

# 小胞体ストレス応答機構を標的とする 和漢薬由来抗アルツハイマー病薬の創製研究

申請代表者	野村 靖幸	久留米大学医学部	客員教授
所外共同研究者	西 昭徳	久留米大学医学部	教授
所外共同研究者	小澤孝一郎	広島大学大学院医歯薬保健学研究科	教授
所外共同研究者	細井 徹	広島大学大学院医歯薬保健学研究科	講師
所外共同研究者	金子 雅幸	広島大学大学院医歯薬保健学研究科	准教授
所内共同研究者	東田 千尋	神経機能学分野	准教授

## 【報告セミナー要旨】

### 【要旨】

超高齢化社会を迎え、神経変性疾患、特にアルツハイマー病（AD）患者の増加が著しく、社会、医療における対応が急務である。ADに対する治療薬としてわが国では、抗アセチルコリンエステラーゼ薬、NMDA受容体遮断薬が臨床使用されているが、いずれも対症薬であり、これらには根本的治療効果は見出されていない。一方、近年、様々なストレス暴露により小胞体内に異常タンパク質が蓄積して生じる小胞体ストレスとAD発症との関係が報告され、注目されている。従って、タンパク質凝集抑制効果を有する薬物はAD治療薬として有用となる可能性が考えられる。そこで本研究では、富山大学和漢医薬学総合研究所が保管する和漢薬の中から、当グループのこれまでの基盤的研究をベースに構築した抗アルツハイマー病薬スクリーニング方法に基づいて候補物質を選び出し、抗AD効果を実証し、その細胞分子生物学的作用機構を究明し、活性物質の化学的自体とその性質を明らかにすることを目的として行った。

富山大学和漢医薬学総合研究所で調整後、提供された天然資源由来化合物成分計96種類から水溶性の化合物38種類を選択し、抗凝集効果を持つ化合物候補を探すためスクリーニングを行った。異常タンパク質凝集抑制活性のスクリーニング方法として、 $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA)をモデルタンパクとしたケミカルシャペロン活性測定と、thioflavin T (ThT)を用いるA $\beta$ 凝集測定の2種類の方法を用いた。 $\alpha$ -LAを用いた検討の結果、 $\alpha$ -LAの凝集抑制が認められた化合物はalkannin, coptisine chloride, shikoninの3種類だった。ThTを用いてA $\beta$ の凝集を抑制させる化合物について検討を行った結果、A $\beta$ 凝集抑制が認められた化合物はalkannin, barbaloin, (z)-Ligustilide, luteolin, shikoninの5種類であった。上記2通りのスクリーニングの結果、計6種類の候補化合物が得られた。この中で共通して抗凝集効果が認められた化合物はalkannin, shikoninであった。そこで、alkannin, shikoninの神経保護効果についての検討を行った。PC12細胞を用いて各化合物を処理した後のA $\beta$ 刺激による細胞死をLDH leakageの測定により各化合物の効果を比較した。その結果、alkannin, shikoninの両化合物において細胞死の低下が示された。以上より、天然資源由来化合物のalkannin, shikoninが $\alpha$ -LA及びA $\beta$ に対する凝集抑制効果を有することが示唆され、アルツハイマー病治療薬候補として可能性が高いと考えられた。

## ■背景・目的

超高齢化社会を迎え、神経変性疾患、特にアルツハイマー病（AD）患者の増加が著しく、社会、医療における対応が急務である。ADは認知症患者の中で最も多くを占めており、記憶力の低下と認知機能障害とを伴う進行性中枢性疾患である。ADに対する治療薬としてわが国では、抗アセチルコリンエステラーゼ薬、NMDA受容体遮断薬が臨床使用されているが、いずれも対症薬であり、これらには根本的治療効果は見出されていない。ADの根絶に向け卓越した治療薬の開発に関する基礎ならびに臨床のAD研究者の一層の努力が切望されている。

