

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 認知症研究開発事業
(英語) Research and Development Grants for Dementia
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Screening of plant extracts to care dementia by improving neural
energy metabolism
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 幹細胞制御プロジェクト
プロジェクトリーダー 川端健二
- 所属 役職 氏名： (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition Project Leader,
Kenji Kawabata
- 実施期間： 平成26年 5月30日 ~ 平成29年 3月31日
- 分担研究 (日本語) iPS細胞の培養・分化誘導
開発課題名： (英語) Culture and differentiation of human iPS cells
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 ヒト幹細胞応用開発室
研究リーダー 古江美保
- 所属 役職 氏名： (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Leader,
Miho Furue
- 分担研究 (日本語) 生薬エキス調整 低分子分析・構造解析
開発課題名： (英語) Plant extract library and structural analysis of compounds
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所
薬用植物資源研究センター 室長 瀧野裕之
- 所属 役職 氏名： (英語) National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Senior
Researcher, Hiroyuki Fuchino

分担研究 (日本語) 脳虚血及び認知症モデルにおける炎症性細胞の神経細胞障害に与える影響
について

開発課題名: (英語) The effect of inflammatory response on neuronal injury in models of
cerebral ischemia and dementia.

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学医学部講師 佐々木努

所属 役職 氏名: (英語) Department of Neurology, Osaka University Graduate School of
Medicine, Assistant Professor, Tsutomu Sasaki

分 担 研 究 (日本語) 電気生理学的解析

開 発 課 題 名: (英語) Electrophysiological analysis

研究開発分担者 (日本語) 富山大学 工学部 准教授 田端 俊英

所属 役職 氏名: (英語) Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama,
Associate Professor, Toshihide Tabata

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

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る。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（神経発生を含む）を障害しないことが求められる。本研究では、正常な神経伝達シグナルを阻害することなく認知症の最終病態である神経細胞死を、神経エネルギー代謝を制御することで回避させる技術開発を行うことを目的とする。

このうち、研究の総括・スクリーニング・認知症モデルマウス評価に関しては、総合的推進及び HTS 系の構築に関わる技術開発及び神経保護候補薬のスクリーニング・評価を実施した（担当：竹森洋（H26, 27 年度）・川端健二（H28 年度））。スクリーニングには大規模生薬（植物）エキスイブラリーを利用し、有用成分の構造決定を行った（担当：洲野裕之）。ヒトへの有効性は、iPS 細胞から分化誘導した神経細胞で予測した（iPS 細胞調整担当：古江美保）。神経保護作用に関しては、脳虚血モデルマウスを中心に評価を行い（担当：佐々木）、電気生理学的解析（担当：田端）を加え検証した。さらに、神経保護に作用するとされるヒストンデアセチラーゼ（HDAC）関連制御剤の開発も実施した。

神経では ATP 産生の殆どをミトコンドリアで合成しており、解糖系から得られるピルビン酸はミトコンドリアでの TCA サイクルに欠かせない。一方、ピルビン酸が乳酸へと変換され細胞外へと排出される経路も存在する。そこで、ピルビン酸を多く生産し乳酸を生産しない方向へ傾けることができる植物成分の同定から着手した。また、ピルビン酸は神経細胞を囲むアストロサイトから供給されるため、アストロサイトでのピルビン酸/乳酸比率に着目した。

生薬（植物）エキス 7000 点以上及び成分（低分子）3000 点以上をマウス培養アストロサイトに加え、ピルビン酸/乳酸比率を高める候補を選別した。次に、培養マウス初代神経細胞（アストロサイト含有集団）にグルタミン酸による興奮毒性を加えた際の候補エキス・成分の ATP 産生能と細胞生存率を評価した。最終的に、酸素消費量（ミトコンドリア活性）を測定し神経保護作用を有すると示唆されるロガニン酸を同定した。ロガニン酸はグルタミン酸による興奮毒性に直接関与するグルタミン酸レセプター（NMDA-R 等）には直接作用せず神経シグナル伝達は正常であることが電気生理的に確認できた。これは、ヒト iPS 細胞由来の神経細胞でも確認できた。また、NMDA-R 活性異常が起こりメマンチン等に感受性が高まったモデルマウス（Grid2 変異マウス）を利用したところ、やはりロガニン酸は *in vivo* でも NMDA-R 活性に影響しないことが示唆された。ロガニン酸の神経保護作用の発現機序として、ピルビン酸を乳酸に変換する酵素である LDH を阻害することでミトコンドリアへのピルビン酸導入量を促進し ATP 産生を高めることが示唆された。

