

厚生労働科学研究委託費（認知症研究開発事業）
委託業務成果報告（総括）

神経エネルギー代謝の改善を指標とした認知症根本治療効果を発揮する生薬エキスの網羅的評価

業務主任者 竹森 洋

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト

プロジェクトリーダー

研究要旨 認知症の原因は様々ではあるが、多くは神経細胞のエネルギー代謝不全に密接に関係しており、ATP産生の最大の場であるミトコンドリアの機能異常を伴う。また、神経細胞内でのエネルギー代謝に加え、アストロサイトによる神経伝達物質の回収及び神経細胞への再分配や、乳酸等の供給も記憶構築に重要であると示唆されており、神経細胞外からのエネルギー源等の供給制御方法の確立が、認知症治療の新戦略になるとされている。本研究は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目し、内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系とヒトiPS細胞由来アストロサイトを用いて、漢方生薬エキスを網羅的にスクリーニングし、神経細胞内エネルギー代謝異常を改善する生薬及びその成分を同定し、老化（認知症）モデルマウス等を利用した記憶能力を評価する。

業務主任者

竹森 洋・ 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

担当責任者

古江 美保・ 独立行政法人医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
研究リーダー

淵野 裕之・ 独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター 栽培研究室 室長
佐々木 勉・ 大阪大学大学院医学系研究科
神経内科学 講師

田端 俊英・ 富山大学大学院理工学研究部
神経情報工学研究室 准教授

上里 新一・ 関西大学化学生命工学部
生命・生物工学科 医薬品工学研究室 教授

A. 研究目的

高齢化社会において、認知症は未だ根本治療薬が存在しない深刻な疾病であり、神経変性及び神経シグナル伝達不全を伴う。神経シグナル伝達の不全・過剰は、ともに神経障害作用を惹起する

ことから、認知症治療薬には神経保護作用を示すこと及び正常な神経伝達シグナルは維持することが求められる。一方で、認知症の原因は様々であることから、認知症病態における多様な型の共通現象（病態発症機構）を標的とした治療薬が有効であると考えられる。

本研究では、認知症病態の共通現象である神経細胞-支持細胞（アストロサイト）間のエネルギー交換能低下による神経興奮毒性制御不全に着目し、認知症治療薬に必要な条件の双方を評価するスクリーニング系を構築し（業務主任者・担当責任者：竹森）漢方生薬エキ斯拉イブラリー（担当責任者：淵野）を網羅的に評価することで、認知症根本治療効果を発揮する生薬及びその成分を同定することを目標とする。なお、評価に用いる高品質細胞供給源として、ヒトiPS細胞由来アストロサイトを利用する（担当責任者：古江）。また、同定する生薬及びその成分のマウスの記憶能力に対する効果を検証する（担当責任者：佐々木・田端）。さらに、将来、製薬企業へ創薬シーズとして高機能化生薬成分を導出するために、生薬成分の有機修飾も行う（担当責任者：上里・竹森・淵野）。

また、本研究のスクリーニングの特徴は、これまでの漢方抽出法では含有率が低かった脂溶性成分を含めた広範囲の極性化合物を含む漢方生薬エキスをスクリーニングすることにある。本研究成果の波及効果としては、同定される生薬成分の有機修飾による新薬創製も期待される。本研究は、神経細胞のエネルギー代謝を改善させる新たな創薬手法を開拓し、治療法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

神経エネルギー代謝評価には、細胞外酸素消費計 Flax analyzer (Seahorse 社) を利用してミトコンドリアでの酸素消費を指標とした。その他、ATP はルシフェラーゼ測定システム、NADH は細胞毒性 Kit を活用して、細胞質とミトコンドリア内を分けて測定した。

神経細胞は、ヒトは iPS 由来、マウスは初代培養細胞及び癌化細胞（ヒト神経芽細胞腫由来株 SK-N-SH 及びマウス Neuro2a）を利用した。神経培養培地及び B27 Supplement は、Miltenyi 社から入手した。

