

| | |
|----------|---|
| 氏名 | おくだ みちあき 奥田 充顕 |
| 学位(専攻分野) | 博士(学術) |
| 学位記番号 | 博乙第207号 |
| 学位授与の日付 | 平成30年3月26日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文題目 | 新規クルクミン誘導体によるアルツハイマー病治療薬開発に関する研究 |
| 審査委員 | (主査)教授 亀井加恵子 教授 田中直毅 教授 宮田清司 |

論文内容の要旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) は認知症の中でも最も代表的かつ最も多くの割合を占める疾患であり、その患者数の増加は世界全体が直面している問題である。しかしながら、現行の AD 治療薬は対症療法薬でしかないため、AD 根本治療薬の開発が急務とされている。

AD 根本治療薬の標的因子として、AD 患者脳内で老人斑 (senile plaque: SP) を形成する「アミロイドβ (Aβ)」と、同じく AD 患者脳内で神経原繊維変化 (neurofibrillary tangle: NFT) を形成する「タウ蛋白質」の2つが有力視されており、これらを標的とする薬剤の研究開発が世界中の製薬企業・大学等で進められてきたが、未だ成功には至っていない。これらの薬剤は基本的に Aβあるいはタウの一方のみを標的としたものであり、それが十分な有効性を示さない一因であると考えられる。

本研究では「Aβおよびタウの両方を同時に阻害すること」が AD の根本治療として重要であると考え、Aβ・タウ凝集阻害作用を機序とする新規薬剤の開発を目指すこととした。既存の Aβ凝集阻害剤あるいはタウ凝集阻害剤は *in vitro* 試験レベルでは阻害活性を示すものの、病態モデル動物を用いた *in vivo* 試験では凝集阻害活性を示さない。その原因として「薬理活性が弱い」「体内動態が悪い」といったことが想定されている。そういった状況を踏まえ本研究では、クルクミンをシード化合物として合成展開を実施することにより、生体内でも Aβ凝集阻害・タウ凝集阻害の両活性を発揮するような、高活性かつ体内動態に優れた化合物の探索を実施し、その成果として新規クルクミン誘導体 PE859 を得た。さらに、各種病態モデルマウスを用いて PE859 の薬効評価を実施し、Aβ凝集阻害・タウ凝集阻害という創薬コンセプトの妥当性について検証した。

上記の研究成果は以下の通り3つの章に分けて論じた。

第1章では、Aβ凝集阻害活性およびタウ凝集阻害活性を指標として *in vitro* スクリーニング評価を実施し、構造活性相関を用いてクルクミンより活性の高い化合物を探索した。これに加えてラットでの体内動態評価も実施し、血中・脳内動態の改善を狙った構造変換を行った。その結果、クルクミンよりも Aβ凝集阻害活性とタウ凝集阻害活性がともに数倍高く、かつ、経口投与時の脳中濃度も10倍以上高い新規クルクミン誘導体 PE859 を見出すに至った。

第2章では、PE859 のタウ凝集阻害作用について、ThT 蛍光法、CD スペクトル解析、QCM 等の手法を用いて解析した。その結果、PE859 はタウに直接結合しβシート形成を阻害すること

によってタウ凝集を阻害していることが示唆された。またタウ病態モデル tau P301L トランスジェニックマウスを用いた試験では、PE859 が生体内でもタウ凝集阻害作用を示すことを確認するとともに、タウによって惹起される神経障害が PE859 投与によって改善されることも確認した。

第 3 章では、PE859 の A β 凝集阻害作用について、ThT 蛍光法、QCM、SDS-PAGE 等の手法を用いて詳細に解析した。その結果、PE859 は A β に直接結合して凝集を阻害していることが示唆された。また、培養細胞を用いた試験では A β 誘発神経毒性に対して PE859 が保護作用を示すことも確認した。さらに、AD 病態モデル APPswe/PS1dE9 トランスジェニックマウスを用いた試験では、PE859 が *in vivo* でも A β 凝集阻害作用を示すことを確認するとともに、A β によって惹起される認知機能障害が PE859 投与によって改善されることも確認した。加えて、老化促進・認知症モデル SAMP8 マウスを用いた試験では、PE859 が A β 凝集とタウ凝集の両方を同時に阻害し、かつ認知機能も改善することを確認した。

