

アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデルと線維形成阻害薬の探索

内木宏延,^{*,a} 長谷川一浩,^a 小野賢二郎,^b 山田正仁^b

A Search for Anti-amyloidogenic Compounds Based on a Nucleation-Dependent Polymerization Model

Hironobu NAIKI,^{*,a} Kazuhiro HASEGAWA,^a Kenjiro ONO,^b and Masahito YAMADA^b

^aDivision of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, 23-3 Matsuokashimoaizuki, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193, Japan, and ^bDepartment of Neurology and Neurobiology of Aging, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, 13-1 Takaramachi, Kanazawa 920-8640, Japan

(Received September 25, 2009)

We have proposed that a nucleation-dependent polymerization model could explain the general mechanisms of amyloid fibril formation *in vitro*. Based on this model, we systematically demonstrated that several classes of organic compounds (*e.g.*, wine-related polyphenols, non-steroidal anti-inflammatory drugs) not only inhibit the formation of A β amyloid fibrils from A β and their extension, but also destabilize A β amyloid fibrils dose-dependently *in vitro*. We found significant positive correlations of the effective concentrations (EC₅₀) of these compounds ranging from 10 nM to 10 μ M, for the formation and destabilization of A β amyloid fibrils. We next investigated the anti-amyloidogenic effects of five flavonoids on A β amyloid fibrils *in vitro*. Oxidized flavonoids generally inhibited fibril formation significantly more potently than fresh compounds. By surface plasmon resonance (SPR) analysis, distinct association and dissociation reactions of myricetin (Myr) to A β amyloid fibrils were observed, in contrast to the very weak binding to the A β monomer. A significant decrease in the rate of fibril extension was observed when >0.5 μ M of Myr was injected into the SPR experimental system. These findings suggest that flavonoids, especially Myr exert an anti-amyloidogenic effect *in vitro* by preferentially and reversibly binding to the amyloid fibril structure of fibrils, rather than to A β monomers. This working model should prove useful not only for the rational development of preventives and therapeutics for Alzheimer's disease and other human amyloidosis, but also for understanding the basic mode of action of amyloid imaging compounds.

Key words—amyloid fibril; anti-amyloidogenic compound; nucleation-dependent polymerization model

1. はじめに

アルツハイマー病患者脳のパリ組織学的特徴は、神経細胞内神経原線維変化に加え、A β ペプチドが細胞外でアミロイド線維を形成し、老人斑及び血管アミロイドとして脳実質に沈着することである。¹⁾ 家族性アルツハイマー病の研究から、A β ペプチドの異常な沈着がすべてのタイプのアルツハイマー病を引き起こすという、A β カスケード仮説が提唱されている。²⁾ したがって、低分子化合物によるA β ペ

プチドのアミロイド線維形成阻害はアルツハイマー病の有力な治療標的となり、世界中で研究開発が進んでいる。本総説では筆者らの知見を中心に、現状を概観する。

2. アミロイド線維の構造と試験管内形成機構

2-1. アミロイド線維の構造 アミロイド線維を電子顕微鏡下に観察すると、幅7から13 nmのゆるやかならせん構造を持った針状細線維として認められる。アミロイド線維のX線結晶解析を行うと、線維軸方向に約4.8 Å周期の、また線維軸に垂直方向に約10 Å周期の繰り返し構造が観察される。これは、線維軸に垂直方向に β ストランドが規則的に配列したひだ状 β シート構造を表しており、このような構造が何層か積み重なることにより一本の細線維が形成されていると考えられる。

^a福井大学医学部医学科病因病態医学講座分子病理学領域 (〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3), ^b金沢大学大学院医学系研究科脳老化・神経病態学(神経内科学) (〒920-8640 金沢市宝町13-1)

*e-mail: naiki@u-fukui.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS22で発表したものを中心に記述したものである。