神経薬理薬、ピルビン酸オキシダーゼ・乳酸オキシダーゼは和光純薬から入手した。

（倫理面への配慮）

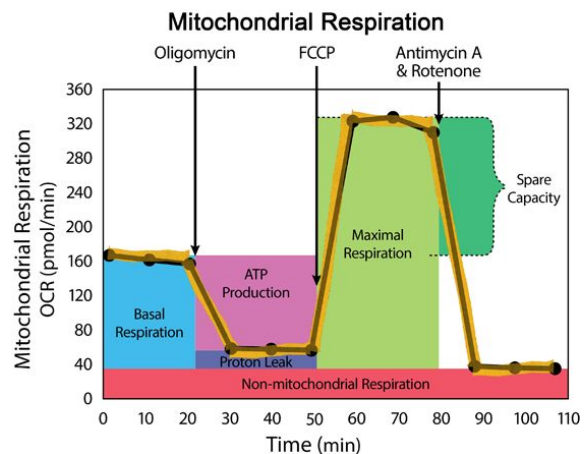
本研究はマウス及びヒト iPS 細胞由来材料を利用する。マウス実験は医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもとガイドラインに沿い、研修のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し研究を行っている。また、ヒト iPS 細胞の取り扱いも、医薬基盤研究所の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

まずは、神経細胞とアストロサイトの細胞内エネルギー利用度と、神経伝達物質との関係を解明することにした。細胞としては、初代マウス神経細胞、神経芽腫、初代マウスアストロサイト、アストロサイトマの4種を利用することで、機能的な神経細胞とアストロサイトの特有な現象を導

きだすことにした。細胞内エネルギー利用度はミトコンドリアでの酸素消費量（OCR: oxygen consumption rate）を目安とすることにした。

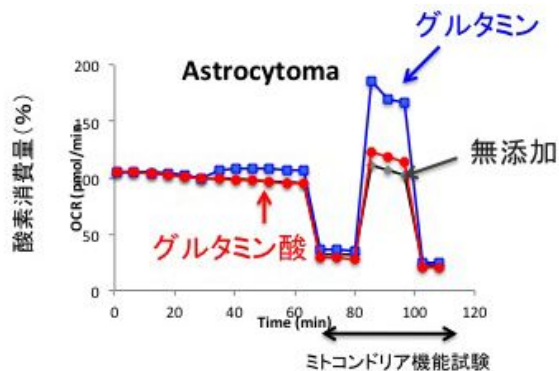
下に細胞の酸素消費量がミトコンドリアの電子伝達系に依存していることを確認するための試験（ミトコンドリア機能試験/ストレス試験）の原理を、試薬メーカーの Home Page から引用して説明する。



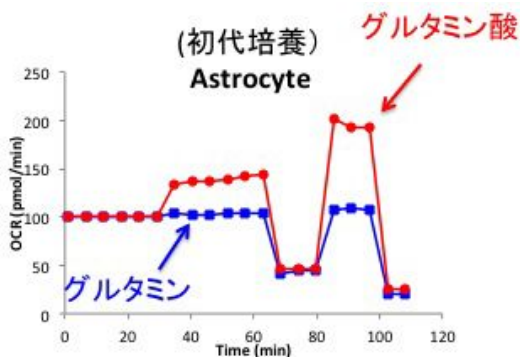
ミトコンドリアでの ATP 産生は、エネルギー代謝で合成された NADH や FADH が酸化される際に、 H^+ をミトコンドリア内膜に貯留しておく。溜められた H^+ は最終的にミトコンドリア内に戻り H_2O に変換され酸素 (O_2) 消費に繋がる。 H^+ がミトコンドリア内膜から内部へ移動するエネルギーが ATP 合成に利用される。oligomycin は H^+ がミトコンドリア内膜から内部への移動を阻害することで、 H^+ のミトコンドリア内膜貯留を高める（このとき酸素消費は抑制されている）。次に、脱共役剤 (FCCP) でミトコンドリア内膜に穴を開けた様な状態にすると、ATP 合成非依存的（脱共役）に H^+ が内部へ移動し酸素が一気に消費される。この状態を最大酸素消費量と定義し、ミトコンドリア最大機能と解釈する。最後に、NADH や FADH の変換や電子伝達経路上流を阻害し (rotenone・antimycin) 脱共役時の酸素消費が電子伝達経路（ミトコンドリア）に依存していることを確認する。

