

セマフォリン阻害剤による 中枢神経再生

住友製薬(株)

研究本部

熊谷和夫
菊地薫
岸野晶祥
細谷宜生
伊藤彰
佐治幾太郎
木村徹

Nerve Regeneration in the Central Nervous System by a Semaphorin Inhibitor

Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.
Research Division

Kazuo KUMAGAI
Kaoru KIKUCHI
Akiyoshi KISHINO
Nobuo HOSOTANI
Akira ITO
Ikutaro SAJI
Toru KIMURA

It is well known that injured neurons in the central nervous system have only limited capability to regenerate and recover neurological function. We identified a low molecular weight compound, SM-216289, from cultured broth of a fungus isolated from the soil of the Osaka Castle Park as a new semaphorin inhibitor. SM-216289 completely inhibits semaphorin activity at less than 1 μ M *in vitro*. The compound could accelerate neuro-regeneration in the central nervous system *in vivo*. Semaphorin inhibitors may become innovative drugs to enhance nerve regeneration after spinal cord or brain injury^{1,2)}.

はじめに

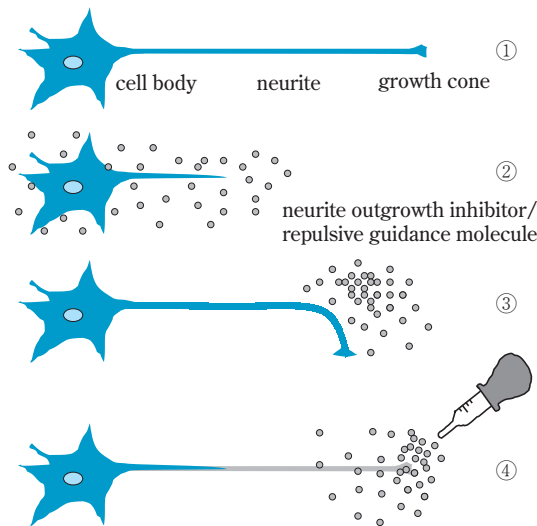
よく知られているように脳や脊髄といった中枢神経組織では損傷によって被った機能障害からの回復は非常に困難である。そのために交通事故などによる外因性の脊髄損傷だけに限っても日本で年間3,000 - 4,000人、世界では数万人が四肢麻痺などの重篤な身体機能障害を負っている。これは中枢神経系においては、神経信号を伝達する線維構造である神経軸索が再生しないことが原因であり、このことはすでに19世紀には知られていた。しかし、1980年代初頭にカナダの研究者Aguayoによって中枢神経でも軸索自体は再生能力を保持していることが突き止められ、生体内で再生が起こらないのは神経細胞の能力の問題ではなく、むしろ脳や脊髄に存在する再生阻害物質（神経伸長阻害因子）が原因であることが示された³⁾。以来、その伸長阻害因子を突き止め、それを抑制する方法を開発することで不治の障害に治療の道が開けるのではないかと

との仮定のもとに多数の研究がなされてきた。現在までに脳や脊髄中で軸索再生阻害活性を示すと報告されている物質も少なくない⁴⁾。しかしながら、一体その中のどれを抑制するとAguayoが示唆したような中枢神経を再生させるのに有効であるかについては未だに明らかになっていない。

中枢神経の再生阻害物質の研究が進む一方で、発生生物学の分野では胎児期の神経回路網形成メカニズムの研究が進められ、軸索（未成熟な状態では単に神経突起と呼ばれる）の伸長を抑制する因子が神経回路網形成の過程で重要な働きをすることが見いだされ、反発性のガイダンス分子と呼ばれて研究が進められてきた⁵⁾。我々はこの反発性ガイダンス分子の一種であるセマフォリン3A（Sema3A）が非常に強い神経伸長阻害作用を持つこと、また、神経回路網形成が終わっているはずの成体の中枢神経系にもSema3Aが強く発現していることなどに着目し、Sema3Aの抑制によって中枢神経の再生を促進できる

のではないかと考え、10年前から研究を進めてきた (Fig. 1)。(以下、単にセマフォリンと述べた場合は Sema3A を指す。)

