慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	新たな作用点をもつ認知症治療薬の開発
Sub Title	Development of novel drugs for improving cognitive impairment
Author	三澤, 日出巳(Misawa, Hidemi) 奥田, 隆志(Okuda, Takashi)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	様々な病態や老化に伴う認知障害に広く有効な薬物を開発する目的で、新規作用点をもつ薬物の探索を行った。高親和性コリントランスポーター(CHT)はアセチルコリン合成の律速段階を担い、その活性は細胞内のトラフィッキングにより制御されている。CHTのトラフィッキングをモニターするアッセイ系を確立して1000種以上の化合物をスクリーニングすることで、CHT作用薬のシード化合物を得た。また、アルファー7型ニコチン性アセチルコリン受容体の内在性リガンドSLURP1の神経系での発現部位を同定した。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2008～2010 課題番号：20500340 研究分野：神経薬理学 科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20500340seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年　６月　６日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：2008～2010
課題番号：２０５００３４０
研究課題名（和文）　新たな作用点をもつ認知症治療薬の開発

研究課題名（英文）　Development of novel drugs for improving cognitive impairment

研究代表者
三澤　日出巳　（MISAWA HIDEMI）
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：８０２１９６１７

研究成果の概要(和文)：様々な病態や老化に伴う認知障害に広く有効な薬物を開発する目的で、新規作用点をもつ薬物の探索を行った。高親和性コリントランスポーター(CHT) はアセチルコリン合成の律速段階を担い、その活性は細胞内のトラフィッキングにより制御されている。CHT のトラフィッキングをモニターするアッセイ系を確立して 1000 種以上の化合物をスクリーニングすることで、CHT 作用薬のシード化合物を得た。また、アルファー７型ニコチン性アセチルコリン受容体の内在性リガンド SLURP1 の神経系での発現部位を同定した。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a novel drug intervention for improving disease-related or age-related cognitive impairment, we focused our research on two potential drug targets; high-affinity choline transporter 1 (CHT1) & alpha7-type nicotinic acetylcholine receptor (α7 nAChR). We established an assay system to monitor CHT1 trafficking in cultured cells and screened >1,000 chemicals, and eventually obtained a few seed chemicals that affected CHT1 trafficking. And besides we demonstrated, for the first time, neuronal localization of SLURP1, a putative endogenous allosteric ligand for α7 nAChR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００８年度	1,500,000	450,000	1,950,000
２００９年度	1,000,000	300,000	1,300,000
２０１０年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経薬理学
科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学
キーワード：神経創薬、認知症、トランスポーター、ニコチン受容体

１．研究開始当初の背景

アルツハイマー病、脳血管障害やレビー小体病など認知症をきたす疾患は多彩であるが、多くの場合に認知障害とコリン作動性神経の機能障害が密接に関連する。本研究ではアセチルコリン(ACh)合成の律速段階を担う高親和性コリントランスポーター(CHT)と、認知機能の増強や神経保護などの作用が期待される alpha7 ニコチン性 ACh 受容体(α7 nAChR)をターゲットとする新たな認知症治療薬開発を目標とした基礎的研究を行う。

２．研究の目的

(1) 認知症をきたす疾患は多彩であるが、多くの場合でコリン作動性神経の機能障害と認知症状が強く相関しており、認知症の

etiology と考えられている。アルツハイマー病(AD)患者脳では、前脳基底部から大脳皮質や海馬などの広範な領域に投射するコリン作動性神経の脱落が認められ、またアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤ドネペジルなどが主要な AD 治療薬として使用されている。高齢化社会の到来に伴い AD ばかりでなく、脳血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭型認知症などの発病頻度も上昇している。また最近、軽度認知障害(Mild Cognitive Impairment; MCI)という概念が提唱され、異常な神経細胞の変性・脱落がおこる以前にシナプス機能の障害・低下が先行した状態が存在することが示されている。脳は正常な老化過程においても、ある程度の記憶力の低下（いわゆる老人ぼけ）は避けられないが、これが AD などの神経変性疾患と同じ機構により進行するのか否かは明らかではない。認知症をもたらす疾患は多岐に渡り、なおかつ生理的老化過程においてもコリン作動性神経の機能不全が見られることから、AChE 阻害剤とは作用点の異なる新たなコリン作動性神経の賦活薬を開発することは、高齢者の QOL の観点からも社会的・医学的に重要な課題であると考えられる。

