

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2012～2015
 課題番号：24390222
 研究課題名(和文) TORC及びHDAC制御機構の解明と新規低分子化合物による神経疾患治療法の開発

 研究課題名(英文) The role and mechanisms of TORC and HDAC signaling pathway and therapeutic new-class small compounds for neurological disease

 研究代表者
 佐々木 勉 (sasaki, tsutomu)

 大阪大学・医学部附属病院・助教

 研究者番号：20534879

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血、パーキンソン病などの神経変性疾患において、神経細胞死を抑制する治療薬は十分ではない。神経保護作用に重要であるSIK1-CREB-CRTCシグナルの制御機構を遺伝子改変マウスを用いて解明するとともに、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の神経疾患における役割を検討した。これらの両シグナルは、神経細胞における細胞死において重要な役割を果たすと同時に、神経疾患における炎症過程に関与していることが分かった。これらの知見のもと、独自のHDAC阻害剤ライブラリーの中から、HDAC1,2を阻害してHDAC3は阻害しない新たなアイソフォーム選択的HDAC阻害剤が神経疾患治療に有用であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Although patients suffering from neurological disease including both neurodegenerative disease and stroke will increase dramatically in the coming years, there are currently a few effective drugs for neuronal protection and disease-modifying therapy. To provide new therapies to overcome these disease, we have examined both roles and mechanisms of salt-inducible kinase (SIK)-CREB-CRTC signaling and both histone deacetylases (HDACs) - histone acetylation. These cascade has been attributed to both not only neuronal injury but also inflammation in many neurological diseases. Among the original HDAC inhibitor library, we identified a novel HDAC1/2 isoform-specific inhibitor for Parkinson's disease and stroke. The isoform selective inhibition of HDAC may pave the way to new strategies for neurological disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：脳虚血 シグナルトランスダクション CREB SIK (塩誘導性キナーゼ) HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) パーキンソン病 HDAC阻害剤 創薬

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、パーキンソン病を含む神経変性疾患は、人口の高齢化とともに増加の一途を辿っている。しかしながら、脳虚血、神経変性疾患ともに、臨床的に有効な神経保護薬、或は disease-modifying therapy(DMT)による病気の進行をくい止める治療はなく、新たな治療薬開発は極めて重要である。我々のグループでは世界に先駆けて虚血耐性現象を報告し、その機序、臨床的応用を模索した。特に転写因子 CREB(cAMP responsive element-binding protein)について検討(J Neurosci 2001, J Neurosci Res 2004, Stroke 2007)し、CREBが脳内に豊富に発現しており、神経栄養因子(BDNF)や mitochondrial biogenesis の中心である PGC-1 α などの誘導を介し神経保護作用を発揮することを明らかにした。また我々は世界に先駆けて(塩誘導性キナーゼ:salt-inducible kinase) SIK2、TORC1が神経細胞に豊富に発現し、脳虚血時には CaMK1/4 の活性化により、SIK2 が分解され、TORC1-CREB を介して下流の神経保護因子の発現誘導する新規シグナル経路を同定(Sasaki et al. *Neuron* 2011 69(1):106-19)した。他方 SIK は Class2a-HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素)をリン酸化し、HDACを抑制する機能も有していることも証明してきた(Nat Med 2007 13:597-603)。中枢神経系において、生理的状態、または神経疾患において、SIK-TORC1、SIK-Class2-HDAC 両シグナルがどのように調節され、また各 SIK isoform による調節機構の差異も未知である。この HDAC はクラス ~ に分類され、その役割が異なることが知られている。臨床応用をする場合、病態における各 HDACs の役割を明らかとしたうえで、isoform 特異的 HDAC 阻害剤を開発する必要性がある。

2. 研究の目的

超急性期脳血管障害に関しては、t-PA 静注療法、頭蓋内血栓除去デバイスなどの血管内治療の発達が目覚ましい。一方で、神経変性疾患においては、神経保護療法、disease-modifying therapy(DMT)は殆どなく、新たな治療法、治療薬の開発は極めて重要である。そこで本研究においては、SIK-CREB-CRTC シグナルの神経疾患における動態、役割について検討すること、遺伝子発現、細胞周期を大きく調節しうる Histone deacetylase (HDAC) の調節機構を検討し、新たな治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SIK2 遺伝子欠損が虚血・再灌流障害に耐性を示す点に着目し、さらに SIK-TORC、SIK-Class2-HDAC、Class1-HDAC シグナルを統合的、網羅的に解析する。SIK には SIK1,2,3 の各アイソフォームがあり、本研究において各 SIK1,2,3 遺伝子改変マウスを用