最近になってようやく、我々は、大阪城公園の土壌から単離した新規糸状菌 (カビ) がセマフォリン阻害物質 SM-216289 を産生することを見いだすことに成功し、さらに、SM-216289 を用いて生体内のセマフォリンを阻害することによって中枢神経系の軸索再生が促進されることを世界で初めて証明したので報告する^{1), 2)}。



1. Neurons extend long neurites from their cell bodies. A fan-like structure called growth cone is observed at the tip of each neurite. 2. In the presence of neurite outgrowth inhibitor or repulsive axon guidance molecules, neurite growth is inhibited. 3. When growing neurites encounter a gradient of repulsive molecules, the neurites make a turn to avoid higher concentration of repulsive molecules. 4. Growth cones are collapsed and neurites are retracted by exposure of neurite outgrowth inhibitor or repulsive axon guidance molecules onto growing neurite.

Fig. 1 Effect of neurite outgrowth inhibitor and repulsive axon guidance molecules to neurite extension

セマフォリン阻害剤のスクリーニングと活性化合物の発見

我々が、セマフォリンを阻害すれば神経は再生するのではないかと思いついた当時、セマフォリンに限らず神経伸長阻害因子に対する低分子阻害剤は全く知られておらず、そのようなものが存在するかどうかさえわかっていなかった。唯一、Nogo という神経伸長阻害蛋白質に対する中和抗体が報告されていたが⁶⁾、これは高分子蛋白質であり、医薬品を目指すにはやはり低分子化合物を探そうということになった。そこで我々は、セマフォリン阻害低分子化合物

を見いだすため、自社の化合物ライブラリ及び天然物ライブラリのスクリーニングを行うことにした。セマフォリンの活性を完全に阻害する物質を見つけるため、実際のスクリーニングは、発育鶏卵胚から顕微鏡下で採取した後根神経節 (DRG) と呼ばれる神経組織 (5,000 ~ 10,000 個の知覚神経細胞からなる 1mm にも満たない組織片) を 96 穴プレートに培養し、それに組換え細胞を用いて調製したセマフォリン蛋白質と被験サンプルとを加えて 37 °C で 1 時間作用させ、神経突起の退縮の有無を 1 ウェルずつ顕微鏡観察するという手間のかかる手法を採用し、最終的に 10 数万検体のサンプルをスクリーニングした。その結果、大阪城公園で採取した土壌から分離された 1 株のカビの培養液エキスに最も強いセマフォリン阻害活性を認めた。化合物ライブラリからも何検体かヒットするものはあったが、それらはいずれも活性が弱く、この天然物の活性は際立っていた。活性をさらに評価する目的で、セマフォリンを 48 時間作用させる 2 次スクリーニングの系にかけたところ、この系でも極めて明瞭なセマフォリン阻害活性が認められた。しかも驚くべきことに、活性を示す 1,000 倍の濃度でも細胞毒性は全く認められなかった。そこで、このカビ SPF-3059 株からの活性成分の単離に着手した。この活性成分は有機溶媒に可溶で、限外ろ過でも分

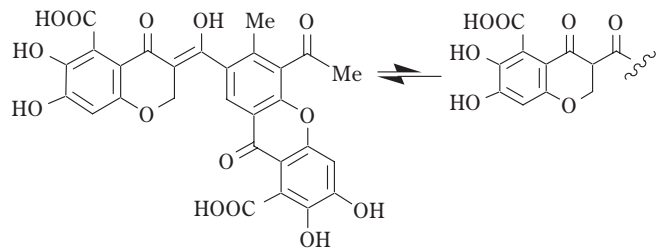


Fig. 2 Structure of SM-216289 (xanthofulvin)