高親和性コリントランスポーター(high-affinity choline transporter; CHT)は脳内での ACh 合成の律速段階を担い、神経活動に連動してその活性がダイナミックに制御されている。我々および海外のグループの最近の研究により、大部分の CHT が定常状態においてシナプス小胞に局在し、神経活動によるシナプス小胞とシナプス前膜の融合・開口放出に伴い、シナプス前膜にトランスロケーションして機能を発揮することが報告されている(Nakata et al., *Synapse* 53, 53-56, 2004; Ferguson et al., *J Neurosci*, 23, 9697-9709, 2003)。従って、CHT または未知の制御蛋白質に結合して、CHT のシナプス前膜での繋留・滞在時間(retention time)を延長する薬物を開発することができれば、新たなコリン作動性神経賦活薬として有望であると考えられる。

(2)一方で、脳の認知機能への関与が知られているα7 nAChR は創薬ターゲットとして有望視され、世界中の製薬会社でアゴニストの探索が行われている。SLURP1 は遺伝性皮膚疾患である Mal de Meleda(メレダ病)の原因遺伝子として発見されたヘビ毒αブンガロトキシンと相同性をもつ新規蛋白質である(Fischer et al., *Hum Mol Genet*, 10, 875-880, 2001)。メレダ病は、手足の皮膚の異常増殖とマクロファージを介する炎症反応を主徴とする掌蹠角化症であるが、精神遅滞を併発することが知られている。SLURP1 の作用機序については不明な点が多いが、α7 nAChR のアロステリックリガンドとして機能することが報告されている(Chimenti et al., *Hum Mol Genet*, 12, 3017-3024, 2003)。メレダ病との関連から、皮膚や免疫系細胞での SLURP1 の機能についての報告は散見されるものの、脳での働きを解析した研究は皆無である。SLURP1 の脳での作用メカニズムを解明することは、SLURP1 の作用を模した低分子化合物を開発するためにも不可避の課題であり、新たなコリン作動性神経賦活薬のリードに繋がる可能性が高いと考えられる。

３．研究の方法

(1)リガンド依存性 CHT 細胞内移行

我々は、CHT の細胞内移行がリガンド依存性であり、CHT とアダプタータンパク質との相互作用がリガンド結合により制御されることを見出している。 [^{3}H]HC-3 を用いたリガンド結合実験、および細胞表面選択的なタンパクビオチン化・脱ビオチン化を用いたウエスタンブロットにより CHT 細胞内移行および形質膜移行の詳細な反応速度論的解析を行う。

(2) CHT -アダプター蛋白質相互作用

CHT の細胞内移行に必須な細胞内領域の同定を行い、新たな CHT トラフィッキング制御タンパク質の同定に向けた足がかりを築く。CHT 変異体を作製し、AP-3/AP-4 および AP-2 結合領域の同定を行う。

(3)CHT トラフィッキングを制御する化合物のスクリーニング

すでに CHT を高度に発現する培養細胞系（HEK293-CHT, PC12D-CHT）を樹立して、リガンド依存性トラフィッキングが起こることを確認している。 [^{3}H]HC-3 結合活性および[^{3}H]choline 取り込み活性の２つを指標として、各種化合物のスクリーニングを行う。

(4)SLURP の脳内分布の免疫電顕

我々は、すでに SLURP1 の特異抗体を作製し、光顕レベルでの免疫組織化学により脳内分布を解析した。次の段階として、さらに微細な細胞下コンパートメントでの局在を検討するため、免疫電顕により解析を行う。

(5)SLURP1 とα7 nAChR との結合様式に関する生化学

SLURP1 がα7 nAChR と同一の神経細胞

で合成された場合、細胞内でα7 nAChR サブユニットの翻訳・立体構造形成・サブユニット会合が行われる過程で、SLURP1 が補助サブユニット(auxiliary subunit)として機能する可能性があるため、免疫沈降法により SLURP1 とα7 nAChR との結合様式を解析する。

(6)組み換え SLURP1 の精製と活性評価系の確立

SLURP1 の生理作用を解明するためには、生物活性を保持した精製 SLURP1 蛋白質が必要である。SLURP1 は分泌型蛋白質であるとともに、10 個のシステイン残基の分子内ジスルフィド結合が活性発現に重要であることが報告されている。そこで、哺乳動物由来の細胞を使った強制発現系を試みる。機能的なα7 nAChR を培養細胞で強制発現させることは困難が伴い、現在までに数種類の神経系 cell line でしか成功例は報告されていない。我々は、成功例のある PC12 細胞でのモデル細胞樹立を目指す。

