

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659037

研究課題名(和文)既存薬によるアルツハイマー病治療効果に与るメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism for anti-AD effect of approved medicines

研究代表者

水島 徹(Mizushima, Tohru)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：00264060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)対象既存薬を決定する

様々な観点から対象とする既存薬を、グリタゾン系糖尿病治療薬、スタチン類、エストロゲン、アンジオテンシン拮抗薬、カルシウム拮抗薬とした。(2) 対象既存薬の作用を分子レベルで網羅的に解析する。1 誘導遺伝子の網羅的解析：DNAチップ、プロテインチップなどを用いて、対象既存薬により誘導される遺伝子を用いて解析した。その結果、特に興味深い結果として、スタチンは熱ショックタンパク質を誘導することを見出した。2 結合タンパク質の網羅的解析：ヒト全タンパク質を二次元電気泳動により分離後、蛍光標識したスタチンを作用させ、結合するタンパク質を網羅的に同定した。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF)-B1 stimulates this phagocytosis. We recently reported that the APP23 mouse model for AD showed fewer AD-related phenotypes when these animals were crossed with transgenic mice expressing heat shock protein (HSP) 70. We here examined the effect of geranylgeranyl acetone, an inducer of HSP70 expression, on the AD-related phenotypes. Repeated oral administration of geranylgeranyl acetone to APP23 mice for 9 months not only improved cognitive function but also decreased levels of AB, AB plaque deposition and synaptic loss. The treatment also up-regulated the expression of an Aβ-degrading enzyme and TGF-B1 but did not affect the maturation of APP and secretase activities. These outcomes were similar to those observed in APP23 mice genetically modified to overexpress HSP70. A single oral administration of geranylgeranyl acetone significantly increased the level of HSP70 when AB was concomitantly injected directly into the hippocampus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

AD について：AD は老人性認知症（痴呆）の主な原因であり、社会の高齢化に伴いその患者数が急増している（2050 年には全世界で患者数が一億人を突破すると予想されている）。しかしながら現在使われている治療薬は病気の進行を止める根本的な治療薬ではない。近年、欧米の大手製薬企業が AD 新規治療薬の臨床試験を行ったが、副作用、あるいは効果不足から全ては失敗に終わり、関係者は失望している。本研究提案は、既存薬に着目した新しい創薬研究戦略を AD に応用し医薬品の開発に繋げようとする挑戦的、かつ社会貢献を目指した研究である。

AD 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。

アミロイドはアミロイド前駆体蛋白質（APP）からセクレターゼにより産生される。そこでセクレターゼの阻害、アミロイドの凝集抑制、神経細胞保護など、AD 治療薬の様々なターゲットが考えられているが、どのターゲットが優れているかは理解されていない。これは病態を再現した動物モデルがなく、候補薬を実際に患者さんに投与しないとそのターゲットの有用性が判定出来ないためである。また他にも有用なターゲットが存在すると思われるが、病態解析のみではターゲットの全容を明らかにすることは困難である。

2. 研究の目的

既存薬に着目した研究成果と提案：疫学調査などから、他の疾患に対する既存薬が AD にも有効ではないかという報告が相次いでいる。例えば、アスピリンなどの非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs、プロスタグランジン E2（PGE2）を減少させる）の長期服用により AD の発症リスクが大きく低下することが知られているが、その機構は不明であった。我々は NSAIDs の作用機構を網羅的に同定してきた。（JBC 2003, 2005, 2006, 2009a; Mol Pharmacol 2005）。NSAIDs の AD 抑制効果に関しては、PGE2 が EP4 受容体を介してアミロイドの産生を促進し AD を増悪している（NSAID は EP4 受容体の活性化を阻害することにより、抗 AD 作用を発揮する）ことを明らかにし、EP4 受容体が AD 治療薬の創薬ターゲットとして有用であることを示唆した（JBC 2007a, 2009b, AD 治療薬の新しい創薬ターゲットが発見されたと、新聞やテレビで広く報道された）。実際我々は EP4 受容体のアンタゴニストが、AD モデルマウスの記憶学習能力を顕著に改善することを報告し（J Neurochem in press）現在その開発を製薬企業と共同で行っている。また我々は、DNA チップを用いて NSAIDs が誘導する遺伝子を網羅的に同定し、NSAIDs