以上の操作で観察している酸素消費量の数値がミトコンドリアのエネルギー代謝量であることを確認でき、以後の実験及び考察に役立てる。ちなみに、メーカーが定義する、予備呼吸量 (spare

capacity) は架空の概念であり、この数値は細胞ごとに異なる (特に神経系の細胞) ため、評価ごとに解釈を議論する必要があった。

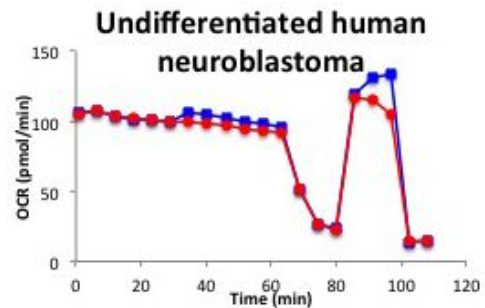


アストロサイトーマは肝臓の細胞に似ており、グルタミンの添加で酸素消費量が増えた。一方、初代アストロサイトでは、グルタミン酸が酸素消費を増加させる栄養因子であった。これは、アミノ酸の取り込み効率に依存すると予想される。

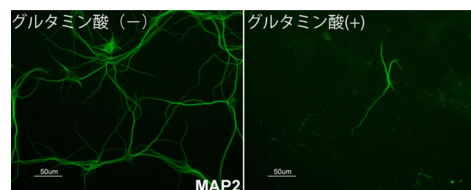
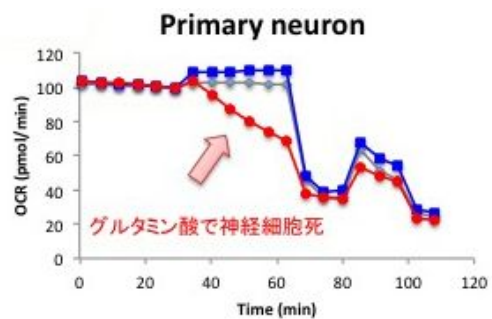


元々、アストロサイトはシナプス間での余分な神経伝達物質であるグルタミン酸の回収 (クリアランス) において重要な役割を担っており、アストロサイト欠乏のシナプスは、グルタミン酸毒性に感受性が高いことと一致する。また、神経毒性を惹起するグルタミン酸トランスポーター阻害剤 (Way 213613) の存在下では、今回のグルタミン酸依存的酸素消費量の亢進が観察されないことから、酸素消費量はアストロサイトでのグルタミン酸の回収能力の評価に役立つ簡便な指標の一つであると結論した。

次に、神経芽腫と初代神経細胞を比較した。神経芽腫細胞は、アストロサイトーマと同様にグルタミン依存的に酸素消費が増加した。しかし、その増加は僅かであった。



初代神経細胞は、グルタミンで僅かながら酸素消費が亢進するが、グルタミン酸では低下した。細胞染色で確認したところ、グルタミン酸処理で細胞が死んでおり、酸素消費低下は神経細胞死によるものであった。



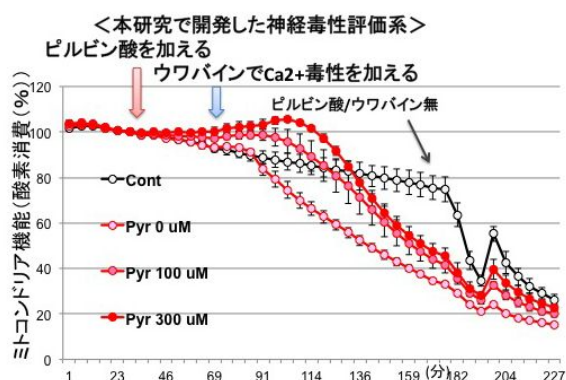
これらのことから、酸素消費量は、培養集団中の神経細胞の種類を見分けることができ、グルタミン酸毒性も経時的に評価できる点で、神経毒性評価に利用可能な一つの手法と結論した。本原理を利用すれば、ヒト iPS 細胞から神経を分化させる際に、どの程度均一な細胞集団かを事前に予測することも簡便になる (詳しくは古江の項目)。

続いて、酸素消費計を利用して、神経ミトコンドリア活性における栄養素の重要性と神経毒性との相関を検討することにした。その結果、ピルピ

ン酸が神経ミトコンドリア活性を上昇させることが明らかとなった。古くから、神経細胞へのエネルギー供給は乳酸が重要と考えられてきた。この説は、アストロサイトに蓄積されているグリコゲンが、ピルビン酸まで分解され、乳酸脱水素酵素で乳酸へと変換され神経細胞へ渡されるという説で、アストロサイト-神経-乳酸シャトル説として定着している。しかし、神経への物質輸送に関わる乳酸トランスポーターとピルビン酸トランスポーターは同一の物であり、また、一般的に細胞から分泌される乳酸：ピルビン酸比率は 10 : 1 と、ピルビン酸が圧倒的に低いため、実際に乳酸とピルビン酸のどちらが神経細胞のエネルギー源として重要かは測定できない。そこで、酸素消費量で予測すると、乳酸には神経のエネルギー代謝を改善させる作用は無かった。