2-2. アミロイド線維の試験管内定量法 アミロイドーシスの本態は、アミロイド線維の形成とその組織への沈着である。したがって、アミロイド線維形成の分子機構を試験管内で詳細に解析することは、アミロイドーシス発症の分子機構を解明するために不可欠の研究手段と言える。一般に、アミロイド線維形成過程を生化学的に解析するためには、純粋な前駆タンパク質を得ること、及び最終産物であるアミロイド線維を特異的に定量できる系を確立することが不可欠である。筆者らは後者を目指し、組織に沈着したアミロイドを特異的に染色する様々な色素を試した結果、1989年、蛍光色素チオフラビンTを用いたアミロイド線維の分光蛍光定量法を世界に先駆けて開発した。³⁾ Figure 1に示すように、チオフラビンT単独では446–450 nm付近の励起光を当てても蛍光を発しないが、溶液中のアミロイド線維上に存在する特異的結合部位に可逆的に結合すると480–490 nm付近に特異的蛍光を発する。これを分光蛍光光度計で測定することにより、アミロイド線維の生化学的定量が可能になる。チオフラビンTは、天然構造の前駆タンパク質と反応させても特異的蛍光を発しない。したがって本法は、前駆タンパク質がアミロイド線維構造をとった時のみこれを特異的に定量できる。その後本法は、様々なアミロイド線維の試験管内形成実験に広く利用され、アミロイド線維形成機構解明に向けた生化学研

究に不可欠のツールとなった。最近ピッツバーグ大学グループは、本色素を母核とし、脳血管閥門を超え易くするため脂溶性を増した Pittsburgh Compound-Bを開発、陽電子放射断層撮影装置 (PET)を用いたアミロイドのイメージング法を確立した。⁴⁾ 現在、アルツハイマー病の診断に向けた治験が世界規模で進行している。

2-3. アミロイド線維形成の重合核依存性重合モデル 筆者らを始めとする多くの試験管内実験より、アミロイド線維形成機構を説明するモデルとして重合核依存性重合モデルが提唱されている (Fig. 2).⁵⁾ このモデルはアミロイド前駆タンパク質からの重合核 (オリゴマー) 形成過程、及び線維伸長過程よりなる。重合核形成は反応速度論的に起こり難く、反応全体の律速段階となっている。一方、線維伸長は一次反応速度論形式に従い、重合核、あるいは線維断端に、前駆タンパク質が立体構造を変化させながら次々に結合することにより速やかに進行する。伸長反応は重合と脱重合の平衡過程であり、伸長速度は重合速度 $K_{on}[P][M]$ と脱重合速度 $-K_{off}[P]$ の和で表され、前駆タンパク質濃度 ($[M]$)、及び断端の数、すなわちアミロイド線維の数濃度 ($[P]$) に比例して変化する。線維伸長反応の進行とともに前駆タンパク質濃度 ($[M]$) が減少するため、伸長速度は次第に低下し、最終的には重合速度と脱重合速度が等しくなって反応は平衡に達する。最近、こ