が小胞体シャペロンを誘導し、これも NSAID による AD の進行抑制に寄与していることを見出した（Cell Death Differ 2004; Oncogene 2006; Mol Pharmacol 2007a）。そこで本研究で我々は、AD に有効であることが示唆されている他の既存薬の作用を網羅的に解析し、AD 抑制機構を解明する（AD 治療薬の新たなターゲットを発見する）。一方、疫学調査等から示唆されているもの以外にも、AD に有効な既存薬は存在すると思われる。そこでそれらを同定するために本研究では、我々が世界に先駆け構築した既存薬ライブラリー（現在臨床で使われている既存薬を網羅した化合物ライブラリー）を充実させ、

アミロイド凝集抑制や神経細胞保護などの作用を持つ既存薬を検索し、その AD 治療薬としての評価を行う。

まとめ：このように本研究は、我々が世界に先駆け展開してきた既存薬に着目した創薬研究戦略を AD に応用し、AD 治療薬の新たなターゲットを発見し世界的に停滞している AD 治療薬の開発を加速させようとする挑戦的、かつ萌芽的な研究であるだけでなく、新しいタイプの AD 治療薬の開発に繋がる社会貢献性の高い研究でもある。

3. 研究の方法

(1) 対象既存薬を決定する

対象とする既存薬に関しては現在のところ、抗 AD 作用が知られているグリタゾン系糖尿病治療薬、スタチン類、エストロゲン、アンジオテンシン拮抗薬、カルシウム拮抗薬を考えている。一方、疫学調査などを行い、新たな対象既存薬をリストアップする。このリストアップのポイントは、医薬品として安全であること、臨床的なエビデンスが強いこと、経口投与可能など優れた体内動態を有することなどである。

(2) 対象既存薬の作用を分子レベルで網羅的に解析する

誘導遺伝子の網羅的解析

DNA チップ、プロテインチップなどを用いて、対象既存薬により誘導される遺伝子を様々な条件で同定する。神経細胞、グリア細胞など様々な細胞を用いると同時に、アミロイドを発現している細胞なども用いる。興味深い遺伝子（AD 抑制に関与している可能性がある遺伝子）に関しては、AD に関する細胞評価系（神経由来培養細胞におけるアミロイドの産生など）にその既存薬を作用させ、効果が見られるかを検討する。さらに AD 動物モデル（APP 過剰発現マウス）を用いてその既存薬のアミロイド量、神経細胞死、記憶学習能力に対する効果を調べ、効果が見られた場合、その効果とその遺伝子発現変化に依存しているかを評価する。例えば我々は、GGA（胃薬）の HSP 誘導効果を見出し、HSP を誘導できないノックアウトマウス

スでは、この胃薬の抗胃潰瘍作用が見られないこと示し、HSP 誘導効果がこの胃薬の抗胃潰瘍作用を担っていることを証明した (Mol Pharmacol 2007b; JBC 2009c)。このような研究を通して、その既存薬の AD 抑制機構を解明する (AD の新たな創薬ターゲットを発見する)。

結合タンパク質の網羅的解析

ヒト全タンパク質を二次元電気泳動により分離後、蛍光標識した対象薬を作用させ、対象薬に結合するタンパク質を網羅的に同定する。同定したタンパク質の解析 (AD 抑制機構の解明へ向けた解析) は、上述の誘導遺伝子の場合と同様に行う。

その他の網羅的解析

我々が持っている技術を活かした網羅的解析も行う。例えば既存薬を細胞に作用させ、細胞内情報伝達物質 (cAMP, Ca²⁺ など) の変化を網羅的に解析する、あるいは既存薬と結合する受容体を網羅的に同定するなどの研究を予定している。

既存薬ライブラリーを用いたスクリーニング

我々は国内で使用されている約 800 種の既存薬の内、600 種を網羅した既存薬ライブラリーを構築している。そこで本研究費を使用して、購入可能なすべての既存薬を揃える。

次に、既存薬ライブラリーを AD に関する様々な医薬品スクリーニング系に適用し、特定の薬理効果を持つ既存薬を発見する。我々が有している医薬品スクリーニング系は、アミロイド凝集・産生抑制、ネプリライシンによる アミロイド分解促進、Tau リン酸化抑制、神経細胞保護、神経伝達促進などである。また上述の研究から明らかになった AD の新たな創薬ターゲットに関するスクリーニングも行う。興味深い既存薬を発見した場合は、上述のように、AD 抑制機構の解明へ向けた解析を行う。

(3) 候補既存薬の絞り込み

上述の研究から選択された既存薬から、有用な既存薬の絞り込みを行う。絞り込みのポイントは、AD のモデルマウスでの効果、疫学などの臨床的なエビデンスの強さ、安全性・投与しやすさ、特許環境などである。