いて、各々の神経病態における役割の差異を検討する。

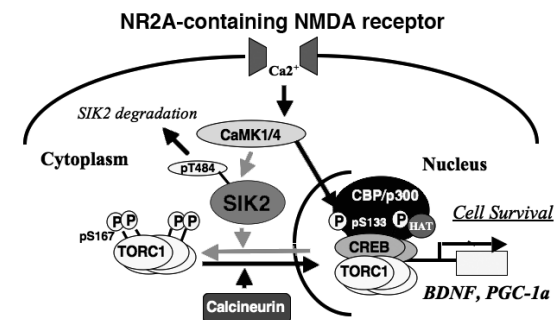
(2) 脳においては SIK の基質である CRTC1/TORC1 が高発現しており、我々は既に CRTC1 が神経保護に繋がることを報告(Sasaki et al. *Neuron* 2011 69(1):106-19)しており、更に発展させ、CRTC1^{flox/flox} マウスを作製し、脳特異的 CRTC1 欠損マウスを作製し、CRTC1 の役割を検討する。

(3) 従来より脳虚血においては、グルタミン酸毒性が重視されてきたが、そのグルタミン酸毒性には NMDA 受容体が重要な役割を果たしている。近年、NMDA 受容体にも NR2A は神経保護、NR2B が神経障害的に作用することが報告され、我々も虚血耐性の系において NR2A が重要であること(*J Cereb Blood Flow Metab*, 2010)を報告した。更に近年 NMDA 受容体の活性に必要な NR1 サブユニットにおいて、従来はグリシンが必要であるとされてきたが、近年、D-serine の重要性が提唱されている。そのため、D/L-serine の脳虚血時の測定並びに重要性を検討する。

(4) SIK は Class2-HDAC リン酸化活性を有するキナーゼであり、神経病態における Class2-HDAC、或は Class1-HDAC についての役割を検討するとともに、新たな作用機序に基づいた新規低分子化合物の創薬、開発を目標とする。特に抗がん剤として臨床的に用いられている HDAC 阻害剤については、独自の HDAC 阻害剤ライブラリーを用いて、新たなアイソフォーム選択的 HDAC 阻害剤を用いた神経疾患治療法の開発を目指す。

4. 研究成果

(1) 脳虚血時には CaMK1/4 の活性化により、SIK2 が分解され、TORC1-CREB を介して下流の神経保護因子の発現誘導する(下図)



Sasaki et al. *Neuron* 2011 69(1):106-19

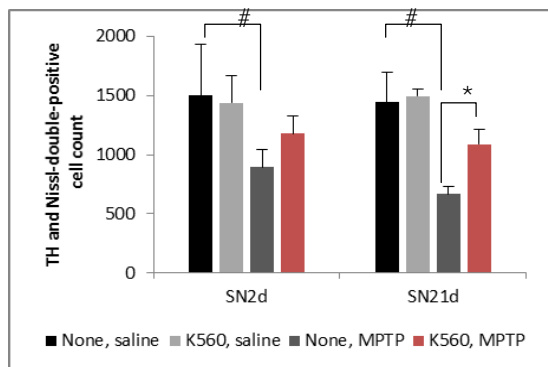
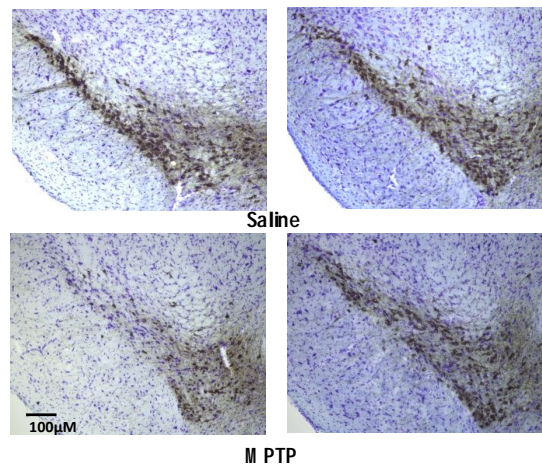
SIK2 はこのように神経細胞内においては、NMDA 受容体の経路に関与するのに対して、SIK1 は神経細胞における Na/K ATPase の調節に寄与することが電気生理学的検討などより示され、SIK2KO マウスが神経保護的であるのに対して、SIK1KO マウスは神経障害的であることが判明した(現在投稿中)。また SIK1/2 ダブル KO についても検討した。SIK2 KO マウスは TNFa が低下しており、このことが脳梗塞サイズ縮小に寄与することも報告していたが、SIK1KO、SIK3KO マウスにお