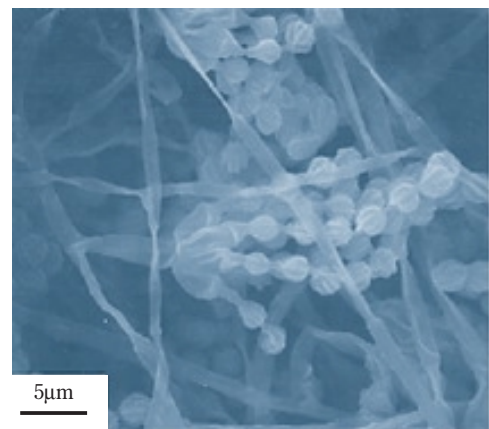


Fig. 3 Scanning electron micrograph of *Penicillium* sp. SPF-3059

子量数千以下と予想されたことから蛋白質やペプチドのような高分子のものではなく、期待通りの低分子有機化合物であると考えられた。大量培養を行い、HPLC等を用いた単離精製の結果、既知化合物3成分を含む32個の新規活性化化合物が単離された。微量な成分もあったため、これら全てを単離するには1年以上を要した。最も活性が強い成分は約100nMのIC₅₀値を示した。UV、IR、MS、NMRを用いた構造解析により、最終的にほぼ全ての成分の構造式を決定することができ、いずれもキサントン及びクロモン構造を持つ化合物であることが明らかとなった。活性成分の代表例としてSM-216289 (xanthofulvin) の構造式をFig. 2に示す。なお、本生産菌株SPF-3059株はその菌学的特徴から、不完全菌類 *Penicillium* sp. と同定された (Fig. 3)。

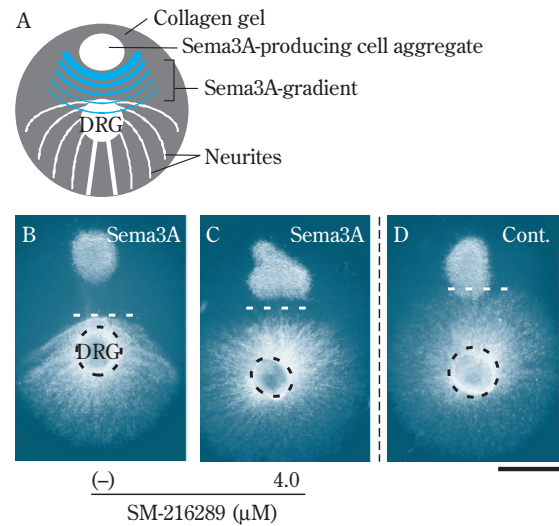
in vitroにおけるSM-216289のセマフォリン阻害作用検討

スクリーニングで同定された化合物について、セマフォリン阻害作用の持続性、既知阻害剤との比較など特徴づけを目的として *in vitro*における薬効評価を行った。

1次スクリーニングに用いたアッセイ系 (コラプスアッセイ) は培養神経細胞の神経突起先端の局所で生じる短時間の反応を検出する実験系であったので、より生体内に近い実験系であるコラーゲン共培養法⁷⁾でSM-216289の活性を調べた。生体内で伸長過程にある神経突起/軸索はセマフォリンが存在する場所に近づくと伸長が止まる、あるいは反発を受けるが (Fig. 1)、コラーゲン共培養法ではこれが再現できる。神経細胞の集まりであるDRGとセマフォリン発現細胞塊をコラーゲン内で0.5 ~ 1.0mmの間隔をおいて培養すると、セマフォリン発現細胞塊から分泌されるセマフォリンは拡散が制限されるコラーゲン内では濃度勾配を形成することになり、DRGから伸長する神経突起はセマフォリンの反発作用を受けてセマフォリン発現細胞の反対側のみに伸長することになる (Fig. 4-A, B)。セマフォリンが存在しない場合は、Fig. 4-Dに示すように神経突起は同心円状に伸長する。SM-216289を添加して培養した場合、セマフォリンによる反発が抑制され、同心円状の神経突起伸長が観察された (Fig. 4-C)。2日間の培養期間中、常にセマフォリンに晒される状態でありながらも、その間、ほぼ完全に反発活性が阻害されていたことになる。すなわち、我々の見いだしたSM-216289は強力かつ持続的なセマフォリン阻害活性を有するものであることがわかった。

セマフォリンの作用発現に関わる細胞内シグナル

伝達経路はまだ十分に解明されていないが、最近いくつかのキナーゼ阻害剤がセマフォリンのシグナル伝達を阻害することが報告された⁸⁾。しかしながら、それらは部分的にセマフォリンの活性を阻害するのみで細胞に対する傷害性もあり、SM-216289のような医薬品候補としての特性を備えていない。



