

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 | 准教授 |
| 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 | 病態制御部門神経機能学分野 | 准教授(現 教授) |

【要旨】

神経変性疾患であるアルツハイマー病 (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、有用な根本的治療薬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。AD 脳では、凝集 A β の沈着が認められ、さらに異常にリン酸化された Tau タンパク質による神経毒性がその病因となる可能性が示唆されている。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、活性物質の化学的本体とその性質を明らかにすることを目的として行った。

現在までに、富山大学和漢医薬学総合研究所から提供された天然資源由来化合物成分から、 α -Lactalbumin (α -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 β 凝集測定の 2 種類の方法を用いてスクリーニングを行い、上記 2 種類の方法で共通してタンパク質凝集抑制効果が認められた化合物は alkannin 及びその光学異性体である shikonin であることを見出している。そこで、alkannin, shikonin の神経保護効果についての検討を行った。PC12 神経細胞を用いて各化合物を処理した後の A β 刺激による細胞死を LDH leakage の測定により検討した。その結果、alkannin, shikonin の両化合物処理により用量依存的な (0.1-1 μ M) 細胞死の抑制効果が観察された。さらに初代培養マウス大脳皮質神経細胞において A β 誘発の樹状突起萎縮ならびに軸索萎縮に対する両化合物の影響を検討した。その結果、alkannin は抑制効果を示さなかったものの、shikonin は 0.01 nM, 0.1 nM という濃度において、萎縮抑制作用を示した。さらに Tau タンパク質においても、ThT を用いた凝集実験を行った。その結果、alkannin 及び shikonin は Tau タンパク質に対しても凝集抑制効果がある可能性が示された。以上より、天然資源由来化合物の alkannin, shikonin が A β 及び Tau タンパク質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有用である可能性が示された。

■背景・目的

我が国は超高齢化社会を迎え、今後、老人人口は増加すると予想されている。このような中、神経変性疾患、特にアルツハイマー病 (AD) の患者数も増加すると予想され、有用な AD 治療薬の開発

が切望されている。現在抗アセチルコリンエステラーゼ薬、NMDA 受容体遮断薬などの抗 AD 薬が使用されているが、これらの薬物は AD の根本治療効果を有さず、より有用な新規 AD 治療薬の開発が望まれている。AD の発症原因として現在、主にアミロイド β ($A\beta$) 仮説並びにタウ仮説 (Tau) が提唱されている。アミロイド前駆タンパク質 APP より β 並びに γ セクレターゼで切断され生成された 40-42 アミノ酸のペプチドから成る $A\beta$ がオリゴマーを形成することで、神経毒性が生じ、老人斑を形成するとともに神経細胞死を誘発すると考えられている。リン酸化 Tau タンパク質は Paired Helical Filament (PHF) を形成し軸索へ物質の輸送に傷害を引き起こし、細胞障害を惹起する。即ち、異常に凝集した $A\beta$ 並びに Tau タンパク質が脳内に蓄積して、老人斑や神経原線維変化を形成するとともに、これらが神経細胞死を惹起し AD 発症に関わる可能性が示唆されている。また、このような凝集タンパク質の蓄積は小胞体ストレスの原因となり、細胞障害を引き起こす。即ち、凝集タンパク質蓄積による折りたたみ不全タンパク質の蓄積が神経細胞死につながり神経変性疾患の発症原因となっていると考えられる。

このような背景において、私たちは $A\beta$ や Tau タンパク質などの凝集性タンパク質を抑制できる化合物は、有用な AD 治療候補薬となる可能性に着目した。ケミカルシャペロンとは、タンパク質高次構造の形成・安定化に関与する低分子化合物のことをいい、このようなケミカルシャペロンの中で $A\beta$ や Tau タンパク質の凝集を抑制し、アミロイド線維形成を抑制する化合物が存在する可能性に着目し、ケミカルシャペロン活性を有する生薬由来化合物の探索を実施した。本研究においては、富山大学和漢医薬学総合研究所より提供された生薬成分から有用な抗 AD 薬候補の探索を試みた。昨年度までのスクリーニング解析の結果、その様な候補化合物として alkannin 及び shikonin の可能性を見出した。そこで、本研究では alkannin と shikonin の薬理作用の解析を詳細に行い、本化合物の抗 AD 薬としての可能性について検討を試みた。また、alkannin と shikonin はエナンチオマーの関係にあり、両薬物の活性に違いがあるかも含めて詳細に検討を行った。

