

201208009B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬と
その有効成分の同定

（H22－創薬総合－一般-009）

平成22～24年度 総合研究報告書

研究代表者 垣 塚 彰

平成25(2013)年5月

目 次

I. 総合研究報告書 -----	1
アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその 有効成分の同定 垣塚 彰	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	25

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業（創薬総合推進研究事業）
総合研究報告書

アルツハイマー病予防効果をもつ漢方薬とその有効成分の同定
研究代表者 垣塚 彰 京都大学大学院生命科学研究科教授

研究要旨

本研究では、漢方薬の原料となっている植物エキス約 1,600 種類をスクリーニングし、啤酒花と雷公籐エキスに明らかな γ セクレターゼの阻害活性が含まれることを見いだした。さらにそれぞれのエキスの主要阻害成分を生成し、NMR で構造を決定した。また、我々が独自に作製した家族性アルツハイマー病の原因遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスに対し、 γ セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスの投与を行い、そのアルツハイマー病の予防効果の解析を行った。その結果、啤酒花エキスの長期にわたる経口投与は、アルツハイマー病モデルマウスの記憶・学習能力の低下と情緒異常を有意に抑制し、また、大脳皮質や血管壁への β アミロイドの沈着も有意に抑制した。したがって、 γ セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスは、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬として極めて有望であると考えられた。

研究分担者

なし

A. 研究目的

超高齢化社会に突入しつつある我が国では、アルツハイマー病に代表される認知症を患う患者の急激な増加が予想される。しかしながら、現在、有効な治療法が無いため、患者のみならず患者の家族を救う手段が無い。今十分な対応策を講じなければ、来るべき医療費と人的負担の膨大な増加は、我が国の存亡をも左右しかねない事態になる。一方、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題である。特に

世界でもっとも顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学政策は無いとさえいえる。

アルツハイマー病の病因の最も上流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である $A\beta$ の産生である。 $A\beta$ は、その前駆体蛋白質である APP (amyloid precursor protein) の膜貫通近傍部分から β セクレターゼと γ セクレターゼの 2 つの蛋白質プロセシング酵素の働きで切り出される。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で $A\beta$ (特に $A\beta_{42}$) の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には、 γ セクレターゼによる $A\beta$ の APP からの切り出しが律速段階であ

ると想定されている。

従来、 γ セクレターゼ活性は、 $A\beta$ の C-末を認識する抗体を用いた ELISA 法によって産生された $A\beta$ 量を定量し、その量から推測する方法しかなかった。しかし、ELISA 法は非常にコストが高いため、 γ セクレターゼ阻害物質のスクリーニングを行うには莫大な費用が必要であった。

アルツハイマー病に対する薬物治療・予防においては、かなりの長期間に渡って薬物投与を行う必要が想定される。したがって、いかに副作用の少ない治療薬を提供できるかが極めて重要となる。このような少ない副作用という点で、我々は漢方薬に代表される植物エキスに注目した。漢方薬は数百年から千年を超えてヒトに使われており、大幅に摂取量を間違わない限り安全であることが実証されている。

本研究では、まず、安価に γ セクレターゼ活性を評価するアッセイ系を構築すること、続いて、この新しいアッセイ系を用いて漢方薬の原料となっている植物エキスをスクリーニングし、アルツハイマー病の主要な要因と考えられている $A\beta$ の産生を阻害する活性をもつ植物エキスを同定すること、そして、それらの植物エキスに含まれる有効成分を精製し、構造決定を行うこと、さらに、新たなアルツハイマー病モデルマウスを樹立し、同定した植物エキスが実際に *in vivo* でアルツハイマー病の発症を予防する効果を有するかどうかを検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. γ セクレターゼ活性を簡便に検出するアッセイ系の構築

我々が構築した γ セクレターゼ活性を評価するアッセイ系では、APP の C-末部位に非哺乳類の転写因子を接続し、その融合蛋白質を培養細胞に発現させた。 γ セクレターゼによってこの融合蛋白質が切断を受けると C-末部位の転写因子が核内移行する。そこで、この転写因子に応答して、ルシフェラーゼを発現するレポーターで、この転写因子の転写活性をモニターし、 γ セクレターゼ活性の強さを評価するというアッセイ系である。

2. γ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方薬エキスのスクリーニング

我々は、漢方薬の原料になっている植物エキス約 1,600 種類に対し、上記のアッセイ系を用い、細胞が持つ γ セクレターゼに対する阻害活性の評価を行った。その結果、啤酒花（ヒシユカ：和名ホップ）と雷公籐（ライコウトウ：和名クロズル）エキスに、明らかな γ セクレターゼの阻害活性が認められた。これらのエキスが、実際に $A\beta$ の産生を抑制することを ELISA 法によって確認した。

