

20020905

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

神経変性疾患における
イニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

平成14(2002)年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 桃井 隆

平成15(2003)年3月

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

神経変性疾患における
イニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と
非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

平成14（2002）年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 桃井 隆

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ活性化の 分子機構と非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究 -----	1
桃井隆	
II. 分担研究報告 -----	11
1. カテプシン阻害剤による虚血性神経細胞死の予防的治療に 関する研究 -----	12
山嶋哲盛	
2. 神経変性疾患における非ペプチド性阻害剤の開発に 関する研究 -----	16
長澤和夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	21

I 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

神経変性疾患におけるイニシエーターカスパーゼ活性化の分子機構と

非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

主任研究者 桃井 隆 国立精神・神経センター 神経研究所
疾病研究第5部 室長

研究要旨 伸長ポリグルタミンを原因とする遺伝性神経変性疾患ではポリグルタミン凝集は、ER ストレスに特徴的な1) UPR レスポンス (Grp78/Bip の up-regulation、CHOP/GADD135 の発現) を誘導し、JNK の活性化とカスパーゼ 12 の活性化を誘導し、ER ストレス細胞死を誘導することが明らかとなった。2) カスパーゼ 12 の活性化型に特異的な抗体の反応性を指標として、ER ストレス細胞死に対する阻害剤 (YM5273) を化合物ライブラリーの中から発見することができた。3) YM5273 はポリグルタミン凝集による細胞死を抑制した。

研究組織

分担研究者

- (1) 東京大学細胞分子生物学研究所
長澤和夫 助教授
- (2) 金沢大学大学院医学系研究科
山嶋哲盛 助教授

A. 研究目的

アルツハイマー病、ポリグルタミン蓄積病などの神経変性疾患における細胞死ではカスパーゼの活性化が原因として問題となっている。こうした神経変性疾患の治療を最終目的として、本研究では神経変性疾患に関与するイニシエーターカスパーゼを特定し、非ペプチド性阻害剤の開発をおこなうことを目的とした。カスパーゼの活性化は、

細胞死のシグナルにより上位に位置するイニシエーターカスパーゼから、下位に位置するエフェクターカスパーゼへと順に引き起こされ、いわゆるカスパーゼカスケードの活性化を介して細胞死を実行する。現在こうしたイニシエーターカスパーゼとしてカスパーゼ 8、9、12 が知られている。細胞死を完全に抑制するには様々な細胞死シグナルと接点をもつカスケードの最上位に位置するイニシエーターカスパーゼ (8、9、12) のオートプロセッシングを特異的に阻害する (非ペプチド性およびペプチド性) 阻害剤の開発が必要である。

CAG トリプレットリピートの伸張を原因とするハンチントン病、DRPLA などの神経変性疾患では核内でのポリグルタミンの

蓄積が観察される。ポリグルタミンがカスパーゼ 8 と細胞質や核内で共凝集を引き起こし、その過程でカスパーゼ 8 が活性化する。しかしながら、研究の結果、細胞質内でのポリグルタミン凝集はカスパーゼ 8 の活性化を誘導するものの、細胞死を必ずしも誘導しないし、カスパーゼの阻害剤は細胞死を抑制できないことが明らかになった。

小胞体 (ER) での折り畳み不全や変異蛋白の蓄積は ER ストレスを誘導し、Grp78/Bip などのシャペロン蛋白の up-regulation、JNK の活性化、GADD135/CHOP の発現を誘導する。最近、ER に局在するカスパーゼ 12 の活性化が ER ストレスを誘導する糖鎖の阻害剤であるツニカマイシン、ER/ゴルジの膜輸送を阻害するプレフェルジン、カルシウム ATPase の阻害剤である Thapsigargin、それにアルツハイマー前駆体蛋白の切断断片である Ab によって誘導されることが明らかにされている。

本研究は神経変性疾患とくに、ポリグルタミン病の治療薬の確立を目的としており、ポリグルタミン凝集による細胞死の分子機構の解明とその細胞死を抑制する阻害剤の探索をおこなった。その結果、ポリグルタミン凝集は ER ストレス細胞死を誘導することを明らかにした。また、カスパーゼ 12 の活性化に対する抗体の反応性を指標として ER ストレスにより活性化されるカスパーゼ 12 の活性化を阻害する化合物 (YM5273) を化合物ライブラリーより分離することができた。YM5273 は ER ストレス細胞死を完全に抑制するとともに、ポリグルタミン凝集による細胞死を抑制した。

B. 研究方法

1) ER ストレスシグナルの解析

JNK の活性化は PhosphoPlus c-Jun (Ser63) II Antibody Kit (Cell signaling Technology) を用い、c-Jun リン酸化特異抗体 (Cell signaling Technology) により検出した。C2C5 細胞に EGF 融合遺伝子 (pEGFP-72CAG, pEGFP-11CAG) をリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクション 5 時間後、細胞培養液で細胞の洗浄を行い、時間を追って回収し、実験に用いた。回収した細胞は RIPA buffer または 0.2% トライトン X-100 を含む PBS で懸濁した後、10000g で遠心し、得られた細胞上清 (50ug) を SDS ポリアクリルアミドゲル (12%) 電気泳動法により泳動し、ブロットティングを行った。ブロットティングしたニトロセルロースフィルターは、1 次抗体として抗 tubulin 抗体、抗 c-Jun 抗体、抗 c-Jun リン酸化特異抗体、抗 Bip 抗体、抗 GFP 抗体を結合させ後、二次抗体として、アルカリフォスファターゼ標識した抗マウスまたはウサギイムノグロブリン抗体を反応させ発色液 (発色試薬である nitro blue tetrazolium, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate を含む) を用い、発色させた。