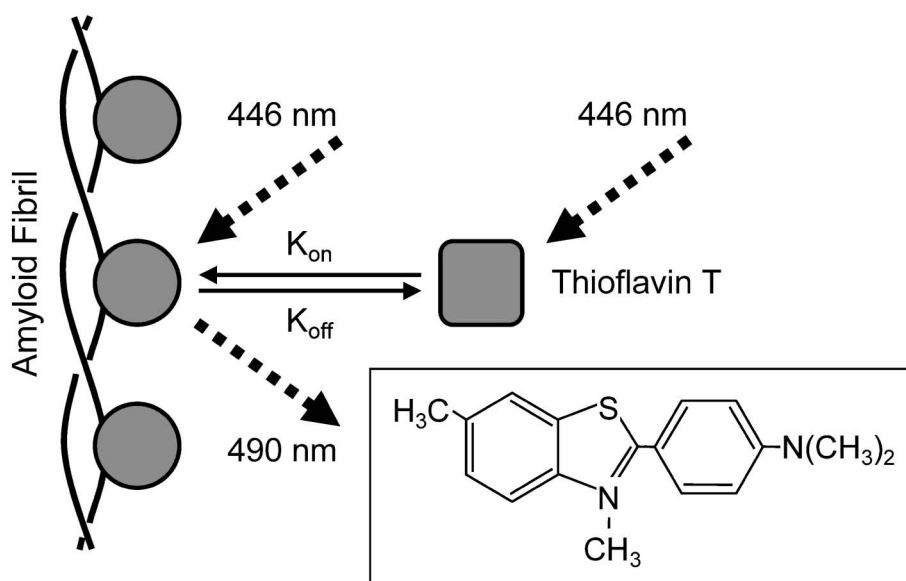


Fig. 1. Principle of Thioflavin T Method

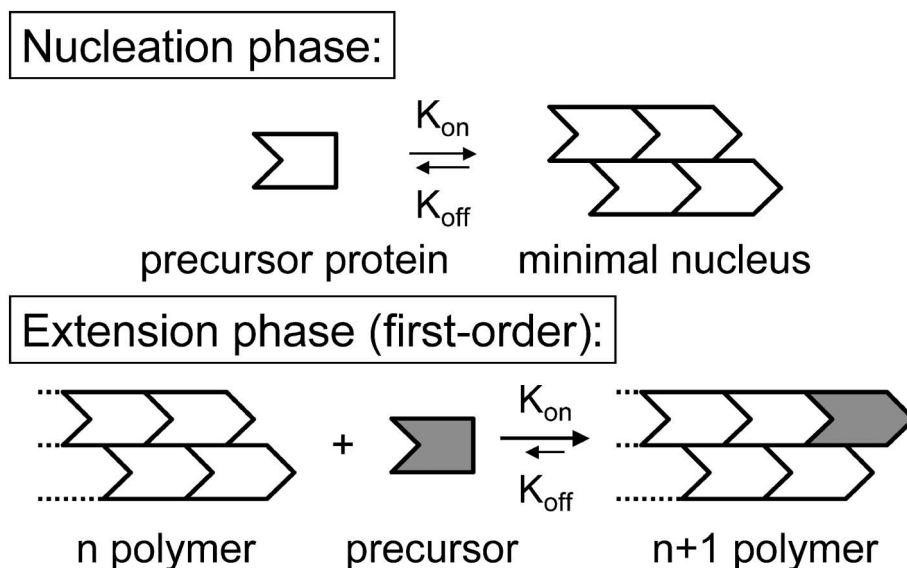


Fig. 2. Nucleation Dependent Polymerization Model of Amyloid Fibril Formation

のモデルが生体レベルでも成り立つことが明らかになった。すなわち、マウス老化 (AApoAII) アミロイドーシス及び AA アミロイドーシスのモデルマウスに、それぞれのアミロイド沈着臓器から精製したアミロイド線維を経静脈的、あるいは経口的に投与したところ、いずれのモデルマウスにおいてもアミロイド沈着が著明に促進され、急激に進行することが報告された。^{6,7)} ヒトプリオン病の伝播機構も、基本的にこのモデルで説明できると考えられている。

3. 抗アミロイド化合物の探索

筆者らは、ポリフェノール環を含む抗酸化剤を中心に、多彩な有機化合物の A β アミロイド線維形成阻害、及び不安定化作用を解析した。⁸⁻¹⁹⁾ Figure 3 に、解析した主要有機化合物の構造式を示す。Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) はクレオソートブッシュに含まれる強力な抗酸化剤、ミリセチンや他のポリフェノール化合物は赤ワインや緑茶に含まれる強力な抗酸化剤である。いずれも共通構造としてポリフェノール環を持っている。Figure 4 に示すように、ミリセチンは A β (1-42) モノマーからのアミロイド線維形成、及び線維伸長反応を抑制した。¹¹⁾ 電顕観察により、ミリセチンを含まない反応溶液では明らかな線維伸長を認めたが、ミリセチンを含む反応溶液では線維伸長を認めなかった。同時に筆者らは、NDGA 及びワイン関連ポリフェノールによる、アミロイド線維形成阻害効果の濃度依存

