

19. 複合系薬物のための包括的薬理作用解析法の開発

久保山 友晴

Key words : 生薬, 軸索伸長, アルツハイマー病,
アミロイド β , DARTS

富山大学 和漢医薬学総合研究所
神経機能学分野

緒言

和漢薬をはじめとする伝統薬物は、西洋医学で用いられる薬物では治療困難な疾患でも治療可能である例が数多くある。私はこれまでに、根治療法が確立されていないアルツハイマー病や脊髄損傷に着目し、これらを根本的に治療できる可能性のある薬物を伝統薬物中に見出してきた^{1,4)}。しかし伝統薬物は多成分性であるため、薬理作用の包括的解明が困難であり、生薬エキスそのものや漢方方剤の治療薬としての有用性を提示することが難しい。そこで本研究では、伝統薬物が“なぜ効くのか？”を正しく解析するために、複合薬物である伝統薬物の作用点を網羅的に探索し、その薬理活性を包括的かつ分子的に解明する手法を開発することを目的とする。これにより、薬理作用をベースとした各伝統薬物の分子プロファイリングが構築される。メカニズムが明確で効果も優れていれば、生薬製剤や漢方方剤を新たな治療薬として開発することが可能になる。また経験に基づく方法で使用されてきた漢方方剤が、科学的基盤の上に、より効果的に投与されることが可能になる。

本研究では、アルツハイマー病にターゲットを絞る。アルツハイマー病では、脳内でのアミロイド β 沈着が引き金となり、軸索が萎縮し、神経細胞死が誘発されて神経回路網が破綻することにより、不可逆的な記憶障害が生じる。そこでアルツハイマー病の治療薬として、アミロイド β の産生を抑制したり、分解を促進させたりする新薬の治療が行われているが、現在のところ成功した例はない⁵⁾。このことは、軸索萎縮の原因であるアミロイド β を除去しても脳機能の回復には至らず、軸索の再伸長を積極的に誘発させて神経回路網を再構築させる必要があることを示唆する。一般的に、一度萎縮してしまった軸索は二度と元に戻らず再生することはないと考えられており、変性して萎縮した軸索の正常化に着目した研究はほとんどなく、その分子機序は明らかになっていない。しかし私は過去の自分自身の研究成果⁶⁾を受けて、変性軸索を正常化させることは可能であると考えている。そこで本研究では、伝統薬物中から、培養系でアミロイド β 誘発の軸索変性を正常化させて再伸展させる薬物を同定し、その薬物のアルツハイマー病モデル動物に対する作用を検討し、活性のあった薬物の作用点を網羅的に同定・解析し、その薬理作用を包括的かつ分子的に解明する。

方法および結果

1. 生薬 X 水エキスによる軸索伸長作用

古典の記載からアルツハイマー病に効果があると推測される漢方生薬 14 種の熱水抽出エキスを作製し、実験に用いた。胎生 14 日目のマウス大脳皮質神経細胞を培養して 3 日目からアミロイド β を 3 日間処置し、軸索萎縮を誘発させた。その後生薬エキスを 4 日間処置した。軸索伸長は以前報告した手法に準拠して計測した⁷⁾。その結果、生薬 X 水エキス (1, 10 μ g/ml) が強い軸索伸長活性を示した (図 1)。その作用は、ポジティブコントロールとして用いた NGF の作用に匹敵した。他の生薬の活性については特許事案なので非公開とする。