以上の研究結果を通して、A β 凝集阻害・タウ凝集阻害というストラテジーがアルツハイマー病治療として有効であることが示されるとともに、PE859 がその臨床導入候補化合物となり得ることが示された。本研究成果は今後の AD 治療薬の研究開発において有用な知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

本研究はアルツハイマー病の発症原因とされているアミロイド β (A β)・タウの両因子を標的とするアルツハイマー病根本治療薬の開発をテーマとした、新規性に富んだものである。アルツハイマー病は記憶障害などの認知機能障害を主な臨床症状とする進行性の神経変性疾患であり、A β を主要構成成分とする老人斑およびタウ蛋白質を主要構成成分とする神経原線維変化の形成に伴って神経細胞死や脳組織の萎縮が進行する。そのため、A β あるいはタウを標的とした AD 治療薬の開発が精力的に進められているが、未だ開発成功には至っていないのが現状である。

そこで本研究では、これまでのアルツハイマー病治療薬候補品の特徴や問題点を分析した結果から「A β 病変およびタウ病変の両方を同時に阻害することが重要である」という視点に立ち、A β ・タウ凝集阻害作用を機序とする新規薬剤を開発することを研究目的とした。具体的には、既報の A β 凝集阻害剤・タウ凝集阻害剤のほとんどが *in vivo* 実験レベルでは凝集阻害活性を示していないという問題点を挙げ、それを解決する手段として「薬理活性の向上」「体内動態の改善」に主眼を置いた新規化合物探索を実施することにより、目的の達成を目指した。

第 1 章では、クルクミンをリード化合物として、A β 凝集阻害活性およびタウ凝集阻害活性を指標とした *in vitro* スクリーニング試験とラット体内動態評価試験を実施し、クルクミンより薬理活性・体内動態に優れた新規化合物を探索した。その結果、クルクミンよりも各活性が数倍高く、かつ、経口投与時の脳中濃度も 10 倍以上高い新規クルクミン誘導体 PE859 を見出すことに成功した。

第 2 章では、PE859 のタウ凝集阻害作用について、*in vitro* および *in vivo* レベルでの詳細な解析を実施した。*In vitro* 試験の具体的な手法としては、ThT 蛍光法、CD スペクトル解析、QCM を用いた。その結果、PE859 はタウに直接結合して β シート形成を阻害することによりタウ凝集を阻害していることを確認した。また、タウ凝集阻害剤として知られているメチレンブルーとの

比較実験により、両者の凝集阻害メカニズムに違いがあることも発見した。さらにタウ病態モデル τ P301L トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 試験では、PE859 投与により脳中の凝集（不溶性）タウ量が減少し、さらにこの時、可溶性（未凝集）タウ量には変化がないことを確認した。またこの試験において、PE859 投与群ではタウによって引き起こされる神経障害にも改善がみられることも確認した。既存のタウ凝集阻害剤は *in vivo* 実験では凝集阻害活性を示さないことから、これまではタウ凝集阻害作用が本当に有効なのかが検証できていなかった。しかし本研究では、高い活性と優れた体内動態を有する PE859 を用いることにより、タウ凝集阻害作用がアルツハイマー病をはじめとするタウ関連疾患に対する治療法として有効であることが示された。