４．研究成果

(1)輸送基質によって誘導される高親和性コリントランスポーターの細胞内移行の解析

CHT の輸送基質であるコリン、あるいは競合的阻害剤であるヘミコリニウム-3 (HC-3)でラット海馬シナプトソームを 30 分間処理した後に、特異的[^{3}H]コリン取り込みを測定した。10 μM コリンの前処理で[^{3}H]コリン取り込みはわずかに減少し、1 μM HC-3 の前処理により約 1.5 倍に増加することを見出した。特異的[^{3}H]HC-3 結合量も同様の増減を示した。リガンド前処理によるこれらの効果は線条体由来のシナプトソームにおいても同様に観察された。次に株化細胞発現系で検討を行ったところ、CHT を遺伝子導入した PC12 細胞における[^{3}H]HC-3 結合は 20 μM コリンの前処理により約 30%減少し、1 μM HC-3 により約 1.5 倍に増加した。HEK293、COS-7、HeLa など他の細胞系でも同様であった。そこで HEK293 細胞をモデル系として CHT 安定的発現株を樹立し、リガンド前処理による細胞表面 CHT 量の制御機構を詳細に解析した。細胞を 20 μM コリンで前処理すると[^{3}H]HC-3 結合活性は 30-50%に減少し、1 μM HC-3 前処理では約 2-4 倍に増加した。[^{3}H]コリン取り込み活性についても同様の増減が観察された。リガンド前処理の効果は Na^+依存的であり、それらの EC_{50} 値は CHT のリガンドに対する K_m、K_d 値と同程度であったことから、リガンドが CHT に直接作用することにより HC-3 結合・コリン取り込み活性を制御することが示唆された。293-FLAG-hCHT 細胞 (FLAG タグ付加 CHT cDNA を恒常発現する HEK293 細胞)を用いた細胞表面選択的抗体染色や、親水性ビオチン化試薬を用いた細胞表面タンパクの精製・解析により、リガンド前処理後の細胞表面 CHT 量を評価したところ、リガンドによる同様の効果が観察された。また、可逆的な細胞表面ビオチン化を利用してエンドサイトーシス速度の解析を行ったところ、CHT 細胞内移行はコリン存在下で有意に促進され、逆に HC-3 存在下で有意に抑制された。

以上の結果から、細胞外のリガンドは CHT の細胞内移行速度を制御することにより細胞表面 CHT 量を規定すると考えられる。クラスリン関連タンパクに対する RNAi や薬理学的解析の結果、少なくとも、株化細胞発現系においてコリンで誘導される CHT の細胞内移行は、主としてクラスリン非依存性・ダイナミン依存性のエンドサイトーシス経路を介するとことが示唆された。

一方、株化細胞発現系と異なり、シナプトソームにおける[^{3}H]コリン取り込みや[^{3}H]HC-3 結合はコリンの前処理による顕著な効果は観察されなかった。そこで高カリウムの脱分極刺激により[^{3}H]コリン取り込みを約 1.5 倍に一過性に上昇させたシナプトソームを用いて定常状態への回復速度を検討したところ、10 μM コリン存在下では[^{3}H]コリン取り込み低下が有意に速まることを見出した（$t_{1/2}$: 3.5 min vs. 7 min for control)。脱分極刺激条件下でのシナプトソームにおいては株化細胞発現系と同様に CHT の細胞内移行が基質存在下で促進されると考えられる。

(2)高親和性コリントランスポーターの新規リガンドの同定

我々は、上記のリガンド依存的細胞内移行という CHT の新たな機能特性を利用して、細胞表面発現量変化を指標とした CHT リガンド評価系を構築した。この系を用いて探索を行い以下の結果を得た。

親水性リガンドである[^{3}H]HC-3 を用いたインタクト細胞でのリガンド結合実験により CHT 細胞表面発現量を評価した。293-hCHT 細胞における[^{3}H]HC-3 結合活性の増大作用を指標にして約 1,000 種類の化合物ライブラリーを一種類ずつスクリーニングした結果、最も強力な作用をもつ化合物として morantel を見出した。morantel は濃度･処理時間依存的に hCHT 細胞表面発現量を約 2 倍に増大させた（EC_{50}: ~2 μM）。親水性ビオチン化試薬を用いた細胞表面タンパクのウエスタンブロット、あるいは細胞表面選択的な抗体染色においても同様に細胞表面発現量の増加が確認された。CHT の機能について解析したところ、morantel は濃度依存的に高親和性[^{3}H]コリン取り込み活性を阻害した