2) EGFP 融合タンパク質と蛍光標識抗体を用いた二重染色

pEGFP-72CAG 及び pEGFP-11CAG (5ug) は C2C5 細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、時間を追って 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS を用いて固定した。1 次抗体として抗 c-Jun リン酸化特異抗体を反応させ、さらに 2 次抗体としてテキサスレッド標識抗ウサギイムノグロブリン 抗体 (赤色) を加え 37°C 1 時間反応後、共焦点レーザー顕微鏡 (CSU-10、ヨコカワ)

を用いて解析した。

pEGFP-C1 vector に 72 リピートの CAG を導入し、C2C5 細胞に導入発現させるとともに、テキサスレッド標識した c-Jun リン酸化抗体による二重染色、およびヘキスト 33342 染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡下でポリグルタミンによる JNK 活性化と細胞死を検討した。

3) カスパーゼ 12 の切断点を認識する抗体の作成

カスパーゼ 12 の活性型に特異的な抗体は、切断部位 318 のアスパラギン酸の付近のペプチドを合成し、ペプチドを KLH(Keyhole limpet hemocyanin;シグマ)に結合させたものをウサギに免疫して作成し、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。pFlag-CMV-2 (コダック)を用いて、N 端に Flag タグを付加したラットカスパーゼ 2D394、マウスカスパーゼ 6D162、マウスカスパーゼ 8D387(DED 領域欠損型)、マウスカスパーゼ 9 全長、D353 および D368、マウスカスパーゼ 12D318 は *EcoRI* 断片を、Flag 発現ベクターの *EcoRI* サイトにサブクローニングした。DNA 配列はシークエンスにより確認した。

pEGFP(enhanced green fluorescence protein)-C1 vector (クローンテック)を用いて、N 端に EGFP タグを付加したカスパーゼ の発現系を作製した。マウスカスパーゼ-12 全長、D318 の断片は、pEGFP-C1 の *EcoRI* サイトにサブクローニングした。培養細胞への遺伝子導入 (トランスフェクション) はリン酸カルシウム法により行った。リン酸カルシウム法を用い、活性型のカスパーゼを認識する抗体の特異性をイムノブロットおよび EGFP 融合タンパク質と蛍光標識抗

体を用いた二重染色で検討した。

4) サル脳虚血の実験

体重 5kg ~ 9kg のニホンザル (*Macaca fuscata*)15 頭を用いた。具体的には、開胸後縦隔内に進入し直視下に大動脈弓より分岐直後の左鎖骨下動脈と無名動脈を剥離後、血管クリップにより 20 分間血流を完全に遮断した。血実験後のサルは 3 群に分け、5 頭は治療なしのコントロールとし、5 頭は CA-074、5 頭は E64c、それぞれ 4mg/kg のカテプシン阻害剤の静脈内注射を虚血解除後に行った。また、術中は直腸温をモニターし、体温を一定に保った。虚血実験の 5 日後、再度全身麻酔下で開胸し脱血後、左心室より 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を 1 時間かけて行った。その後、開頭により脳を摘出し全脳切片を作製した。標本はパラフィンに包埋した後 4 μ m の全脳薄切切片を作製し、H.E.染色を施した。1 頭につき海馬 CA1~CA4 の各領域、小脳、尾状核、被殻外側、および大脳皮質 III 層、V 層の計 9 ケ所を写真撮影し、正常な神経細胞の数と異常な神経細胞の数を数えと共に、虚血による神経細胞の形態変化を観察した。

倫理面への配慮：実験動物に対する倫理面については、実験実施場所である金沢大学医学部の倫理規定/指針に基づき十分に配慮の上、実験の計画が立てられている。実験動物 (サル) をハロセンにより緩徐に麻酔導入し、全身麻酔 (1%ハロセン、60%笑気、40%酸素) 下で無痛的に手術を行った。

C. 研究成果

1) カスパーゼ 12 活性化を阻害する化合

物の探索

ポリグルタミン凝集による細胞死の抑制に関わる分子標的の探索研究に着手した。この際、バイオプローブ作成のためのリードとなりうる化合物が必要であるが、カスパーゼ 12 の活性化に対する抗体の反応性を指標として、ER ストレスにより活性化されるカスパーゼ 12 の活性化を抑制する化合物スクリーニングの結果、図 1 に示す化合物 (YM5273) が ER ストレスによるカスパーゼ 12 の活性化と細胞死に対して良好な抑制作用を示した (桃井)

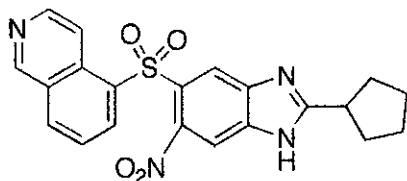


図 1

2) YM5273 による ER ストレス細胞死に対する抑制作用 (桃井)。

ツニカマイシンが誘導する ER ストレス細胞死に対する YM5273 の抑制効果を調べた結果、YM5273 はカスパーゼ活性である DEVD 活性を抑制、DNA 断片化を抑制し、カスパーゼ 12 の活性化を抑制した。更に、UPR である Bip の増大を抑制したが、CHOP の増大は抑制しなかった (図 2)。

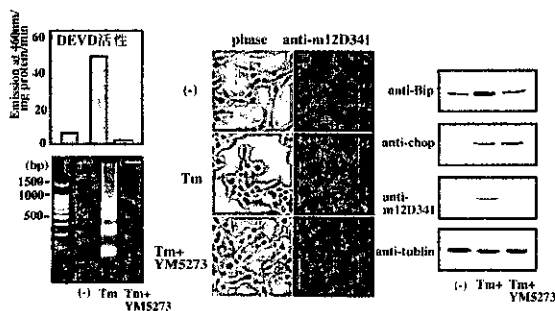


図 2

3) ポリグルタミン凝集が誘導する細胞死に対する YM5273 の抑制効果 (桃井)。

ポリグルタミン凝集は ER ストレスの特徴である Bip の増大を誘導し、JNK の活性化とカスパーゼ 12 の活性化を誘導することから、何らかの機構を介して、小胞体膜に作用し ER ストレスを誘導していると考えられる (Kouroku et al., 2002)。