(A) A schematic representation of collagen gel co-culture assay. When a cell aggregate of Semaphorin 3A-producing cells (Sema3A-Cell) and DRG are cultured in collagen gel matrix, concentration gradient of Semaphorin 3A is formed around the Sema3A-Cell due to difficulty of diffusion of the Semaphorin 3A in the matrix. Neurites extending from DRG explant are repelled by Semaphorin 3A and can only grow avoiding Sema3A-Cell. (B)-(D) DRG and cell aggregate were co-cultured in collagen gel matrix. (B) Repulsion of the neurites was observed without SM-216289. (C) In the presence of SM-216289 neurites could grow even toward Sema3A-Cell, and radial extension of the neurites was observed. (D) Radial extension of the neurites was observed, when DRG was co-cultured with control (non-Semaphorin 3A producing) cell-aggregate. Dashed-circle indicates the location of explanted DRG. Dashed-line indicates the position of neurite tips extending in the direction of cell-aggregate. Scale bar: 0.5 mm.

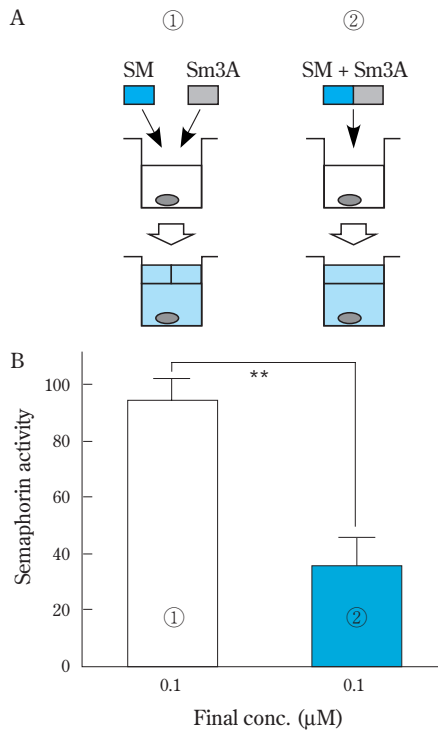
Fig. 4 SM-216289 inhibits the repulsive activity of Semaphorin 3A.

作用メカニズム解析

セマフォリン活性を100%阻害する一方で細胞に対する傷害性が極めて少ないSM-216289はどのようなメカニズムでセマフォリン阻害活性を発揮するのかについて検討した。

セマフォリンの作用発現 (成長円錐退縮、軸索反発) は、セマフォリン蛋白質が神経細胞上の受容体に結合することから始まる。受容体からのシグナルは、細胞内に伝達され、さらに増幅されて最終的に細胞骨格の脱重合を引き起こす。SM-216289は、そ

の一連の過程のどこかで作用してセマフォリンの機能を阻害しているはずである。ここでは詳細は割愛するが、作用メカニズム解析の予備的な実験から、SM-216289 が細胞の外で作用していると推察できる結果を得た。言い換えると、標的分子はセマフォリン蛋白質そのものかあるいはその受容体のどちらかであるということになる。そのどちらであるかを特定するために、コラプスアッセイを利用した以下に記載する実験を行った (Fig. 5)。Fig. 5-A に示すように、①：SM-216289 とセマフォリンを別々に培養神経に添加、あるいは、②：SM-216289 とセマフォリンの混合物を培養神経に添加し、この①、②間でセマフォリン阻害を比較するというものである (ただし、SM-216289 の最終濃度は、①の方法でセマフォリン阻害が認められない濃度である)。①と②で最終の培養条件は全く同一になるよう設定しているに