(4) 既存薬の周辺化合物を合成し、その作用を調べる

本研究では、ヒトでの安全性や体内動態が確認されているという既存薬の利点を活かすために、出来れば既存薬それ自体を対象にしたい。しかし薬理効果が弱いなどの問題がある場合は、周辺化合物の合成を行う。即ち、リストアップした既存薬の周辺化合物を多数合成する。その際、明確な合成戦略を立てて系統的に合成を行う。例えば我々は、膜傷害性が少ない NSAID を得るために、NSAID と膜との相互作用をシミュレーションし合

成戦略を立てた結果、高い確率で膜傷害性の少ない NSAID を得ることが出来た (J Med Chem 2010)。合成した化合物の作用を細胞・動物を用いて解析し、AD 治療薬として有用な化合物を選択する。

(5) DDS 技術による、薬物の特異的送達

DDS 技術は、医薬品を患部へ特異的に運搬 (ターゲティング) するために、医薬品を修飾する技術である。目的化合物をナノ粒子に封入し、その粒子表面を修飾 (組織特異的に発現しているタンパク質に対する抗体でコートするなど) しターゲティングする技術は、DDS にとって大変有用である。従来技術では親水性の高い化合物は封入できなかったが、最近我々は鉄や亜鉛イオンにより不溶化することにより、親水性の高い化合物を封入する方法を確立した (この方法により血管新生作用のある PGE1 を血管傷害部位へターゲティングすることに成功し、現在臨床試験を行っている) (Pharm Res 2008, 2009a, 2009b; Int J Pharm 2010; Biomacromolecules 2010; J Control Release 2010)。この技術を使えば、ほとんどの化合物をナノ粒子に封入出来る。また我々は、ナノ粒子表面を癌細胞で特異的に発現しているタンパク質に対する抗体でコートし、ナノ粒子を癌組織へ特異的に送達することに成功している。そこで本研究において我々は、ナノ粒子を脳へ送達させる技術を確立し、上述の研究でリストアップした既存薬の脳へのターゲティングを目指す。

4. 研究成果

(1) 対象既存薬を決定する

様々な観点から対象とする既存薬を、グリタゾン系糖尿病治療薬、スタチン類、エストロゲン、アンジオテンシン拮抗薬、カルシウム拮抗薬とした。

(2) 対象既存薬の作用を分子レベルで網羅的に解析する

誘導遺伝子の網羅的解析

DNA チップ、プロテインチップなどを用いて、対象既存薬により誘導される遺伝子を用いて解析した。その結果、特に興味深い結果として、スタチンは熱ショックタンパク質を誘導することを見出した。

結合タンパク質の網羅的解析

ヒト全タンパク質を二次元電気泳動により分離後、蛍光標識したスタチンを作用させ、結合するタンパク質を網羅的に同定した。しかし、上述の作用に関連する因子は同定出来なかった。

既存薬ライブラリーを用いたスクリーニング

まず、本研究費を使用して、購入可能なす

すべての既存薬を揃え、既承認薬ライブラリーを完成させた。

次に、既存薬ライブラリーを用いて、現在プリオンとアミロイドとの結合を阻害する既存薬、EphB2とアミロイドとの結合を阻害する既存薬、HSPを誘導する既存薬を検索している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計22件)

1. Yamashita, Y., Tanaka, K., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Ishihara, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T., Wada, M., Mashimo, T., Fukunishi, Y. and Mizushima, T. Synthesis and biological comparison of enantiomers of mepenzolate bromide, a muscarinic receptor antagonist with bronchodilatory and anti-inflammatory activities. *Bioorg. & Medic. Chem.* in press.
2. Kurotsu, S., Tanaka, K., Niino, T., Sugizaki, T., Azuma, A., Suzuki, H. and Mizushima, T. Ameliorative effect of mepenzolate bromide against pulmonary fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* in press.
3. Sawazaki, R., Ishihara, T., Usui, S., Hayashi, E., Tahara, K., Hoshino, T., Higuchi, A., Nakamura, S., Tsubota, K. and Mizushima, T. Diclofenac protects cultured human corneal epithelial cells against hyperosmolarity and ameliorates corneal surface damage in a rat model of dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 2547-2556. (2014)
DOI:10.1167/iovs.13-1385
4. Tanaka, K., Kurotsu, S., Asano, T., Yamakawa, N., Kobayashi D., Yamashita, Y., Yamazaki, H., Ishihara, T., Watanabe, H., Maruyama, T., Suzuki, H. and Mizushima, T. Superiority of pulmonary administration of mepenzolate bromide over other routes as treatment for chronic obstructive pulmonary disease. *Sci. Rep.* 28, 4510. (2014).
5. Yamakawa, N., Suzuki, K., Yamashita, Y., Katsu, T., Hanaya, K., Shoji, M., Sugai, T. and Mizushima, T. Structure-activity relationship of celecoxib and rofecoxib for the membrane permeabilizing activity. *Bioorg. & Medic. Chem.* 22, 2529-2534. (2014)
DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.032.
6. Tanaka, K., Ishihara, T., Sugizaki, T., Kobayashi D., Yamashita, Y., Tahara, K., Yamakawa, N., Iijima, K., Mogushi, K., Tanaka, H., Sato, K., Suzuki, H. and Mizushima, T. Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse

model of chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Communications* 4, 2686. (2013)

