

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	流動研究員
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	室長

【報告セミナー要旨】

(関谷・飯島)：

独自に作製したアミロイドベータ ($A\beta$) を神経細胞特異的に発現するショウジョウバエを用い使用して、経日的なバエ個体の運動機能の低下を $A\beta$ 毒性の指標として実験を行った。生後2, 10, 25日目のハエ脳の頭のマイクロアレイのデータを解析し、フェノタイプが現れる前である2日目で発現の上がっているものを、神経保護的に働く因子候補として検出した。その中で、さらに経日的に変動があるシャペロンの集団に絞り込んでclimbing assayを行った。その結果、Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) を候補として得た。NMNATの強制発現により、 $A\beta$ 毒性による神経機能低下が抑制された。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 $A\beta$ 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、 $A\beta$ 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。今後は、NMNATによる神経保護作用の機序を解析し、その機序の中で鍵となる因子の機能を高める和漢薬のスクリーニングを行う予定である。

(東田・久保山)

今年度の研究により、アルツハイマー病モデルの記憶障害をよく改善する、漢方方剤・生薬・化合物の3点セットが示され揃い、それぞれについて、シグナルパスウェイの入口、中間、出口についての解析を進めた。生薬DRによる記憶改善作用は、これまでに報告のない成績であるため、生薬エキスとしての有用性、活性化合物の特定、それらの分子機序解明という方向性でさらなる検討を進めている。加味帰脾湯、Diosgenin, DRそれぞれにおける、入口分子やその下流の中間分子らは、いずれも認知機能改善作用に関わる分子としては想定外の分子である。このことは本プロジェクトが、既存の方法論では知りえない薬理反応をキャプチャーする新しい研究手法を提示している。また、本研究での結果では、相当数の成分が混在しているはずの加味帰脾湯、DRによっても、主として刺激されphenotypeに直結する神経上の分子は多くなく、せいぜい数分子に集約されることが示されつつある。「複雑系薬物は多種多様なシグナリングを惹起するはずだ」という常識を覆したところに真実がある可能性も考えている。

■背景および目的

和漢薬をはじめとする伝統薬物は、西洋医学で用いられる薬物では治療困難な疾患に対しても効果を示す例が数多くある。しかし伝統薬物中の多成分性が、薬理作用の包括的解明を困難にしており、生薬エキスや漢方方剤の治療薬としての有用性を提示することが難しい。和漢薬が“なぜ効くのか”を正しく解析することが達成されれば、次の2点が解明される。

- ① 複合薬物としての和漢薬の強み・特徴を引き出し、その科学的基盤を盤石にする。

強み・特徴とは以下を指す。

- ・和漢薬には、創薬シーズとなるような活性化化合物がかなり高い確率で含有されていることを生かし、新しい治療戦略を創出する。
- ・既に医薬品である漢方方剤は、臨床試験を実施するハードルが低い。この利点を生かし、エビデンスの充実、効能リポジショニングを達成する。

- ② 複合薬物である和漢薬の作用機序は複雑である、という大前提を検証する。

和漢薬研究において、『生薬、漢方方剤は正確に含有成分数を把握するのが困難なほどの多くの複合成分からなる薬物であることから、その作用機序も複合的で複雑であるはずである。ゆえに解明が困難である、あるいはそのカオスを紐解くには何か特別な方法論が必要である』と考える大前提がある。しかし、ある和漢薬の薬理活性に直結するシグナリングパスウェイが、各含有成分が固有に持つシグナリングパスウェイの足し算・掛け算で表されるのか（=多くのシグナルが動く）、あるいは優先・集約の結果（=メインで動くシグナルは比較的シンプル）のようになるのかは、実はよくわかっていない。つまり、“複合薬物は複雑でない”という仮説が否定されるに十分な証拠はまだないのである。これまでの和漢薬の薬理作用の解析は、関与していそうなシグナルにあたりをつけて確認する手法が主であったため、真のシグナルパスウェイを客観的にとらえているとは言い切れなかった。本研究はこの問題点を克服するため、和漢薬の first target molecule およびその下流の分子シグナルを解析する。疾患治療に結びつく薬理活性が表出する真の作用機序が明確になるという点においても、本研究は innovative である。

以上、本研究は、複合薬物である和漢薬の作用点を網羅的に探索し、その薬理活性を包括的かつ分子的に解明することを目的とする。またその結果を、トランスレーショナルリサーチに展開し、画期的治療戦略の創出につなげる。和漢薬研究による innovation を狙う。

■方法

1. アルツハイマー病に有効な生薬を網羅的に探索する

1) 変性軸索を正常化させる薬物の同定

培養マウス大脳皮質神経細胞に対してアミロイドβを処置して軸索変性（軸索終末部の退縮、軸索の萎縮）を誘発させた後に、各種伝統薬物エキスを処置し、軸索伸長を再開させる薬物を同定した。生薬は14種類を対象とした。