3. γ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方薬エキス成分の精製と構造決定

啤酒花エキスに含まれる γ セクレターゼを阻害する主成分の精製を以下のように行った。まず、Bligh Dyer 法で大まかに脂溶性分画と水溶性分画に分けた後、活性を含む脂溶性分画に対し、固相抽出、5CN-MS という順相カラム、5C18-AR-II という逆相カラム、

Symmetry Shield C18 という逆相カラム、COSMOSIL π -NAP という逆相カラムを用いた HPLC で順次分画した。その結果、 γ セクレターゼの阻害活性をシングルピークに精製することができた。精製物に γ セクレターゼ活性の阻害活性があることは、ELISA 法で確認した。

上記の精製を繰り返し行い、最終精製物を約 2 mg 得た。質量解析で、この物質の分子量を決定し、また、NMR で構造決定をおこなった（京都大学薬学研究科竹本教授、塚野助教の協力による）。

雷公籐から γ セクレターゼの阻害活性の主成分の精製を以下のように行った。まず、Bligh Dyer 法で分画後、阻害活性を認めた脂溶性分画を 5CN-MS という順相カラム、5C18-AR-II という逆相カラム、X terra という逆相カラムを用いた HPLC で順次分画することで、 γ セクレターゼの阻害活性をシングルピークに精製することができた。精製物に γ セクレターゼ活性の阻害活性があることは、ELISA 法で確認した。

上記の精製を繰り返し行い、最終精製物を約 13 mg 得た。質量解析で、この物質の分子量を決定し、また、NMR で構造決定をおこなった（京都大学薬学研究科竹本教授、塚野助教の協力による）。

4. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製

γ セクレターゼの阻害活性を示す植物エキスが実際に *in vivo* でアルツハ

イマー病の抑制効果があるかどうかを確認するためには、動物での検証が不可欠である。これまでに、幾つかのアルツハイマー病モデルマウスの報告があり、その内のいくつかは市販されていたり、また、MTA を交わすことで入手が可能である。しかしながら、これらのマウスは非常に高価であったり、交配によって増やすことが禁じられていたり、さらには、薬物開発に利用することの制限があり、いずれのマウスも非常に使い勝手が悪い。

我々はこれまでに幾つかのトランスジェニックマウスを作製した実績があるので、新たなアルツハイマー病のモデルマウスの作製を行った。

5. アルツハイマー病モデルマウスに対する啤酒花エキスによる治療効果の解析

得られた APP マウス（後述）を 2 群に分け、その内の 1 群には、啤酒花エキス 2 g を 1 リットルの水に加えたものを離乳後より自由摂取させ、もう 1 群には、エキスを加えない水を自由摂取させた。また、対象として週齢の一致する野生型マウスを用いた。これらの 3 群のマウスに対し、体重と飲水量の測定を行った。また、定期的に Open field 試験、Morris 水迷路試験等の行動・学習試験を行った。さらに、生後 16 ヶ月時で脳組織での β アミロイドの沈着を解析した。

6. 高い γ セクレターゼ阻害活性を持つ啤酒花の選別と抽出方法の検討

国内外で育成されている約 20 種類の啤酒花に対し、水で抽出したエキス

とエタノールで抽出したエキスを作製し、 γ セクレターゼの阻害活性に違いがあるかどうかの検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験：京都大学における動物実験の実施に関する基本指針に従い実施した。具体的には、実験を行う研究者、大学院生は、全員京都大学の「動物実験講習会」を受講し、京都大学内で動物実験を行うために必要な教育受講を終えたのちに実験を行った。その他の実験に関しては、倫理的な問題に関わる実験は含まれていない。

トランスジェニックマウスの作製は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいて行った。

C. 研究結果

1. γ セクレターゼ活性を簡便に検出するアッセイ系の構築

$A\beta$ の前駆体である APP の C-末部位に酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域と Herpes Simplex virus の転写活性化領域を融合した GAL4-VP16 (G4V16) を付加した蛋白質 (APP-G4V16) を発現させるベクターを構築した。この GAL4-VP16 は、転写研究領域で汎用されている強力な転写因子で、その活性は、プロモーター領域に GAL4 認識配列 (UAS) を挿入したルシフェラーゼのレポーター (TK(UAS)LUC) で測定することができる。この APP-G4V16 と TK(UAS)LUC を培養細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回

