

# NAD<sup>+</sup>を増やし脳の健康を保つ 機能性物質探索法の開発

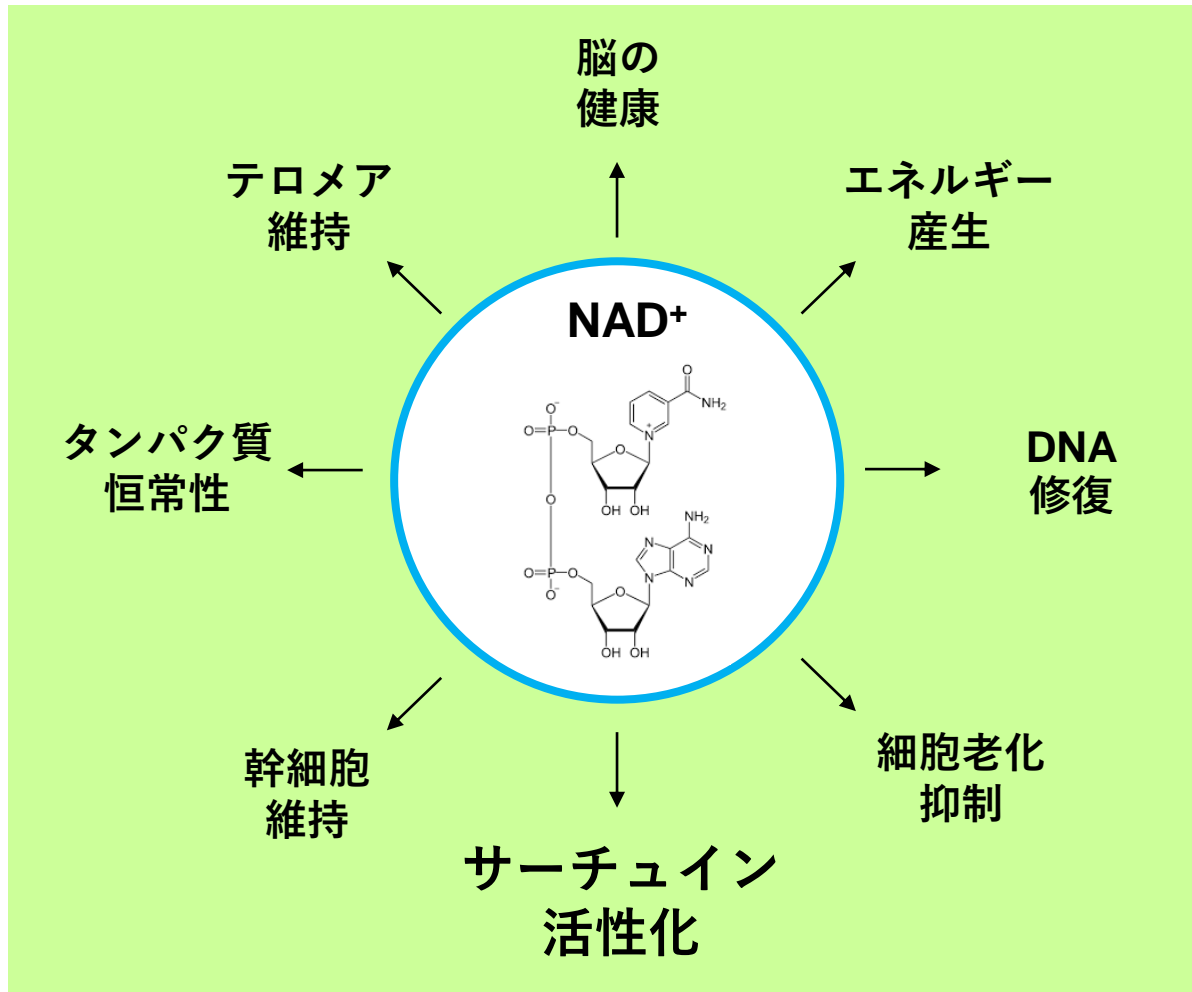
岡山大学学術研究院医歯薬学域

細胞生物学分野

講師 村田 等

## 研究の背景

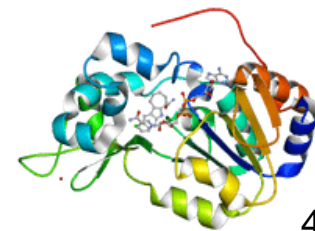
NAD<sup>+</sup>（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）は生物のエネルギー産生に必須の補酵素であり、長寿に関係している