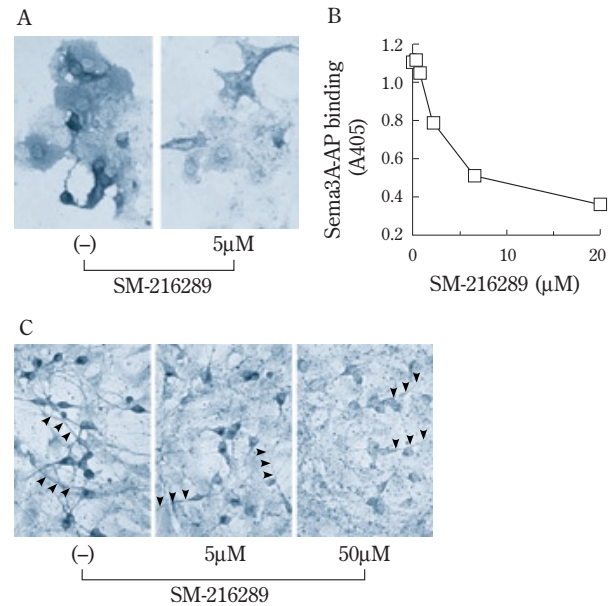


(A) A schematic representation of experimental procedures. ①: SM-216289 and Sema3A (Sm3A) are independently added to the assay medium. ②: Sema3A was pre-incubated with 0.5 μM of SM-216289 before addition to the assay medium. Final concentration of Sema3A and SM-216289 were identical in both cases (3 units/ml Sema3A and 0.1 μM SM-216289). (B) Collapse activities of Sema3A observed in procedure-① and procedure-② are shown. In the procedure-①, Sema3A was not inhibited. However, in the procedure-②, significant Sema3A-inhibition was observed, although final condition was identical to the procedure-①. Thus, incubation of Sema3A with higher concentration of SM-216289 was crucial to inhibit activity of Sema3A, suggesting that SM-216289 directly targets Sema3A. ** Student's *t*-test: $P < 0.01$.

Fig. 5 SM-216289 directly targets Sema3A.

もかわらず、①ではセマフォリン阻害が認められず、②では阻害が認められるという結果が得られた。この結果は、Sema3A と SM-216289 を混合した時点でセマフォリン阻害が生じており (混合物中の SM-216289 は阻害活性を示す濃度)、その阻害効果が培養神経への添加後 (SM-216289 は無作用濃度まで希釈される) も持続していると考えられることができる。すなわち、SM-216289 の標的分子はセマフォリン蛋白質であると考えられることができる。

続いて、SM-216289 がセマフォリンの受容体結合を実際に阻害するかどうかを検討した。受容体のセマフォリン結合コンポーネントである Neuropilin-1 を発現する COS7 細胞 (NP1-COS) に対する結合への作用を検討した結果、SM-216289 はセマフォリンの Neuropilin-1 への結合を阻害することが明らかとなった (Fig. 6-A, B)。さらに Neuropilin-1 以外の受容体コンポーネントも含み機能的なセマフォリン受容体を発現する初代培養神経細胞に対する結合を阻害するかどうかについても検討したところ、この場合も同様に SM-216289 によってセマフォリンの神経細胞への結合が阻害された (Fig. 6-C)。



(A) Alkaline phosphatase-fused Sema3A (Sema3A-AP) could bind to COS cells expressing a Sema3A receptor component, neuropilin-1 (NP1-COS), and were stained black. But in the presence of SM-216289, the binding was significantly inhibited, which could be seen as faint staining. (B) Quantitative measurements of the inhibition of Sema3A-AP binding to NP1-COS by SM-216289. SM-216289 inhibited Sema3A-AP-binding in a dose dependent manner. (C) SM-216289 also inhibited binding of Sema3A-AP to DRG neurons, in which functional Sema3A receptor was expressed. Arrowheads in (C) indicate neurites.

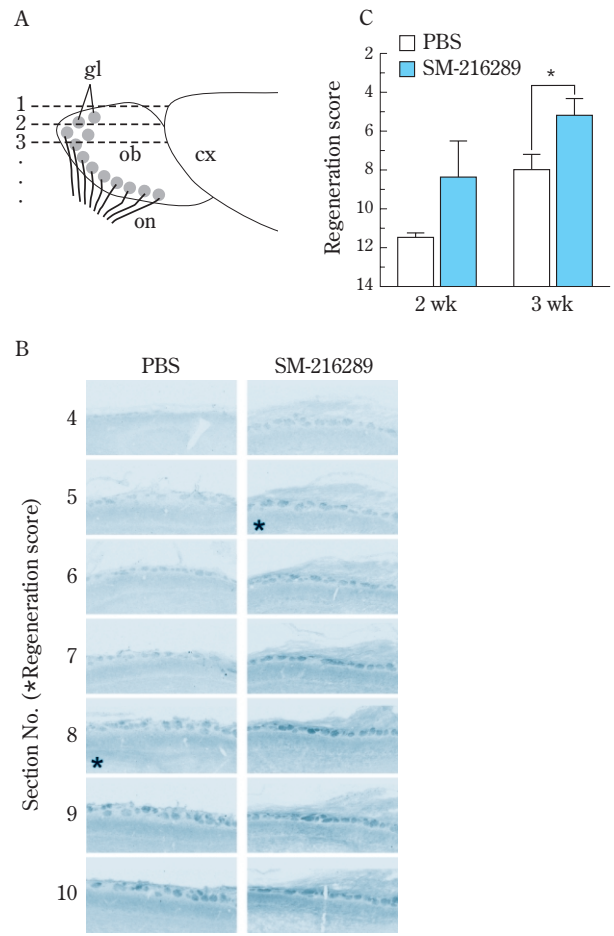
Fig. 6 SM-216289 inhibits binding of Sema3A to its receptor.