収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。このルシフェラーゼ活性は、既存の γ セクレターゼの阻害剤である DAPT を添加することで減少したので、 γ セクレターゼによって膜に存在する APP-G4V16 が切断された結果、G4V16 が核に移行してレポーターの転写を活性化していることが確認できた。従って、このアッセイ系を用いることで、 γ セクレターゼに対する阻害活性を安価なルシフェラーゼ活性の測定で行えるようになった。

2. γ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方薬エキスのスクリーニング

我々が開発した γ セクレターゼ活性評価するアッセイ系を用いて、現在ヒトに対して使用されている漢方薬の原材料となっているものを中心に約 1,600 種類の植物エキスに対して、 γ セクレターゼの阻害活性を含んでいるかどうかを検証した。このアッセイ系では、非特異的な転写抑制作用が擬陽性になるため、サイトメガロウイルスのプロモーターで β ガラクトシダーゼ (β gal) を発現させるプラスミッドを同時にトランスフェクションし、 β gal 活性に変化を与えずルシフェラーゼ活性を低下させるものをポジティブと判定した。このスクリーニングによって、啤酒花と雷公籐のエキスにルシフェラーゼ活性を特異的に低下させる活性があることが判明した。実際、これらのエキスに γ セクレターゼの阻害活性があることを ELISA 法によって確認した。

3. γ セクレターゼ阻害活性を持つ漢方薬エキス成分の精製と構造決定

啤酒花と雷公籐エキスそれぞれから、 γ セクレターゼの阻害活性の主成分の精製を行った。結果、啤酒花エキスに含まれる γ セクレターゼの阻害活性の主成分は、質量分析により分子量は 416 であり、核磁気共鳴 (NMR) により、構造を $C_{25}H_{36}O_5$ と決定した。また、雷公籐エキスに含まれる γ セクレターゼの阻害活性の主成分は、質量分析により分子量は 632 であり、核磁気共鳴 (NMR) により、構造を $C_{32}H_{40}O_{13}$ と決定した。

4. アルツハイマー病原因遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製

脳の神経細胞に特異的に発現させることを目的に、神経特異的エノラーゼ (NSE : neuron-specific enolase) 遺伝子のプロモーターを用い、家族性アルツハイマー病の原因となる家族性アルツハイマー病の原因となる Indiana 変異 (V717F) をもつ変異 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を行った。このトランスジェニックマウス同士を掛けあわせ、トランスジーンをホモに持つ雌雄を得、それらをさらに掛けあわせることで、トランスジーンがホモの状態ですべての細胞で発現させた (以下、APP マウス)。一方、変異 APP 遺伝子に加え、同じく家族性アルツハイマー病の原因となる変異をもつ変異プレセニリン遺伝子を同時に発現させるトランスジェニックマウスも作製した (以下、APP/PS マウス)。このトランスジェニ

ックマウスについても 2 つの変異遺伝子をホモに持つ状態で維持することを試みたが、そのようなダブルホモのトランスジェニックマウスは得ることができず、APP/PS マウスの個体数を増やすことに予定以上に時間を要した。

5. アルツハイマー病モデルマウスに対する啤酒花エキスによる治療効果の解析

野生型マウス、水飲水 APP マウス、啤酒花飲水 APP マウスについて、月齢 18 ヶ月までに渡って解析を行った。この間、3 群の間で体重及び飲水量に有意な差は観察されなかった。また、啤酒花の飲水によってトランスジーン mRNA レベルにも変化は認められなかった。Open field テストにおいて、これら 3 群のマウスの活動量に有意な差は認められなかったが、18 ヶ月齢において、水飲水 APP マウスにのみ、側壁から離れて中央部分に滞在する時間の有意な上昇が認められた (不安感情の欠如)。記憶・学習能力を測定する Morris 水迷路試験では、生後 6 ヶ月において、水面下のプラットフォームにたどり着くまでの時間に野生型マウスと水飲水 APP マウスの間に差が見え始め、9 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢では水飲水 APP マウスで、有意に遅延した。これらの月齢において啤酒花飲水 APP マウスでは、プラットフォームにたどり着くまでの時間は、野生型マウスとほぼ同等であった。一方、水面下のプラットフォームの位置を記憶しているかどうかを検証するプローブテストにおいても、9 ヶ月齢及

び 12 ヶ月齢において、野生型マウスと水飲水 APP マウスの間で、有意な差を認めましたが、啤酒花飲水 APP マウスと野生型とに差は認められなかった。しかしながら、15 ヶ月齢及び 18 ヶ月齢においては、啤酒花エキスの飲水による記憶・学習能力の保持は、もはや観察されなかった。

