

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860358

研究課題名(和文)クルクミン誘導体CNB-001をシードとした新規認知症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic drug for dementia using a novel neuroprotective compound J147

研究代表者

赤石 樹泰 (Akaishi, Tatsuhiro)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：90386384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミン誘導体CNB-001より創製された新規神経保護薬J147には、経口投与で正常ラットの記憶力を高める効果が見出されたため、認知症治療薬のリード化合物として注目されている。本研究では、J147の認知症に対する有効性を明らかにするとともに、その作用機序の解明を試みたところ、J147は認知症モデル動物の海馬においてCREB-BDNF経路を活性化させることにより、記憶障害改善効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have recently found that J147, a novel neuroprotective compound, facilitates long-term potentiation in rat hippocampal slices and enhances object recognition in rats. J147 could be useful in the development of therapeutic drugs for senile dementia. In this study, we showed that J147 rescued cognitive deficits in Alzheimer's disease model mice by modulating several signaling pathways including the CREB-BDNF pathway in the hippocampus.

研究分野：応用薬理学

キーワード：認知症 J147 記憶

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、認知症患者の急増が社会問題となっている。厚生労働省の調査によると、2012年時点における我が国の認知症高齢者は462万人に上ることが明らかとなった。これは、政府の過去の推計を遥かに上回る猛烈な速度で認知症が増えていることを示したものであり、その深刻さが再認識された。しかし、現在臨床で用いられている薬物の効果は十分ではなく、確実な治療薬の開発が急務である。

これまでに私は、ウコンに含まれる天然ポリフェノール“クルクミン”の誘導体の薬理作用を検討してきたところ、ピラゾール系の新規化合物 CNB-001 に興味深い薬効を見出した。CNB-001 は強い神経細胞保護作用を発揮するほか、従来のクルクミンおよび誘導体には認められていない記憶力向上作用を併せ持っていた。私は、米国 Salk 研究所 Schubert 教授の協力を得て、種々の CNB-001 の誘導体を新規合成し、その薬効解析を進めた結果、CNB-001 と同等の活性を持つ CNB-023 を発見した。さらに、これらの実験で得られた構造活性相関の知見をもとに、最終的に 12 個の候補化合物を創製して薬効を解析したところ、CNB-001 や CNB-023 よりも遥かに高活性な J147 の発見に至った。

2. 研究の目的

J147 は強力な神経保護効果と記憶向上効果を併せ持つため、認知症治療薬のリード化合物となりうる可能性が注目されていたが、J147 の認知症に対する有効性については十分に解析されていなかった。そこで本研究では、健常動物ならびに認知症モデル動物を用いた行動学的検討を行い、認知症動物に対する J147 の効果を解明することにした。また、J147 の認知症動物に対する有効性が確認されたら、種々の行動学的・薬理的・免疫組織化学的・生化学的検討を行うことにより、J147 の作用機序の解明を試みることにした。

3. 研究の方法

(1) 行動学的検討

実験には、健常動物として C57BL/6J マウスならびに Sprague-Dawley ラット、認知症モデル動物としてヒトアミロイド前駆タン

パク質 (huAPP) の Swedish 変異ならびにプレセニン-1 の エキソン9変異を導入したマウス (huAPP^{swe}/PS1 Δ 9 transgenic マウス) を用いた。

健常ラットに J147 (1~5 mg/kg) を経口投与し、1時間後に novel object recognition test を行い、正常な動物の記憶・学習に対する J147 単回経口投与の効果について検討した。また、健常マウスに J147 (200 ppm, 10 mg/kg/day) を2週間持続摂取させ、様々な記憶・学習試験 (novel object location test、Barnes maze、Y-maze) を実施して正常な動物の記憶・学習に対する J147 継続投与の効果について検討した。

さらに、認知症モデル動物に J147 (200 ppm, 10 mg/kg/day) を3ヶ月間または7ヶ月間持続摂取させた後、Morris water maze による記憶・学習テストを行い、認知症に対する J147 の有効性について検討した。

(2) ウエスタンブロット解析

動物より摘出した脳組織または培養細胞から、タンパク質抽出液を調製した。サンプル中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、抗 BDNF (脳由来神経栄養因子) 抗体、抗 NGF (神経成長因子) 抗体、抗リン酸化 CREB (サイクイック AMP 応答配列結合タンパク質) 抗体、抗ドレブリン抗体、抗シナプシン I 抗体、抗シナプトフィジン抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

(3) 細胞培養

培養実験には、Cell line であるマウス海馬由来 HT22 細胞ならびに PC12 細胞を用いた。両細胞種とも、10% FBS (ウシ胎児血清) を含有した DMEM 培地中で培養して増殖させた後、薬物処置の前日に FBS を含まない DMEM 培地へと交換した。薬物 (J147) は、FBS 非含有 DMEM に溶解して、細胞に処置した。