以上の検討の結果、SM-216289はセマフォリン蛋白質に直接結合し、受容体への結合能を低下させることによって阻害作用を發揮していることが明らかになった。

SM-216289による嗅神経再生の促進

最初に述べたように、成体の中枢神経は傷害に対して脆弱であり、損傷後の軸索の再伸長はほとんど望めない。1990年代の終わりごろから傷害後の損傷部位でセマフォリンの発現が惹起されるという報告が次々となされるようになり、この再生不良にセマフォリンが関わっているのではないかと世間でも考えられるようになってきた⁹⁾。そこで我々は、セマフォリン阻害によって神経再生が促進することを示すためにセマフォリンの発現が報告されているいくつかの神経障害モデルの中から、嗅神経の神経傷害モデルに注目し、SM-216289を投与することによって損傷部位のセマフォリンを阻害し、その結果として神経再生が促進されるかどうかを検証することとした。(嗅神経：鼻粘膜上の匂いを感知する神経細胞が脳の嗅球と呼ばれる部位に連絡する神経線維を指す。末梢神経に分類されるが、線維は中枢神経組織(嗅球)を走行する。嗅神経切断モデルにおいても損傷部位でセマフォリンが顕著に上昇するという報告がなされている。さらに胎児嗅神経はセマフォリンに感受性であることがわかってきた。)脳や脊髄の中枢神経傷害モデルでは再生がほとんど起こらないために薬効評価が困難になる可能性があるが、嗅神経はもともと再生能を持っており¹⁰⁾、再生速度の亢進に着目することで薬効評価を比較的容易に行えるのではないかと考えた。再生速度も速いことから、比較的短期間(2~3週間)での評価が可能である点もメリットである。

ラットの嗅神経を切断し、損傷部位に浸透圧ポンプを用いてSM-216289を連続的に投与した。嗅神経切断の2週間および3週間後に鼻腔にトレーサー(WGA-HRP: wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase conjugate)を投与した後、脳を摘出した。トレーサーを可視化することにより、嗅神経の再生状態を調べると、SM-216289投与群での再生は、非投与群に比べ有意に亢進していた(Fig. 7)。この結果は、SM-216289が損傷後に上昇したSema3Aの作用を抑制し、実際に神経軸索を再伸長させることを示し、セマフォリン阻害剤が、神経損傷治療薬になる可能性を示唆するものであった。さらに、この実験結果は、セマフォリンが生体内において神経再生を抑制していることを実際に確認したという観点からも重要である。これまで、神経損傷時にセマフォリンが発現