NAD<sup>+</sup> は若返り成分の1つとして近年非常に注目されている

## NAD<sup>+</sup>による長寿遺伝子サーチェーンの活性化

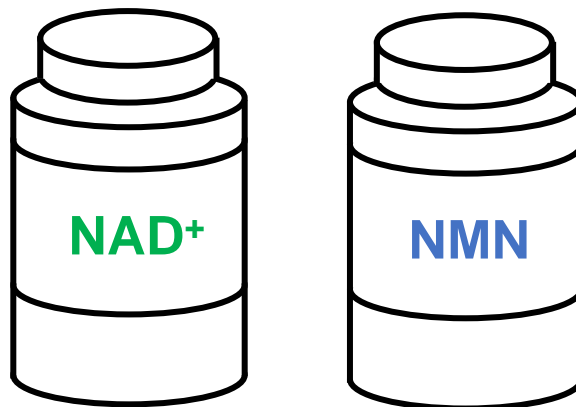
サーチェーンはNAD<sup>+</sup>によって活性化される**脱アセチル化酵素**



4151

**脳の視床下部で発現する**サーチェーンが遺伝子発現のオン・オフを制御し、  
生体のエネルギー代謝の変化によって老化・寿命を制御する

しかし**NAD<sup>+</sup>は加齢に伴い減少し**、サーチェーンの活性が低下する

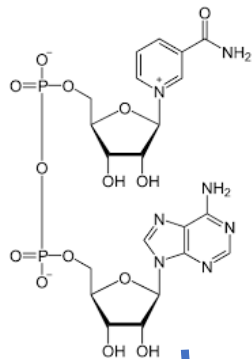


NAD<sup>+</sup>やNMN（NAD<sup>+</sup>前駆体）のサプリメントが  
老化防止のために利用されている

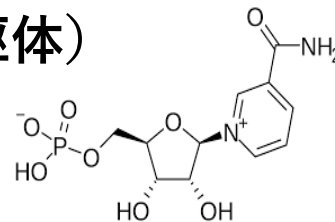
## 従来技術とその問題点

従来技術ではNAD<sup>+</sup>やNMN（NAD<sup>+</sup>前駆体）をサプリメントで摂取して細胞内に届けることを期待している

NAD<sup>+</sup>

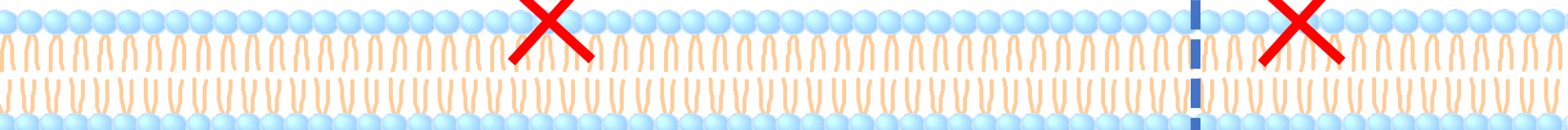
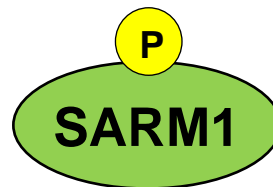


NMN  
(NAD<sup>+</sup>の前駆体)