いては、虚血後の炎症性サイトカインの動態が異なっており、これらの差異が各 SIK の神経病態における差異に繋がること示唆され、現在論文投稿中である。このことは、脳虚血をはじめとする神経疾患で、炎症性サイトカインへの SIK-CREB シグナルの重要性を示唆するもので、今後新たな創薬発展に寄与しうると考えられた。

(2) 転写因子 CREB の coactivator として CBP が当初報告されてきたが、CBP はその他多くの遺伝子の coactivator としても作用することや CBP 強制発現においても CREB の転写活性が上昇しないことなどが従来から、CBP 以外の CREB 特異的な coactivator が探索されてきたが、2003 年 Conkright MD らにより新たに CREB 特異的な coactivator として CRTC/TORC が同定され、特に CRTC1 がその他の臓器とは異なり、高発現していることが判明した。我々は CRTC1 の更なる重要性を証明すべく、CRTC1^{flox/flox} マウスの作製に着手した。Eucomm 由来の受精卵より CRTC1^{flox/flox} マウスを作製したが、ホモが取れず、FRT 配列などの排除を試みたが、CRTC1^{flox/flox} マウスホモマウスがとれず、状況を克服すべく、その後、現在、米国研究所のグループと共同研究を開始しており、現在も継続中である。脳における CRTC1 の役割解明は認知症治療へと繋がりをうるものである。特に糖尿病は認知症の重要な危険因子であることが報告されているが、CRTC は糖代謝、脂肪代謝経路との関連性が報告されており、両者の関係性を証明するものとして現在も検討中である。

(3) NMDA 受容体 NR1 サブユニットにおいて、従来はグリシンが必要であるとされてきたが、近年、D-serine の重要性が提唱されている。それに加え、D-serine は Grid2 を介した小脳学習に関与することが報告されてきた。我々は進行性の歩行障害を示す自然発症の TS3 マウスを認め、原因遺伝子が Grid2 の deletion mutant であることを同定した (Genes, 2014)。これらの背景をもとに、Grid2 と D-serine の関係性などについて着目、HPLC にて、光学異性体である D/L-serine の測定系の確立とともに、脳虚血においては、神経細胞においては L-serine 投与にて神経毒性を発揮するが、他方で L-serine が脳血流増加を来し、脳梗塞サイズの縮小に寄与することを証明し、脳虚血などにおいては、D/L-serine のバランスが重要であることが示された (Watanabe A, Sasaki T et al. *Neuroscience*, 2016, in press)。Grid2 については、従来より小脳において注目されてきたが、我々は大脳神経細胞においても発現していることを発見しており、現在、その役割について解析中であり、投稿準備中である。これら D-amino 酸における脳内の役割は未だ不明のことも多く、今後、神経疾患患者サンプルのバイオマーカーとして臨床応用を現在検討している。