2) アルツハイマー病モデル動物における記憶障害改善作用の検討

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DR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。

2. アルツハイマー病に有効な薬物の作用機序を網羅的に探索する

1) 薬物の直接結合分子の網羅的探索

今年度に同定したDR水エキス、過年度に既にアルツハイマー病改善作用を明らかにしてきた加味帰脾湯に関して、直接の結合分子を探索するために、成体マウス大脳皮質のライセートと反応させ、DARTS法とSDS-PAGE、TOF-MS/MSを組み合わせて薬物中の化合物と結合する分子候補を得た。

2) 薬物刺激により発現量に変化する分子の網羅的探索

過年度に既にアルツハイマー病改善作用を明らかにしてきたdiosgeninに関しては、神経細胞上の直接の結合分子が1,25D3-MARRSであることを既に同定している。Diosgeninが1,25D3-MARRSを刺激すると、軸索修復作用、記憶改善作用が生じるが、このパスウェイに関わっている分子を同定するために、5XFADマウスに溶媒投与またはdiosgenin投与した5XFADマウス、溶媒投与した野生型マウスの3群から、大脳皮質を摘出し、タンパク質発現量を2次元電気泳動で比較した。比較的ダイナミックに変動した5つのスポットをTOF-MS/MSで解析した。

■結果および考察

1) DRエキスによる軸索萎縮改善作用

培養大脳皮質神経細胞にアミロイドβを処置して軸索変性（軸索終末部の退縮、軸索の萎縮）を誘発させ、14種類の生薬水エキスを後処置し軸索伸展作用を検討した。伸展活性を示した生薬エキスとして、丹参、DR、太子参、五味子、黄精、何首烏、接骨木、鶏血藤、女貞子が示されたため、さらに*in vivo*での効果を検討した。正常マウス(ddY, 雄性, 6週齢)に7日間、各エキスを500 mg/kgで経口投与し、物体認知記憶亢進作用(トレーニングセッションとテストセッションのインターバル: 48時間)を検討したところ、DRエキスにのみ記憶増強作用が認められた。*In vivo*でも効果を示したDRエキスに絞って次項以下の検討を進めた。

2) DRエキスによる5XFADマウスの記憶改善作用

5XFADマウス(雄性及び雌性, 6-8ヵ月齢)にDR水エキスを31日間経口投与した(5, 50, 500 mg/kg)。投与21日目に、物体認知記憶試験(トレーニングセッションとテストセッションのインターバル: 1時間)を行ったところ、5XFADマウスの記憶障害に対してDR水エキス投与群では用量依存的に改善効果を示した。投与25日目に、物体場所記憶試験(トレーニングセッションとテストセッションのインターバル: 1時間)を行ったところ、5XFADマウスの記憶障害に対してDR水エキス500 mg/kg投与群が改善効果を示した。投与31日目に、エピソード記憶試験(3つのセッション間のインターバル: 10分間)を行ったところ、5XFADマウスの記憶障害に対してDR水エキス500 mg/kg投与群が改善効果を示した。

3) DRエキス中の活性化合物の同定

DR水エキスを有機溶媒にて分画し、培養大脳皮質神経細胞にアミロイドβを処置して軸索変性を誘発させ、各画分を後処置し軸索伸展作用を検討した。ブタノール分画に軸索伸展活性が認められたため、ブタノール画分中に含有される成分を単離した。同定された5成分について、軸索伸展作用を検討したところ、特に2成分に有意な活性が認められた。

現在さらに、骨碎補水エキスをマウスに経口投与した後、脳内で検出される骨碎補由来の化合物およびその代謝産物を検出済みであり、脳内に移行して神経細胞を刺激する活性化合物を同定すること

を目指している。

4) DRエキスの直接結合分子の同定

DR水エキス (1 mg/ml) と、ddYマウス(雄性, 7週齢)の大脳皮質ライセートを反応させ、DARTS法によりDR水エキス成分と結合する分子の同定を試みた。候補となったタンパク質のうち、Raf kinase inhibitory protein (RKIP), •Collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) が、DRエキス中成分とinteractionすることが確認された。上記3)で同定される脳内の活性化化合物についても、同様に直接結合分子の同定を行う。

5) 加味帰脾湯による直接結合分子の同定

自家製加味帰脾湯 (5 mg/ml) と、ddYマウス(雌性, 4週齢)の大脳皮質ライセートを反応させ、DARTS法により加味帰脾湯成分と結合する分子の同定を試みた。候補タンパク質として、cytosolic aspartate aminotransferase (cAST), dihydrolipoyl dehydrogenase, gamma-enolaseが得られた。このうち、cASTと加味帰脾湯とのinteractionが確認された。またアミロイドβ処置により大脳皮質神経細胞中のcAST活性が低下し、加味帰脾湯はそれを上昇させることも見出した。現在、cASTが神経細胞の機能に及ぼす役割を検討中である。