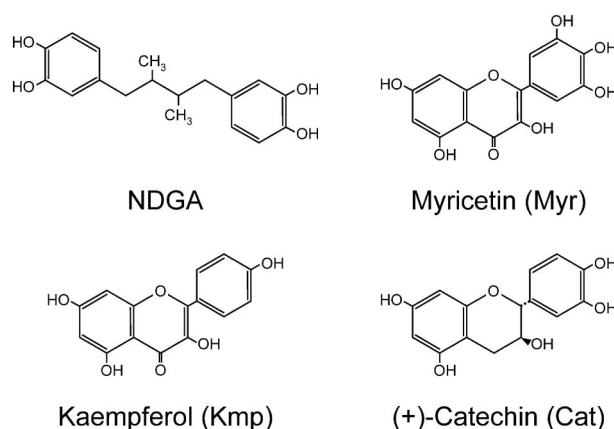


Fig. 3. Various Antioxidants as Candidates of Anti-amyloidogenic Compounds

性を調べた。ここで EC₅₀ 値を、線維形成量をコントロールの 50% に阻害する有機化合物濃度と定義すると、0.1 から 1 μ M のオーダーであった。ここで注目すべきは、反応溶液に含まれる A β ペプチドの濃度が 50 μ M であることである。つまりこれらの有機化合物は、A β ペプチドに対し substoichiometric な濃度で有効であった。

並行して筆者らは、NDGA 及びワイン関連ポリフェノールによる A β アミロイド線維の不安定化効果を調べた。^{9,11)} Figure 5 に示すように、チオフラビン T 蛍光は反応開始直後から低下し、電顕観察により、反応開始 1 時間後には多数の断片化線維を認めた。反応開始 4 時間後には観察できるアミロイ

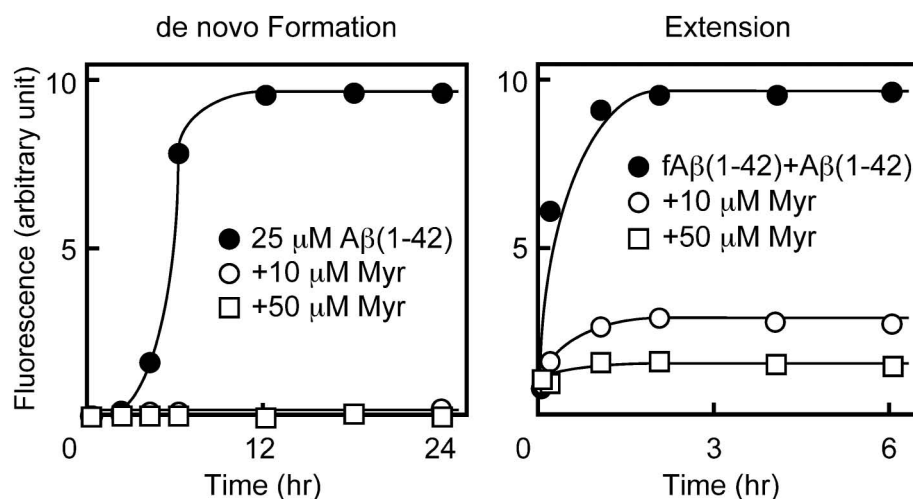


Fig. 4. Inhibition of the *de Novo* Formation and Extension of β -Amyloid Fibrils (1-42) by Myricetin