しかし  
NAD<sup>+</sup>やNMNは細胞内にほとんど入らない

一部が取り込まれてもNAD<sup>+</sup>分解酵素であるSARM1によって分解されてしまう

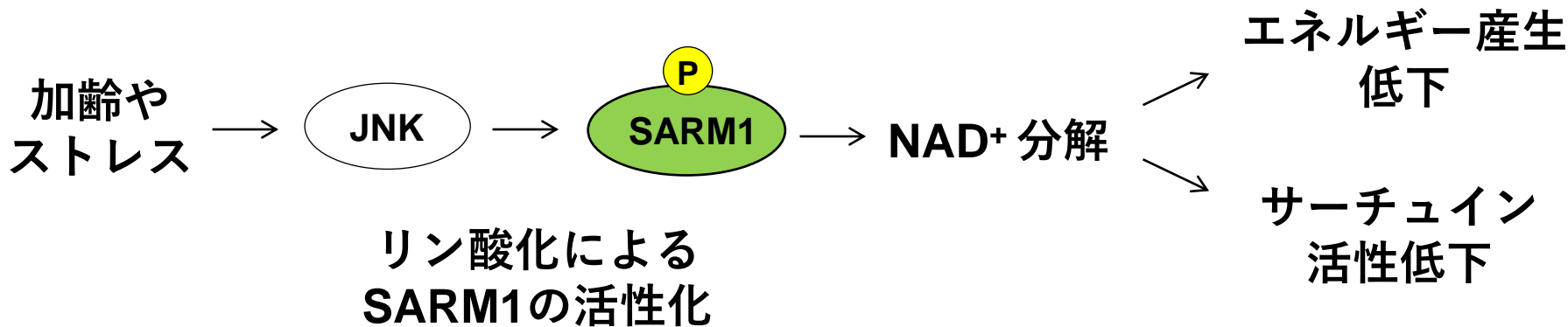


# SARM1はストレス時にNAD<sup>+</sup>を分解し、 エネルギー産生やサーチュイン活性化を阻害する

SARM1は主に脳で発現する分子で、ストレス時にNAD<sup>+</sup>を分解する

SARM1は通常不活性型であるが、我々はストレス時にJNKキナーゼがSARM1をリン酸化し、活性化するメカニズムを発見した

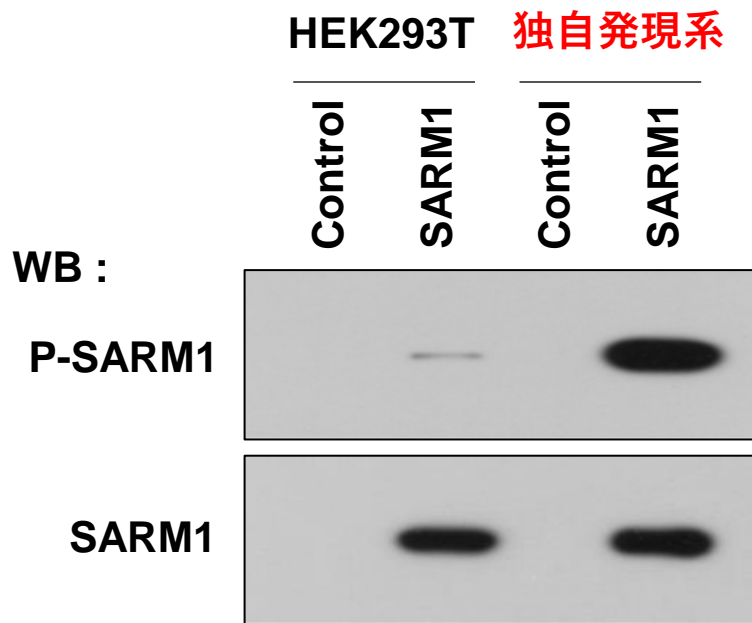
(Murata et al, J Biol Chem, 293, 2018)



活性型であるリン酸化SARM1を阻害し、  
脳内のNAD<sup>+</sup>量を増加させることが重要である

# リン酸化全長SARM1の精製と NAD<sup>+</sup>分解酵素活性測定方法の開発

様々な発現系や条件を検討し、リン酸化全長SARM1を高収量で得る方法を検討した

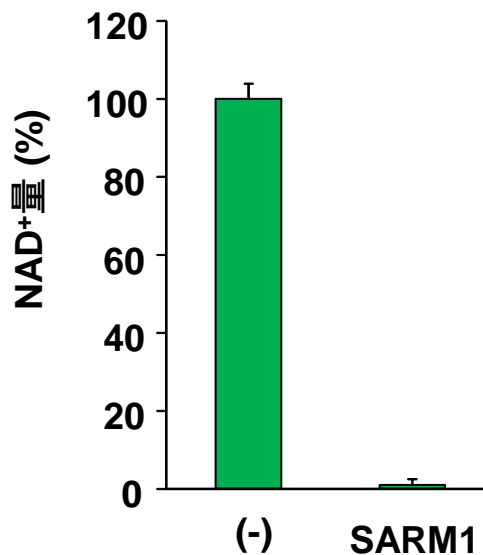


同量のSARM1タンパク質量で比較すると  
HEK293Tから精製したSARM1よりも  
独自発現系のSARM1はリン酸化レベルが  
圧倒的に高く、NAD<sup>+</sup>分解活性を有している