（K_i: 3 μM）。morantel 存在下（5 μM）における高親和性[^{3}H]コリン取り込み活性の反応速度論解析では CHT のコリンに対する K_m 値は 2 倍に増大したが V_{max} 値は変化せず、阻害様式は競合的であると考えられた。また、morantel は 293-hCHT 細胞膜画分における[^{3}H]HC-3 結合活性も競合的に阻害した（K_i: 4 μM）。morantel アナログである pyrantel と oxantel についても解析を行ったところ、高親和性コリン取り込み活性や HC-3 結合活性を競合的に阻害し、morantel > pyrantel > oxantel の順に、より低濃度で作用した。同じ標的を持ちながらも異なる骨格をもつ levamisole ではこのような阻害作用は観察されなかった。これらの化合物は古くから駆虫薬として知られ、寄生線虫の神経筋でニコチン性アセチルコリン受容体を脱分極的に遮断して痙攣性麻痺を引き起こす。線虫 *C. elegans* の CHT オーソログ（CHO-1）についても解析したところ、morantel は CHO-1 恒常的高発現細胞株における高親和性コリン取り込み活性を競合的に阻害した（K_i: 1 μM）。さらに、ラット脳シナプトソーム画分における内在性 CHT への作用を調べたところ、morantelは競合的かつ特異的に高親和性[^{3}H]コリン取り込み活性を阻害し、その結果として[^{3}H]アセチルコリン合成も阻害した。

以上より我々は、新規の CHT リガンドとしてテトラヒドロピリミジン（THP）系薬（morantel、pyrantel、oxantel）を同定した。THP 系薬は競合的にコリン取り込みを阻害することから、CHT の基質結合部位と相互作用すると予想される。既知の CHT リガンドはコリンや HC-3、それらのアナログなどの四級アンモニウム化合物のみであったが、THP 系薬は三級アミンである。これらは生理的 pH で正電荷を持つことから、リガンド間で共通する N^+の正電荷が CHT との相互作用に重要であると考えられる。培養細胞系や脳シナプトソーム画分における機能解析の結果から、THP 系薬は線虫から哺乳類に至るまで普遍的に高親和性コリントランスポーターを強力かつ競合的に阻害すると考えられる。線虫の運動機能における高親和性コリン取り込み系の生理的重要性が既によく知られていることから、THP 系薬はニコチン性アセチルコリン受容体脱分極性遮断作用のみでなく、従来想定されていなかったアセチルコリン合成抑制という新たな作用を含めた二重の機序により駆虫作用を示す可能性が推測される。また、新たな CHT 作用薬のリードとしても有望であると考えられる。

(3) SLURP1の局在および生理作用の解析

マウス SLURP1 のアミノ酸配列 77-89 に相当する 13 残基のペプチド(CLATDPDGIGVAH)をハプテン（KLH）に結合させ、家兎に免疫することで抗血清を得た。さらに抗血清は、上記の抗原ペプチドを用いたカラムクロマトグラフィーで精製して SLURP1 特異抗体を調製した。抗体の特異性は、SLURP1 およびその類縁タンパク質である SLURP2 の発現ベクターを RK13 細胞に導入した細胞から抽出液を調製し、Western blot 法にて検定を行った

ラットおよびマウス組織での発現部位の検討を行ったところ、SLURP1 の発現は神経系では広範な領域で認められたが、特に脊髄後角の膠様質で強い発現が観察された。この部位は一次知覚神経の入力部位であるが、SLURP1 陽性細胞は脊髄後根神経節の Substance P(SP)やカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)含有神経の一部（ペプチド含有の無髄 C 線維）であることが判明した。

ニコチン及びその誘導体には強力な鎮痛作用があることが知られているが、そのメカニズムの詳細は分かっていない。脊髄後角におけるニコチンの作用については、鎮痛または痛覚過敏を起こすとの相反する報告があり、動物の種差や性差および実験モデルによっても結果が異なることが報告されている。現在、鎮痛薬としてはモルヒネに代表されるオピオイド鎮痛薬とNSAIDSなどの抗炎症薬が主流であるが、従来の鎮痛薬では効果不十分な病態も多く、新たな作用点を持つ鎮痛薬の開発が望まれている。我々は、α7nAChRの内在性アロステリックリガンドであるとの報告があるSLURP1が、一次知覚神経で発現していることを見出した。我々はさらに、SLURP1がSPやCGRPなどの神経ペプチドと同一の分泌小胞に含まれるとの電子顕微鏡での知見も得ており、神経ペプチドとともに放出されるSLURP1が侵害刺激伝達の修飾因子として働く可能性が考えられる。