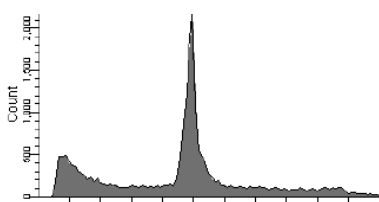
(4) HDAC アイソフォーム阻害剤活性の異なる、構造的には、hydroxamate、carboxylate、2-aminobenzamide、thienyl 基置換 2-aminobenzamide からなる独自の HDAC 阻害剤ライブラリーから、in vitro, in vivo における神経疾患治療に有用な薬剤を探索してきた。色々な HDAC 阻害剤の中で、TSA, SAHA などは、神経細胞への毒性が強く、HDAC1,2,3 を阻害する MS-275 も神経疾患モデルマウスにて、長期投与にて体重減少などの毒性を認めた。他方、神経疾患においては、今回そのライブラリーから抽出された K560 は、HDAC1,2 を選択的に阻害 (HDAC3 は阻害しない) 薬に加え、2-aminobenzamide 構造に、ペナム系抗生剤ピペラシリンの水溶性官能基であるジケトピペラジン基を付与することにより、物性の向上とともに、細胞死抑制効果をもたらした。即ち、K560 は通常の HDAC1,2 阻害剤とは異なり、アポトーシスを誘発せずに、むしろアポトーシスを抑制する作用を有する。このことは、実際に FACS 解析の subG1 分画の減少や、アポトーシス関連タンパク質、生存関連タンパク質の検出試験で確認した。



(Choong CJ, Sasaki T et al. *Neurobiology of Aging*, 2016)

上記のごとく、パーキンソン病モデルマウス (MPTP モデル) の大脳皮質において、HDAC1,2 活性が上昇していることを見出すと共に、HDAC1,2 選択的阻害剤 K560 が、MPTP 処理前及び処理後いずれの経口投与でも、有意な神経細胞死防御効果を発揮するこ

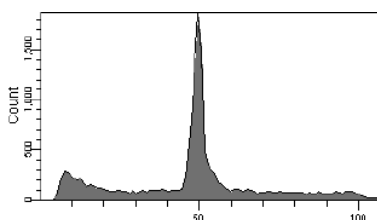
とを認めた (Choong CJ, **Sasaki T** et al. *Neurobiology of Aging*, 2016 Jan;37:103-16)。K560 は我々のグループによって独自に創製されたものであり、X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) の上昇並びに、p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) の低下を介して、抗アポトーシス作用により神経細胞死を抑制した。なお、マウスの体重減少や臓器肥大などは全く観察されなかった。また K560 脳内移行については、四重極 LC-MS/MS にて証明するとともに (**parent peak corresponding to K560 at m/z: 492.1701, daughter ion at m/z: 350.0240**) 脳内アセチルヒストン H3 の著明な亢進を認めた。



MPTP (apo), 48h

Sub G1: 32.2%:

K560 による抗アポトーシス効果



MTPT + K560 (apo), 48h

Sub G1: 27.5%:

HDAC1,2 のみ阻害し HDAC3 は阻害しない K560 はパーキンソン病(PD)、脳虚血の両者において、神経保護に繋がる。病態に応じて様々な class HDACs が活性化するが、class HDACs 阻害剤の 1 つである MC-1568 (Nebbio A et al. *EMBO Rep*, 2009)は、PD モデル、脳虚血モデルの両者において、ともに神経保護効果はなかった。他方、選択的 HDAC3 阻害剤 (Cpmod 11) についても、PD モデルにおいては神経保護効果を認めなかったが、脳虚血では神経保護に繋がることが示された。特に HDAC3 に関しては、PINK1 が HDAC3 を活性化しており、このことが HDAC3 による p53 依存性アポトーシス抑制に寄与していることが報告されている (Choi HK et al, *Hum Mol Genet*, 2015)。PINK1 が遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であることを鑑みると、少なくとも PD では HDAC3 は阻害しない方が良く考えられる。PD では、K560 のように活性化した HDAC1,2 のみを抑制する治療戦略が重要であると考えられる。

5) 癌抑制遺伝子である p53 は近年、アポトーシスだけでなく、ネクローシス、ネクロプトーシスなど幅広い細胞死に関与することが

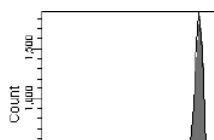
知られている。p53 蛋白を中心に p53 蛋白と MDM2, MDMX, PPID, DAPK1 などの相互作用を阻害する薬剤もすでに見出しており (Uesato S, Sasaki T Enari M et al. *Bioorg Med Chem*. 2016) 今後、神経疾患に対する治療効果を検討中である。

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 13 件)