生後 16 ヶ月に 3 群のマウスの脳を組織学的に解析した。結果、水飲水 APP マウスの大脳皮質頭頂部において顕著な β アミロイドの沈着を認めた。この β アミロイド沈着は啤酒花飲水 APP マウスでは有意に低下していた。また、水飲水 APP マウスにおいてのみ大脳血管壁への β アミロイド沈着が認められた。

6. 高い γ セクレターゼ阻害活性を持つ啤酒花の選別と抽出方法の検討

これまでの実験では、中国産の啤酒花を用いたが、本実験では国内外で育成されている約 20 種類の啤酒花から水及びエタノールで抽出したエキスを調整し、それぞれに含まれる γ セクレターゼの阻害活性の比較を行った。その結果、同じ啤酒花でも品種によって含まれる γ セクレターゼの阻害活性に大きな差があることが判明した。また、この γ セクレターゼの阻害活性は、水での抽出エキスには、ほとんど検出できないことが明らかとなった。

D. 考察

今後著しい患者数の増大が予測されるアルツハイマー病に対して、有効な薬剤を用意することは極めて重要

な課題である。家族性アルツハイマー病の研究から、これまでに同定されたほぼ全ての原因遺伝子の変異によって $A\beta$ (特に $A\beta_{42}$) の産生亢進が引き起こされていることが示され、孤発性のアルツハイマー病においても $A\beta$ の産生抑制が有効な治療戦略になるであろうと推測されている。

$A\beta$ は、その前駆体蛋白質である APP の膜貫通近傍部分から β セクレターゼと γ セクレターゼの 2 つのプロセシング酵素の働きで切り出されるが、 $A\beta$ (特に $A\beta_{42}$) の産生抑制には C-末部位の切り出しを担う γ セクレターゼの活性抑制が極めて重要であると推測されている。

長期に渡る治療が想定されるアルツハイマー病の治療薬には、副作用が少なく安全であることが極めて重要である。我々は、安全性が確立している漢方薬に注目し、これまでに、漢方薬の原料となっている約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、啤酒花と雷公籐エキスに γ セクレターゼを阻害する成分が含まれることを見いだし、それぞれの主要成分の精製に成功した。

我々が作製した神経細胞特異的に Indiana 変異 (V717F) をもつ APP を発現させたトランスジェニックマウス (APP マウス) は、加齢と共に記憶・学習能力の低下を認め、18 ヶ月齢では不安行動の減少を認めた。組織学的には、16 ヶ月齢において、大脳皮質頭頂部および脳血管周辺にアミロイドの沈着が観察された。この APP マウスに、離乳後より、啤酒花エキスを飲水

に混ぜ自由摂取させたところ、9ヶ月齢と12ヶ月齢で顕著な記憶・学習能力の保持が観察された。しかしながら、この効果は、15ヶ月齢以降では観察されなかった。即ち、啤酒花エキスの投与によって、認知機能の低下を遅延させる効果は明確に確認できたが、完全に防ぐまでにはいたらなかった。一方、18ヶ月齢の水飲水 APP マウスに認められた不安行動の抑制という表現型は、啤酒花飲水 APP マウスでは全く観察されず、啤酒花エキスの投与は、アルツハイマー病患者に観察される情緒異常に対しても予防効果が期待できることを示唆している。

国内外で育成されている約20種類の啤酒花に含まれる γ セクレターゼの阻害活性を解析したところ、ほとんど活性の無いものから中国産の物と比較して数倍強い阻害活性を示すものまで、まちまちであった。これらの結果から、 γ セクレターゼの阻害活性を含む啤酒花エキスを正しく選別することで、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬を提供できると考えられた。

E. 結論

我々は、 γ セクレターゼの活性を簡便に評価するアッセイ系を構築することに成功した。このアッセイ系を用いて約1,600種類の植物エキスをスクリーニングし、 γ セクレターゼの阻害活性を持つ漢方薬植物エキスとして啤酒花及び雷公籐エキスを同定し、それぞれの主要有効成分の同定に成功した。一方、啤酒花エキスの長期にわた

る経口投与は、新たに作製したアルツハイマー病モデルマウスの記憶学習能力の低下と情緒異常を有意に抑制し、また、大脳皮質や血管壁への β アミロイドの沈着も有意に抑制した。したがって、 γ セクレターゼの阻害活性を持つ啤酒花エキスは、全く新しいアルツハイマー病の治療・予防薬として極めて有望であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

1. 論文発表

Okamoto A, Koike M, Yasuda K, & Kakizuka A. Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress. **Biochem Biophys Res Commun** 394: 42-47, 2010.

Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, & Kakizuka A. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. **J Biol Chem** 285: 21736-21749, 2010.