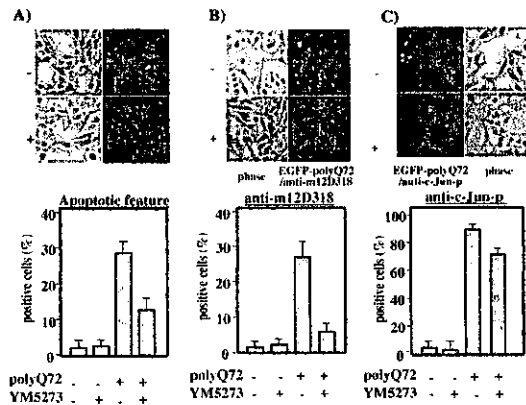


図 3

YM5273 はポリグルタミン凝集が誘導する細胞死 (図 3A)、カスパーゼ 12 の活性化を抑制し (図 3B)、また JNK の活性化 (図 3C) の程度を抑制することが明らかとなった。YM5273 はカスパーゼ 12 の活性化を抑制するだけでなく、UPR である Bip の増大を抑制することから、カスパーゼの上流に位置する ER ストレスセンサーである Ire 近傍の蛋白を標的にしていると想定される。

4) YM5273 誘導体の合成 (長澤)

YM5273 の分子標的を探索するためのアフィニティゲルを作成することを目的とし、YM5273 をリードに A~E の化合物を新たに設計した。得られた化合物について生物活性試験を行ない、その中から活性の強かった化合物について、同化合物にスペーサーを導入して、実際にアフィニティゲルを作

成することとした。スパーサーを導入した化合物のうち化合物 **G** が、その生物活性を維持していたことから、さらにこれを用いてアフィニティゲルを作成した。現在このゲルを用いた標的タンパク質の同定を検討している。

5) サル脳虚血の神経細胞死阻害剤 (山嶋)

一方、脳虚血による海馬 CA1 ニューロンの脆弱性は、異常な上昇をきたした Ca イオンが虚血後 5 日間にわたり μ カルパインを活性化し続けること、さらにこの活性型カルパインがリソソーム膜を分解しカテプシンのリソソーム外への放出を惹起するために構成蛋白を破壊してしまうことの 2 点に起因する。(カルパイン-カテプシン仮説) ことを共同研究者の山嶋が明らかにした。また、CA-074 や E64c 等のエポキシコハク酸は、カテプシンの活性中心にあるシステイン残基のチオール基 (-SH) にエポキシ基が結合するため、その酵素活性を特異的に阻害する。また、ピリドキサーール (ビタミン B6) は、ピリジン環 5 位にある活性アルデヒド基がシステイン残基のチオール基 (-SH) と結合するために、カテプシン B の酵素活性を阻害する。虚血 5 日目の時点で海馬の錐体細胞のみならず、小脳のプルキンエ細胞、尾状核、被殻外側、および皮質の III 層、V 層の神経細胞において有意な神経保護効果がみられた。しかし、YM5273 はサルの脳虚血による神経細胞死を抑制する効果は十分示さなかった。

D. 考察

1) ポリグルタミンと ER ストレス細胞死研究の初期において、活性型カスパーゼ 8 に対する特異的抗体を作製し解析した結果、

カスパーゼ 8 はポリグルタミンと共凝集過程で、カスパーゼ 8 の活性化するが、既知カスパーゼ阻害剤では完全に細胞死を阻害できないことから、カスパーゼ 8 以外の経路が存在する可能性も考えられた。こういった観点から、変異蛋白凝集がもたらす、ER ストレスに焦点をあて、ポリグルタミンによる ER ストレスの誘導について解析するに至った。

核内のポリグルタミン凝集はストレスシグナルのひとつである SEK1/JNK および ASK1 経路を活性化するという報告がなされている (Yasuda et al., *Genes Cells*, 1999)。またハンチントン病患者の血球細胞がストレスに対して脆弱性を示し、優位にアポトーシスを引き起こすという報告がなされ (Sawa et al., *Nat. Med.*, 1999)、ポリグルタミンによる細胞死とストレスとの関与が示唆されている。しかしながら、ポリグルタミンの凝集と ER ストレスとの関係については何も解っていなかった。研究を展開した結果、polyQ72 は Bip の発現を上昇させ、JNK やカスパーゼ 12 を活性化する事が明かとなった。Bip は小胞体シャペロン分子の一つで、ER ストレスがかかると、UPR により発現が上昇することが知られている。また ER ストレス時には同時に、Ire-1 が TRAF2 と結合し、JNK の活性化を引き起こす (Urano et al., *Science*, 2000)。このことから、polyQ72 は ER ストレスを引き起こしていることが示唆された。しかしながら何故 ER に局在しない、核内のポリグルタミン凝集や核周辺の凝集、細胞質の封入体が ER ストレスとなるのか、そのメカニズムは定かではない。

