

氏 名	新 名 芳 有
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 657 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	アミロイドカスケードに対する複数の薬理作用を有する化合物の同定と BACE-1の炎症条件下における機能の解明に関する研究

論文調査委員 (主 査)
教授 赤池昭紀 教授 金子周司 教授 佐治英郎

論 文 内 容 の 要 旨

アルツハイマー型認知症 (AD) は神経細胞の機能障害・細胞死により惹起される難治性神経変性疾患である。AD の病態として想定されているアミロイドカスケードとは、アミロイド β ($A\beta$) の産生に始まり、 $A\beta$ の高次構造変化 (凝集) と、それによる神経細胞の障害・細胞死、そしてADの発症に至る一連のカスケードである。

$A\beta$ の産生酵素の一つである BACE-1 (β -secretase) は $A\beta$ の前駆体蛋白質 (APP) が生理的基質であると考えられてきたが、その機能については未知の部分が多い。BACE-1の阻害剤がAD治療薬として注目を集めている現在において、その機能の詳細な解明が期待される。本研究において著者は、アミロイドカスケードに対して薬理作用を有する化合物の探索と薬理作用機序の解明を試みた。さらにBACE-1の、 $A\beta$ に起因する炎症条件下での新規な生理的機能の研究を行った。さらにこれらの研究を基にして新規アルツハイマー病治療薬の探索に取り組み以下の新知見を得た。

第一章 アミロイドカスケードに対するフラボノイドの薬理作用

フラボノイドの一種であるミリセチンが、アミロイドカスケードに対し複数の作用機序を有していることを、著者は明らかにした。

ラット胎仔由来初代培養神経細胞に対して $A\beta$ を適用したところ、有意な神経細胞障害がMTT法により観察された。チオフラビン蛍光法を用いて、 $A\beta$ が神経毒性を発揮するために必要な高次構造変化 (凝集) をミリセチンが阻害することを明らかにした。 $A\beta$ の凝集抑制作用により $A\beta$ による細胞膜の障害が抑制されることが考えられることから、Fura-2蛍光測定法により細胞内 Ca^{2+} の観察を行った。その結果 $A\beta$ による細胞内への過剰な Ca^{2+} の流入がミリセチンにより有意に抑制された。また過剰な Ca^{2+} 流入により活性化されるカスパーゼ-3の活性をミリセチンは減少させアポトーシス性神経細胞死を有意に抑制した。さらにミリセチンは $A\beta$ 産生酵素の一つである BACE-1 (β -secretase) を直接的に阻害し、また非 $A\beta$ 産生経路に関わる α -secretase の発現量と活性を上昇させた。

ミリセチン以外のフラボノイド (ケルセチン・モリン・ケンフェロール・アピゲニン) についても BACE-1 阻害作用を検討したところ、阻害活性はフラボン構造の B 環と C 環の水酸基の個数と相関していることが明らかとなった。細胞系において有意な $A\beta$ 種の減少、ならびに BACE-1 阻害作用は、ミリセチンとケルセチンにおいてのみ観察された。

最近の研究により、AD の病態にはグルタミン酸毒性が関わることを示唆されている。この過剰なグルタミン酸による神経細胞障害に対するミリセチンの薬理作用機序の解明を行った。ミリセチンは NMDA 型グルタミン酸受容体の Ser-890 残基のリン酸化を抑制することがウエスタンブロッティング法により示された。また NMDA 受容体を介する Ca^{2+} 流入をミリセチンは抑制した。すなわち Ca^{2+} 流入を起点とするアポトーシス経路が抑制されることが判明した。またミリセチンはグルタミン酸が惹起する活性酸素種の生成を減弱させた。これはミリセチンが元来有する抗酸化作用とも相関があることも明らかとなった。さらに FRET 法による検討の結果、ミリセチンはカスパーゼ-3 を直接的に阻害する作用を有していることが明らかになった。