精製リン酸化SARM1タンパク質 (1 μM) に  
NAD<sup>+</sup> (1 μM) を加え、37°C, 30分間反応



NAD/NADH-Glo assayで残存する  
NAD<sup>+</sup>量を発光量として測定



# SARM1阻害活性をもつ化合物のスクリーニング (医薬品開発としての例)

ファルマバレーセンターより提供を受けた様々な骨格を有する1,920個の低分子化合物を使用



精製リン酸化SARM1タンパク質 (1  $\mu\text{M}$ ) に化合物 (10  $\mu\text{M}$ ) を加え、37°C, 30分間反応

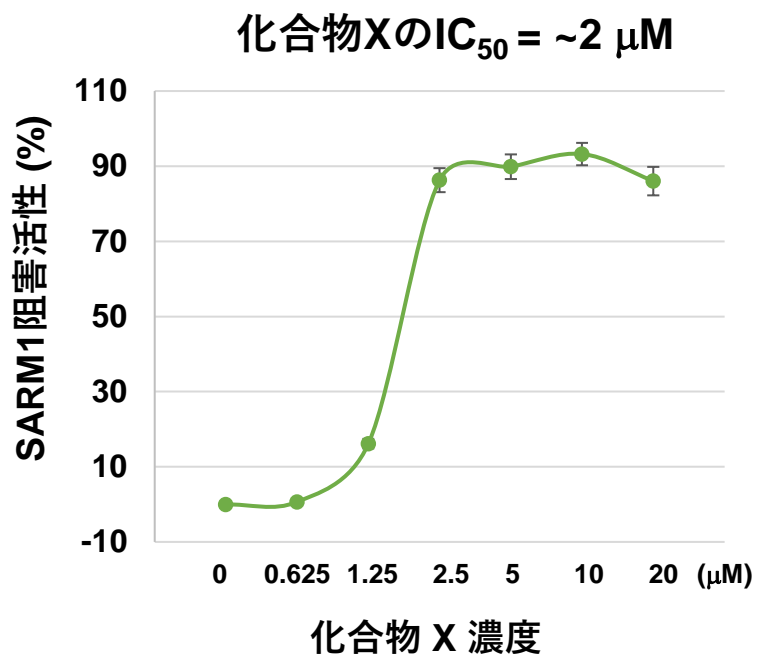
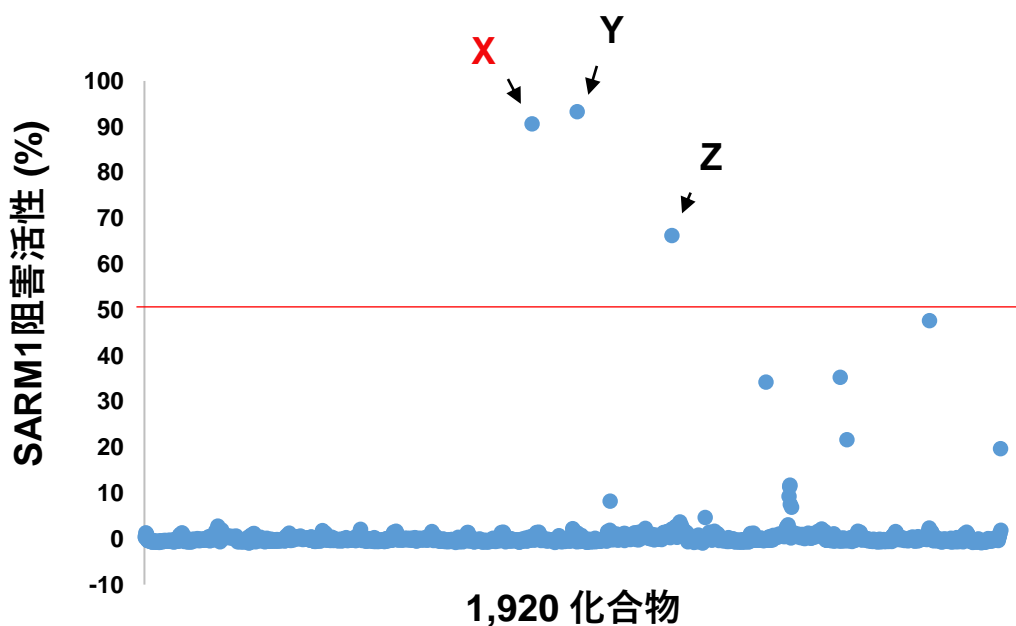