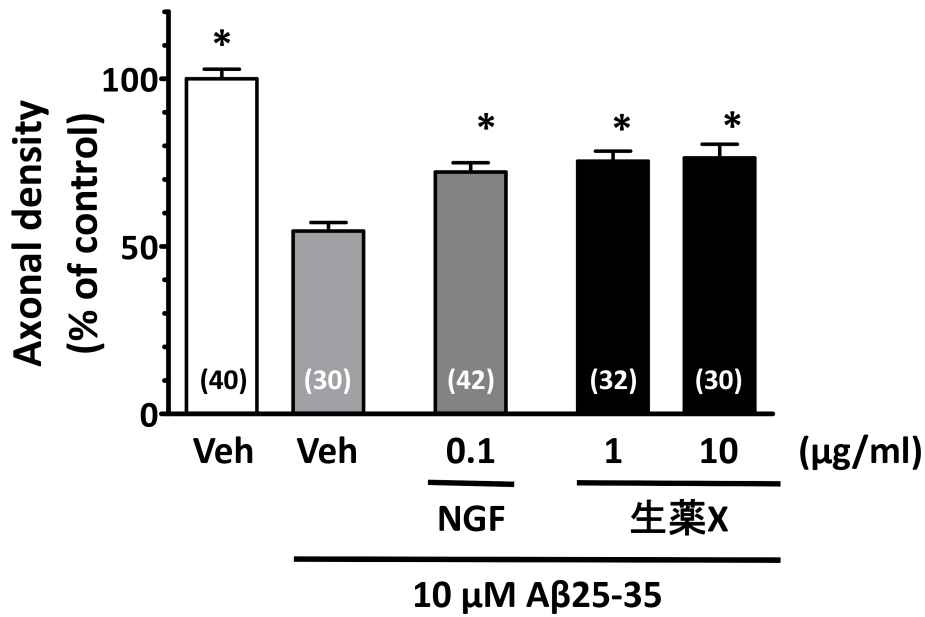


図1. 生薬 X 水エキスによる軸索伸長作用.

大脳皮質神経細胞培養3日目に10 μ M A β 25-35 を処置し, 軸索萎縮を誘発させた. A β 25-35 処置3日後, 生薬 X 水エキスあるいは NGF, 溶媒 (Veh) を処置し, その4日後に固定した. その後免疫染色を行い, 軸索密度を算出した. 括弧内は観察した画像の枚数. *P < 0.05 vs Veh/A β 25-35, one-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test.

2. 生薬 X 水エキスによる記憶改善作用

アルツハイマー病モデルマウスの5XFAD マウス⁸⁾に生薬 X 水エキス (5, 50, 500 mg/kg) を連続経口投与した後, 以前報告した手法に準拠して物体認知記憶を評価した⁷⁾. その結果, 生薬 X 水エキスを 50 および 500 mg/kg 投与した群では, 溶媒投与群に比べて優位に物体認知記憶が改善した (図2). またその作用は投与量依存的に増加した.