私たちは、AD発症機序の細胞・分子生物学的機構の解明に向けて、これまで研究を重ね、成果を得てきた。すなわち、孤発的ADの発症には、小胞体のタンパク質品質管理機構（protein quality control system）である折りたたみ不全タンパク質応答（unfolded protein response, UPR）が密接に関わることを示した。とくに、UPRのうち、1）折りたたみ不全タンパク質（UP）の再折りたたみ機能を有する新規内因性シャペロン（protein disulfide isomerase）の発見・同定、及び合成した化学シャペロン（4-phenylbutyric acid 各種誘導体）の再折りたたみ活性、2）UPユビキチン化に関わる新規ヒトユビキチンリガーゼ（HRD1）の単離・同定とユビキチン化に続くプロテアソーム分解による除去、に関し新知見を得た。また、これらシャペロンとHRD1の神経細胞死抑制効果とともに、HRD1酸化・不溶化がAD発症に関わることを患者死後脳組織を用いて証明してきた（Fig. 1）。当共同研究は、私たちのこれまで発見・創製した、各種化学シャペロンやヒト新規HRD1、ならびに神経細胞死機序に関わる知見を基盤にして、画期的な抗AD予防・治療薬の探索・創製を目指すことを目的とした。さらに本研究は、多くの可能性を秘める和漢薬のエキスに未知の有効成分を見出し、その本体、作用機構へと展開し、臨床応用へ展望を切り開く研究を意図している。

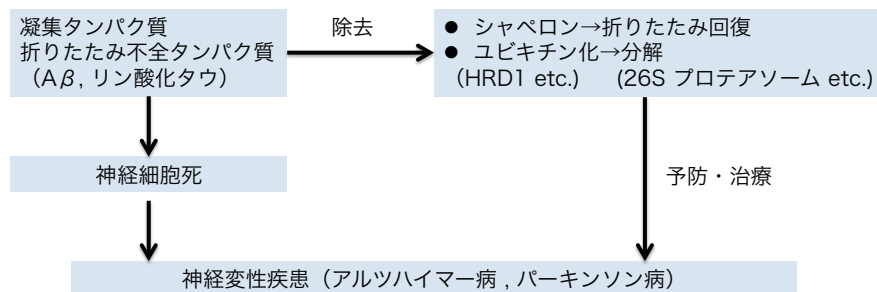


Fig. 1 凝集タンパク質によるアルツハイマー病発症・予防・治療

ADの主な病理学的特徴として、アミロイド班の脳内への沈着が知られている。このアミロイド班は40-42アミノ酸のペプチドから成る amyloid  $\beta$  protein(A $\beta$ )を主成分とし、A $\beta$ が過剰に凝集し不溶性の細線維構造を形成したものであることが知られている。A $\beta$ は、前駆体タンパク質である amyloid precursor protein(APP) が $\beta$ セクレターゼ、 $\gamma$ セクレターゼの働きによって切断されることで生成される。この凝集A $\beta$ は神経細胞毒性を持ち、この凝集A $\beta$ の増加はAD発症に密接に関わると考えられている（アミロイド仮説）。さらに近年、凝集タンパク質の蓄積に伴う小胞体ストレスがAD発症に密接に関わる可能性が示唆され注目されている。

そこで本研究では天然資源から得られる化合物の中から、タンパク質の凝集抑制活性、すなわちケミカルシャペロン活性を有し、さらにはA $\beta$ 凝集を抑制する化合物を明らかにする目的で検討を試みた。

## ■結果・考察

### 1. 天然資源由来化合物からのタンパク質凝集抑制活性を有する薬物の探索

天然資源由来化合物 38 種類の中から抗凝集効果を持つ候補化合物の探索スクリーニングを行った。異常タンパク質凝集抑制活性のスクリーニング方法として、 $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA) をモデルタンパクとしたケミカルシャペロン活性測定と、thioflavin T (ThT) を用いた  $A\beta_{1-42}$  凝集測定の 2 種類の方法を用いた。

$\alpha$ -LA は 37 °C でインキュベートを行うと凝集し、488nm において吸光度が上昇する。インキュベート開始前の  $\alpha$ -LA 溶液に各種天然資源由来化合物を最終濃度 10 $\mu$ M になるように調製後、添加した。開始から 7 時間後の測定値を各実験の cont (DMSO) の値を基準値として相対値を求めた (Fig.1)。その結果、 $\alpha$ -LA の凝集抑制が認められた化合物は alkannin (No.5), coptisine chloride (No.29), shikonin (No.91) の 3 種類であることが明らかになった。