2) ER ストレスおよびポリグルタミン凝集による細胞死を抑制する化合物 YM5273 の分子標的

化合物のスクリーニングにより、ER ストレスによる細胞死に対し抑制作用を示すイソキノリン化合物 YM5273 (図 1) を見い出した。この YM5273 はポリグルタミン凝集が誘導する細胞死、カスパーゼ 12 の活性化や JNK の活性化を阻害した。YM5273 はまた、ER ストレスにより誘導される Ire ストレスセンサーを介する Bip の発現を抑制することから、カスパーゼの阻害剤とか細胞死の阻害剤ではなく、Ire 近傍の蛋白を標的としているものと考えられる。こうした化合物の存在はこれまで知られておらず、YM5273 の標的蛋白を明らかにすることは ER ストレスの発生、細胞死の分子機構を理解するだけでなく、ポリグルタミン病の病因を明らかにし、治療薬の開発への道を可能にすると考えられる。

YM5273 の標的分子の探索を目的として、この化合物をリードとして新たなプローブ化合物の設計及び合成を行った。リード化合物の構造中に存在するベンゼン環中のニトロ基を持たない類縁化合物 A~E について合成を行い、生物活性を検討した。その結果、ニトロ基を持たなくとも活性を示すことが分かり、より化学的に安定で容易に合成可能な新たな ER ストレス細胞死抑制活性を示す化合物を合成することができた。さらに本化合物を基に、アフィニティゲル作成のための誘導體合成を行った。この際、フェノール性の水酸基を足場にスパーサーの導入を行った。その結果、合成した類縁化合物は活性を維持していることがわかった。本化合物は ER ストレスをポリグルタ

ミン病をはじめとする神経変性疾患の神経細胞死抑制に関わる分子標的探索同定のための有用なプローブとなりうると考えられる。従ってその分子標的の同定の可能性も高いと考えられる。

3) 脳虚血に対する効果

モデル動物を用いての実験に使うだけの十分量の誘導體が得られなかったので、必ずしも至適な量での阻害実験がおこなえたわけではないが、プレリミナリーな実験では ER ストレス特異的に作用する YM5273 は脳虚血による神経細胞死を抑制することはできなかった。

しかし、脳虚血が誘導する神経細胞死に対する効果を評価するには、YM5273 の誘導體を含め、濃度依存的な実験が必要であると判断している。

E. 結論

ポリグルタミンは ER ストレスシグナルの指標である Bip 蛋白の発現上昇と JNK の活性化、カスパーゼ 12 の活性化を引き起こした。これらのことから、伸長したポリグルタミンの凝集は ER ストレスシグナルを活性化し、細胞死を引き起こしている可能性が考えられた。

1) ER ストレスによるカスパーゼ 12 の活性化を抑制する化合物 YM5273 を同定した。2) YM5273 はツニカマイシンが誘導する Bip の発現増大、カスパーゼ 12 の活性化、JNK の活性化を抑制した。3) YM5273 はポリグルタミン凝集が誘導する細胞死、カスパーゼ 12 の活性化、JNK の活性化の程度を抑制した。YM5273 はポリグルタミン凝集による細胞死を抑制するリーディング化合物

として、有望である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1: Momoi, T., Fujita, E., and Urase, K. Region-specific caspase-3-dependent programmed cell death in the developing forebrain. *Neuroreport* 14, 111-115 (2003)
- 2: Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Ohnishi, J., Inohara, N., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Momoi, T., ER stress induces caspase-8 activation stimulating the cytochrome *c* release and caspase-9 activation. *Exp. Cell Res.* 283, 156-166 (2003)
- 3: Nakamoto, Y., Kaneko, S., Fan, H., Momoi, T., Tsutsui, H., Nakanishi, K., Kobayashi, K., and Suda T. Prevention of Hepatocellular Carcinoma Development Associated with Chronic Hepatitis by Anti-Fas Ligand Antibody Therapy. *J. Exp. Med.* 196, 1105-1111 (2002)
- 4: Fukami, T., Satoh, H., Fujita, E., Maruyama, T., Fukuhara, H., Kuramochi, M., Takamoto, S., Momoi, T., and Murakami Y. Identification of the *Tslc1* gene, a mouse orthologue of the human tumor suppressor *TSLC1* gene. *Gene.* 295, 7-12 (2002)
- 5: Fujita, E., Kouroku, Y., Jimbo, A., Maruyama, K., and Momoi, T. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ.* 9, 1108-1114 (2002)
- 6: Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Kikuchi, T., Yamagata, T., Momoi, M.Y, Kominami E., Kuida, K., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Momoi, T. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress

signals and caspase-12 activation. *Human Mol. Genet.* 11, 1505-1515 (2002)

- 7: Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Toyoda, Y., Kigasawa, H., Nishi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Tanaka, Y., and Kuchino, Y. Increased ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 358-368 (2002)
- 8: Daré, E., Tofighi, R., Momoi, T., Mutti, A., and Ceccatelli, S. Styrene 7,8-oxide induces caspase activation and regular DNA fragmentation in neuronal cells. *Brain Res.* 933, 12-22 (2002)

山嶋哲盛

- 1: Anton B. Tonchev, et al., Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 2003 (in press)
- 2: Boryana K. Papivanova, et al., Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Brain Res* 2003 (in press)
- 3: Tetsumori Yamashima, et al., Sustained Calpain Activation and Lysosomal Rupture Prevailing Apoptosis Cascade, Execute Necrosis of the Postischemic CA1 Neurons in Primates. *Hippocampus* 13, 1-11 (2003)
- 4: Anton B. Tonchev, et al., Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia* 42, 1-16 (2003)
- 5: Liang Zhao, et al., PET imaging of ischemic