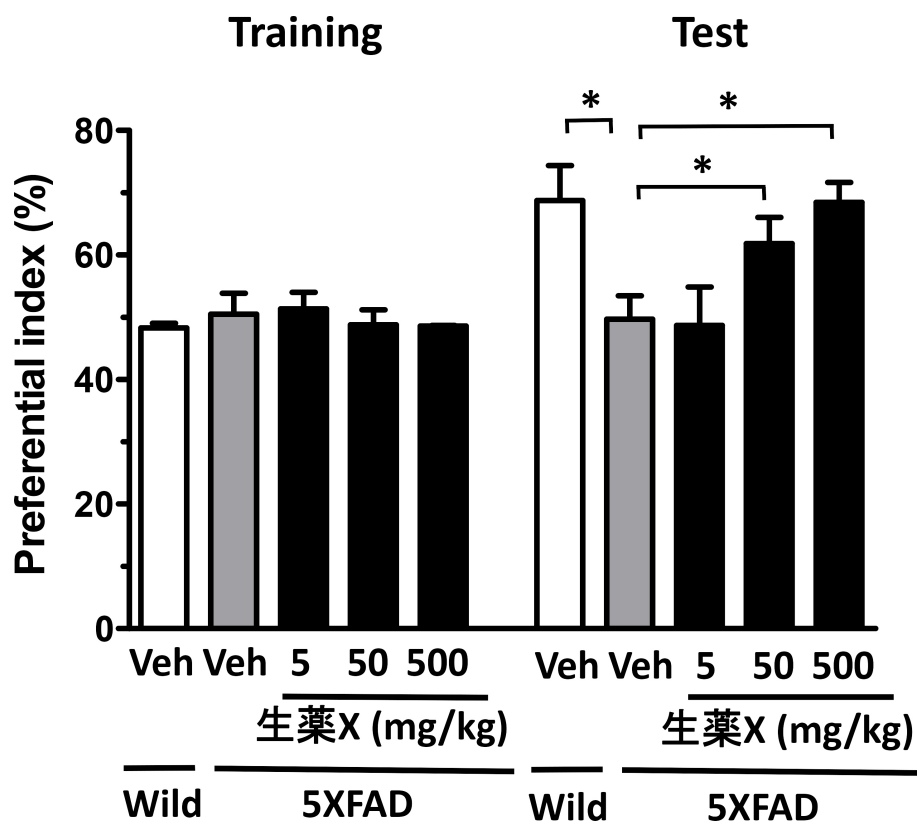


図2. 生薬 X 水エキスによる記憶障害改善作用.

野生型マウス (Wild) あるいはアルツハイマー病モデルマウス (5XFAD) に生薬 X 水エキスあるいは溶媒 (Veh) を 24 日間連続経口投与した. その後, 物体認知記憶試験を行った. *P < 0.05, one-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, n = 5.

3. 生薬 X 中の化合物と直接結合するタンパク候補の同定

私は以前, drug affinity responsive target stability (DARTS) 法を用いて, 生薬成分 diosgenin の直接結合する受容体が, 1,25D₃-MARRS であることを証明した⁹⁾. DARTS 法とは, タンパクが化合物と結合すると構造が変化するため, タンパク分解酵素による分解能に変化が生じることを利用して, 化合物が直接結合するタンパクを同定する手法である⁹⁾. 本手法を用い, 生薬 X 中の化合物に直接結合するタンパク群を探索した. 生薬 X 水エキスをマウス大脳皮質タンパク抽出物と混合させた後, タンパク分解酵素 (thermolysin) と反応させた. その後二次元電気泳動で展開し, 溶媒処置群と比べて濃さの異なるバンドを切り取った. これらを MALDI-TOF-MS を用いてタンパクを同定した (データ未提示). その結果, 2 種のタンパク (タンパク A, タンパク B) に着目した.

生薬 X 水エキスをマウス大脳皮質タンパク抽出物と混合させた後, タンパク分解酵素と反応させ, その後 SDS-PAGE に展開してそれぞれのタンパクに対する抗体を用いて western blot を行ったところ, タンパク A は生薬 X 中の何らかの化合物と直接結合することにより構造を変化させてタンパク分解酵素によって分解されにくくなり (図 3A), 反対にタンパク B は分解されやすくなっている (図 3B) ことを示唆する結果が得られた.

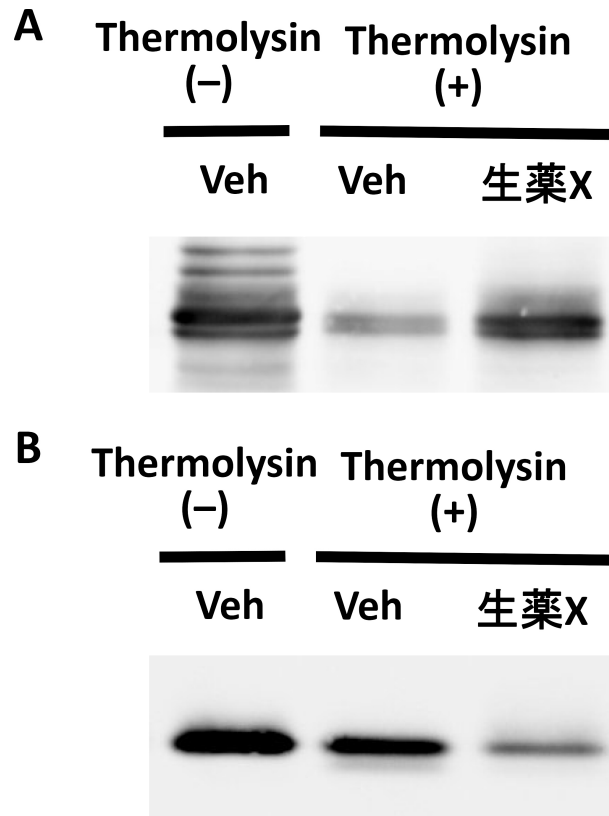


図3. 生薬 X 水エキス中の化合物が直接結合するタンパク候補.

