

和漢薬の標的分子の網羅的解析および 包括的作用メカニズムの解明

統括者	東田 千尋	神経機能学分野	准教授
所内共同研究者	久保山友晴	神経機能学分野	助教
申請代表者	関谷 倫子	国立長寿医療研究センター認知症先進医療開発センターアルツハイマー病研究部発症機序解析研究室	博士研究員
所外共同研究者	飯島 浩一	国立長寿医療研究センター認知症先進医療開発センターアルツハイマー病研究部発症機序解析研究室	室長

【報告セミナー要旨】

【関谷・飯島グループ：アルツハイマー病改善に関わる分子を網羅的に明らかにする】

独自に作製したA β 42を神経細胞特異的に発現させたショウジョウバエを使用して、A β の毒性に対して保護的に働くと考えられる候補遺伝子のスクリーニングを行った。昨年度は、NmnatがA β 毒性による神経機能低下を抑制することを発見したので、今年度はNmnatのどのような機能がA β 毒性による神経機能低下の抑制に関与しているのかを検討した。Nmnatは、NADの生合成を触媒する酵素であるとともに、分子シャペロンとしての機能を併せ持っている。

NADの生合成を触媒する酵素機能部分に変異の入ったNmnatを発現するショウジョウバエでは、A β 毒性による神経機能低下が抑制されなかった。一方、Nmnatは（NAD合成酵素活性に依存しない）分子シャペロン機能を併せ持っており、タウやポリQといった凝集タンパクを減少させると報告されているが、NmnatはA β 量に変化を与えなかった。

以上の結果より、A β の神経毒性に対するNmnatの神経保護作用には、NmnatのNAD合成酵素活性が重要であることが明らかになり、A β の神経毒性に対する保護作用のdrug targetとしてのNADの重要性を見出された。

【東田・久保山グループ：アルツハイマー病あるいは脊髄損傷の改善に有効な薬物の作用点を網羅的に明らかにする】

今年度の特定研究では、DARTS法により、加味帰脾湯により直接刺激される脳内分子の同定を試み、候補タンパク質として、cytosolic aspartate aminotransferase (cAST)を見出し、cASTの新たな機能の存在を提示した。

骨碎補に関しては、水エキス投与によって5XFADマウスにおける記憶障害を改善することを見出した。さらに、naringenin, naringenin-7-O-glucuronideが、骨碎補水エキス経口投与後にマウス脳内に移行する成分であることを特定し、かつ軸索修復作用を有することも確認した。それら化合物の直接の結合分子をDARTS法にて検討し、神経細胞の軸索伸展を調節する重要な分子であるCRMP2を特定した。

また、脊髄損傷作用を示した苦参水エキス中のmatrineに関して、直接の結合分子をDARTS法にて検討し、HSP90である結果を得た。

【成果の見通し】

今年度の取組みにより、病気を治す分子シグナリングを解明する方法の妥当性を示唆するデータが蓄積されてきた。これによって、和漢薬の薬効メカニズムを解析していく手法が構築できると思われる。また、得られた基礎データを製品開発に繋げる出口戦略においても、臨床研究の実施など着実に進展しており、次年度はさらに製品化の幅を広げられるような計画を立てている。和漢薬の標的分子の網羅的解析および包括的作用メカニズムの解明に向けて、成果があがることが見込まれる。

Publications

- 1) Ando K, Hearn S, Suzuki E, Maruko-Otake A, **Sekiya M, Iijima K. M.** *Neuromethods*, (2016) in press
- 2) Ando K, Maruko-Otake A, Ohtake Y, Hayashishita **M, Sekiya M, Iijima K.M.** *PLoS Genetics*, in revision
- 3) **Sekiya M**, Maruko-Otake A, Hearn S, Sakakibara Y, Suzuki E, Ando K, **Iijima K.M.** *Developmental Cell*, in revision
- 4) 関谷倫子, 飯島浩一 ファルマシア, 52(2), 121-126, (2016).
- 5) Watari H, Shimada Y, **Tohda C.** *Traditional Kampo Meidcine*, (2016) in press
- 6) Watari H, Shigyo M, Tanabe N, Tohda M, Cho KH, Kyung PS, Jung WS, Shimada Y, Shibahara N, **Kuboyama T, Tohda C.** *Phytother Res.* 29(3):35135-35136, (2015).
- 7) Yang ZY, **Kuboyama T**, Kazuma K, Konno K, **Tohda C.** *J Nat Prod*, 78(9):2297-2300, (2015).
- 8) Tanabe N, **Kuboyama T**, Kazuma K, Konno K, **Tohda C.** *Front Pharmacol.* 2016 ;6:326, (2016).
- 9) Shigyo M, **Kuboyama T**, Sawai Y, Tada-Umezaki **M, Tohda C.** *Sci Rep.* 5:12055, (2015).

■背景および目的

(関谷・飯島)

脳神経細胞においてアミロイドβ (Aβ) を発現するショウジョウバエの遺伝子発現解析の結果から得られた情報をもとに、Aβの毒性に対して保護的に働くと考えられる候補遺伝子を選定し、スクリーニングを行った。その結果、Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) の強制発現により、Aβ毒性による神経機能低下を抑制できることを見いだした。NMNATは、軸索損傷による神経変性を遅延させる効果が報告されており、またAβを発現するショウジョウバエにおいても発現が上昇していることから、Aβによる神経障害に対して保護的に働く可能性が考えられる。

NMNATは、NADの生合成を触媒する酵素であるとともに、分子シャペロンとしての機能を併せ持っている。本年度は、Aβ毒性による神経機能低下を抑制する薬物の作用点を見つけるために、スクリーニングで得られたNMNATの効果がNAD合成酵素活性によるものか、それ以外の機能によるものかを明らかにする。