次に、ピルビン酸が神経保護作用を発揮できるか否かを検討した。神経細胞は神経活動に伴ってイオンが流入し脱分極を起こす。脱分極が持続すると、Ca²⁺イオンの流入が増加し、Ca²⁺毒性によりミトコンドリア機能が破壊される。これが、神経活動に伴う興奮毒性の発生機序の一つである。神経細胞の流入イオンをくみ出すポンプとして、Na⁺/K⁺ATPase が存在し、神経細胞で生産される 70% の ATP が、Na⁺/K⁺ATPase により消費されている。すなわち、神経エネルギー代謝（ミトコンドリアを含む）が低下して ATP 産生能が低下すると、Na⁺/K⁺ATPase 活性の低下による Ca²⁺毒性がさらにミトコンドリアを破壊し、最終的に神経障害を惹起する。このカスケードを擬似化するために、Na⁺/K⁺ATPase 阻害剤で強心配糖体であるウワバインを利用してミトコンドリア障害回避実験を行った。

その結果、ピルビン酸 (Pyr) は濃度依存的にウワバイン毒性を低下させ、神経細胞死までの時間を倍に延長できることが示唆された。同様な神経保護作用は、グルタミン酸毒性でも観察され、Ca²⁺毒性発現に必要なグルタミン酸濃度を 10 倍以上上昇させる作用があった。



さらに、本測定系は、神経伝達に重要なシグナルの成熟度も予想可能であることが示唆された。例えば、Grid2 (グルタミン酸トランスポーター delta2) 欠損である (詳しくは田端の項目)、Grid2 を欠損させることが神経保護的に作用するかの結果を得たが、これは、NMDA-R 機能低下による Ca²⁺毒性抑制作用であった。同様な現象は、認知症関連病態治療薬メマンチンでも再現できた。一方、メマンチン存在下で神経を培養すると、正常なシナプス形成が阻害された。すなわち、メマンチンは、本研究計画の正常な神経シグナル伝達を阻害しないという前提にそぐわない薬と予想され、Grid2 機能阻害の方向性も同様に目的にはそぐわないと予想される。事実、Grid2 欠損マウスの運動記憶は殆ど構築されず、メマンチンも同様であった (詳しくは、田端の項目)。

また、塩誘導性キナーゼ SIK の欠損マウス (詳しくは佐々木の項目) も、神経シグナル伝達機能の攪乱で神経毒性への耐性変化が起こっている結果を得ている。ピルビン酸代謝が関わっているかは現在検討中である。

これらの結果から以下の作業仮説を立てた。

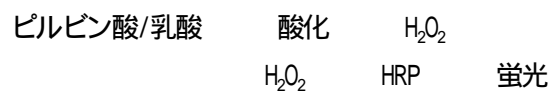
(仮説)

アストロサイトからのピルビン酸供給を高めれば、新たな神経保護効果を発揮し、認知症 (神経老化) に役立つ薬を創製できるのではないかと。

本仮説を証明するために、まずは、アストロサイトからのピルビン酸/乳酸測定系を構築し、それ

を HTS (ハイスルットスクリーニング) 対応にしていく必要がある。また、測定系から可能な限り擬陽性を外す工夫も必要である。そこで、ピルビン酸/乳酸測定を可能な限り同一系で測定できるように調整した。

ピルビン酸と乳酸測定に、ピルビン酸酸化酵素と乳酸酸化酵素を利用して、 H_2O_2 を発生させた。次に H_2O_2 を HRP (パーオキシダゼ) で H_2O で O_2 に変換させる際に、非蛍光物質アセチルレゾルフィン を HRP 反応で蛍光物質レゾルフィンへ変換させ、変換後の蛍光で元のピルビン酸と乳酸の量とした。