生薬 X 水エキスをマウス大脳皮質タンパク抽出物を混合した後, thermolysin と反応させ, その後 SDS-PAGE に展開してそれぞれのタンパクに対する抗体 (A, 抗タンパク A 抗体; B, 抗タンパク B 抗体) を用いて western blot 解析を行った.

考 察

本研究で初めて生薬 X がアミロイド β による軸索萎縮の後から軸索を伸長させる活性を有することを明らかにした. また, 生薬 X がアルツハイマー病モデル動物における記憶障害を改善させる作用を有することを明らかにしたのも本研究が初めてである.

さらに DARTS 法を用いて生薬 X 中の化合物が直接作用するタンパク候補を 2 種同定した. 生薬 X の作用機序に関してはほとんど報告がなく, 本研究で明らかにした 2 種のタンパクが初めての直接結合タンパクの候補である. 今後これらタンパクの役割を明らかにしていくことで, 生薬 X の作用を包括的に解明することができるだろう.

また以上で同定されたタンパクは, これまでアルツハイマー病との関連性が報告されていない. もしこれらタンパクが生薬 X の抗アルツハイマー病作用に関わるものが証明されれば, 新たなアルツハイマー病治療薬開発の標的分子となるだろう.

以上本研究で新たなアルツハイマー病治療薬候補を同定するとともに, その作用機序解明の手掛かりとなる直接結合タンパクの候補を同定することができた. 本研究成果は生薬薬理学分野だけではなく, アルツハイマー病治療薬開発分野を新たなステージへと導くものになるだろう.

共同研究者

特許事案のため, 生薬 X およびタンパク A, タンパク B の名前は非公開とする. 二次元電気泳動および MALDI-TOF-MS によるタンパク同定は, Genomine 社に外部委託した. 本研究の共同研究者は, 富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学分野の東田千尋, 楊 志友そして同研究所和漢薬製剤開発分野の紺野勝弘, 数馬恒平である.

文 献

- 1) Kuboyama, T., Tohda, C. & Komatsu, K. : Effects of Ashwagandha (roots of *Withania somnifera*) on neurodegenerative diseases. *Biol. Pharm. Bull.*, **37** : 892-897, 2014.
- 2) Teshigawara, K., Kuboyama, T., Shigyo, M., Nagata, A., Sugimoto, K., Matsuya, Y. & Tohda, C. : A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br. J. Pharmacol.*, **168** : 903-919, 2013.
- 3) Tohda, C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I. & Kuboyama, T. : Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D₃-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci. Rep.*, **2** : 535, 2012.
- 4) Tohda, C., Nakada, R., Urano, T., Okonogi, A. & Kuboyama, T. : Kamikihito (KKT) rescues axonal and synaptic degeneration associated with memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease, 5XFAD. *Int. J. Neurosci.*, **121** : 641-648, 2011.
- 5) Cummings, J. L., Morstorf, T. & Zhong, K. : Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res. Ther.*, **6** : 37, 2014.
- 6) Kuboyama, T., Luo, X., Park, K., Blackmore, M. G., Tojima, T., Tohda, C., Bixby, J. L., Lemmon, V. P. & Kamiguchi, H. : Paxillin phosphorylation counteracts proteoglycan-mediated inhibition of axon regeneration. *Exp. Neurol.*, **248** : 157-169, 2013.
- 7) Kuboyama, T., Lee, Y.-A., Nishiko, H. & Tohda, C. : Inhibition of clathrin-mediated endocytosis prevents amyloid β -induced axonal damage. *Neurobiol. Aging*, **36** : 1808-1819, 2015.
- 8) Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R. & Vassar, R. : Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.*, **26** : 10129-10140, 2006.
- 9) Lomenick, B., Hao, R., Jonai, N., Chin, R. M., Aghajan, M., Warburton, S., Wang, J., Wu, R. P., Gomez, F., Loo, J. A., Wohlschlegel, J. A., Vondriska, T. M., Pelletier, J., Herschman, H. R., Clardy, J., Clarke, C. F. & Huang, J. : Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106** : 21984-21989, 2009.