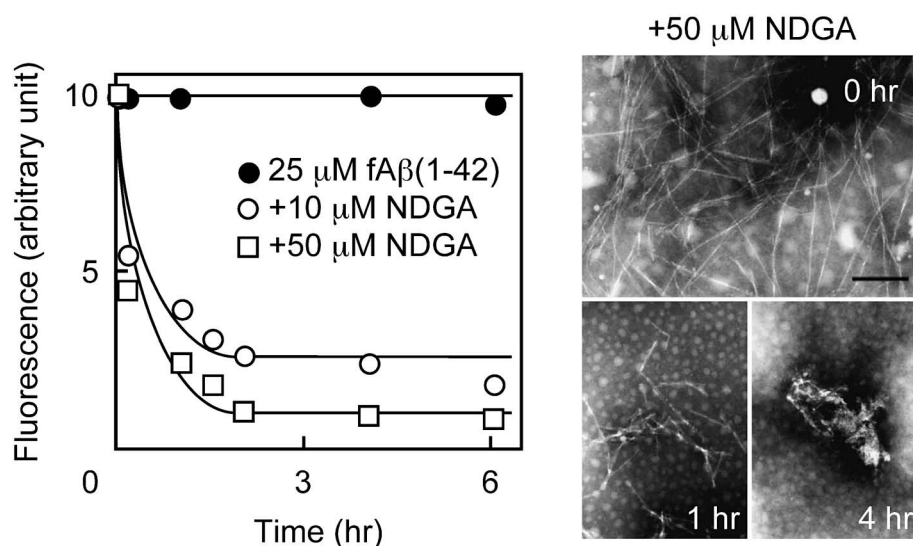


Fig. 5. Destabilization of β -Amyloid Fibrils (1-42) by NDGA

ド線維が減少し、無構造な凝集体を散在性に認めた。NDGA 及びワイン関連ポリフェノールによる、アミロイド線維不安定化効果の濃度依存性を調べたところ、 EC_{50} 値 (アミロイド線維をコントロールの 50% まで不安定化する有機化合物濃度) は 1 から 10 μM のオーダーであった。反応溶液に含まれるアミロイド線維濃度は $A\beta$ ペプチドモノマーに換算して 25 μM であり、NDGA, ミリセチンなど一部の分子は、アミロイド線維を構成する $A\beta$ ペプチドに対し substoichiometric な濃度で有効であった。

以上の結果を基に、筆者らはワイン関連ポリフェノールの構造と抗アミロイド活性の相関を検討した (Fig. 6).¹¹⁾ 抗アミロイド活性の強さは等号、不等

号で示す通りであり、ミリセチン、モリン、クエルセチン、及びカンフェロールの基本骨格は同じで、ポリフェノール環に含まれる水酸基の数は、それぞれ 5, 4, 4, 3 である。したがって、ポリフェノール環に含まれる水酸基の数が多いため、抗アミロイド活性が強いと言える。次に、最初の 4 分子はキラル構造を持たないが、カテキンとエピカテキンはキラル構造を持っている。このような 3 次元分子構造の違いも抗アミロイド活性に影響すると考えられる。

Figure 7 に、筆者らの解析した様々な有機化合物のアミロイド線維形成阻害及び不安定化に対する EC_{50} 値の相関を示す。 EC_{50} 値はいずれもログスケールで表示されており、左下にプロットされる