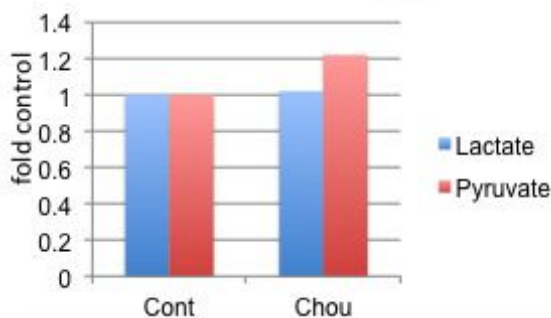


この系は最初の酸化酵素に費用がかかるものの、培地中のピルビン酸と乳酸を nM レベルで測定できる高感度測定系である。また、 H_2O_2 以降の反応系が同一であるた、被験薬に蛍光物質が含まれていてもその作用が補正されるため、擬陽性が僅かである点が優れている。

まずは、模擬スクリーニングして、認知症に効果があるとされる生薬のアルコール抽出物を試験した。

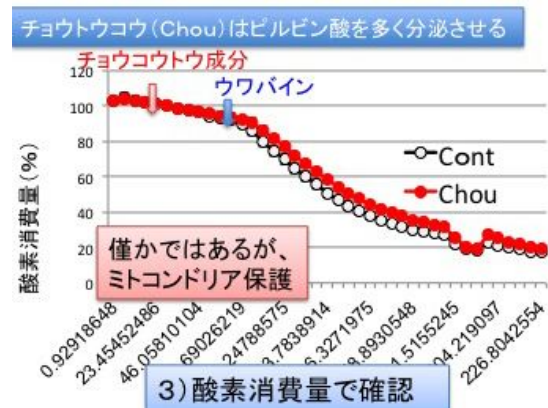
1) チョウトウコウの熱水抽出エキス

アストロサイトのピルビン酸分泌



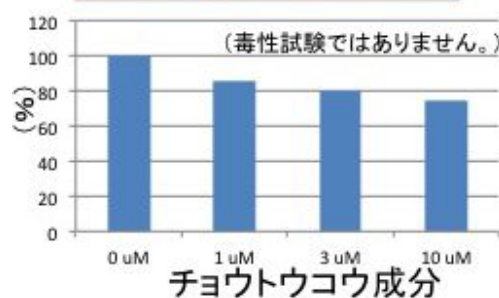
その結果、チョウトウコウ (Chou) のエキスにアストロサイトからのピルビン酸分泌促進作用があることが示唆された。次に、医薬基盤研究所の薬用植物資源研究センターの別ロットを、ATP 量を元にした神経毒性評価から、どのロットに目的

成分が多く含まれるかを予測した (詳しくは測野の項目)。測野による多項解析結果から、成分が同定でき、その成分にはミトコンドリア機能亢進活性が検出できた。



ATP と同時に、細胞毒性試験に利用される NADH を測定してみると、本成分には NADH 量を高める活性が存在していたが、その活性は毒性負荷を行わないコントロール細胞よりも高かった。乳酸脱水素酵素 LDH がピルビン酸を乳酸に変換する際に NADH を NAD に変換することから、チョウトウコウ成分は、LDH 阻害剤である可能性が示唆された。そこで、LDH 活性を測定したところ、やはり、チョウトウコウ成分は LDH 活性を 30% ほど抑制した。

4) 精製成分による LDH 阻害

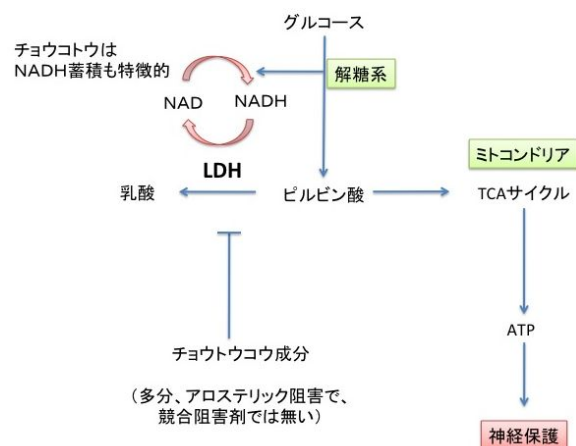


一般的に、LDH 阻害は神経障害を惹起すると考えられるが、これは、LDH 完全欠損患者でのことで、LDH の 30% 活性阻害は、ピルビン酸供給量を高める手段としては有用かもしれない。今後の解析が期待される。