- neuronal death in the hippocampus of living monkey. *Hippocampus* 12: 309-318 (2002)
- 6: Harada K, et al., Hypothermia inhibits translocation of CaM kinase II and PKC-alpha, beta, gamma isoforms and fodrin proteolysis in rat brain synaptosome during ischemia-reperfusion. *J Neurosci Res* 67, 664-669 (2002)
- 7: Masaki Yoshida, et al., Primate neurons show different vulnerability to transient ischemia and response to cathepsin inhibition. *Acta Neuropathol (Berl)* 104: 267-272 (2002)
- 8: Xiang-Di Wang, et al., Vitamin B6 Protects Monkey Retinal Neurons from Ischemic Injury *Brain Res* 94, 36-43 (2002)
- 9: Tsukada T, Watanabe M, Yamashima T. Implications of CAD and DNase II in ischemic neuronal necrosis specific for the primate hippocampus. *J Neurochem.* 79, 1196-1206 (2002)

長澤和夫

- 1: Kakuta, H., Koiso, Nagasawa, K., and Hashimoto, Y. Fluorescent Bioprobes for Visualization of Puromycin-Sensitive Aminopeptidase in Living Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 83-86 (2003)
- 2: Ishiwata, T., Hino, T., Koshino, H., Hashimoto, Y., Nakata, T., and Nagasawa, K. Total Synthesis of Batzelladine D. *Org. Lett.* 4, 2921 (2002)
- 3: Nagasawa, K., Ishiwata, T., Hashimoto, Y., and Nakata, T. Stereoselective Synthesis of Tricyclic Guanidine, the Key Component of the Batzelladine Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 43, 6383 (2002)
- 4: Takahashi, H., Kashiwa, N., Kobayashi, H., Hashimoto, Y., and Nagasawa, K., Nucleophilic Substitution on 4-Hydroxymethylanilines under Neutral Conditions via Aza Quinone Methide

- Intermediate. *Tetrahedron Lett.* 43, 5751 (2002)
- 5: Takahashi, H., Kashiwa, N., Hashimoto, Y., and Nagasawa, K. Novel Mannich-type Nucleophilic Substitution Reaction with Tertiary Aromatic Amines. *Tetrahedron Lett.* 43, 2935 (2002)
- 6: Nagasawa, K., Georgieva, H. Koshino, T. Nakata, T. Kita, Y. Hashimoto. Total Synthesis of Crambescidine 359. *Org. Lett.* 4, 177 (2002)
- 7: Noguchi, T., Shimazawa, R., Nagasawa, K., and Hashimoto. Thalidomide and Its Analogues as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 1043 (2002)
- 8: Ishioka, T., Kubo, A., Koiso, Y., Nagasawa, K., Itai, A., and Hashimoto, Y. Novel Non-Steroidal/Non-Anilide Type Androgen Antagonists with Isoxazolone Moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 1555 (2002)

2. 学会発表

- 1) 日比野利彦, 辻弓子, 桃井隆: TGF β によるカスパーゼの活性化経路について: microarray および real time-PCR を用いた解析. 第25回日本分子生物学会, 横浜, 12.11-12, 2002
- 2) Takashi Momoi, Koko Urase, Kumi Aikawa, Eriko Fujita : The regionally specific caspase-3-dependent programmed cell death in the developing forebrain. 第25回日本分子生物学会, 横浜, 12.11-12, 2002
- 3) Atsushi Jimbo, Satoshi Iwasaki, Eriko Fujita, Yoriko Kouroku, Takashi Momoi : ER stress induces caspase-8 and caspase-9 activation as alternative apoptotic pathways. 第25回日本分子生物学会, 横浜, 12.13-14, 2002
- 4) Eriko Fujita, Yoriko Kouroku, Takashi Momoi : Intracellular localization of Dysferlin and ER stress-mediated cell death. 第25回日本分子生物学会, 横浜, 12.13-14, 2002

- 5) 高鹿依子, 藤田恵理子, 神保敦, 桃井隆: ポリグルタミン凝集によるERストレス. 第75回日本生化学会大会, 京都, 10.14-17, 2002
- 6) 神保敦, 藤田恵理子, 高鹿依子, 大西純一, 猪原直弘, 桃井隆: カスパーゼ 8 を介した小胞体ストレスによるチトクロムc流出機構. 第75回日本生化学会大会, 京都, 10.14-17, 2002
- 7) Jimbo, A., Fujita, E., Kouroku, Y., Momoi, T.: ER stress induces caspase-8 and caspase-9 activation as alternative apoptotic pathways. Apoptosis in cancer and infection. Oct. 6-9, CAPRI, 2002
- 8) Kouroku, Y., Fujita, E., Jimbo, A., Momoi, MY., Kuida, K., Yonehara, S., Kanazawa, I., Momoi, T.: Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. HD foundation "Annual Meeting for Huntington's Disease Researchers", Aug. 8-11, Massachusetts, 2002
- 9) 桃井隆: 神経変性疾患とERストレス (シンポジウム) 第25回日本神経科学大会, 東京, 7.8, 2002
- 10) 神保 敦, 藤田恵理子, 高鹿依子, 大西純一, 猪原直弘, 桃井隆: 小胞体ストレスによるチトクロムc流出機構. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7.7, 2002
- 11) 藤田 恵理子, 高鹿依子, 桃井隆: ジスフェリンの局在とERストレス細胞死. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7.7, 2002
- 12) 桃井隆, 浦瀬香子, 五十嵐智女: 初期脳形成における細胞死. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7.7, 2002
- 13) 高鹿 依子, 藤田恵理子, 杭田慶介, 酒巻和弘, 米原伸, 桃井隆: ポリグルタミン凝集によるERストレス誘導とカスパーゼ12の活性化. 第25回日本神経科学大会, 東京, 7.9, 2002
- 14) 山嶋哲盛: 虚血性神経細胞死とシステインプロテアーゼ. 第 25 回日本神経科学会 東京 7.9, 2002

