

平成 22 年 5 月 6 日現在

研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2008 -2009  
課題番号：20790067  
研究課題名（和文）PGE<sub>2</sub> 受容体を介する アミロイドの産生制御とそのアルツハイマー病治療薬への応用  
研究課題名（英文）INVOLVEMENT OF PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> IN PRODUCTION OF AMYLOID- $\beta$  PEPTIDES BOTH *IN VITRO* AND *IN VIVO*

## 研究代表者

星野 竜也（HOSHINO TATSUYA）  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：70457589

研究成果の概要（和文）：我々は、APP を過剰発現している神経由来培養細胞を用いて、PGE<sub>2</sub> がアミロイドの産生を促進することを見出した。また PGE<sub>2</sub> の受容体である EP 受容体（EP<sub>1</sub>~EP<sub>4</sub> まで 4 種類存在する）の特異的アゴニストの内、EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> 受容体のアゴニストが PGE<sub>2</sub> 同様、アミロイドの産生を促進すること、及び EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> 受容体のアンタゴニストが アミロイドの産生を阻害することを見出した。さらに APP トランスジェニックマウスと EP<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウス、あるいは EP<sub>4</sub> 受容体ノックアウトマウスを掛け合わせたとこ、野生型マウスに比べ、症状の改善が見られた。

研究成果の概要（英文）：Amyloid- $\beta$  peptides (A $\beta$ , generated by proteolysis of the  $\beta$ amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Inflammation is also believed to be integral to the pathogenesis of AD. Here we show that prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a strong inducer of inflammation, stimulates the production of A $\beta$  in cultured human embryonic kidney (HEK) 293 or human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells, both of which express a mutant type of APP. We have demonstrated using subtype-specific agonists that, of the four main subtypes of PGE<sub>2</sub> receptors (EP<sub>1-4</sub>), EP<sub>4</sub> receptors alone or EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors together are responsible for this PGE<sub>2</sub>-stimulated production of A $\beta$  in HEK293 or SH-SY5Y cells, respectively. An EP<sub>4</sub> receptor antagonist suppressed the PGE<sub>2</sub>-stimulated production of A $\beta$  in HEK293 cells. This stimulation was accompanied by an increase in cellular cAMP levels and an analogue of cAMP stimulated the production of A $\beta$ , demonstrating that an increase in the cellular level of cAMP are responsible for the PGE<sub>2</sub>-stimulated production of A $\beta$ . Immunoblotting experiments and direct measurement of  $\gamma$ -secretase activity suggested that PGE<sub>2</sub>-stimulated production of A $\beta$  is mediated by activation of  $\gamma$ -secretase but not of  $\beta$ -secretase. Transgenic mice expressing the mutant type of APP showed lower levels of A $\beta$  in the brain, when they were crossed with mice lacking either EP<sub>2</sub> or EP<sub>4</sub> receptors, suggesting that PGE<sub>2</sub>-mediated activation of EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> receptors is involved in the production of A $\beta$  *in vivo* and in the pathogenesis of AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬学微生物学分野

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アミロイド・アルツハイマー

1. 研究開始当初の背景

研究提案は、我々が発見したプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) によるアミロイドの産生促進に関する分子機構を解明し、アルツハイマー病治療薬の新しい開発戦略を確立することである。

社会の高齢化に伴い、老人性認知症(痴呆)の主な原因であるアルツハイマー病の患者数が急増しているにも関わらず、その治療法(治療薬)は確立されていない。従ってアルツハイマー病の進行を促進する因子を発見し、それを阻害する医薬品を開発することは極めて重要である。

アルツハイマー病の主な原因は、**アミロイド**という蛋白質が過剰に産生・蓄積・凝集することにより、神経細胞の機能が低下することである。アルツハイマー病の病理学的な特徴の一つである老人斑はアミロイドが凝集したものである。アミロイドはアミロイド前駆体蛋白質(APP)がセクレターゼ、及びセクレターゼにより分解されることにより産生される。

古くから脳内の炎症がアルツハイマー病の進行を促進すると考えられてきた。この根拠は、脳挫傷など炎症を起こす要因がアルツ

ハイマー病のリスクファクターになっていること、及びアルツハイマー病患者の脳において炎症性病変が見られることなどである。特に、強力な炎症増悪因子であるPGE<sub>2</sub>、及びその合成に与る酵素・シクロオキシゲナーゼ(COX)が、アルツハイマー病を増悪していると考えられている。この根拠は、(1)COXを過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、加齢に伴うアルツハイマー病様症状の進行が早いこと、(2)アルツハイマー病患者の脳において、COXの過剰発現とPGE<sub>2</sub>量の増加が見られること、(3)COX阻害薬であるアスピリンなどの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)の長期服用により、アルツハイマー病の発症リスクが大きく低下したりアルツハイマー病の進行が抑制されたりすることが疫学調査から分かっていることなどである。しかしCOXやPGE<sub>2</sub>がアルツハイマー病の進行を促進する機構は理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究で我々は、PGE<sub>2</sub>による**アミロイド産生促進に関する分子メカニズムを明らかにすると共に**、NSAIDsによる抗アルツハイマー