Manno A, Noguchi M, Fukushi J, Motohashi Y, & Kakizuka A. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins (VCPs) that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia

- (IBMPFD). *Genes Cells* 15: 911-922, 2010.
- Muguruma K, Nishiyama A, Ono Y, Miyawaki H, Mizuhara E, Hori S, Kakizuka A., Obata K, Yanagawa Y, Hirano T, & Sasai Y. Ontogeny recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. *Nat Neurosci* 13: 1171-1180, 2010.
- Takeshita Y, Fujinaga R, Kokubu K, Islam MN, Jahan MR, Yanai A, Kakizuka A, & Shinoda K. Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain. *Neuroreport* 22: 232-238, 2011.
- Nakano N, Ohashi-Ikeda H, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, Kakizuka A, & Yoshimura N. Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:8754-8762, 2011.
- Ohyama K, Yasuda K, Onga K, Kakizuka A, & Mori N. Spatio-temporal expression pattern of the NatB complex, Nat5/Mdm20 in the developing mouse brain: implications for co-operative versus non-co-operative actions of Mdm20 and Nat5. *Gene Expr Patterns* 12:36-45, 2012.
- Muraoka Y, Ohashi-Ikeda H, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, & Yoshimura N. Real-Time Imaging of Rabbit Retina with Retinal Degeneration by using Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *PLoS ONE* 7: e36135, 2012.
- Takata T, Kimura Y, Ohnuma Y, Kawawaki J, Kakiyama S, Tanaka K, & Kakizuka A. Rescue of growth defects of yeast *cdc48* mutants by pathogenic IBMPFD-VCPs. *J Str Biol* 173: 93-103, 2012.
- Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, Kakizuka A, & Sehara-Fujisawa A. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 7:e47078, 2012.
- Murakami K, Ichinohe Y, Koike M, Sasaoka N, Iemura S, Natsume T, & Kakizuka A. VCP Is an Integral Component of a Novel Feedback Mechanism that Controls Intracellular Localization of Catalase and H₂O₂ Levels. *PLoS One*. 8:e56012, 2013.
- Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Tsukano C, Takemoto Y, & Kakizuka A. Long-term oral administration of Hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. (submitted)

2. 学会発表

(招待講演)

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学（京都）平成 22 年 5 月 7 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症の分子機構」第 11 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 芝蘭会館（京都）平成 22 年 7 月 1 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部（金沢）平成 22 年 9 月 29 日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学（東京）平成 22 年 11 月 2 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」第 3 回グローバル COE 国内シンポジウム「神経変性疾患とがんの共通分子機構をめぐって」名古屋大学医学部（名古屋）平成 22 年 11 月 5 日

垣塚 彰「癌ってどういうもの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学（京都）平成 23 年 5 月 6 日

垣塚 彰「細胞内 ATP の制御機構」第 13 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 芝蘭会館（京都）平成 23 年 7 月 8 日

垣塚 彰「神経変性疾患およびストレス応答における VCP の役割」第 20 回日本 Cell Death 学会 東京大学薬学講堂（東京）平成 23 年 7 月 30 日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における VCP 蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部（金沢）平成 23 年 9 月 1 日

垣塚 彰「VCP が関わる異常蛋白質に対するストレス応答機構と ATP 制御機構」第 84 回日本生化学会大会シンポジウム (2S2a) ストレスシグナル研究の最前線 京都国際会議場（京都）平成 23 年 9 月 22 日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学（東京）平成 23 年 10 月 18 日

Akira Kakizuka “Roles of VCP in abnormal phospholipid metabolisms in polyglutamine disease models.” 9th International conference on AAA proteins. Kumamoto City International Center (Japan) November 10, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in polyglutamine diseases.” Asian Aging Core for Longevity (AACL)-Nagasaki Symposium Asian Aging 2011: Japan-Korea Joint Conference on Brain Aging and Neurodegeneration (Molecular Perspectives and Regional Bridging). Nagasaki University (Japan) November 21, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in human neurodegenerative disorders.” Kyoto University day in Nanjing. Nanjing University (China) December 2, 2011.