15) 山嶋哲盛: 虚血後の霊長類脳における神経細胞の再生. 第 61 回日本脳神経外科学会総会 松本 10.4, 2002

16) 山嶋哲盛: 霊長類に特異的な虚血性神経細胞死—病態と診断、治療—第 11 回海馬と高次脳機能学会 浜松 11.23, 2002

17) 長澤和夫: Crambescidine359 の全合成および類縁化合物の化学的性質. 日本化学会第 81 春季年会 東京 3.26, 2002

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

一連の ER ストレスの阻害化合物について特許出願中である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

カテプシン阻害剤による虚血性神経細胞死の予防的治療に関する研究

分担研究者 山嶋哲盛 金沢大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：虚血性神経細胞死は脳硬塞や脳血管性痴呆等の根本原因である。その病態を解明し効果的な治療法を開発することは、高齢化社会を迎えた我が国においては緊急の課題である。げっ歯類を用いた従来の研究で、グルタミン酸レセプターやアポトーシスの解明は相当進んだが、これらの研究成果に基づき開発された新規薬剤で臨床応用にまで至ったものは皆無である。本研究では、遺伝子構造がヒトと95%もの相同性を示すサルを用いて、ヒトの病気の予防と診断、治療に直接役立つ成果を得た。

- 1) 海馬 CA1 ニューロンの脆弱性は、脳虚血により異常な上昇をきたした Ca イオンが虚血後5日間にわたり μ カルパインを活性化し続けること、さらにこの活性型カルパインがリソソーム膜を分解しカテプシンのリソソーム外への放出を惹起するために構成蛋白を破壊してしまうことの2点に起因する。(カルパイン-カテプシン仮説)
- 2) CA-074 や E64c 等のエポキシコハク酸は、カテプシンの活性中心にあるシステイン残基のチオール基 (-SH) にエポキシ基が結合するため、その酵素活性を特異的に阻害する。虚血負荷後に阻害剤を投与したサルにおいては、虚血5日目の時点で海馬の錐体細胞のみならず、小脳のプルキンエ細胞、尾状核、被殻外側、および皮質のⅢ層、Ⅴ層の神経細胞において有意な神経保護効果がみられた。
- 3) ピリドキサル (ピタミンB6) は、ピリジン環5位にある活性アルデヒド基がシステイン残基のチオール基 (-SH) と結合するために、カテプシン B の酵素活性を阻害する。本剤 15mg/Kg/day の虚血負荷前後10日間にわたる投与にて、虚血5日目の海馬と網膜において各々54%、95%のニューロンが生存していた (Wang 論文参照)。

A. 研究目的

一過性脳虚血を負荷すると、海馬の CA1 ニューロンが数日かかって死んでゆくことは、砂ネズミからヒトに至るまでよく知られている。しかし、この神経細胞死の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。すなわち、同一の虚血刺激を受けているにもかかわらずなぜ特定部位のニューロンのみが脆弱性を示すのかという疑問に対する完璧な解答は誰もできないのが現状である。

近年 Yamashima らは、虚血負荷中の細胞内 Ca イオンの上昇によってカルパインが活

性化し、活性型のカルパインがリソソーム内のカテプシンを放出させ、これが細胞構成タンパクの異常分解を惹起し神経細胞死を惹起すると報告した。しかし、海馬以外の脳の各部位の神経細胞に関しては、詳細な研究はなされていない。

本研究では、サルの一過性脳虚血モデルを用いて、海馬の錐体細胞のみならず、小脳のプルキンエ細胞、尾状核、被殻外側、および皮質のⅢ層、Ⅴ層の神経細胞に対して、虚血性神経細胞死の程度を比較検討し、同時にカテプシン B、L の阻害剤である CA-074 や E64c を用いてそれぞれの神経保護効

果を調べた。

B. 研究方法

体重 5kg～9kg のニホンザル (*Macaca fuscata*)15 頭を用いた。具体的には、開胸後縦隔内に進入し直視下に大動脈弓より分岐直後の左鎖骨下動脈と無名動脈を剥離後、血管クリップにより 20 分間血流を完全に遮断した。血実験後のサルは 3 群に分け、5 頭は治療なしのコントロールとし、5 頭は CA-074、5 頭は E64c、それぞれ 4mg/kg のカテプシン阻害剤の静脈内注射を虚血解除後に行った。また、術中は直腸温をモニターし、体温を一定に保った。

虚血実験の 5 日後、再度全身麻酔下で開胸し脱血後、左心室より 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を 1 時間かけて行った。その後、開頭により脳を摘出し全脳切片を作製した。標本はパラフィンに包埋した後 4 μm の全脳薄切切片を作製し、H.E.染色を施した。1 頭につき海馬 CA1～CA4 の各領域、小脳、尾状核、被殻外側、および大脳皮質 III 層、V 層の計 9 ケ所を写真撮影し、正常な神経細胞の数と異常な神経細胞の数を数えたと共に、虚血による神経細胞の形態変化を観察した。

倫理面への配慮：ハロセンにより緩徐に麻酔導入し、全身麻酔 (1%ハロセン、60%笑気、40%酸素) 下で無痛的に手術を行った。

C. 研究結果

完全な細胞死ではあるが細胞の残渣が残っている神経細胞はいうまでもなく、細胞の萎縮が著明で、エオジン好性でニッスル小体のみられない、濃縮した核を示す変性神経細胞は細胞死と判定した。エオジン好性の神経細胞は CA1 に多数みられたが、皮質の III 層や被殻外側を含む全脳にも多少認められた。しかし、脳全体を通してクロマチンの点状の濃縮像は認められたが、い