- 1) Uesato S, Matsuura Y, Matsue S, Sumiyoshi T, Hirata Y, Takemoto S, Kawaratani Y, Yamai Y, Ishida K, **Sasaki T**, Enari M. Discovery of new low-molecular-weight p53-Mdmx disruptors and their anti-cancer activities. *Bioorg Med Chem*. 2016 Apr 15;24(8):1919-26. 査読有
doi: 10.1016/j.bmc.2016.03.021.
- 2) Watanabe A, **Sasaki T**, Kanki H, Yukami T, Sakaguchi M, Takemori H, Kitagawa K, Mochizuki H. *Neuroscience*. 2016 査読有 (in press)
- 3) Choong CJ, **Sasaki T**, Hayakawa H, Yasuda T, Baba K, Hirata Y, Uesato S, Mochizuki H. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2016 Jan;37:103-16. 査読有
doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.10.001.
- 4) Hatate J, Miwa K, Matsumoto M, **Sasaki T**, Sakaguchi M, Kitagawa K, Mochizuki H. Association between cerebral small vessel diseases and mild parkinsonian signs in the elderly with vascular risk factors. ***Parkinsonism Relat Disord***. 2016 May;26:29-34. 査読有
doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.02.011..
- 5) Gon Y, Okazaki S, Terasaki Y, **Sasaki T**, Yoshimine T, Sakaguchi M, Mochizuki H. Characteristics of cryptogenic stroke in cancer patients. ***Annals of Clinical and Translational Neurology***. Feb 11;3(4):280-7. doi: 10.1002/acn3.291. 査読有
- 6) Yukami T, Yagita Y, Sugiyama Y, Oyama N, Watanabe A, **Sasaki T**, Sakaguchi M, Mochizuki H, Kitagawa K. Chronic Elevation of Tumor Necrosis Factor- α Mediates the Impairment of Leptomeningeal Arteriogenesis in db/db Mice. ***Stroke***. 2015 Jun;46(6):1657-63. 査読有
doi: 10.1161/STROKEAHA.114.008062.
- 7) Sugiyama Y, Yagita Y, Yukami T, Oyama N,



- Terasaki Y, Sasaki T, Mochizuki H, Kitagawa K. Granulocyte colony-stimulating factor fails to enhance leptomeningeal collateral growth in spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett*. 2014 Apr 3;564:16-20. 査読有
doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.053.
- 8) Kumagai A, Fujita A, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. 査読有
Genes (Basel). 2014 Dec 11;5(4):1095-114.
doi: 10.3390/genes5041095.
- 9) Yagita Y, Kitagawa K, Oyama N, Yukami T, Watanabe A, Sasaki T, Mochizuki H. Functional deterioration of endothelial nitric oxide synthase after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013, Oct;33(10):1532-9 査読有
doi: 10.1038/jcbfm.2013.112.
- 10) Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in glucose and lipid homeostasis in mice. **PLoS One**. 2012;7(5):e37803 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0037803
- 11) Kitagawa K, Sasaki T, Terasaki Y, Yagita Y, Mochizuki H. CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):904-7.
- 12) Konno M, Hasegawa T, Baba T, Miura E, Sugeno N, Kikuchi A, Fiesel FC, Sasaki T, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. Suppression of dynamin GTPase decreases α -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener*. 2012 Aug 14;7:38. 査読有
doi: 10.1186/1750-1326-7-38
- 13) Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, Terasaki Y, Uebi T, Horike N, Takagi H, Susumu T, Teraoka H, Kusano K, Hatano O, Oyama N, Sugiyama Y, Sakoda S, Kitagawa K: SIK2 is a new key regulator for neuronal survival after ischemia through TORC1-CREB. **Neuron** (2011) Jan 13;69(1):106-19
査読有
doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.004.
- 〔学会発表〕(計 12 件)
- 1) 佐々木 勉 他、アイソフォーム特異的 HDAC 阻害剤による虚血性脳血管障害の治療検討、第 33 回日本神経治療学会総会、名古屋国際会議場、名古屋市 2015 年 1 月 28 日
 - 2) 佐々木 勉 他、脳虚血における PGC-1 α シグナルの調節機序の検討、第 27 回日本脳循環代謝学会総会、富山国際会議場、富山市、2015 年 10 月 30 日
 - 3) 渡邊 彰弘、佐々木 勉 他、脳虚血における SRR-Serine の役割について、第 27 回日本脳循環代謝学会総会、富山国際会議場、富山市、2015 年 10 月 30 日
 - 4) Choong CJ, Sasaki T et al. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease. IAPRD 2015, Milan, Italy
 - 5) Choong CJ, Sasaki T et al. Novel HDAC 1/2 isoform-specific inhibitor K560 ameliorates MPP+/MPTP-mediated experimental Parkinson's disease. AOPMC2016 2016/3/11~3/16, Manila, Philippines
 - 6) 佐々木 勉 他、脳虚血における CRTC-PGC-1 α シグナルの動態についての検討、第 51 回日本臨床分子医学会総会、東京国際フォーラム、東京都千代田区、2014 年 4 月 11 日
 - 7) 佐々木 勉 他、脳虚血時の CRTC-PGC-1 α シグナルの動態、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 21 日~24 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
 - 8) Sasaki T, Choong CJ et al. Efficacy and implications of selective class I or 2 HDAC inhibitors for neurological disorders. American Neurological Association 2014 Annual Meeting, 10/12/2014—10/14/2014
 - 9) Choong CJ, Sasaki T et al. Efficacy of selective class I or 2 HDAC inhibitors for neurological disorders, ASENT 2015, 19/2/2015—21/2/2015, Washington, USA
 - 10) 佐々木 勉 他、ニコチン性アセチルコリン受容体活性化による神経保護作用の検討、日本脳卒中学会 (Stroke2014) 2014 年 3 月 14 日、大阪国際会議場、大阪
 - 11) 佐々木 勉 他、ニコチンによる神経保護効果の検討、第 54 回日本神経学会総会、2013 年 5 月 29 日 A Role of CREB-CRTC signaling in nicotine-induced neuroprotection, 20/5/2013 6 月 1 日、東京国際フォーラム、東京