Akira Kakizuka “Roles of VCP in neurodegenerative disorders.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

垣塚 彰「神経細胞が死ぬ病気はなぜおこるの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 京都大学（京都）平成24年6月22日

垣塚 彰「緑内障および網膜色素変性症マウスモデルに対して有効性を示した新規 VCP 阻害剤の開発」京都大学新技術説明会 JST 東京別館ホール（東京）平成24年8月24日

垣塚 彰「新規神経保護薬の開発とその緑内障動物モデルに対する応用」第23回日本緑内障学会 石川県立音楽堂（金沢）平成24年9月28日

垣塚 彰「細胞内主要 ATPase VCP の役割とその新規制御薬の開発」糖尿病研究センターセミナー/転写代謝セミナー 国立国際医療研究センター（東京）平成24年10月19日

垣塚 彰「神経変性疾患発症における

VCP 蛋白質の役割」ニューロサイエンスセミナー 金沢大学医学部（金沢）平成24年10月30日

垣塚 彰「医薬品の神経毒性」東京大学薬学部特別講義 東京大学（東京）平成24年11月6日

垣塚 彰「細胞内主要 ATPase VCP の生理・病態における役割とその新規制御薬の開発」奈良県立医大大学院セミナー 奈良県立医大（奈良）平成24年11月30日

垣塚 彰「新規の作用機序による緑内障および網膜色素変性症治療薬」イノベーションフェア関西 グランキューブ大阪（大阪）平成24年12月6日

（一般発表：口頭）

Junpei Fukushi, Yuzuru Ichinohe, & Akira Kakizuka. “Crucial damage of particular classes of linoleoyl phospholipids in polyglutamine disease *Drosophila* models.” The 9th International Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto) March 7, 2011.

Masaaki Koike, Junpei Fukushi, Yuzuru Ichinohe, Chiyomi Sasaki, & Akira Kakizuka. “Modifications of VCP via abnormal protein accumulation lead to neuronal cell atrophy and neurodegeneration.” The 9th International Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto) March 8, 2011.

中野紀子、池田華子、村岡勇貴、板谷正紀、垣塚彰、吉村長久「HRA、OCT同時撮影による GLAST 欠損マウス網膜神経節細胞障害の経時変化」第 115 回日本眼科学会総会、東京国際フォーラム（東京）平成 23 年 5 月 13 日

今村博臣、中野雅裕、永井健治、野地博行、垣塚彰「ミトコンドリア ATP 濃度は細胞質 ATP 濃度とは半独立に制御されている」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館（京都）平成 23 年 9 月 22 日

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, & Akira Kakizuka
“Involvement of MAG11 and *c-fos* in schizophrenia like behavioral abnormality.” 第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館（京都）平成 23 年 9 月 23 日

福士順平、一戸勇弦、加藤悠、垣塚彰
「ポリグルタミン発現に伴うリノール酸含有リン脂質の低下」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館（京都）平成 23 年 9 月 23 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館（京都）平成 23 年 9 月 24 日

田中喬、長嶋一昭、稲垣暢也、野地博行、垣塚彰、今村博臣「ATP バイオセ

ンサー(GO-ATeam)を用いた膵島 β 細胞のライブイメージング」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学（京都）平成 23 年 12 月 21 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学（京都）平成 23 年 12 月 21 日

Norio Sasaoka, Megumi Sakamoto, Shoko Kanemori, & Akira Kakizuka
“Identification of plant extracts with anti-Alzheimer’s disease activities.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura
“Simultaneous ATP and Ca^{2+} imaging of a single insulin-secreting islet cell.” The 10th NTU-Japan International mini-symposium on Molecular and Cell biology & promotion of Academic Exchange and Collaborations for NTU-Japan. Taiwan National University (Taiwan) January 8, 2012.

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira

Kakizuka, & Hiromi Imamura
“Simultaneous ATP and Ca²⁺ imaging of
a single insulin-secreting islet cell.”
The 10th International Student Seminar
Kyoto University (Kyoto) March 5-8,
2012.

池田華子、中野紀子、村岡勇貴、板谷
正紀、垣塚彰、吉村長久「VCP 阻害剤
による網膜色素変性モデルマウスに
おける神経保護効果の検討」第116回
日本眼科学会総会 東京国際フォー
ラム (東京) 平成24年4月5日

中野紀子、池田華子、村岡勇貴、板谷
正紀、垣塚彰、吉村長久「VCP 阻害剤
によるマウス網膜神経節細胞傷害モ
デルにおける神経保護効果の検討」
第116回日本眼科学会総会 東京国際
フォーラム (東京) 平成24年4月6
日

池田華子、中野紀子、村岡勇貴、吉村
長久、垣塚彰「緑内障モデルマウスに
おける VCP 阻害剤による神経保護効
果の検討」第7回日本ケミカルバイオ
ロジー学会年会 京都大学百周年時計
台記念館 (京都) 平成24年6月8日

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama,
Tadashi Uemura, & Akira Kakizuka.
“Fluorescent ATP biosensor optimized
for imaging of cells from non-vertebrate
model organisms” International
Symposia "New Frontiers of Metabolism
Research in Biomedical Sciences" The
University of Tokyo (Japan) September

28, 2012.