NAD<sup>+</sup> (1  $\mu\text{M}$ ) を加え、37°C, 30分間反応



NAD/NADH-Glo assayで残存するNAD<sup>+</sup>量を発光量として測定

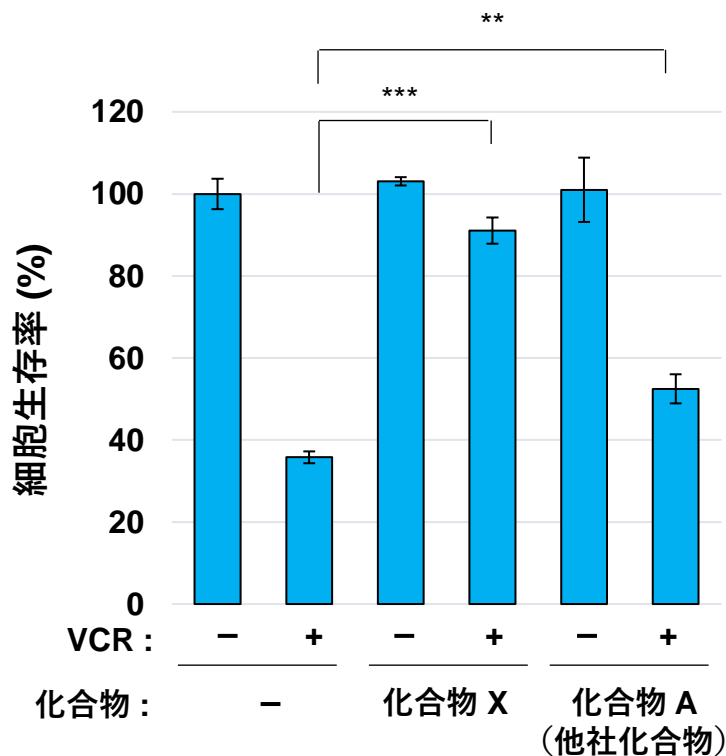
SARM1阻害活性を有する3種類の化合物X、Y、Zを見出した



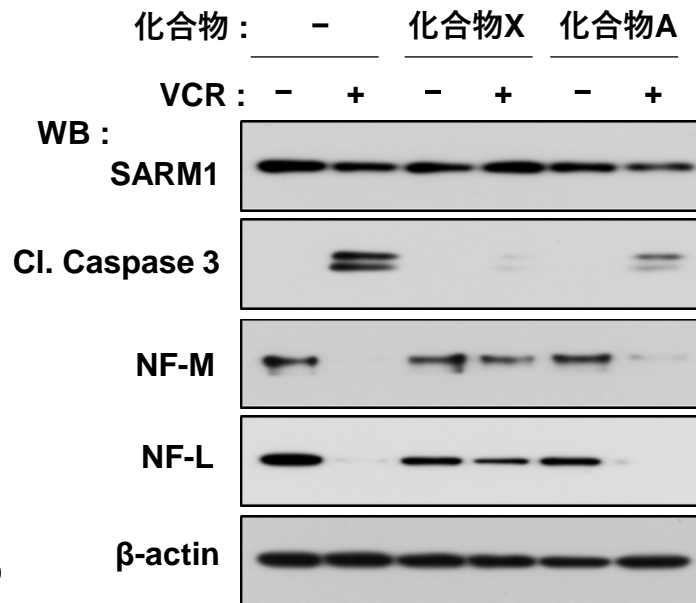
# *in vitro* 疼痛モデルに対する化合物Xを用いた SARM1阻害効果の検証