第 3 章では、PE859 の A β 凝集阻害作用について、*in vitro* および *in vivo* レベルでの詳細な解析を実施した。*In vitro* 試験の具体的な手法としては、ThT 蛍光法、QCM、SDS-PAGE 法を用いた。その結果、PE859 は A β に直接結合し、凝集の進行を 3~4 量体のオリゴマーの状態では停止させていることが示唆された。一般的に A β オリゴマーは神経毒性が強いと考えられているが、興味深いことに、培養細胞を用いた *in vitro* 試験では、A β 処置によって起こる細胞死を PE859 が抑制した。これらの結果から、PE859 は A β に結合することによって凝集構造を変化させ、A β オリゴマー本来の神経毒性を軽減するとともに高次 A β 凝集体の形成を阻害することが示唆された。さらに AD 病態モデル APP^{swe}/PS1^{dE9} トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 試験では、PE859 投与により脳中の凝集（不溶性）A β 量が減少し、さらにこの時、可溶性（未凝集）A β 量には変化がないことを確認した。またこの試験において、PE859 投与群では A β によって引き起こされる認知機能障害にも改善がみられることも確認した。第 2 章で述べたタウの場合と同様、既存の A β 凝集阻害剤は *in vivo* 実験では凝集阻害活性を示さないことから、これまでは A β 凝集阻害作用が本当に有効なのかが検証できていなかった。しかし本研究で PE859 を用いることにより、A β 凝集阻害作用がアルツハイマー病に対する治療法として有効であることが示された。これに加えて第 3 章では、老化促進・認知症モデル SAMP8 マウスでも同様に薬効評価を実施した。その結果、PE859 が脳内タウ・A β の凝集を同時に阻害し、かつ、認知機能障害も改善させることを確認した。この結果から PE859 が本研究の目的である、A β 病変およびタウ病変の両方を阻害する新規アルツハイマー病治療薬の候補品となることが示された。

以上、これらの一連の研究は、アルツハイマー病の根本治療薬の研究開発に大きく貢献するものであると判断した。

これらの研究の成果は、申請者を筆頭著者とする下記の国際科学雑誌 3 編に掲載されている。

1. Michiaki Okuda, Ichiro Hijikuro, Yuki Fujita, Takayuki Teruya, Hirochika Kawakami, Takashi Takahashi, Hachiro Sugimoto. Design and synthesis of curcumin derivatives as tau and amyloid β dual aggregation inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016; 26(20): 5024-5028.
2. Michiaki Okuda, Ichiro Hijikuro, Yuki Fujita, Xiaofeng Wu, Shinichi Nakayama, Yoko Sakata, Yuji Noguchi, Makoto Ogo, Shigeru Akasofu, Yoshimasa Ito, Yoshiyuki Soeda, Nobuhiko Tsuchiya, Naoki Tanaka, Takashi Takahashi, Hachiro Sugimoto. PE859, a novel tau aggregation inhibitor, reduces aggregated tau and prevents onset and progression of neural dysfunction *in vivo*. *PLoS One*, 2015; 10 (2): e0117511.
3. Michiaki Okuda, Yuki Fujita, Ichiro Hijikuro, Mei Wada, Takuya Uemura, Yukako

Kobayashi, Tomonori Waku, Naoki Tanaka, Takaaki Nishimoto, Yasuhiko Izumi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike, Takashi Takahashi, Hachiro Sugimoto. PE859, a novel curcumin derivative, inhibits amyloid- β and tau aggregation, and ameliorates cognitive dysfunction in senescence-accelerated mouse prone 8. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017; 59 (1): 313-328.

また、参考論文として下記 2 編が学術雑誌に掲載されている。

1. 橋本道男、松崎健太郎、矢野彰三、住吉愛理、柴藤治、勝部拓矢、田畑光正、奥田充顕、杉本八郎、吉野勝美：超高水圧加圧玄米の長期摂取は老年期の骨密度低下を予防する、*応用薬理* 92(3/4): 69-73 (2017)
2. 奥田充顕、藤田有紀、杉本八郎、吉野勝美：高圧加工玄米の抗認知症作用に関する *in vivo* 研究、*超高水圧加工食品技術雑誌* 1(1): 31-37 (2016)