病作用がこの PGE<sub>2</sub> による アミロイド産生促進作用の阻害で説明出来るかを検証する。また EP<sub>2</sub> や EP<sub>4</sub> 受容体のアンタゴニストがアルツハイマー病治療薬として有用であるかを評価する。特に共同研究を行っている小野薬品工業(EP 受容体のアンタゴニストに関しては、世界一の製薬企業)が有する EP<sub>2</sub> や EP<sub>4</sub> 受容体のアンタゴニストライブラリーの中から、アルツハイマー病治療薬として有用なものを選択する研究に力を入れる。また選択した EP<sub>2</sub> や EP<sub>4</sub> 受容体のアンタゴニストを脳へターゲットングするための、DDS (ドラッグデリバリーシステム)を開発する。

### 3. 研究の方法

アルツハイマー病の発症には アミロイドの産生促進以外にも、ネプリライシン依存のアミロイド分解の抑制、タウ蛋白質リン酸化の促進、グリア細胞における アミロイド貪食の抑制なども関与している。そこでこれらの現象に対する EP<sub>2</sub>、EP<sub>4</sub> 受容体アゴニスト・アンタゴニストの効果を検討し、アルツハイマー病における EP<sub>2</sub>、EP<sub>4</sub> 受容体の役割の全体像を明らかにする。この研究は、EP<sub>2</sub>、EP<sub>4</sub> 受容体どちらのアンタゴニスト(あるいは両方ともに作用するアンタゴニスト)が、アルツハイマー治療薬としてより有望かを判断するために必要である。

上述の研究で、脳内に直接投与した場合にはアミロイド産生を抑制するが、静脈から投与した場合には抑制しないアンタゴニストが見出された場合には、脳内移行しない、即ち BBB (血液脳関門) を通過しない薬剤であると考えられるので、DDS 技術を用いて脳内移行させる必要がある。最近我々はベンチャー企業と共同で、化合物の末端にリン酸基を導入すると、PLA (ポリ乳酸) から成るナノ粒子内にその化合物を効率的に封入出来るようになること、及びその PLA ナノ粒子が BBB を通過することを見出した(特許申請中)。そこでこの方法に従いアンタゴニストを有機化学合成により修飾した後ナノ粒子化する

ることにより、BBB を通過させる製剤設計を行う。最終的にはこの製剤を APP トランスジェニックマウスに静脈から投与し、アルツハイマー様症状を改善するかを検討する。

### 4. 研究成果

我々は、APP を過剰発現している神経由来培養細胞を用いて、PGE<sub>2</sub> が アミロイドの産生を促進することを見出した。また PGE<sub>2</sub> の受容体である EP 受容体(EP<sub>1</sub> ~ EP<sub>4</sub> まで 4 種類存在する)の特異的アゴニストの内、EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> 受容体のアゴニストが PGE<sub>2</sub> 同様、アミロイドの産生を促進すること、及び EP<sub>2</sub> と EP<sub>4</sub> 受容体のアンタゴニストが アミロイドの産生を阻害することを見出した。さらに APP トランスジェニックマウスと EP<sub>2</sub> 受容体ノックアウトマウス、あるいは EP<sub>4</sub> 受容体ノックアウトマウスを掛け合わせたと、野生型マウスに比べ、症状の改善が見られた。

### 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 3 件)

Hoshino, T., Matsuda, M., Yamashita, Y., Takehara, M., Fukuya, M., Minoda, K., Maji, D., Ihn, H., Adachi, H., Sobue, G., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Suppression of melanin production by expression of HSP70. *J. Biol. Chem.* 285, 13254-13263. (2010)  
査読有

Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K., Maji, D., Sato, K., Adachi, H., Sobue, G., Ihn, H., Funasaka, Y. and Mizushima, T. Prevention of ultraviolet B radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J. Biol. Chem.* 285, 5848-5858. (2010)  
査読有

Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Nakaya, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narumiya, S., Suzuki, T. and Mizushima, T. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the production of amyloid-β peptides through internalization of the EP<sub>4</sub> receptor.

*J. Biol. Chem.* 284, 18493-18502.  
(2009) 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

星野 竜也 (HOSHINO TATSUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号 : 70457589