In vivo での神経保護作用の評価系構築としては、老化促進モデルマウスへのエチルピルビン酸投与で脳内ピルビン酸濃度を高めた状態を再現し、半数以上のマウスで老化に伴う餌探索能力低下の抑制が観察された。また、脳虚血による神経毒性評価指標として D-Ser が有効であることが示唆された。D-Ser の神経エネルギー代謝への関与及び認知症（老化依存的）への関与は現在検討中である。さらに、神経保護作用を有する HDAC 阻害剤として、N-[2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenyl]-4-acetamidobenzamide を得た。この HDAC 阻害剤も神経エネルギー代謝への関与を検討中である。

Dementia is the severe disease for which no effective treatment/drugs exists. Because both dysfunction and overload of neural signal transmission cause impairments in neurons, drugs for dementia are required to prevent neural cell death without disruption of normal neural signals. To identify the candidates for neuro-protectors, we tried to develop methods to enhance neural energy metabolism.

In this effort, Takemori (2014-2015) and Kawabata (2016) screened plant extracts/small compounds and evaluated their potential of neuro-protection. Fuchino prepared the extract library and performed structural analysis of candidates. Furue prepared human iPS cells and neurons derived from these cells to predict efficacy of the candidates in human. Sasaki prepared in vivo (mouse) models for neural toxicity, such as ischemic stresses. Tabata examined the candidates by electrophysiological analysis.

In neuronal cells, ATP is predominantly produced in mitochondria, and pyruvate occurred in glycolysis is the major source of TCA cycle for the ATP production in mitochondria. On the other hand, pyruvate is excreted from cells after being converted to lactate. Therefore, compounds (plant extracts) that inhibit the conversion from pyruvate to lactate may lead to upregulation of pyruvate supply to mitochondria and support neural activities. Because the candidates for the neuro-protective compounds could raise the ratio of pyruvate /lactate, we monitored the ratio in culture media. In addition, we used astrocytes because they care neurons by association.

We first added plant extracts (>7000) and small compounds (>3000) into culture media of mouse primary astrocytes and monitored the pyruvate/lactate ratio. Then, we monitored ATP production in mouse primary neurons and evaluated neural survival (population with astrocytes) that had been damaged by glutamate excitatory toxicity. Finally, we measured oxygen consumption rate (mitochondrial activity) and identified loganic acid as a neuro-protector by upregulating neural energy metabolism. Electrophysiological analysis suggested that loganic acid did not interrupt normal neural transmission via NMDA-R in mouse primary neurons. This was also confirmed in human neural cells differentiated from human iPS cells. In addition, loganic acid did not affect NMDA-R functions in vivo, which was confirmed in the memantine-sensitive Grid2 mutant mice in which the NMDA-R functions were impaired. Loganic acid inhibited lactate dehydrogenase (LDH) that converts pyruvate to lactate, which leads to the enhanced production of ATP in mitochondria.

The efficacy of pyruvate-mediated neuro-protection was examined by the administration of ethyl-pyruvate to model mice that were characterized by dementia as aging. Ethyl-pyruvate suppressed memory impairments in more than half of the model mice when they memorized the location of foods hid experimentally. In addition, we found D-Ser is helpful to monitor neurotoxicity during ischemic stresses and are examining the involvement of this amino acid in the progression of dementia. Furthermore, we identified N-[2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenyl]-4-acetamidobenzamide as a neuro-protector which may contribute to energy metabolism in neurons.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 7件、国際誌 12件）