4. 研究成果

(1) 研究初年度 (平成 26 年度) は、主に in vivo 実験を行い、経口投与による J147 の有効性と作用機序の解析を実施した。健常マウスまたはラットに J147 (1~5 mg/kg) を単回経口投与または J147 (200 ppm, 10 mg/kg/day) を2週間持続摂取させ、novel

object recognition test や novel object location test などの様々な記憶・学習試験を行ったところ、いずれの試験においても J147 を摂取した正常な動物では有意な記憶力向上効果が確認された。

次に、認知症モデル動物に対する J147 の有効性を検討した。J147 (200 ppm, 10 mg/kg/day) を持続摂取させた認知症モデルマウスと J147 を摂取させなかった認知症モデルマウスを用いて、Morris water maze による記憶・学習試験を行ったところ、J147 を摂取させなかったマウスには著しい記憶障害が確認されたが、J147 を摂取したマウスでは記憶力の有意な改善が認められた。驚くべきことに、J147 を摂取した認知症モデルマウスの記憶力は、健常な野生型マウスとほぼ同程度であった。

以上より、J147 は経口で抗認知症効果を発揮することが確認されたので、次に作用機序の解明にとりかかった。上述の実験が終了した後、動物の脳を摘出してスライス標本やタンパク質抽出液を調製した。スライス標本は免疫染色を施して顕微鏡観察し、タンパク質抽出液はウエスタンブロット法による解析を行った。その結果、J147 を投与した動物の脳内では、記憶形成や神経細胞保護に関わる分子である BDNF の発現量が增大することが明らかとなった。

(2) 平成 27 年度および 28 年度では、in vivo 実験と in vitro 実験を並行して実施し、J147 の作用機序の解明を進めた。

J147 を継続摂取させた動物の脳内では、BDNF のみならず NGF の発現量も有意に増大していた。BDNF や NGF の発現に関わる転写因子として CREB が知られるので、J147 を摂取した動物の脳内における CREB のリン酸化レベルを測定し、J147 を摂取しなかった動物のものと比較したところ、J147 摂取により、CREB リン酸化が有意に促進されることが明らかとなった。

BDNF や NGF には神経細胞のスパイン数を増加させる作用が報告されているため、J147 が海馬のスパイン数にどのような影響を及ぼすか検討した。スパイン局在蛋白である Drebrin、シナプス前終末に存在してシナプスマーカーとしても用いられるシナプシン I およびシナプトフィジンの海馬におけ

る発現量をウエスタンブロットにより解析したところ、J147 を投与した動物では、これら全ての分子の発現レベルが有意に上昇した。

次に、培養細胞を用いた検討を行った。HT22 細胞を無血清培地で 2 日間培養すると、細胞生存率は著しく低下したが、J147 (100 nM) 共存下で細胞を培養すると、生存率の改善が認められた。BDNF の受容体である TrkB 受容体を発現させた HT22 細胞と TrkB を欠損させた HT22 細胞で J147 の効果を比較したところ、両群ともに同程度の細胞生存促進効果が認められた。よって、J147 の細胞保護効果は、TrkB 受容体を介さないものであることが示唆された。

HT22 細胞に J147 を 1 晩処置して、その培地 (condition medium) を PC12 細胞に適用したところ、NGF を PC12 細胞に処置した時と同程度の神経様突起伸展作用が認められた。一方、J147 を単独で直接 PC12 細胞に処置した場合には突起伸展が誘導されなかった。よって、J147 自身が NGF 様分子として作用するのではなく、NGF の合成や分泌を促進することにより PC12 細胞の神経様突起を伸展させることが示唆された。

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 1 件)

(1) Akaishi T.

Memory-enhancing drugs.

Nihon Yakurigaku Zasshi.

2014;143(5):260-1.

<http://doi.org/10.1254/fpj.143.260>

[学会発表](計 3 件)

(1) 赤石樹泰、鷓澤勇氣、永島瞳、小野あかり、武内彩香、Schubert, David、阿部和穂

クルクミン誘導体 CNB-001 はミクログリアのリポ多糖誘発 STAT-1 リン酸および IRF-1 発現を抑制する

第 90 回日本薬理学会年会

平成 29 年 3 月 15 日

長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール (長崎県・長崎市)

(2) 赤石樹泰、梅川奈津実、池田睦、稲葉くるみ、渡邊紀子、Schubert, David、阿部和穂

クルクミン誘導体 CNB-001 はミクログリアにおけるリポ多糖誘発 p38 MAP キナーゼ活性化を選択的に抑制する

第 89 回日本薬理学会年会

平成 28 年 3 月 9 日

パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(3) 赤石樹泰、青木駿、本村友紀、高橋利昌、佐藤嘉高、Schubert, David、阿部和穂

クルクミン誘導体 CNB-001 は初代培養ミクログリア細胞のリポポリサッカライド誘発 NO 産生を抑制する

第 88 回日本薬理学会年会

平成 27 年 3 月 19 日

名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.musashino-u.ac.jp/yakugaku/yakuri/m-yakuri-home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤石 樹泰 (AKAISHI TATSUHIRO)

武蔵野大学・薬学研究所・講師

研究者番号：90386384

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()