以上の結果より、天然物であるミリセチンは、アミロイドカスケードならびにグルタミン酸神経毒性に対して複数の薬理作用を有する化合物であることが判明した。

第二章 BACE-1のA β 誘発炎症条件下における機能

BACE-1は膜結合型アスパラギン酸プロテアーゼであり、APPを切断しA β を産生する機能を有している。BACE-1の阻害はアミロイドカスケードを遮断するため、有望なAD治療標的として期待されている。最近、BACE-1の新たな機能が報告されており、ADと関係する未知な機能の存在が考えられる。そこでA β 過剰存在下におけるBACE-1の機能を検討した。

ラット胎仔由来初代培養神経細胞-グリア細胞共培養系にA β を処置するとBACE-1の蛋白質発現量が有意に増加した。BACE-1の発現量上昇はさらなるA β の産生を誘導し、ADの病態をより増悪させると考えられる。このBACE-1の発現増加は、抗炎症薬であるインドメタシンや、抗酸化物質EUK-8により抑制されたことから活性酸素種やプロスタグランジン類(PGs)により惹起される可能性が示唆された。次に、PGsの中でもADをはじめとする種々の神経変性疾患に大きく関与しているPGE₂に注目し、BACE-1との相互作用を検討した。その結果、BACE-1阻害薬処置によりA β が惹起するプロスタグランジンE₂(PGE₂)量が有意に減少することが競合ELISA法により明らかになった。PGE₂産生に関与する酵素群との相互作用を検討したところ、BACE-1は膜結合型プロスタグランジンE₂合成酵素2型(mPGES-2)のN末端側を切断していることが判明した。切断の結果mPGES-2とCOX-2が相互作用することが可能となりPGE₂の産生増加が生じると考えられた。またPGE₂により有意な細胞障害が観察されること、さらにPGE₂によりA β の産生量が有意に増加することも確認した。

以上の結果から、BACE-1はA β に起因する炎症条件下においてPGE₂の産生を増加させ、炎症反応の増悪を惹起し、さらなる神経細胞機能障害を誘発することが明らかになった。

第三章 BACE-1阻害作用とA β 凝集抑制作用を有する新規化合物の同定

天然物をリード化合物として、主としてBACE-1阻害作用とA β 凝集抑制作用の両方を有する新規化合物の創出に取り組んだ。種々の天然化合物を検討した結果、上記2種の薬理作用がフラボノイドよりも優れていることが確認されたクルクミンをリード化合物として選定し、各種誘導体の合成とin vitroにおける薬理作用評価を行った。その結果Cell Free系におけるBACE-1に対する50%阻害濃度が0.33 μ M、A β 凝集に対する50%抑制作用が0.92 μ Mという優れた薬理作用を有する新規化合物CU532を同定した。

以上、著者はアミロイドカスケードに対する複数の薬理作用を有する天然物を同定し、そのA β 産生阻害作用機序と神経細胞保護作用機序の詳細を明らかにした。また、A β 産生酵素BACE-1の新規な生理的機能を解明し、BACE-1阻害薬の新たな可能性を提示した。

さらにこれらの知見に基づきAD治療薬として有望なBACE-1阻害作用とA β 凝集抑制作用の両作用機序を有する新規化合物を同定した。本研究の成果は、ADの治療薬の創出ならびに難治性神経変性疾患の治療に資する貴重な知見を多数提供するものである。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー型認知症(AD)は神経細胞の機能障害・細胞死により惹起される難治性神経変性疾患であり、その病態として想定されているアミロイドカスケードとは、アミロイド β (A β)の産生に始まり、A β の高次構造変化(凝集)、神経細胞の障害、そして疾患の発症に至る一連のカスケードである。A β の産生酵素の一つであるBACE-1(β -secretase)は、A β の前駆体蛋白質を基質とする酵素であると考えられており、BACE-1阻害薬はAD治療薬として注目を集めているが、その機能の詳細については不明の点が多い。申請者は、アミロイドカスケードに対する阻害作用を有する化合物の探索と作用機序の解析を行い、さらにA β により誘発される脳内炎症反応におけるBACE-1の役割に関する研究を行った。