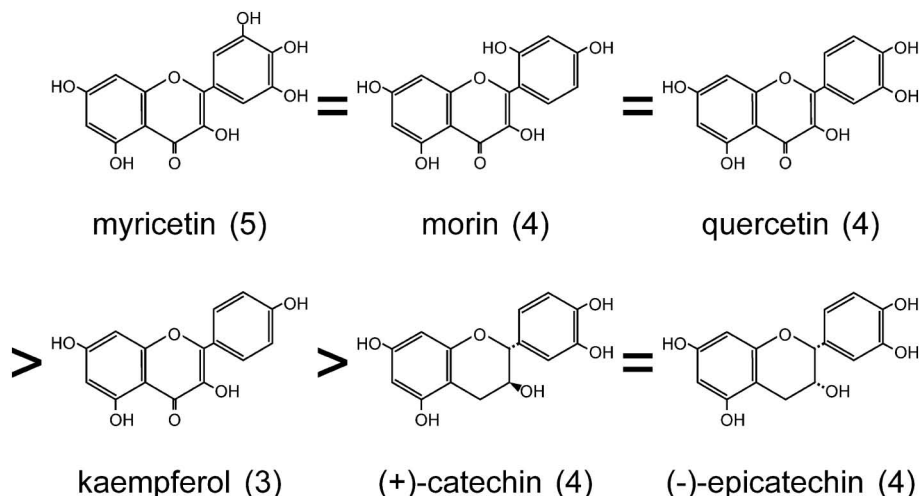


Fig. 6. Structure-activity Relationships of Wine-related Polyphenols

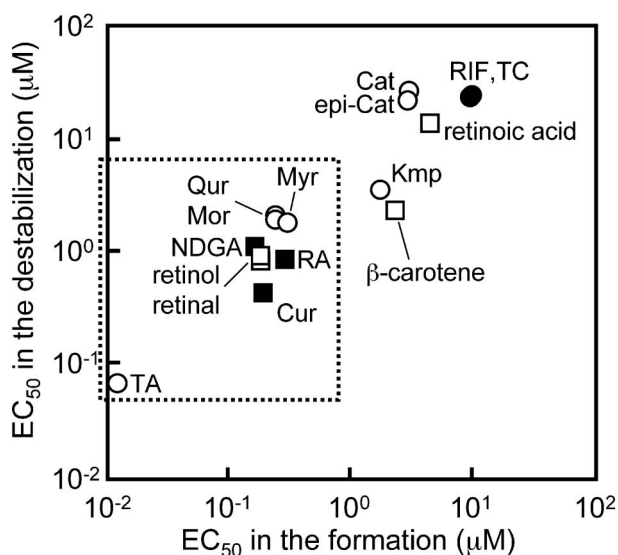


Fig. 7. Correlation of EC_{50} of Various Antioxidants in the Formation and Destabilization of β -Amyloid Fibrils(1-40)
 ■, NDGA and related compounds; ○, wine-related polyphenols; □, vitamin A and related compounds; ●, rifampicin and tetracycline.

程, 抗アミロイド活性が強いことを示す. 点線で囲った分子は, $A\beta$ ペプチドに対し substoichiometric な濃度で有効であった. $A\beta$ (1-42) 線維に対しても同様のデータを得ている.

4. 抗アミロイド機構の探索

以上のデータを踏まえ筆者らは, 代表的抗アミロイド化合物である NDGA とミリセチンに焦点を絞り, 抗アミロイド効果のメカニズムを探索した. 現在, 多様な有機化合物が抗アミロイド効果を発揮するメカニズムはほとんど知られておらず, 研究は萌芽期にある. これまでに, フラボノイド化合物のバ

イカレインが α シヌクレインに共有結合し, α シヌクレインをオリゴマーの状態にトラップすることにより, アミロイド線維形成を阻害するという報告がある一方,²⁰⁾ ドーパミンが α シヌクレインモノマーの特異的結合部位に可逆的に結合し, その立体構造を変化させることによりアミロイド線維形成を阻害するという報告もなされている.²¹⁾

筆者らはまず, NDGA やミリセチンで不安定化した $A\beta$ アミロイド線維を dimethylsulfoxide で溶解し, 溶出した $A\beta$ ペプチドを MALDI-TOF マスペクトルにより解析したが, $A\beta$ ペプチドの脱水, 酸化やオリゴマー化は認められず, NDGA やミリセチンの $A\beta$ ペプチドへの共有結合も認められなかった. これらのデータは, NDGA やミリセチンが $A\beta$ ペプチドに非共有結合性に結合することにより, 抗アミロイド活性を発揮することを示唆している.

次に筆者らは, ミリセチンの $A\beta$ ペプチドモノマー, $A\beta$ アミロイド線維それぞれに対する親和性を, ビアコアバイオセンサーを用いて解析した (Fig. 8).²²⁾ センサーチップ上に固相化した $A\beta$ アミロイド線維に対し, ミリセチンは濃度依存性に, 高親和性の結合・解離を示した. 一方, センサーチップ上に固相化した $A\beta$ ペプチドモノマーに対しては, 非常に弱い結合しか示さなかった. 以上のデータは, ミリセチンが, $A\beta$ ペプチドモノマーの一次構造ではなく, $A\beta$ アミロイド線維の立体構造, 恐らくひだ状 β シート構造に特異的かつ可逆的に結合することにより, 抗アミロイド活性を示すことを

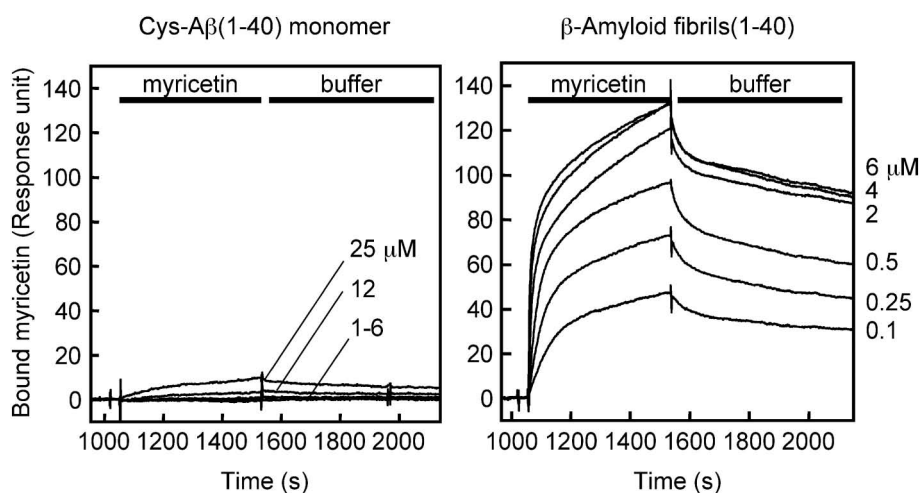


Fig. 8. Myricetin Preferentially and Reversibly Bound to the Amyloid Fibril Structure of β -Amyloid Fibrils(1-40)