Hanako Ikeda, Noriko Nakano, Yuki
Muraoka, Masanori Hangai, Akira
Kakizuka, & Nagahisa Yoshimura.
“Neuroprotective effects of VCP
inhibitors on DBA/2J mice, a mouse
model of glaucoma” 第23回日本緑内
障学会 石川県立音楽堂 (金沢) 平成
24年9月28日

Shu-ichiro Sakamoto, Akira Kakizuka, &
Hiromi Imamura. Imaging of intracellular
ATP dynamics in single apoptotic cells.
The 11th International Student Seminar,
Shiran Kaikan (Kyoto) March 6, 2013.

(一般発表:ポスター)

Sachi Tsujikawa, Yukio Taniguchi,
Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa,
Shingo Maegawa, Shigeo Kobayashi,
Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki,
Akira Kakizuka, & Hiroshi Hosokawa.
“MAGI-1 modulates anxiety-like
behavior in mice” BMB2010 神戸国際
会議場 (神戸) 平成22年12月7日

Junpei Fukushi, Yuzuru Ichinohe, &
Akira Kakizuka. “Crucial damage of
particular classes of linoleoyl
phospholipids in polyglutamine disease
Drosophila models.” The 9th International
Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto)
March 7, 2011.

Masaaki Koike, Junpei Fukushi, Yuzuru
Ichinohe, Chiyomi Sasaki, & Akira

Kakizuka. "Modifications of VCP via abnormal protein accumulation lead to neuronal cell atrophy and neurodegeneration." The 9th International Student Seminar Shiran Kaikan (Kyoto) March 8, 2011.

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Kazuo Nakanishi, Tsuyoshi Miyakawa, Akira Kakizuka, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, & Hiroshi Hosokawa. "Deficiency of sensory motor gating in MAGI-1 knockout mice" 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 パシフィコ横浜 (横浜) 平成 23 年 3 月 28 日

今村博臣、中野雅裕、永井健治、野地博行、垣塚彰「ミトコンドリア ATP 濃度は細胞質 ATP 濃度とは半独立に制御されている」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

福士順平、一戸勇弦、加藤悠、垣塚彰「ポリグルタミン発現に伴うリノール酸含有リン脂質の低下」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

Sachi Tsujikawa, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Haruaki Ninomiya, Tomoh Masaki, & Akira Kakizuka "Involvement of MAGI1 and *c-fos* in schizophrenia like behavioral abnormality." 第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 23 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都) 平成 23 年 9 月 24 日

小池雅昭、今村博臣、垣塚彰「飢餓条件下における VCP タンパク質の機能解析」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学 (京都) 平成 23 年 12 月 21 日

坂本修一郎、野地博行、垣塚彰、今村博臣「Pannexin 1 は細胞内 ATP レベルを制御することでアポトーシスの進行に重要な役割を果たす」第 37 回日本生体エネルギー研究会シンポジウム 京都産業大学 (京都) 平成 23 年 12 月 21 日

Norio Sasaoka, Megumi Sakamoto, Shoko Kanemori, & Akira Kakizuka "Identification of plant extracts with anti-Alzheimer's disease activities" The 10th NTU-Japan international mini-symposium on molecular and cell biology Taiwan University (Taiwan) January 8, 2012

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima, Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, & Hiromi Imamura "Simultaneous ATP and Ca²⁺ imaging of a single insulin-secreting islet cell" The 10th NTU-Japan international mini-symposium on molecular and cell biology

National Taiwan University (Taiwan)
January 8, 2012

Takashi Tanaka, Kazuaki Nagashima,
Nobuya Inagaki, Hiroyuki Noji, Akira
Kakizuka, & Hiromi Imamura
“Simultaneous ATP and Ca²⁺ imaging of
a single insulin-secreting islet cell”
The 10th International Student Seminar
Kyoto University (Japan), March 5, 2012

笹岡紀男、坂本めぐみ、兼森祥子、大
泉宏、垣塚彰「アルツハイマー病予防
薬の探索と薬理学的効果」第7回日本
ケミカルバイオロジー学会年会 京都
大学百周年時計台記念館（京都）平成
24年6月8日

池田華子、中野紀子、垣塚彰、吉村長
久「NMDA 硝子体内投与緑内障モデル
マウスにおける VCP 阻害剤による網
膜神経節細胞保護効果の検討」18 回成
人病の病因・病態の解明に関する研究
発表会 平成 24 年 7 月 7 日

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama,
Jun-ichi Kishikawa, Hiroyuki Noji, Akira
Kakizuka, Ken Yokoyama, & Tadashi
Uemura. “Genetically-encoded ATP
biosensor for low temperatures”
European Bioenergetic Conference 2012,
University of Freiburg (Germany)
September 19, 2012.