その他、ピルビン酸の認知症への有用性を老化促進・脳萎縮モデルマウス SAMP10 で検証中である。

評価に1年かかるため、平成27年6月頃に結果が出る予定である。また、スクリーニングは平成27年2月時点で2000点のエキスが終了し、チョウトウエキスを超えてピルビン酸分泌を促進するエキスを20点ほど同定した。平成27年6月には、数点に絞りこみ、マウスを活用した評価に移る予定である。また、解糖系を促進する作用として、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害があげられ、複数の候補低分子を合成した(詳しくは上里の項目)。一方で、乳酸がHDAC阻害活性を有しており、ピルビン酸/乳酸比率変動に、ヒストンアセチル化を利用するとよいことも示唆された。

D. 考察



チョウトウエキス成分から予想される新たな神経保護戦略を図示した。これまで、神経チャンネルに作用する化合物やbeta-アミロイド蓄積阻害に作用する化合物/抗体などが認知症に有効と考えられたが、本研究から神経細胞のエネルギー代謝を改善させることも重要な戦略であると示唆された。今後、多くの候補をスクリーニングし、認知症の根本治療に役立つ戦略を構築したい。

E. 結論

神経細胞のエネルギー代謝を改善し、神経毒性耐性を獲得させるためにピルビン酸が重要な役割を担っていることが示唆された。ピルビン酸の高感度測定計を樹立し、生薬エキスライブラリーのスクリーニングを開始した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 参考文献

- 1) Fukuchi M, Tabuchi A, Kuwana Y, Watanabe S, Inoue M, Takasaki I, Izumi H, Tanaka A, Inoue R, Mori H, Komatsu H, Takemori H, Okuno H, Bito H, Tsuda M. Neuromodulatory effect of Gs- or Gq-coupled GPCR on NMDAR selectively activates the NMDAR/Ca²⁺/calcineurin/CREB-regulated transcriptional coactivator 1 (CRTC1) pathway to effectively induce Bdnf expression in neurons. *J Neurosci* (2015) in press.
- 2) Lee J, Tong T, Takemori H, Jefcoate C. Stimulation of StAR expression by cAMP is controlled by inhibition of highly inducible SIK1 via CRTC2, a co-activator of CREB. *Mol Cell Endocrinol.* (2015) in press.
- 3) Popov S*, Takemori H*, Tokudome T, Mao Y, Otani K, Mochizuki N, Pires N, Pinho MJ, Franco-Cereceda A, Torielli L, Ferrandi M, Hamsten A, Eriksson P, Bertorello AM, Brion L. (* equally contributed) Lack of SIK2 prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake *PLoS ONE* (2014) 9e95771
- 4) Sontag JM, Sontag E, Tesone-Coelho C, Takemori H, Zwiller J, Dierrich JB. Cocaine Regulates the Salt-Inducible Kinase (SIK1) by Inducing Protein Phosphatase-2A Expression in Rat Brain. *J Drug Alcohol Res* (2014) 3: ID 235854.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice. *Immunology* (2015) in press
- 2) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes* (2014) 5: 1095-1114.
- 3) 熊谷彩子, 竹森 洋. 薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用 薬用植物・生薬の開発と今後の展望 ~資源確保, 品質評価, 製品開発

シーエムシー出版 川原信夫編集 (2014)
pp114-120

2. 学会発表

1) 佐野坂 真人、伊東 裕美、藤本 穰、大河原
知治、仲 哲治、竹森 洋

塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリー欠損マウスの
LPS 感受性に関する研究

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

2) 黒井 梓、伊東祐美、淵野裕之、山原 年、
川原信夫、竹森 洋

ワラビ成分 Pterosin B の皮膚炎症疾患への応用

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

3) 賀川 舞、杉村康司、飯田 修、淵野裕之、黒
井 梓、熊谷彩子、山原 年、川原信夫、竹森 洋
メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的
解析

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

4) 熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤
一郎、佐々木 勉、田端 俊英、竹森 洋

GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい
調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

5) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、淵野裕之、
川原信夫、竹森 洋

肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3
の重要性について

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

I. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 特願 2014-234698 「メラニン生成抑制剤、化粧
料、医薬組成物、及びメラニン生成抑制剤の製造
方法」 竹森 洋、熊谷彩子、賀川舞、伊東祐美、

川原信夫、淵野裕之、杉村康司、黒井梓 (独立
行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館)
国内

2) 特願 2014-130876 「プテロシン誘導体を含む軟
骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」妻木
範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫 (国立大
学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所)
(国内優先権主張)、米国

3. 実用新案

該当せず

4. その他