■結果・考察

1. alkannin と shikonin の α -lactalbumin (α -LA) 凝集抑制効果

α -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。そこで、 α -LA 溶液に alkannin と shikonin を最終濃度 10 μ M になるように調製・添加後、タイムコースを追ってそれぞれの化合物の凝集抑制効果について検討した。その結果、DMSO コントロールにおいては時間 (1 - 7 時間) 依存的に濁度、すなわち凝集度の上昇が見られたが alkannin 及び shikonin 処理群においてはいずれの時間においても凝集度の上昇は見られなかった。また、凝集抑制度に関して alkannin 及び shikonin は同程度の抑制効果を示し、両者の違いは見られなかった。

2. alkannin とシコニンの $A\beta$ 凝集抑制効果

thioflavin T (ThT) を用いた $A\beta_{1-42}$ 凝集測定法により 6、12、24 時間のタイムコースをとって検討を行った。その結果、alkannin と shikonin 両化合物共にいずれの時間においても同程度 $A\beta_{1-42}$ 凝集抑制効果があることが明らかになった。alkannin と shikonin の IC₅₀ 値を算出したところ、alkannin の IC₅₀ 値が 5.5 μ M, shikonin の IC₅₀ 値が 4.8 μ M となり、shikonin の方が若干強い凝集抑制効果があることが明らかになった (図)。



図 アルカニンとシコニンの $A\beta$ 凝集抑制効果と神経細胞死抑制効果 (仮説図)

本研究の結果、アルカニンとシコニンは $A\beta$ 凝集抑制効果を有する可能性が示された。

3. alkannin と shikonin の A β による神経細胞死保護効果

alkannin と shikonin が A β の凝集抑制作用を有していたことより次にこれらの化合物が実際に神経保護機能を有している可能性について検討を試みた。実験では、神経モデル細胞である PC12 細胞に A β を処置した時の神経毒性に対する、両化合物の効果について検討を行った。細胞死は、培養上清中の LDH の遊離を指標に検討した。検討の結果、A β 単独処置で上昇する細胞死は alkannin、shikonin の用量依存的に抑制されることが明らかになった。

4. alkannin と shikonin の A β による樹状突起と軸索萎縮に対する効果

次に、alkannin と shikonin の A β による樹状突起と軸索萎縮に対する効果について検討を行った。初代培養マウス大脳皮質神経細胞に A β_{25-35} を処置した時の樹状突起と軸索の萎縮に対する化合物の影響を検討した。検討の結果、A β_{25-35} によって抑制された樹状突起、軸索、神経密度低下に対して alkannin は回復効果を有さないことが明らかになった。一方、shikonin は alkannin とは異なり A β_{25-35} 誘発樹状突起萎縮ならびに軸索萎縮を抑制する可能性が示された。従って、alkannin と shikonin の A β による樹状突起と軸索萎縮に対する効果に対して異なる作用を示す可能性が示唆された。

5. alkannin と shikonin の Tau タンパク質凝集に対する効果

ThT はタンパク質の β -sheet 構造を認識して蛍光を発するため、この特徴を利用して Tau タンパク質の凝集が確認でき、蛍光強度を比較することにより、凝集の程度を評価することができる。そこで ThT を用いて Tau タンパク質の凝集度を測定した。Tau タンパク質には微小管結合部位 (MBD: Microtubule-binding domain) が含まれており、MBD は約 30 個の類似したアミノ酸残基が 3 回又は 4 回繰り返した構造を有している (3R 及び 4RMBD)。検討の結果、3R および 4R MBD いずれの Tau タンパク質においても alkannin と shikonin は凝集抑制効果を示した。また、4R は 3RMBD に比べて 10 倍程強い凝集抑制活性を有していることが明らかになった。

■結論

本研究では、天然資源由来化合物 38 種類の中から抗凝集効果を有する化合物の探索を行った。その結果得られた化合物 alkannin と shikonin において、ケミカルシャペロン活性、A β 凝集抑制効果、A β による細胞毒性軽減効果、A β による樹状突起萎縮ならびに軸索萎縮抑制効果 (shikonin のみ)、Tau タンパク質凝集抑制効果が認められた。これらのことから、これらの化合物がアルツハイマー病治療薬として有効である可能性が示唆された。今後、これらの化合物のさらなる詳細な解析により有用な抗 AD 薬の解明が必要と考えられた。