ゆるアポトーシス小体はみられなかった。一方、阻害剤を投与した場合、下記のように有意な神経細胞死の抑制効果がみられた。

CA -074 は CA1 神経細胞や小脳のプルキンエ細胞を有為に保護しており、E64c はこれらの神経細胞はもちろん脳全体の神経細胞を有意に保護していた。各群の残存神経細胞の計測結果は以下のとおりであった。

無治療コントロール群：

CA1 2.0%、CA2 16.2%、CA3 24.3%、CA4 35.3%、小脳 28.2%、大脳皮質 III 層 37.8%、V 層 34.1%、尾状核 55.8%、被殻外側 44.1%

CA074 投与群：

CA1 47.4%、CA2 53.0%、CA3 60.3%、CA4 77.3%、小脳 85.6%、大脳皮質 III 層 67.7%、V 層 65.9%、尾状核 89.8%、被殻外側 87.7%

E64c 投与群：

CA1 80.1%、CA2 83.6%、CA3 79.6%、CA4 88.6%、小脳 91.6%、大脳皮質 III 層 75.5%、V 層 75.0%、尾状核 86.1%、被殻外側 81.3%

D. 考察

神経細胞はレセプターやチャンネル、細胞骨格等を構成する多種多様の蛋白からなり、神経伝達物質を産生している。これらのターンオーバーやリサイクルおよびプロセシング等には、当然、リソソーム酵素の関与が不可欠である。リソソームにはシステインプロテアーゼであるカテプシン B、L やアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D および DNA エンドヌクレアーゼである DNase II など、多数のプロテアーゼが含まれているが、神経細胞死におけるこれらのプロテアーゼの関与に関してはごく最近まで全く不明であった。

霊長類の海馬 CA1 ニューロンの選択的脆弱性は、脳虚血によりカルシウムイオンが

異常な上昇をきたすこと、これが 2 次的にカルパインを活性化すること、さらに、この活性型カルパインがカテプシンのリソソーム外への放出を惹起するために構成蛋白を破壊してしまうことの 3 段階で発生する。Yamashima らが提唱したこの「カルパイン-カテプシン仮説」は、最近、線虫の神経細胞変性モデルにおいても確認され (Syntichiki et al., Nature 419, 939-944, 2002)、カルパインとカテプシンが関与する種を越えたネクロシスのカスケードが存在するものと思われる。

E. 結論

霊長類の虚血性神経細胞死はカルパインとカテプシンという二つのシステインプロテアーゼが関与するネクロシスであるとされる。本研究においては、カテプシン B、L ないしカルパインの阻害剤である CA-074 と E64c には、海馬のみならず、虚血に脆弱といわれている脳の各部分の神経細胞を保護する作用があることが明らかになった。今後、これらのカテプシン阻害剤は臨床的に脳硬塞の急性期治療に応用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zhao, L., Yamashima, T., Wang, X. D., Tonchev, A. B., Yamashita, J., Kakiuchi, T., Nishiyama, S., Kuhara, S., Takahashi, K., Tsukada, H. PET imaging of ischemic neuronal death in the hippocampus of living monkeys. Hippocampus 12, 109-118, (2002)
- 2) Harada, K., Maekawa, T., Tsuruta, R., Kaneko, T., Sadamitsu, D., Yamashima, T., Yoshida, Ki. K. Hypothermia inhibits translocation of CaM

kinase II and PKC-alpha, beta, gamma isoforms and fodrin proteolysis in rat brain synaptosome during ischemia-reperfusion. J. Neurosci. Res. 67, 664-669 (2002)

- 3) Yoshida, M., Yamashima, T., Zhao, L., Tsuchiya, K., Kohda, Y., Tonchev, A. B., Matsuda, M., Kominami, E. Primate neurons show different vulnerability to transient ischemia and response to cathepsin inhibition. Acta. Neuropathol. (Berl) 104, 267-272 (2002)
 - 4) Wang, X. D., Kashii, S., Zhao, L., Tonchev, A. B., Katsuki, H., Akaike, A., Honda, Y., Yamashita, J., Yamashima, T. Vitamin B6 Protects Monkey Retinal Neurons from Ischemic Injury. Brain Res. 940, 36-43 (2002)
 - 5) Yamashima, T., Tonchev, A. B., Tsukada, T., Tada, M., Saïdo, T. C., Imajoh-Ohmi, S., Momoi, T., Kominami, E. Sustained Calpain Activation and Lysosomal Rupture Prevailing Apoptosis Cascade, Execute Necrosis of the Postischemic CA1 Neurons in Primates. Hippocampus 13, 1-11 (2003)
 - 6) Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H. Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. Glia 42, 1-16 (2003)
 - 7) Tonchev, A. B., Yamashima, T., Zhao, L., Okano, H. J., Okano, H. Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. Mol. Cell Neurosci. (2003) (in press)
 - 8) Boryana K. Papivanova, et al., Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. Brain Res. (2003) (in press)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 山嶋哲盛：
虚血性神経細胞死とシステインプロテアー

ゼ.

第 25 回日本神経科学会 東京 7.9, 2002

2) 山嶋哲盛 :

虚血後の霊長類脳における神経細胞の再生.

第 61 回日本脳神経外科学会総会 松本 10.4,
2002

3) 山嶋哲盛 :

霊長類に特異的な虚血性神経細胞死—病態
と診断、治療—.

