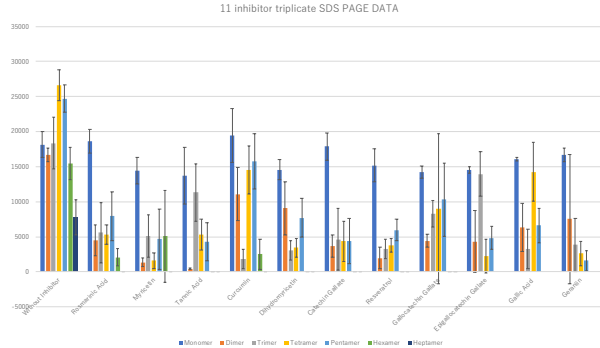


図 3: PICUP-SDS PAGE でのオリゴマー形成阻害活性の定量

このうち、ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*, EC<sub>50</sub> = 18 μg/mL)から得られた geraniin は、5 μg/mL の Aβ 凝集阻害活性を示した。ところが、geraniin は、Aβ 凝集阻害活性を実施した反応溶液中で加水分解を受け、没食子酸、エラグ酸、コリラギンを生ずることが <sup>1</sup>H-NMR の解析から明らかとなり、ゲラニニン Form A, ゲラニニン Form B, 没食子酸, エラグ酸, コリラギンの積分比が 1.00, 0.35, 1.48, 0.13, 0.41 であることから、モル存在比は 0.3, 0.1, 0.44, 0.004, 0.12 と算出された(図 4)。また、ゲラニニン, 没食子酸, エラグ酸, コリラギンの Aβ 凝集阻害活性を MSHTS 法と ThT 法でそれぞれ評価した結果、MSHTS 法では各 EC<sub>50</sub> は 6.7, 3.2, 1.7×10<sup>2</sup>, 3.2 μg/mL, ThT 法では 10, 1.7, 6.0×10<sup>3</sup>, 8.9 μg/mL であった。

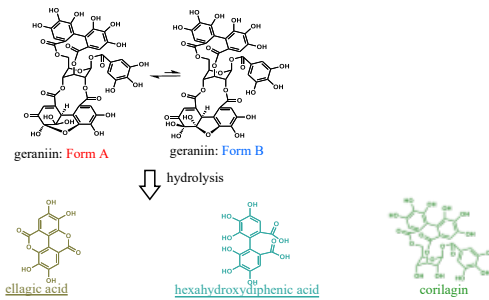


図 4: Geraniin の加水分解物

これらの値を用いて活性貢献度を算出した結果、MSHTS 法では没食子酸: 92%, エラグ酸: 0.15%, コリラギン: 25%, ThT 法では没食子酸: 260%, エラグ酸: 0.006%, コリラギン: 14%でゲラニニンの活性に貢献していることが明らかとなり、見かけのゲラニニンの活性は没食子酸とコリラギンが主に関与していることが明らかとなった。

ゲラニニンとゲラニニンの Aβ 凝集阻害に主に関与する没食子酸とコリラギンがどのように Aβ ペプチドと相互作用するかを STD NMR スペクトルによって観測するためにゲラニニン, 没食子酸, コリラギンの Aβ (-), Aβ (+) の <sup>1</sup>H-NMR, Aβ (+) の STD NMR を測定した(表 1)。各物質の Aβ (-) と Aβ (+) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを比較した結果、Aβ を加えることにより化合物のシグナルがシフトすることが確認された。Aβ (+) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルと Aβ (+) の STD NMR を比較した結果、コリラギンのみのシ

グナルがシフトすることが確認された。Aβ (+) の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルと Aβ (+) の STD NMR を比較した結果、コリラギンのみのシ

表 1: Aβ 凝集阻害剤と Aβ の NMR 解析

	geraniin	gallic acid	corilagin
<sup>1</sup> H NMR Aβ (-)			
<sup>1</sup> H NMR Aβ (+)			
STD NMR Aβ (+)			

グナルが観測された。これはコリラギンのみが可溶性A $\beta$ ペプチドと相互作用することを示唆しており、没食子酸は大きな不溶性A $\beta$ ペプチド凝集体，コリラギンは小さな可溶性A $\beta$ ペプチド凝集体の凝集を阻害することが示唆された (Kubo ら, 2022)。

これらの物質の可溶性オリゴマー形成阻害活性を確認し、実際に生体内での活性を評価するために、この化合物の化学合成を試みた。その結果、カエデやヤナギ由来のA $\beta$ 凝集阻害物質をグルコースや経皮酸、没食子酸といった安価な出発原料から合成する経路を確立することができた。この知見をもとに、これらの化合物を種々の類縁化合物に誘導して可溶性オリゴマー形成阻害活性および抗酸化活性について構造活性相関の検討を進め、フェノール性水酸基の活性への寄与や化合物の疎水性と活性との相関を明らかにした (図5)。