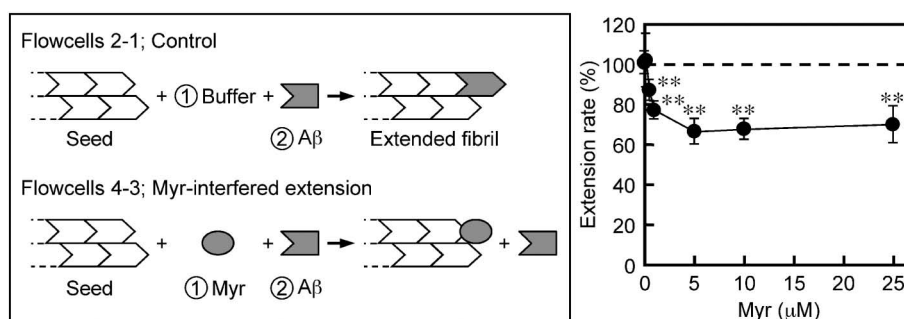


Fig. 9. SPR Analysis of the Effect of Myricetin on the Extension of β -Amyloid Fibrils(1-40)

示唆している。

最後に筆者らは、アミロイド線維の伸長初速度に対するミリセチンの影響を、ピアコアを用いて解析した (Fig. 9).²²⁾ ミリセチンのアミロイド線維伸長阻害機構として、ミリセチンが伸長線維断端に結合し、重合速度を低下させること、あるいはミリセチンが伸長線維断端に結合し、重合したばかりの $A\beta$ ペプチドを不安定化することにより、脱重合速度を増加させること等が考えられる。まず、センサーチップ上にシードとなる $A\beta$ アミロイド線維を固相化し、フローセル 2-1 にはバッファーを、フローセル 4-3 にはミリセチン溶液を添加した。ついで、それぞれのフローセルに同濃度の $A\beta$ ペプチド溶液を添加し、それぞれのフローセルにおける伸長初速度を比較したところ、 $0.5 \mu\text{M}$ 以上のミリセチンを添加した場合、伸長初速度はコントロールに比し有意に低下した。これらのデータは、ミリセチンが伸長線維断端に結合し、 $A\beta$ ペプチドモノマーが伸長断端

に結合することを阻害することにより、重合速度を低下させることを示唆している。今後、様々な有機化合物が示す抗アミロイド活性のメカニズムを、NMR を中心とする構造生物学的手法を導入しながら解析していくことが不可欠である。

5. モデル動物での検証と臨床応用

このテーマに関する系統的レビューは本総説の目的ではなく、ここでは筆者らの試験管内実験に関連する数件の報告を紹介するに留める。クルクミンの抗アミロイド効果に関する筆者らの報告に続き、¹²⁾ クルクミンがアルツハイマー病モデルマウスの脳血管関門を超えて老人斑に結合すること、及びアミロイド沈着を減少させることが報告された。²³⁾ クルクミンのアルツハイマー病患者に対する臨床治験に期待が寄せられたが、残念ながら有意な効果を認めることができなかった。²⁴⁾ 最近 UCLA の Teplow グループは、葡萄由来ポリフェノールが $A\beta$ ペプチドのオリゴマー化やアミロイド線維形成を抑制し、ア

ルツハイマー病モデルマウスの脳実質への A β オリゴマー沈着を抑制するとともに、認知機能低下も抑制することを報告している。^{25,26)} 近い将来、周到に計画された臨床治験が待望される。