Hiromi Imamura, Taiichi Tsuyama,
Tadashi Uemura, & Akira Kakizuka.
“Fluorescent ATP biosensor optimized

for imaging of cells from non-vertebrate
model organisms” International
Symposia "New Frontiers of Metabolism
Research in Biomedical Sciences" The
University of Tokyo (Japan) September
27, 2012.

田中喬、長嶋一昭、稲垣暢也、野地博
行、垣塚彰、今村博臣「蛍光 ATP バ
イオセンサーを用いたインスリン分
泌細胞内 ATP のダイナミクスの計測」
日本生体エネルギー研究会 岡山大
学（岡山）平成 24 年 12 月 22-24 日

坂本修一郎、野地博行、垣塚彰、今村
博臣アポトーシスにおける細胞内
ATP の挙動の解析日本生体エネルギ
ー研究会 岡山大学（岡山）平成 24
年 12 月 22-24 日

Shu-ichiro Sakamoto, Akira Kakizuka, &
Hiromi Imamura. Imaging of intracellular
ATP dynamics in single apoptotic cells.
The 11th International Student Seminar,
Shiran Kaikan (Kyoto) March 5-6, 2013.

Yuko Ito, Masaaki Koike, & Akira
Kakizuka. “Regulation of autophagosome
formation by Golgi dynamics via
CDC2-p37/p47/VCP axis” The 11th
International Student Seminar, Shiran
Kaikan (Kyoto) March 5-6, 2013.

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

発明の名称：「ナフタレン誘導体」 発明者：垣塚彰、堀清次、他 2 名。出願人：国立大学法人京都大学、他 1 社。出願日：平成 22 年 7 月 30 日、特願 2010-172467

発明の名称：「眼疾患処置薬」、発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、他 2 名。出願人：国立大学法人京都大学、他 1 社。出願日：平成 22 年 9 月 30 日、特願 2010-221873

発明の名称：「抗癌剤の副作用を軽減させる薬剤・方法」、河合裕子、垣塚彰、堀清次、他 2 名。国立大学法人京都大学、他 1 社 出願日：平成 23 年 4 月 28 日 特願 2011-102330

発明の名称：「ナフタレン誘導体」 発明者：垣塚彰、堀清次、他 2 名。出願

人：国立大学法人京都大学、他 1 社。出願日：平成 23 年 7 月 28 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/067320)

発明の名称：「アルツハイマー病予防薬のスクリーニング法と同定物」、垣塚彰、笹岡紀男、兼森祥子、坂本めぐみ 竹本佳司、塚野千尋。出願人：国立大学法人京都大学 出願日：平成 23 年 9 月 1 日 特願 2011-19043

発明の名称：「眼疾患処置薬」、発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、吉村長久、中野紀子、他 2 名。出願人：国立大学法人京都大学、他 1 社。出願日：平成 23 年 9 月 30 日、PCT 出願 (PCT/JP2011/ 073160)

発明の名称：「加齢黄斑変性予防・治療薬」、発明者：垣塚彰、堀清次、池田華子、村岡勇貴、吉村長久。出願人：国立大学法人京都大学。出願日：出願日：平成 23 年 2 月 20 日、特願 2013-221873.

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamoto A, Koike M, Yasuda K, <u>Kakizuka A.</u>	Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress.	Biochem Biophys Res Commun	394	42-47	2010
Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, <u>Kakizuka A.</u>	Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression.	J Biol Chem	285	21736-21749	2010
Manno A, Noguchi M, Fukushi J, Motohashi Y, <u>Kakizuka A.</u>	Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins (VCPs) that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD).	Genes Cells	15	911-922	2010
Muguruma K, Nishiyama A, Ono Y, Miyawaki H, Mizuhara E, Hori S, <u>Kakizuka A.</u> Obata K, Yanagawa Y, Hirano T, Sasai Y.	Ontogeny recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells.	Nat Neurosci	13	1171-1180	2010
Takeshita Y, Fujinaga R, Kokubu K, Islam MN, Jahan MR, Yanai A, <u>Kakizuka A.</u> Shinoda K.	Interaction of ataxin-3 with huntingtin-associated protein 1 through Josephin domain.	Neuroreport	22	232-238	2011
Nakano N, Ohashi-Ikeda H, Hangai M, Muraoka Y, Toda Y, <u>Kakizuka A.</u> Yoshimura N	Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate.	Invest Ophthalmol Vis Sci	52	8754-8762	2011