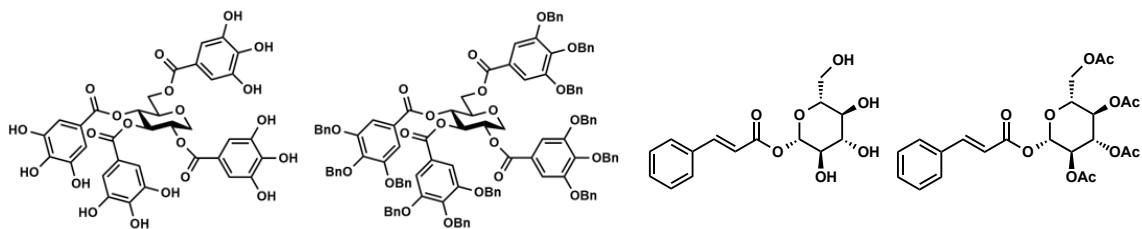


図5：合成したA $\beta$ 凝集阻害物質と誘導体例

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Deepak Hadya Virupaksha, Swamy Mahadeva M. M., Murai Yuta, Suga Yoshiko, Anetai Masaki, Yo Takuro, Kuragano Masahiro, Uwai Koji, Tokuraku Kiyotaka, Monde Kenji	4. 巻 25
2. 論文標題 Daurichromenic Acid from the Chinese Traditional Medicinal Plant Rhododendron dauricum Inhibits Sphingomyelin Synthase and A Aggregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 4077 ~ 4077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25184077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kuragano Masahiro, Yoshinari Wataru, Lin Xuguang, Shimamori Keiya, Uwai Koji, Tokuraku Kiyotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Evaluation of Amyloid 42 Aggregation Inhibitory Activity of Commercial Dressings by A Microliter-Scale High-Throughput Screening System Using Quantum-Dot Nanoprobes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 825 ~ 825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/foods9060825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kubo Kenji, Watanabe Hikaru, Kumeta Hiroyuki, Aizawa Tomoyasu, Seki Chigusa, Nakano Hiroto, Tokuraku Kiyotaka, Uwai Koji	4. 巻 68
2. 論文標題 Chemical analysis of amyloid aggregation inhibitors derived from Geranium thunbergii	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116840 ~ 116840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2022.116840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Rina Sasaki, Masahiro Kuragano, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku
2. 発表標題 Development of an automated microliter-scale high-throughput evaluation system for amyloid aggregation inhibitory activity and evaluation of extracts from plants collected in Hokkaido
3. 学会等名 The 27th Annual Meeting of International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (ICNIM 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島森圭弥、倉賀野正弘、佐々木里奈、上井幸司、徳樂清孝
2. 発表標題 自動化微量ハイスループットスクリーニングシステムによるシソ栽培品種のアミロイド凝集阻害活性の詳細分析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木里奈、倉賀野正弘、門出健次、上井幸司、徳樂清孝
2. 発表標題 アミロイド凝集阻害物質の自動スクリーニングシステムにより見出した高活性天然抽出物の評価
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rina Sasaki, Reina Tainaka, Yuich Ando, Masahiro Kuragano, Kiminori Ota, Kenji Monde, Koji Uwai, Kiyotaka Tokuraku
2. 発表標題 An automated microliter-scale high-throughput screening system (MSHTS) using quantum-dot nanoprobe for amyloid aggregation inhibitors
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今前田大朗、久米田博之、久保研二、渡邊輝、倉賀野正弘、相沢智康、関千草、中野博人、徳樂清孝、上井幸司
2. 発表標題 NMRスペクトルを指標としたアミロイド42凝集阻害物質の探索
3. 学会等名 第58回NMR討論会(2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上井幸司, 久保研二, 久米田博之, 渡邊輝, 関千草, 中野博人, 相沢智康, 徳樂清孝
2. 発表標題 ゲンノショウコ (Geranium thunbergii) 含有アミロイド 凝集阻害物質の化学的解析
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上井幸司, 久米田博之, 今前田大朗, 倉賀野正弘, 関千草, 中野博人, 相沢智康, 徳樂清孝
2. 発表標題 STD-NMR法による植物抽出エキスのアミロイド 結合スクリーニング
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸愛永, 佐藤敦哉, 倉賀野正弘, 上井幸司, 徳樂清孝
2. 発表標題 食品エキスのアミロイド 凝集阻害および細胞毒性緩和能の網羅的評価
3. 学会等名 日本食品化学学会第26回総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸愛永, 吉成 航, 倉賀野正弘, 上井幸司, 徳樂清孝
2. 発表標題 生(なま)醤油に含まれるアミロイド 凝集阻害活性物質
3. 学会等名 日本食品化学学会第27回総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島森圭弥、南部智彦、川又大輝、倉賀野正弘、飯森俊文、山中真也、上井幸司、徳樂清孝
2. 発表標題 チリメンアオジソのアミロイド 凝集阻害活性を向上させる栽培条件
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上井幸司
2. 発表標題 白糠町産チリメンアオジソの機能性食品開発に向けた機能実証と加工法開発
3. 学会等名 超異分野学会北海道フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上井幸司
2. 発表標題 北海道白糠町産素材を利用した認知症予防のための機能性食品開発
3. 学会等名 超異分野学会 東京大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保野 真理、島森 圭弥、倉賀野 正弘、徳樂 清孝、上井 幸司
2. 発表標題 チリメンアオジソの採取時期による機能性成分の含有量変動とアミロイド 凝集阻害活性
3. 学会等名 日本薬学会第124年会
4. 発表年 2022年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイド形成を評価する方法、装置及びプログラム	発明者 徳楽清孝、上井幸司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/51077	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="https://u.muroran-it.ac.jp/lifeorg/biocat/Top.html">https://u.muroran-it.ac.jp/lifeorg/biocat/Top.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	徳楽 清孝  (Tokuraku Kiyotaka)	室蘭工業大学・大学院工学研究科・教授	
研究協力者	林 貴史  (Hayashi Takafumi)	東北医科薬科大学・薬学部・講師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------