7. Hoshino, T., Suzuki, K., Matsushima, T., Yamakawa, N., Suzuki, T. and Mizushima, T. Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by geranylgeranylacetone in mice. *PLoS One* 8, e76306. (2013)

DOI:10.1371/journal.pone.0076306

8. Yamashita, Y., Hanaya, K., Sugai, T., Mizushima, T. and Shoji, M. Chemo-enzymatic enantioconvergent approach toward ethyl shikimate from ethyl 5-hydroxy-3,4-isopropylidenedioxycyclohex-1-enecarboxylate. *Tetrahedron* 69, 6527-6532. (2013).

9. Ishihara, T., Yamashita, Y., Takasaki, N., Yamamoto, S., Hayashi, E., Tahara, K., Takenaga, M., Yamakawa, N., Ishihara, T., Kasahara, T. and Mizushima, T. Prostaglandin E1-encapsulated nanoparticles improve walking activity in an experimental rat model of intermittent claudication. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 1187-1194. (2013)

10. Tanaka, R., Watanabe, H., Kodama, A., Chuang, VTG., Ishima, Y., Hamasaki, K., Tanaka, K., Mizushima, T., Otagiri, M. and Maruyama, T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 345, 271-283. (2013)

DOI:10.1124/jpet.112.201814

11. Yamakawa, N., Suemasu, S., Watanabe, H., Tahara, K., Tanaka, K., Okamoto, Y., Ohtsuka, M., Maruyama, T. and Mizushima, T. Comparison of pharmacokinetics between loxoprofen and its derivative with lower ulcerogenic activity, fluoro-loxoprofen. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 28, 118-124. (2013)

12. Matsuda, M., Hoshino, T., Yamakawa, N., Tahara, K., Adachi, H., Sobue, G., Maji, D., Ihn, H. and Mizushima, T. Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J. Invest. Dermatol.* 133, 19-28. (2013)

doi:10.1038/jid.2012.383

13. Nakashita, M., Suzuki, H., Miura, S., Taki, T., Uehara, K., Mizushima, T., Nagata, H. and Hibi, T. Attenuation of acetic acid-induced gastric ulcer formation in rats by glucosylceramide synthase inhibitors. *Dig. Dis. Sci.* 58, 354-362. (2013)

doi:10.1007/s10620-012-2350-x

14. Tanaka, K., Shirai, A., Ito, Y.,

Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Expression of 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 818-824. (2012)
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.07.158

15. Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T. Tahara, K., Tanaka, K., Matsui, M., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, S. and Mizushima, T. Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1470-1481. (2012)
DOI:10.1016/j.bcp.2012.09.016

16. Tanaka, K., Azuma, A., Miyazaki, Y., Sato, K. and Mizushima, T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Chest* 142, 1011-1019. (2012)

17. Mizushima, T. Development of NSAIDs with lower gastric side effect. *Frontier of Gastrointestinal Research* 30, 71-78. (2012)
DOI:10.1159/000338396

18. Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, k., Ohtsuka, M. and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *J. Med. Chem.* 55, 5143-5150. (2012)
DOI:10.1021/jm300049g2012

19. Tanaka, K., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1250-L1261. (2012)
DOI:10.1152/ajplung.00019.2012

20. Asano, T., Tanaka, K. Suemasu, S., Ishihara, T., Tahara, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Fukudo, S. and Mizushima, T. Effects of α -(1,3-1,6)-D-glucan on irritable bowel syndrome-related colonic hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 444-449. (2012)
DOI:10.1016/j.bbrc.2012.03.015

21. Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T. and Mizushima, T. purification and characterization of hsp-inducers from eupatorium lindleyanum *Biochem. Pharmacol.* 82, 909-922. (2012)

22. Hoshino, T., Namba, T., Takehara,

M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP₄ receptor. *J. Neurochem.* 120, 795-805. (2012)
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07567.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水島徹 (MIZUSHIMA, Tohru)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：0026406