(東田・久保山)

我々は以前より、“神経回路網修復によるアルツハイマー病改善の概念の実証”を目指してきた。神経回路網修復がADの記憶障害改善にとって決定的に重要であると考えて、Aβによって誘発される神経回路網破綻に対して、それを修復する活性物質を生薬から探索し、また活性を示した生薬中から、軸索を再伸展させる成分を種々同定してきた。

また、漢方方剤では加味帰脾湯に着目し、早期から重篤なAD病変を示すトランスジェニックマウス5XFADへの加味帰脾湯の経口投与により、物体認識記憶障害が有意に改善されること、アミロイドプラーク近傍に局限した軸索とシナプス前部位の変性を顕著に改善されるという新しい知見を得た。さらに加味帰脾湯による軸索変性解除の機序の一つとして、タウ過剰リン酸化の持続的抑制によること、それにはタウの脱リン酸化酵素PP2Aの活性化が関与することを明らかにした。

この、“神経回路網修復によるアルツハイマー病改善”の研究の集大成として、diosgeninの抗AD作用とその分子メカニズムの解明に取り組み、重篤期に入ったアルツハイマー病モデルマウス5XFADへのdiosgenin投与によって、物体認識記憶、空間記憶障害の有意な改善、アミロイドプラークや神経原線維変化の減少、アミロイドプラーク近傍に局限した軸索とシナプス前部位の変性の顕著な改善をもたらすことを見出した。

さらに、diosgeninの直接の結合タンパク質をdrug affinity responsive target stability (DARTS)法により検討し、種々の検証を重ね、1,25D3-MARRSがdiosgeninの受容体であることを突き止めた。1,25D3-MARRSの神経系での機能についてはこれまで報告がなかった。我々は、in vivoでの神経活動電位の測定や、脳室内への1,25D3-MARRS中和抗体投与下での記憶試験等の検討を行い、1,25D3-MARRSが確かにdiosgeninの受容体であり、その刺激により軸索伸展や神経細胞の興奮が起こり記憶亢進に至ることを証明した。

アルツハイマー病モデル動物である5XFADマウスを用いた。変性軸索を正常化させる作用を示した生薬として着目した骨碎補水エキスに関して5XFADマウスに経口投与し、物体認知記憶、物体場所記憶、エピソード記憶のそれぞれに対する改善効果を検討した。

本年度は、昨年度までの取り組みで5XFADマウスに対する記憶改善作用が示されている、骨碎補水エキス、加味帰脾湯に関して、それらの作用機序の最上流分子を網羅的に同定することを目的とした。

■結果および考察

(関谷・飯島)

A β 毒性による神経機能低下を抑制する薬物の作用点を見つけるために、スクリーニングで得られたNmnatの効果はNAD合成酵素活性によるものか、それ以外の機能(シャペロン機能)によるものかを検討した。2種類の変異ショウジョウバエを作製した。Nmnat H30AはNmnatのcatalytic motifに、Nmnat WRはNMN binding motifとATP binding motifの両方に変異が入っている。

まずNAD合成酵素活性の関与について調べるため、NADの生合成を触媒する酵素機能部分に変異の入ったNmnatがA β 毒性による神経機能低下を抑制するかどうか、ショウジョウバエで検討した。Nmnat H30AもNmnat WRも、A β 毒性による神経機能低下を抑制しなかったため、NmnatのA β 毒性に対する神経保護作用には、NAD合成酵素活性が必要であることが示唆された。

次に分子シャペロン機能の関与について調べた。Nmnatは、NAD合成酵素活性に依存しない分子シャペロン機能を併せ持っており、タウやポリQといった凝集タンパクを減少させると報告されている。脳にNmnatを過剰発現したショウジョウバエにおいて、脳内のA β 量を定量したところ、コントロール群との差は見られなかった。

以上の結果より、A β の神経毒性に対するNmnatの神経保護作用には、Nmnatのシャペロン機能よりもNAD合成酵素活性が重要であることが明らかになり、A β の神経毒性に対する保護作用にNADが重要な働きをしていることが示唆された。

(東田・久保山)

今年度の特定研究では、DARTS法により、加味帰脾湯により直接刺激される脳内分子の同定を試み、候補タンパク質として、cytosolic aspartate aminotransferase (cAST)を見出し、cASTの新たな機能の存在を提示した。

骨碎補に関しては、水エキス投与によって5XFADマウスにおける記憶障害を改善することを見出した。さらに、naringenin, naringenin-7-O-glucuronideが、骨碎補水エキス経口投与後にマウス脳内に移行する成分であることを特定し、かつ軸索修復作用を有することも確認した。それら化合物の直接の結合分子をDARTS法にて検討し、神経細胞の軸索伸展を調節する重要な分子であるCRMP2を特定した。

■結論

(関谷・飯島)

A β の神経毒性に対する保護作用にNADが重要な働きをしていることが示唆され、NADがdrug screenのターゲットの1つになるのではないかと考えられる。

(東田・久保山)

今年度の取組みにより、病気を治す分子シグナリングを解明する方法論が徐々に固まってきており、その方法で示される結果が妥当であることが示唆するデータも蓄積されてきた。これによって、和漢薬の薬効メカニズムを、先入観なしにシグナリングの起点から下流へ順に解析していく手法、が構築できると思われる。また、得られた基礎データを製品として実用化する出口に向けても、今年度の取組

み（学長裁量経費戦略的経費の使用も含む）により既に、臨床研究の実施や開発担当企業の確定など、着実に進展しており、次年度はさらに製品化の幅を広げられるような計画を立てている。和漢薬の標的分子の網羅的解析および包括的作用メカニズムの解明に向けて、成果があがることを見込まれる。