ヒトiPS由来神経細胞にSARM1阻害剤（20  $\mu$ M）と軸索障害を通じて疼痛を誘発する  
ビンクスチン（VCR、50 nM）を添加し、24時間後に細胞生存率およびWB測定を実施した

化合物XはVCRによって誘導される細胞死マーカー（Cl. Caspase 3）の出現や  
軸索成分（NF-M、NF-L）の分解を大幅に減少させた



n = 3,  $\pm$  SD  
\*\*,  $p < 0.01$   
\*\*\*,  $p < 0.001$

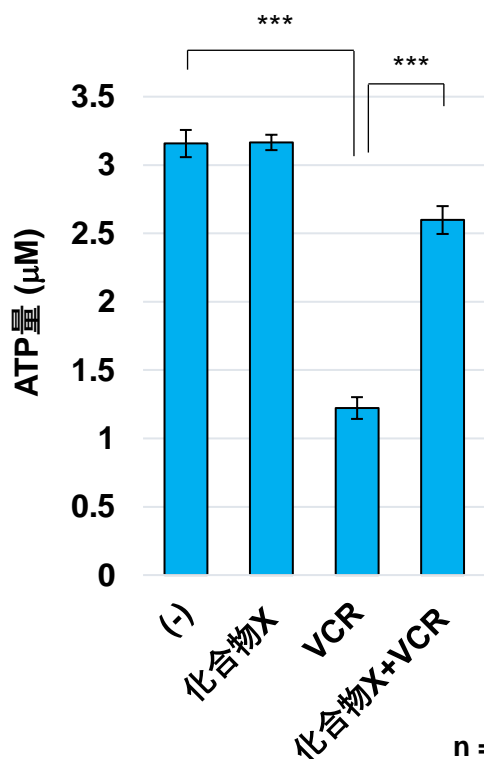
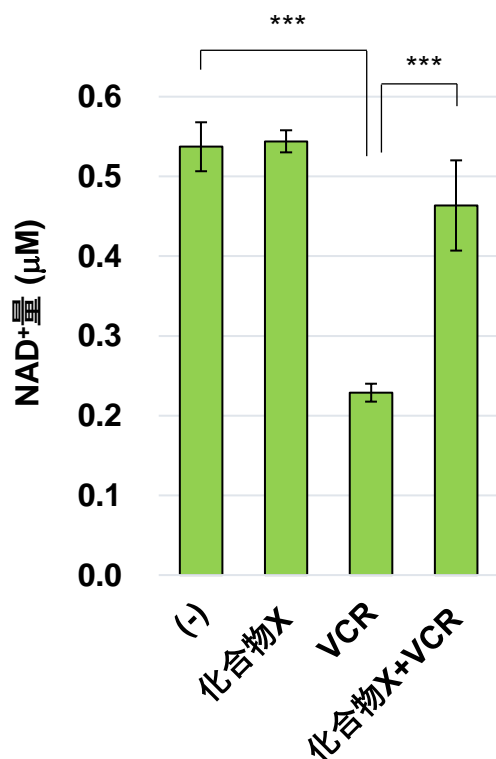