6) Diosgenin投与により5XFADマウスの大脳皮質で変動するタンパク質の同定

5XFADマウス (雄性, 6ヵ月齢) にdiosgeninを15日間経口投与し (0.1 μmol/kg), 物体認知記憶試験(トレーニングセッションとテストセッションのインターバル: 1時間)を行ったところ、溶媒投与した5XFADマウスでは記憶障害が見られたのに対し、diosgenin投与群では有意に記憶能力が改善した。記憶試験後のマウスから大脳皮質ライセートを作製し、2次元電気泳動により、発現するタンパク質の比較を行った。溶媒投与野生型マウス, 溶媒投与5XFADマウス, diosgenin投与5XFADマウスの3群の間で、発現量に変化を示すタンパク質を選別し、MALDI-TOF/MS解析により配列の同定を行った。同定された5種のタンパク質のうち、現在、heat shock cognate 70 (HSC70)に着目し次項の検討を進めている。

7) HSC70と軸索伸展作用の関係

5XFADマウスにdiosgenin投与すると発現量が減少する分子としてHSC70を同定した。そこで、初代培養大脳皮質神経細胞をdiosgeninで4日間処置したところ、diosgenin濃度依存的にHSC70発現量が減少することが確認された。この時、diosgenin処置により神経細胞の軸索密度が増加していた。HSC70の阻害剤であるVER-155008を大脳皮質神経細胞に処置すると、HSC70発現量が減少することが確認された。この時、VER-155008処置により神経細胞の軸索密度が増加していた。HSC70が神経細胞の機能、記憶改善作用にどのような役割を果たすのかについて、現在検討中である。

■結論

本プロジェクトの進捗状況を可視化するために、2014年2月25日の昨年度報告会時点での研究状況(図1)と、今年度の研究遂行による現在の研究状況(図2)を示す。今年度の研究により、アルツハイマー病モデルの記憶障害をよく改善する、漢方方剤・生薬・化合物の3点セットが揃い、それぞれについて、シグナルパスウェイの入口、中間、出口についての解析も進んだ。加味帰脾湯、diosgenin, DRそれぞれにおける、入口分子やその下流の中間分子らは、いずれも認知機能改善作用に関わる分子としては想定外の分子である。このことは本プロジェクトが、既存の方法論では知りえない薬理反応をキャプチャーするinnovativeな研究であることを示唆している。

プロジェクトの進行状況 (アルツハイマー病)

	加味帰脾湯	Diosgenin関連	新たに着目する生薬 14種
入口 受容体	実施中	終了	次年度
中間 シグナリング	一部同定・実施中	一部同定・実施中	次年度
出口 神経変性回復 <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	終了 ○	終了 ○	スクリーニング終了 ○ 次年度
記憶試験	終了	終了	実施中
臨床に向けて	臨床試験準備中 (日韓)	ライセンス戦略を担当する会社設立(2013,7)	

図1 昨年度の進行状況

プロジェクトの進行状況 (アルツハイマー病)

	加味帰脾湯	Diosgenin関連	DR
H27に終了 入口 受容体	1分子を候補として解析中	1,25D3-MARRS	2分子を候補として解析中
H27-H28に終了 中間 シグナリング	PP2A活性化ほか	HSC70 ほか	検討中
既に終了 出口 神経変性回復 <i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	○	○	○
記憶試験	記憶改善	記憶改善	記憶改善
活性成分の同定	数成分同定済み	該当しない	脳内に移行している活性成分の同定中
臨床に向けて	・特許公開 ・臨床試験準備中 (日韓)	・特許出願済 (日米で審査中) ・製薬企業等と交渉中	・特許出願済 ・製薬企業等と交渉中
関連論文発表	5報	2報	投稿準備中

認知機能改善パスウェイ

図2 今年度の進行状況

『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』のロードマップ

	平成25年度	平成26年度	平成27年度	平成28年度
活性を示す生薬の探索	<p>In vitroスクリーニング</p> <p>変性軸索の改善作用を評価する <i>in vitro</i>スクリーニング系を確立し、活性生薬の探索を行う。</p> <p>In vivoにおける評価</p> <p>正常マウスの記憶力増強作用およびアルツハイマー病モデルマウスにおける記憶改善作用を検討する。</p>			
作用機序の網羅的探索 ターゲットタンパクとシグナルパスウェイの同定	<p>①DARTS法 ②リン酸化アレイ ③発現タンパク変化(2D-PAGE)の手法で薬物の作用機序を網羅的に探索する。</p>			
包括的作用機序の解明 認知機能改善パスウェイとしての生薬作用機序の <i>in vivo</i> での証明	<p>ターゲットタンパク、パスウェイ分子に対するsiRNA、機能阻害抗体、阻害剤、賦活剤処置を <i>in vivo</i>、<i>in vitro</i>で行い、変性軸索・記憶障害改善作用に関わるシグナルを検証する。</p>			