第 11 回海馬と高次脳機能学会 浜松 11.23,
2002

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経変性疾患における非ペプチド性阻害剤の開発に関する研究

分担研究者 長澤和夫 東京大学分子細胞生物学研究所 助教授

研究要旨：神経細胞死抑制作用のスクリーニング系で見出されたイソキノリン系化合物について、これをリードに神経細胞死抑制作用にかかわる分子標的の探索・同定を行うための構造類縁化合物を設計合成した。また、その合成した化合物の中から強い活性を示した化合物を用いて、その分子標的同定のためのアフィニティゲルの作成を行った。

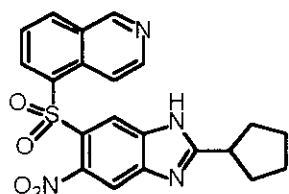
A. 研究目的

神経変性疾患の改善薬の開発を目指し、本年度は、神経細胞死抑制作用を有するイソキノリン化合物（図1）の分子標的探索・同定を行うための、構造類縁化合物の合成及びそれらを用いたアフィニティゲルの作成を目的とした。

B. 研究方法

神経細胞死抑制作用に関わる分子標的の探索研究に関する研究を行った。この際、バイオプローブ作成のためのリードとなりうる化合物が必要となる。今回、化合物スクリーニングの結果、図1に示す化合物が良好な神経細胞死抑制作用を示すことが明らかとなった。

図1



そこで本化合物の分子標的を探索するためのアフィニティゲルを作成することを目的とし、本化合物をリードに A~E の化合物を新たに設計した。得られた化合物について生物活性試験を行ない、その中から活性

の強かった化合物について、同化合物にスーパーサーを導入して、実際にアフィニティゲルを作成することとした。

C. 研究結果

化合物 A~E の合成は以下のように行った（スキーム1）。5-ヒドロキシイソキノリン 1 に対し塩基条件下 N,N-ジメチルチオカルボニルクロライドと反応させ 2 を得た（収率80%）。2 に対し無溶媒下で200℃に加熱したところ、転位反応が進行し、3 が低収率ながら生成した（収率35%）。ついで 3 を水酸化ナトリウム水溶液を用いて加水分解することにより、イソキノリン-5-チオール 4 を得ることができた（収率60%）。そこで 4 に対し、DMF 中炭酸カリウム存在下、100℃にて5-クロロ-2-ニトロアニリンを反応させたところ、カップリング反応が進行し、5 が中程度の収率で得られた（収率58%）。得られた 5 に対し塩化スズを反応させることによりジアミン 6 を得ることができた（収率92%）。また、5 に対し、室温で OXONE を作用させることにより化合物 A を得ることができた（収率58%）。さらに得られた A に対し先と同様にニトロ基の還元反応を行い、目的化合物 B を合成した（収率87%）。

次に化合物 6 及び B を用いて、C、D、E

の合成を行った（スキーム2）。

6 に対し NaHSO₃ 存在下エタノール中、4—ヒドロキシベンズアルデヒドを反応させたところ **D** を得ることができた（収率65%）。また、**B** に対しトルエン中カルボン酸と反応させることにより、**C** を得た（収率38%）。さらに **D** の場合と同様の反応条件で、**B** に対し 4—ヒドロキシベンズアルデヒドを反応させることにより **E** を合成した（収率45%）。

得られた **A~E** の化合物に対して生物活性試験を行ったところ、**A~C** に関しては殆ど神経細胞死抑制活性がみられなかったが、**D** 及び **E** は中程度の活性を有することが分かった。そこで、これらの化合物についてその標的タンパク質の探索・同定を行うことを目的とし、同化合物にスパーサーを導入して、実際にアフィニティゲルを作成するためのプローブ合成を行うこととした（スキーム2）。即ち、先に得られた **6** 及び **B** に対しそれぞれ 4—ヒドロキシベンズアルデヒド誘導体 **7** を反応させたところ、目的とするスパーサーの導入された化合物 **F** 及び **G** をそれぞれ合成することができた（それぞれ72%、40%）。

スパーサーを導入した化合物のうち化合物 **G** が、その生物活性を維持していたことから、さらにこれを用いてアフィニティゲルを作成した。現在このゲルを用いた標的タンパク質の同定を検討している。

D. 考察

神経細胞死抑制作用を示す化合物のスクリーニングにより今回見いだされた、イソキノリン化合物（図1）の標的分子の探索を行うことを目的として、図1に示した化合物をリードとして新たなプローブ化合物の設計及び合成を行った。リード化合物の構造中に存在するベンゼン環中のニトロ基を持たない類縁化合物 **A~E** について合成を

行い、生物活性を検討した。その結果、ニトロ基を持たなくとも活性を示すことが分かり、より化学的に安定で容易に合成可能な新たな神経細胞死抑制活性を示す化合物を合成することができた。さらに本化合物を基に、アフィニティゲル作成のための誘導体合成を行った。この際、フェノール性の水酸基を足場にスパーサーの導入を行った。その結果、合成した類縁化合物は活性を維持していることがわかった。本化合物は神経細胞死抑制に関わる分子標的探索同定のための有用なプローブとなりうると思われる。従ってその分子標的の同定の可能性も高いと考えられる。

E. 結論

本年度は、神経細胞死抑制作用を有するイソキノリン化合物の標的タンパク質の同定を目指し、高い生物活性を有する類縁化合物の合成に成功した。さらに得られた知見を基に、スパーサーを導入した新たな化合物の設計を行いそのプローブ合成に成功した。神経細胞死抑制作用を有するイソキノリン化合物の分子標的探索に向けての準備が完了した。今後これらのゲルを用い、さらなる検討を続ける。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

・ 論文/学会発表

- 1) Ishioka, T., Kubo, A., Koiso, Y., Nagasawa, K., Itai, A., Hashimoto, Y. Novel Non-Steroidal/Non-Anilide Type Androgen Antagonists with Isoxazolone Moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 1555 (2002)
- 2) Noguchi, T., Shimazawa, R., Nagasawa, K., Hashimoto, Y. Thalidomide and its Analogues as Cyclooxygenase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*