次に  $A\beta$  の凝集を抑制させる化合物について検討を行った。 $A\beta_{1-42}$  の溶液 (10 $\mu$ M) を作製し、37 °C でインキュベートを行い、6 時間後に取り出して ThT 5 $\mu$ M 溶液で希釈し、励起波長 450nm、測定波長 480nm で測定を行った。ThT は  $A\beta$  の正常タンパク質に対しては蛍光を発しないが、凝集した  $A\beta$  には結合して蛍光を発する色素である。検討の結果、 $A\beta_{1-42}$  の凝集抑制傾向が認められた化合物は alkannin (No.5), barbaloin (No.15), (z)-ligustilide (No.65), luteolin (No.69), shikonin (No.91) の 5 種類であることが明らかになった。

上記 2 通りのスクリーニングの結果、計 6 種類の候補化合物が得られた。この中で共通して抗凝集効果が認められた化合物は alkannin (Alk, No.5) および shikonin (Shi, No.91) であった (Fig. 2)。

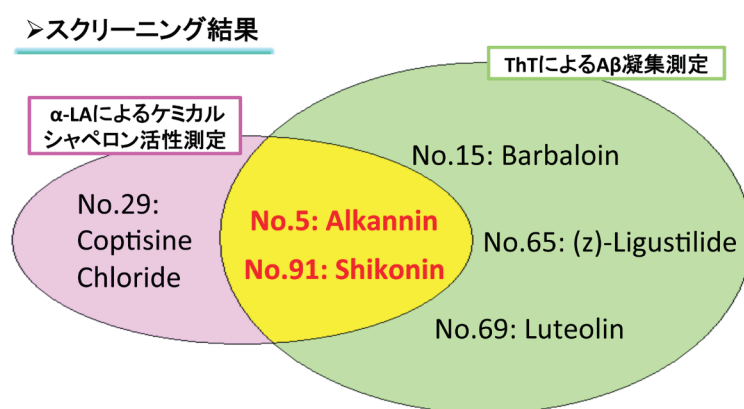


Fig. 2 抗凝集効果を有する天然資源化合物の探索

### 2. alkannin, shikonin の $A\beta$ 凝集改善効果

次に上記検討の結果同定された天然資源由来化合物 alkannin および shikonin に関して、凝集が一旦形成された後の  $A\beta_{1-42}$  に対しても凝集抑制効果を示すかどうかについて検討を試みた。 $A\beta_{1-42}$  溶液を 37°C、6 時間インキュベートし、 $A\beta_{1-42}$  を凝集させた後に alkannin および shikonin を添加した。蛍光測定はインキュベート開始から 6 (alkannin, shikonin 処理直後), 12, 24 時間後に行った。検討の結果、alkannin, shikonin は凝集形成後の  $A\beta_{1-42}$  に対しても抗凝集作用が惹起される可能性が示された。

### 3. 天然資源由来化合物の神経保護機能の検討

上記 2 通りのスクリーニングで得られた化合物、alkannin (No.5) および shikonin (No.91) に関し

て、神経細胞保護機能を有するか否かについて検討を試みた。AD病態モデル系として、PC12神経細胞に $A\beta_{1-42}$ を処理した時の神経細胞死をLDH assayにより検討した。検討の結果、alkannin およびshikonin が、 $A\beta_{1-42}$ による神経細胞死に対して抑制傾向を示すことが明らかになった。しかし、現段階では本検討結果は、予備検討段階であり、今後再現性も含めてさらなる詳細な検討が必要と考えられる。

## ■結論

以上より、天然資源由来化合物のalkannin, shikoninが $\alpha$ -LA及び $A\beta$ に対する凝集抑制効果を有することが示唆され、AD治療薬候補として可能性が高いと考えられた。今後は、ADモデルマウスを用いてこれらの天然資源由来化合物が*in vivo*の系においてもAD治療薬候補として有用であるかなど、さらなる検討が必要と考えられた。