12) Sasaki T et al. A Role of CREB-CRTC signaling in nicotine-induced neuroprotection, 20/5/2013—23/5/2013, Shanghai, China

〔産業財産権〕
出願状況（計5件）

名称：アイソフォーム特異的新規 HDAC 阻害剤による神経疾患治療の開発
発明者：佐々木 勉、望月秀樹、Choong Chi-Jing、上里新一、平田佳之
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学
番号：特願 2014-183239
出願年月日：平成 26 年 9 月 9 日
国内外の別： 国内

名称：新規含窒素複素環誘導体
発明者：上里新一、住吉孝明、平田佳之、望月秀樹、佐々木 勉
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学
番号：特願 2014-183235
出願年月日：平成 26 年 9 月 9 日
国内外の別： 国内

名称：含窒素複素環誘導体、神経保護剤及びがん治療用医薬組成物
発明者：佐々木 勉、望月秀樹、Choong Chi-Jing、上里新一、住吉孝之、平田佳之
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学
番号：**PCT/JP2015/075660**
出願年月日：平成 27 年 9 月 9 日
国内外の別： 国際

名称：アシルアミノフェニル基を有する化合物及びその用途
発明者：望月秀樹、佐々木勉、Choong Chi-Jing、上里新一
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学
番号：特願 2014 - 237826
出願年月日：平成 26 年 11 月 25 日
国内外の別： 国内

名称：アシルアミノフェニル基を有する化合物及びその用途
発明者：佐々木 勉、望月秀樹、Choong Chi-Jing、上里新一、住吉孝之、平田佳之
権利者：国立大学法人大阪大学、学校法人関西大学
番号：**PCT/JP2015/083139**
出願年月日：平成 27 年 11 月 25 日
国内外の別： 国際

(1)研究代表者
佐々木 勉 (sasaki tsutomu)
大阪大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20534879

(2)研究分担者
北川 一夫 (kitagawa kazuo)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70301257

(3) 研究分担者
長岡 康夫 (nagaoka yasuo)
関西大学・工学部・教授
研究者番号：90243039

(4) 研究分担者
竹森 洋 (takemori hirosi)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・プロジェクトリーダー
研究者番号：90273672

(5)連携研究者
望月 秀樹 (mochiduki hideki)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：90230044

(5)連携研究者
上里 新一 (uesato shinnichi)
関西大学・工学部・教授
研究者番号：50111969