第一章 アミロイドカスケードに対するフラボノイドの薬理作用

フラボノイドの神経保護作用に着目し、ラット胎仔由来初代培養神経細胞を用い、A β により誘発される神経細胞障害に対する作用を検討した。フラボノイドの一種であるミリセチンがA β 神経毒性を著目に抑制することを見出し、その保護作

用機序の解析を行った。ミリセチンは、 $A\beta$ が神経毒性を発揮するために必要な高次構造変化、凝集を阻害し、 $A\beta$ 誘発細胞内 Ca^{2+} 流入を抑制し、カスパーゼ-3活性化を抑制した。さらに、ミリセチンはBACE-1を阻害するとともに α -secretaseの発現量と活性を上昇させた。ミリセチン以外のフラボノイド（ケルセチン、モリン、ケンフェロール、アピゲニン）についてもBACE-1阻害作用を検討したところ、これらのフラボノイドのBACE-1阻害活性はフラボン構造のB環とC環の水酸基の個数と相関することが示唆された。ミリセチンは、NMDA受容体のSer-890残基のリン酸化を抑制し、NMDA受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 流入を抑制し、 Ca^{2+} 流入を起点とするアポトーシス経路が抑制した。さらに、ミリセチンは、グルタミン酸により誘発される活性酸素種の生成を抑制した。以上の結果より、ミリセチンは、 $A\beta$ およびグルタミン酸神経毒性に対して複数の機序により保護作用を示す天然由来化合物であることが示された。

第二章 BACE-1の $A\beta$ 誘発炎症条件下における機能

過剰な $A\beta$ 存在下に誘発される脳内の炎症反応におけるBACE-1の役割を明らかにする目的で、初代培養神経細胞-グリア細胞共培養系を用い、 $A\beta$ によるBACE-1発現量変化および抗炎症薬の作用を検討した。 $A\beta$ によりBACE-1の発現が増大し、このBACE-1発現増加は、抗炎症薬インドメタシンおよび抗酸化物質EUK-8により抑制された。 $A\beta$ によりプロスタグランジンE₂が増大し、その作用はBACE-1阻害薬により抑制された。PGE₂産生に関与する酵素群とBACE-1の相互作用を検討したところ、BACE-1は膜結合型プロスタグランジンE₂合成酵素2型(mPGES-2)のN末端側を切断することが明らかになった。切断の結果mPGES-2とCOX-2が相互作用することが可能となりPGE₂の産生増加が生じると考えられた。さらに、プロスタグランジンE₂は $A\beta$ 産生量を増加するとともに細胞障害を誘発した。以上の結果より、BACE-1は $A\beta$ に起因する炎症条件下においてPGE₂の産生を増加させ、炎症反応の増悪を惹起し、さらなる神経細胞機能障害を誘発すると結論された。

第三章 BACE-1阻害作用と $A\beta$ 凝集抑制作用を有する新規化合物の同定

天然物をリード化合物として、主としてBACE-1阻害作用と $A\beta$ 凝集抑制作用の両者を有する新規化合物の創出に取り組んだ。種々の天然化合物を検討した結果、クルクミンがフラボノイドよりも優れたBACE-1阻害作用および $A\beta$ 凝集抑制作用を示すことを見出した。そこで、クルクミンをリード化合物として選定し、各種クルクミン誘導体のin vitroにおける薬理作用の評価を行った。その結果、Cell Free系におけるBACE-1に対する50%阻害濃度が0.33 μ M、 $A\beta$ 凝集に対する50%抑制作用が0.94 μ Mという優れた薬理作用を有する新規化合物を見出した。

以上、申請者はアミロイドカスケードに対する複数の薬理作用を有する天然物を同定し、その $A\beta$ 産生阻害作用機序と神経細胞保護作用機序の詳細を明らかにした。さらに、 $A\beta$ 産生酵素であるBACE-1の新規な機能を解明し、BACE-1阻害薬のAD治療薬としての新たな可能性を提示した。これらの知見に基づき、BACE-1阻害作用と $A\beta$ 凝集抑制作用の両作用機序を有しAD治療薬としての有用性が期待される新規化合物を見出した。本研究の成果は、ADを含む難治性神経変性疾患の治療薬の創出に資する重要な基礎的資料を提供するものである。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。