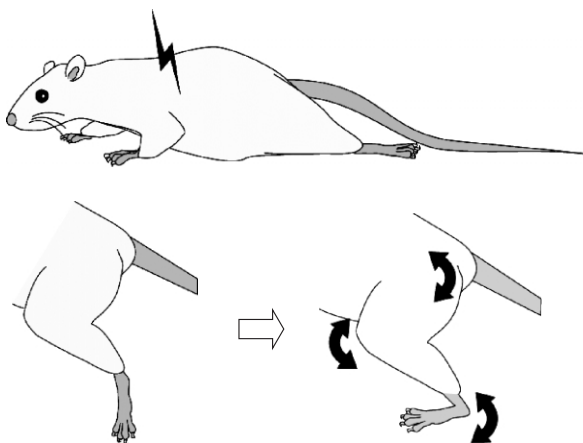
Olfactory nerves of rats were axotomized, and PBS or SM-216289 was locally administered into injury sites for two or three weeks. Regenerated olfactory nerves were stained and the level of regeneration was quantified by scoring. (A) Schematic representation of our scoring method. Regenerating nerves grow from bottom to top in this figure. Horizontal sections (30µm thickness) were prepared from top to bottom of the olfactory bulb, and the number of the first section in which regenerated nerves were used as regeneration score. Note that smaller scores indicate faster regeneration. (B) A series of sections from PBS- (left) and SM-216289- (right) treated rats (3 weeks) are shown. Asterisks indicate the first section in which regenerating nerves were detected in each treatment. Scale bar: 300µm. gl; glomerulus, ob; olfactory bulb, on; olfactory nerve (growing bottom to top), cx; cerebral cortex. (C) Graphical view of the results. Acceleration of olfactory nerve regeneration by SM-216289 treatment was statistically significant. Regeneration scores are presented as the mean ± SEM (2 wk: PBS; n = 4, SM-216289; n = 3, 3wk: PBS; n = 4, SM-216289; n = 5). * Student's *t*-test: *P*<0.05.

Fig. 7 SM-216289 promotes regeneration of axotomized olfactory nerves in rat

誘導されることは複数の実験モデルの例で示されていたが、そのセマフォリンが実際に神経再生を抑制しているのかどうかは検証されていなかった。ここで紹介した結果は、成体神経におけるセマフォリンの機能を証明した世界で初めての例となった²⁾。

セマフォリン阻害剤の今後の展望

本稿ではセマフォリン阻害剤の *in vivo* における作用として、ラットにおける嗅神経再生を紹介したが、現在、セマフォリン阻害剤の臨床応用として、最も期待されているのは脊髄損傷である。言うまでもなく、脊髄損傷は最も重篤な神経変性疾患の一つであり、重症であれば、一命を取り留めても四肢麻痺をはじめとする運動、感覚、自律神経障害が起こる。軽症でも種々の神経機能不全が残る場合が多い。現在のところ有効な治療法はなく2次的な炎症を抑えるための急性時ステロイド投与が唯一の薬剤治療である。このため、新しい脊髄損傷の治療方法が熱望されており、薬剤治療の他、最近では各種細胞の移植による再生医療的な治療も基礎的な研究が進んでいる。最近の研究では脊髄損傷では損傷部において Sema3A が過剰に発現しており、神経線維の再生を阻害していると考えられている。そこで我々は、慶應義塾大学医学部の岡野栄之教授との共同研究により、動物モデルにおける脊髄損傷に対するセマフォリン阻害剤の有効性を検討した。ラット脊髄に対して人工的に損傷を与えた後、SM-216289 を髄腔内損傷部に持続投与し、運動機能の変化を調べた。その結果、運動機能の回復は SM-216289 投与群の方が PBS 投与群よりも有意に勝っていた (Fig. 8)。さらに、このときの脊髄内を組織学的に調べると、SM-216289 投与した動物では、多数の神経線維の再伸長が観察された。これよりセマフォリン阻害剤は脊髄損傷後の回復を促進する可能性を持つことが示された¹¹⁾。これらの結果は多くの新聞で取り上げられるなど、大きな注目を浴びている。また、最近になり網膜神経の細胞死にもセマフォリンが関与しているとの報告も



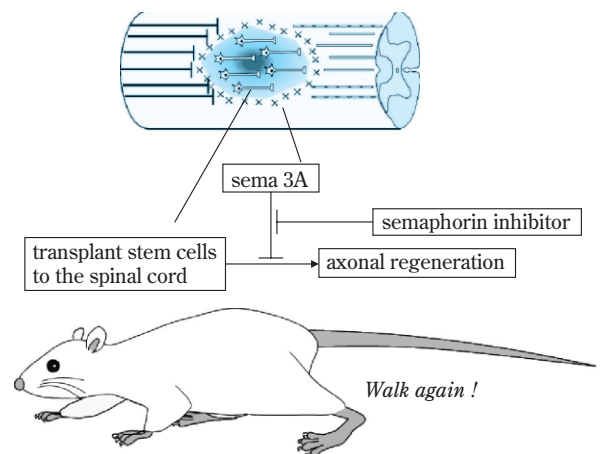
In rat spinal cord injury models, SM-216289 was administered in the proximity of the injury site by osmotic mini-pump. SM-216289 promoted recovery in the motor function of hind limb.