1. 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
2. 熊谷 彩子、竹森 洋 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 2014 pp114-120
3. Tabata T, Yamaguchi Y, Hata Y, Ichida F, Mori H. Modification of KCNH2-encoded cardiac potassium channels by KCNE1 polymorphism. *Circulation Journal*. 2014, 78, 2331
4. Kumagai A, Suga M, Yanagihara K, Itoh Y, Takemori H, Furue MK. A Simple Method for Labeling Human Embryonic Stem Cells Destined to Lose Undifferentiated Potency. *Stem Cells Transl Med*. 2016 5:275-281
5. Nonobe Y, Yokoyama T, Kamikubo Y, Yoshida S, Hisajima N, Shinohara H, Shiraiishi Y, Sakurai T, Tabata T. Application of surface plasmon resonance imaging to monitoring G protein-coupled receptor signaling and its modulation in a heterologous expression system. *BMC Biotechnol*. 2016 12;16:36.
6. Kinoshita K, Takahashi H, Hata Y, Nishide K, Kato M, Fujita H, Yoshida S, Murai K, Mizumaki K, Nishida K, Yamaguchi Y, Kano M, Tabata T, Nishida N. SCN5A(K817E), a novel Brugada syndrome-associated mutation that alters the activation gating of NaV1.5 channel *Heart Rhythm* 2016;13:1113-1120.
7. Itoh Y, Fuchino H, Sanosaka M, Kako K, Hada K, Fukamizu A, Takemori H, Kawahara N Pteroin B has multiple targets in gluconeogenic programs, including coenzyme Q in ROR α -SRC2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 473:415-20
8. Kawahara Y, Hoshino T, Morimoto H, Shinizu T, Narukawa Y, Fuchino H, Kawahara N, Kiuchi F. LC-MS-based quantification method for *Achyranthes* root saponins. *J Nat Med*. 2016 70:102-6
9. Watanabe A, Sasaki T, Yukami T, Kanki H, Sakaguchi M, Takemori H, Kitagawa K, Mochizuki H. Serine racemase inhibition induces nitric oxide-mediated neurovascular protection during cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2016 339:139-149
10. 上窪裕二, 田端俊英. 代謝型グルタミン酸受容体の構造と種類. *Clinical Neuroscience*. 2016, 34, 8-9.
11. 上窪裕二, 田端俊英. グループ I 型代謝型グルタミン酸受容体の生理的および薬理的な作用. *Clinical Neuroscience*. 2016, 34, 136-7.
12. 上窪裕二, 田端俊英. グループ II 型および III 型代謝型グルタミン酸受容体の生理的および薬理的な作用. *Clinical Neuroscience*. 2016, 34, 256-7.
13. 田端俊英, 上窪裕二. アデノシン受容体の種類とあらまし. *Clinical Neuroscience*. 2016, 34, 1288-9.
14. Fukuda T, Takayama K, Hirata M, Liu YJ, Yanagihara K, Suga M, Mizuguchi H, Furue MK. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. *Exp Cell Res*. 2017 52:333-345
15. Kato R, Matsumoto M, Sasaki H, Joto R, Okada M, Ikeda Y, Kanie K, Suga M, Kinehara M, Yanagihara K, Liu Y, Uchio-Yamada K, Fukuda T, Kii H, Uozumi T, Honda H, Kiyota Y, Furue MK. Parametric analysis of colony morphology of non-labelled live human pluripotent stem cells for cell quality control. *Sci Rep*. 2016 6:34009

16. Choong CJ, Sasaki T, Hayakawa H, Yasuda T, Baba K, Uesato S, Mochizuki H. A novel histone deacetylase 1 and 2 isoform-specific inhibitor alleviates experimental Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2016, 37:103-16
17. Suga M, Tachikawa S, Tateyama D, Ohnuma K, Furue MK. Imaging-cytometry revealed spatial heterogeneities of marker expression in undifferentiated human pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 53:83-91
18. 田端俊英, 上窪裕二. アデノシン受容体の神経系における機能と役割. *Clinical Neuroscience.* 2017, 35, 10-1.
19. 上窪裕二, 田端俊英. アデノシン受容体をターゲットとした臨床応用と最新研究. *Clinical Neuroscience.* 2017, 35, 128-9.
20. Gon Y, Sakaguchi M, Takasugi J, Kawano T, Kanki H, Watanabe A, Oyama N, Terasaki Y, Sasaki T, Mochizuki H. Plasma D-dimer levels and ischaemic lesions in multiple vascular regions can predict occult cancer in patients with cryptogenic stroke. *Eur J Neurol.* 2017 24:503-508
21. Uesato S, Hirata Y, Sasaki T. Potential Application of 5-Aryl-Substituted 2-Amino- benzamide Type of HDAC1/2-Selective Inhibitors to Pharmaceuticals. *Curr Pharm Des.* 2017 in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 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 ポスター 第 51 回日本臨床分子医学会 2014 国内
2. 佐々木勉、竹森洋、渡辺彰弘、由上登志郎、北川一夫、望月秀樹 脳虚血における CRTCL1-PGC-1 α シグナルの動態についての検討 ポスター 第 51 回日本臨床分子医学会 2014 国内
3. 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、竹森洋、瀧野裕之、川原信夫、土居純子、太田美穂 ワラビ Pteroin B の ATP 産生抑制作用 口頭 第 68 回日本栄養・食糧学会 2014 国内
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 口頭 第 87 回日本生化学会 2014 国内
5. 瀧野裕之、高橋みき子、新井玲子、川崎武志、川原信夫 シコン中に含まれるピロリチジンアルカロイドについて ポスター 日本生薬学会第 61 回年会 2014 国内
6. 上窪裕二、坂入伯駿、田端俊英、櫻井隆 アデノシン A1 受容体と代謝型グルタミン酸受容体の複合体形成と機能的相互作用 口頭 第 130 回日本薬理学会関東部会 2014 国内
7. 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、古江-楠田美保、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム 品質評価法の開発 口頭第 66 回日本生物工学会大会 2014 国内
8. Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, Furue MK Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. 口頭 ISSCR 12th Annual Meeting 2014 国外
9. Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, Furue MK. Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm International Society for Stem Cell Research ISSCR 12th Annual Meeting 2014 国外