一方で我々は、SLURP1が気管支上皮細胞で発現していることを見出したが、この細胞では同時にACh合成の律速段階となる高親和性コリントランスポーター(CHT)が発現していることを確認している。また、ヒトおよびサルの気管支上皮細胞ではACh合成酵素であるコリンアセチル転移酵素が発現しているという報告がなされている。したがって、気管支上皮細胞はAChとSLURP1を同時に合成・放出していると考えられる。気管支上皮細胞ではさらにα7nAChRが発現しているとの報告もあり、AChおよびSLURP1が自己の分化・増殖を制御して恒常性を維持しているものと考えられる。さらに、気管支では常在性マクロファージが気道の炎症やアレルギーに関与することが知られているが、この時にもACh/SLURP-1がα7nAChRを介してTNF-αなどのサイトカインの産生を制御している可能性がある。以上の研究から、SLURP-1がニコチン作用の内在性修飾因子である可能性が浮かび上がってきた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 11 件）

①． Uchida, S., Hotta, H., Misawa, H. (他１名) Sustained subcutaneous infusion of nicotine enhances cholinergic vasodilation in the cerebral cortex induced by stimulation of the nucleus basalis of Meynert in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 654, 238-240 (2011) 査読有

②． Hideyama, T., Yamashita, T., Suzuki, T., Tsuji, S., Higuchi, M., Seeburg, P.H., Takahashi, R., Misawa, H. and Kwak, S. Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J. Neurosci.*, 30, 11917-11925 (2010) 査読有

③． Haramanti, S., Chapnik, E., Sztainbreg, H., Eilam-Altstadter, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlinn, E., Heiser, P.W., Wills, A-M., Wirguin, I., Rubin, L., Misawa, H., Tabin C.J., Brown Jr. R., Chen, A. and Hornstein, E. miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 13111-13116 (2010)査読有

④． Moriwaki, Y., Watanabe, Y., Shinagawa, T., Kai, M., Miyazawa, M., Okuda, T., Kawashima, K., Yanbashi, A., Waguri, S. and Misawa, H. Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neurosci. Res.*, 64, 403-412 (2009)査読有

⑤． Horiguchi, K., Horiguchi, S., Yamashita, N., Irie, K., Masuda, J., Takano-Ohmuro, H., Himi, T., Miyazawa, M., Moriwaki, Y., Okuda, T., Misawa, H., Ozaki, H. and Kawashima, K. Expression of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allostreric ligand, in murine bronchial epithelial cells. *J. Neurosci. Res.*, 87, 2740-2747 (2009)査読有

⑥． Zhang, L., Schessl, J., Werner, M., Bonnemann, C., Xiong, G., Mojsilovic-Petrovic, J., Zhou, W., Cohen, A., Seeburg, P., Misawa, H., Jayaram, A., Personius, K., Hollmann, M., Sprengel, R. and Kalb, R. Role of GluR1 in activity-dependent motor system development. *J. Neurosci.*, 28, 9953-9968 (2008)査読有

⑦． Misawa, H., Fujigaya, H., Nishimura, T., Moriwaki, Y., Okuda, T., Kawashima, K., Nakata, K., Ruggiero, A.M., Blakely, R.D., Nakatsu, F. and Ohno, H. Aberrant trafficking of the high-affinity choline transporter in AP-3-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.*, 27, 3109-3117 (2008)査読有

⑧． Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., and Cleveland, D.W. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited ALS. *Nature Neurosci.*, 11, 251-253 (2008)査読有

〔学会発表〕（計 23 件）

①． 小西麻未 他 3 名．テトラヒドロピリミジン系薬の新たな中枢作用点の同定．第 83 回日本薬理学会年会．2010 年 3 月 18 日．大阪市

②． 野村有希 他 3 名．テトラヒドロピリミジン系薬の新たな中枢作用点の同定．次世代を担う創薬･医療薬理シンポジウム 2009．2009 年 8 月 24 日．東京

③． 奥田隆志 他 4 名．高親和性コリントランスポーターの細胞内移行．第 82 回日本薬理学会年会．2009 年 3 月 18 日．横浜市

④． 三澤日出巳 他 4 名．ニコチン性アセチルコリン受容体内在性アロステリックリガンド SLURP1 の一次知覚神経での発現．第31回日本神経科学大会.2008年7月 10 日．東京

〔図書〕（計 3 件）

①． 三澤日出巳．クバプロ．ブレインサイエンスレビュー2010;認知症のトライアングル仮説とコリン作動性ニューロン．237-258 (2010)

６．研究組織

(1)研究代表者

三澤　日出巳　(MISAWA HIDEMI)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：80219617

(2)研究分担者

奥田　隆志　(OKUDA TAKASHI)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：00322040

(3)連携研究者

なし