Fig. 8 Functional recovery by SM-216289

出ており¹²⁾、セマフォリン阻害剤の適用疾患が更に広がる可能性もある。

一方で、近年研究が盛んなES細胞や神経幹細胞の移植療法は、将来的に脊髄損傷の有望な治療方法になると考えられている。失った神経細胞を直接補充する再生医療は、神経変性疾患の根本的な治療方法と期待されている。我々はこれら再生医療の場でも、セマフォリン阻害剤は特に有効であると考えている。すなわち、中枢神経の損傷部位へ幹細胞を移植しても、これらの細胞から新たな神経線維が伸長し、宿主への神経回路を形成しなければ神経機能の回復は起こらない。しかし、移植部位周辺では、損傷による影響が残っており、セマフォリンをはじめとした神経伸長を阻害する因子が大量に発現している可能性がある。この場合、移植細胞から発芽した神経線維は阻害因子のため宿主の神経実質には伸長できないことになる。このとき細胞移植にセマフォリン阻害剤を併用すれば、再生線維はセマフォリン発現部位を越えて宿主の組織に伸び、新たな神経回路を形成できると期待される。今回紹介したセマフォリン阻害剤は、これら新しい移植療法を伴う再生医療の場においても優れた機能を発揮するものと期待される (Fig. 9)。

セマフォリン阻害剤は、これまで有効な治療法がほとんど無い疾患を対象にした新規作用メカニズムの化合物であるため克服すべき課題も多い。しかし、我々はセマフォリン阻害剤の既存医薬品にはない多くの優れた特性が、新しい難病治療につながることを信じ、実際の医薬品として開発するための検討を多方面より進めているところである。



Semaphorin inhibitor promotes the axonal elongation from the transplant cells into the spinal cord by inhibits the activity of semaphorin in the injury site.

Fig. 9 Application of semaphorin inhibitor in the stem cell implantation

謝辞

脊髄損傷モデル動物に対するセマフォリン阻害剤の有効性を検討いただいている慶應義塾大学・岡野先生に感謝します。

引用文献

- 1) K. Kumagai et al. *J. Antibiotics* 56, 610 (2003)
- 2) K. Kikuchi et al. *J. Biol. Chem.* 278, 42985 (2003)
- 3) M. Benfey and A. J. Aguayo *Nature* 296, 150 (1982)
- 4) P. D. Koeberle and M. Bahr *J. Neurobiol.* 59, 162 (2004)
- 5) B. J. Dickson *Science* 298, 1959 (2002)
- 6) B. S. Bregman et al. *Nature* 378, 498 (1995)
- 7) S. Guthrie and A. Lumsden *Neuroprotocols* 4, 116 (1994)
- 8) Y. Sasaki et al. *Neuron* 35, 907 (2002)
- 9) R. J. Pasterkamp and J. Verhaagen *Brain Res Rev* 35, 36 (2001)
- 10) R. J. Pasterkamp et al. *Cell. Mol. Biol.* 45, 763 (1999)
- 11) S. Kaneko et al. in preparation.
- 12) A. Shirvan et al. *J. Biol. Chem.* 277, 49799 (2002)

PROFILE



熊谷 和夫
Kazuo KUMAGAI
住友製薬株式会社
研究本部
主席研究員 工学博士



伊藤 彰
Akira ITO
住友製薬株式会社
研究本部 創薬第1研究所
主席研究員 薬学博士



菊地 薫
Kaoru KIKUCHI
住友製薬株式会社
研究本部 ゲノム科学研究所
主席研究員 理学博士



佐治 幾太郎
Ikutaro SAJI
住友製薬株式会社
研究本部 化学研究所
主席研究員 薬学博士



岸野 晶祥
Akiyoshi KISHINO
住友製薬株式会社
研究本部 創薬第1研究所
主席研究員 理学博士



木村 徹
Toru KIMURA
住友製薬株式会社
研究本部 ゲノム科学研究所
主席研究員 理学博士



細谷 宜生
Nobuo HOSOTANI
住友製薬株式会社
研究本部
主任研究員