10. Kamikubo Y, Tabata T, Sakurai T. Bidirectional interaction between adenosine A1 receptor and type-1 metabotropic glutamate receptor. ポスター Society for Neuroscience Annual Meeting USA 2015 国外
11. Ota M, Ishikawa M, Tanaka K, Kitagawa H, Usui K, Kohno T, Okada T, Minehira D, Toyooka N, Tabata T, Kawahara S T-588 analog TK-6 impairs the hippocampus-dependent trace eyeblink conditioning in mice 口頭第 38 回日本神経科学大会 2015 国内
12. Takahashi H, Kinoshita K, Yoshida S, Fujita H, Murai K, Tabata T Electrophysiological characterization of a novel SCN5A mutant identified in a Brugada syndrome patient 口頭第 130 回日本生理学会大会 2015 国内
13. 伊東祐美, 澁野裕之, 川原信夫, 竹森洋 フラビ Pterosisin B の Forskolin 誘導性 G6Pc 遺伝子の抑制機構 ポスター第 88 回日本生化学会 2015 国内
14. 佐々木勉, 渡邊彰弘, 神吉秀明, 由上登志郎, 坂口学, 竹森洋, 望月 秀樹 脳虚血における PGC-1 α シグナルの調節機構の検討 口頭 第 27 回日本脳循環代謝学会 2015 国内
15. 太刀川彩保子, 菅三佳, 古江・楠田美保, 大沼清 二次元イメージングサイトメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 口頭 第 14 回再生医療学会総会 2015 国内
16. 澁野裕之, 河野徳昭, 樹下耕太郎, 飯田 修, 熊谷健夫, 乾 貴幸, 吉松嘉代, 和田浩志, 御給一世, 川原信夫 茨城県で発生したチョウセンアサカオ類とコハウの誤食に関する事例 口頭第 22 回日本食品化学学会 2015 国内
17. 澁野裕之, 高橋みき子, 高上馬希重, 川原信夫 シコン中に含まれるピロリチジンアルカロイドについて 口頭 日本生薬学会第 62 回年会 2015 国内
18. 古江・楠田美保 Clinical application of human ES/iPS cells and points to consider: Stemcell character and Reproducibility 口頭第 88 回日本組織培養学会 2015 国内
19. 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 菅三佳, 柳原佳奈, 福田隆之, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江・楠田美保, 加藤竜司 Morphology-based iPS colony evaluation for industrial cell culture automation 口頭 第 88 回日本組織培養学会 2015 国内
20. 柳原佳奈, 菅三佳, 劉有容, 浜田彰子, 平井雅子, 末盛博文, 古江・楠田美保 Bioactivity assay of growth factors for human ES / iPS cell culture 口頭 第 88 回日本組織培養学会 2015 国内
21. 木下耕史, 横山亮介, 高橋宏幸, 畑由紀子, 田端俊英, 廣野恵一, 市田露子, 西田尚樹 A novel HCN4 mutation in a patient with left ventricular noncompaction impairs the pacemaker current, ポスター日本循環器学会学術集会, 2016 国内.
22. 吉田翔, 上窪裕二, 篠原寛明, 白石有希, 櫻井隆, 田端俊英 Modulation of type-1 metabotropic glutamate receptor by adenosine A1 receptor: an analysis with surface plasmon resonance imaging, ポスター 日本神経科学大会, 2016, 国内.
23. 上窪裕二, 坂入伯駿, 阿部, 松岡希斗, 田端俊英, 櫻井隆 Regulation of type-1 metabotropic glutamate receptors function through inter-GPCR interplay, ポスター 日本薬理学会年会, 2017 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS細胞を見てみよう 古江美保 H26年度 医薬基盤研究所一般公開 2014.11.15, 国内
2. 脳卒中の危険因子と治療 佐々木努 千里ライフサイエンスセンターセミナー 2014.12.4 国内
3. 学習・記憶の脳メカニズム 田端俊英 富山大学サテライト公開講座 2014.8.30 国内
4. 脳科学再入門 田端俊英 富山大学公開講座 2015.5.11 国内
5. 薬と毒 薬草とその付き合い方 澁野裕之 栃木県保健福祉部薬務課主催 みかも山公園薬草観察会 2015.5.17 国内
6. 記憶のメカニズムと健康 田端俊英 石川県工業師会講演会 2016.2.6 国内
7. いろいろな細胞に変化する“幹細胞”ってなあに? 川端健二 H28年度 医薬基盤・健康・栄養研究所一般公開 2016.11.19, 国内

(4) 特許出願

該当なし