REFERENCES

- 1) Selkoe D. J., *Physiol. Rev.*, **81**, 741–766 (2001).
- 2) Hardy J., Selkoe D. J., *Science*, **297**, 353–356 (2002).
- 3) Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T., *Anal. Biochem.*, **177**, 244–249 (1989).
- 4) Johnson K. A., Gregas M., Becker J. A., Kincom C., Salat D. H., Moran E. K., Smith E. E., Rosand J., Rentz D. M., Klunk W. E., Mathis C. A., Price J. C., Dekosky S. T., Fischman A. J., Greenberg S. M., *Ann. Neurol.*, **62**, 229–234 (2007).
- 5) Naiki H., Gejyo F., *Methods Enzymol.*, **309**, 305–318 (1999).
- 6) Xing Y., Nakamura A., Chiba T., Kogishi K., Matsushita T., Li F., Guo Z., Hosokawa M., Mori M., Higuchi K., *Lab. Invest.*, **81**, 493–499 (2001).
- 7) Lundmark K., Westermarck G. T., Nyström S., Murphy C. L., Solomon A., Westermarck P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6979–6984 (2002).
- 8) Naiki H., Hasegawa K., Yamaguchi I., Nakamura H., Gejyo F., Nakakuki, K., *Biochemistry*, **37**, 17882–17889 (1998).
- 9) Ono K., Hasegawa K., Yoshiike Y., Takashima A., Yamada M., Naiki H., *J. Neurochem.*, **81**, 434–440 (2002).
- 10) Ono K., Hasegawa K., Yamada M., Naiki H., *Biol. Psychiatry*, **52**, 880–886 (2002).
- 11) Ono K., Yoshiike Y., Takashima A., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *J. Neurochem.*, **87**, 172–181 (2003).
- 12) Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *J. Neurosci. Res.*, **75**, 742–750 (2004).
- 13) Ono K., Yoshiike Y., Takashima A., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *Exp. Neurol.*, **189**, 380–392 (2004).
- 14) Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Basis of Disease*, **1690**, 193–202 (2004).
- 15) Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**, 111–116 (2005).
- 16) Hirohata M., Ono K., Naiki H., Yamada M., *Neuropharmacology*, **49**, 1088–1099 (2005).
- 17) Ono K., Hasegawa K., Naiki H., Yamada M., *Neurochem. Int.*, **48**, 275–285 (2006).
- 18) Ono K., Hamaguchi T., Naiki H., Yamada M., *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Basis of Disease*, **1762**, 575–586 (2006).
- 19) Ono K., Naiki H., Yamada M., *Curr. Pharm. Des.*, **12**, 4357–4375 (2006).
- 20) Zhu M., Rajamani S., Kaylor J., Han S., Zhou F., Fink A. L., *J. Biol. Chem.*, **279**, 26846–26857 (2004).
- 21) Norris E. H., Giasson B. I., Hodara R., Xu S., Trojanowski J. Q., Ischiropoulos H., Lee V. M., *J. Biol. Chem.*, **280**, 21212–21219 (2005).
- 22) Hirohata M., Hasegawa K., Tsutsumi-Yasuhara S., Ohhashi Y., Ookoshi T., Ono K., Yamada M., Naiki H., *Biochemistry*, **46**, 1888–1899 (2007).
- 23) Yang F., Lim G. P., Begum A. N., Ubeda O. J., Simmons M. R., Ambegaokar S. S., Chen P. P., Kaye R., Glabe C. G., Frautschy S. A., Cole G. M., *J. Biol. Chem.*, **280**, 5892–5901 (2005).
- 24) Baum L., Lam C. W., Cheung S. K., Kwok T., Lui V., Tsoh J., Lam L., Leung V., Hui E., Ng C., Woo J., Chiu H. F., Goggins W. B., Zee B. C., Cheng K. F., Fong C. Y., Wong A., Mok H., Chow M. S., Ho P. C., Ip S. P., Ho C. S., Yu X. W., Lai C. Y., Chan M. H., Szeto S., Chan I. H., Mok V., *J. Clin. Psychopharmacol.*, **28**, 110–113 (2008).
- 25) Wang J., Ho L., Zhao W., Ono K., Rosenzweig C., Chen L., Humala N., Teplow D. B., Pasinetti G. M., *J. Neurosci.*, **28**, 6388–6392 (2008).
- 26) Ono K., Condrón M. M., Ho L., Wang J., Zhao W., Pasinetti G. M., Teplow D. B., *J. Biol. Chem.*, **283**, 32176–32187 (2008).