SARM1を阻害することによって神経細胞をストレスから保護することができる



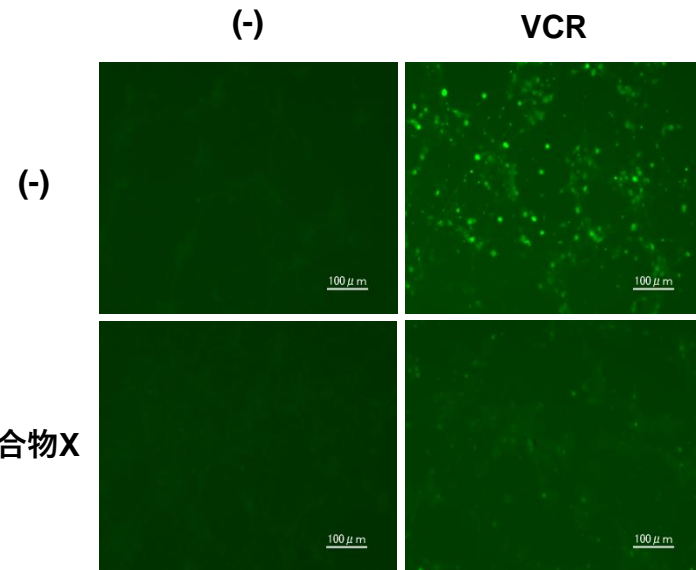
## ミトコンドリア機能に対するSARM1阻害効果の検証

ヒトiPS細胞から分化誘導した神経細胞に対して、20  $\mu\text{M}$ で化合物Xを添加し、更に50 nMでビクリスチン（VCR）を添加した24時間後にNAD<sup>+</sup>量、ATP量、活性酸素種（ROS）発生量を測定した



n = 3,  $\pm$  SD  
\*\*\*,  $p < 0.001$

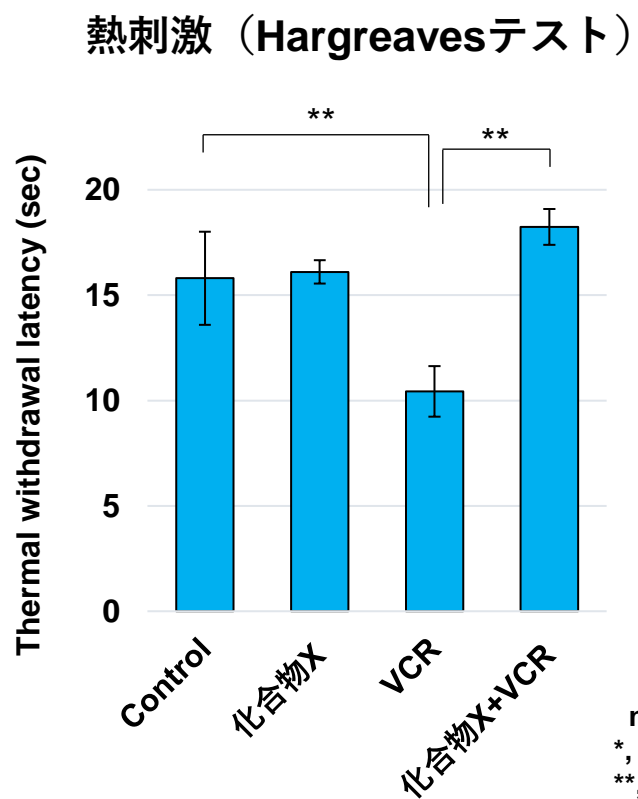
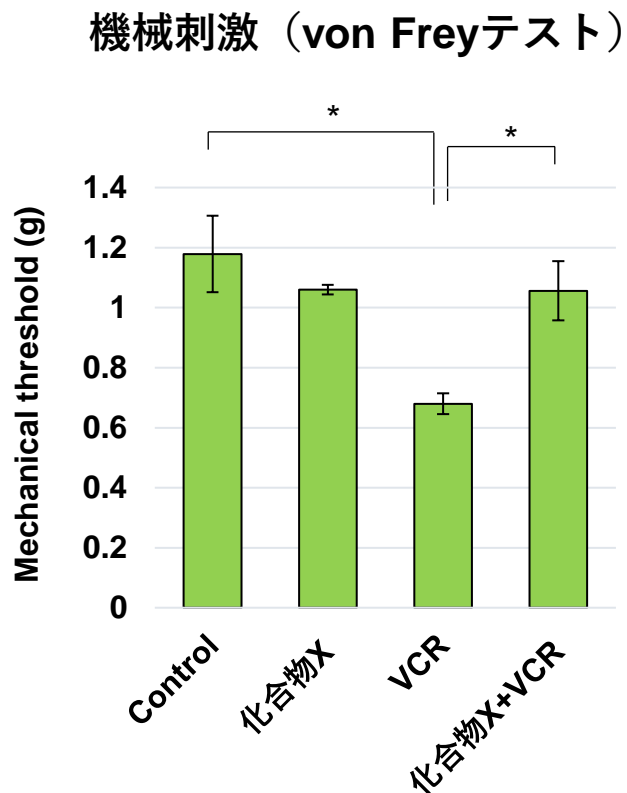
### ROSの検出 (CM-H<sub>2</sub>DCFDA染色)



SARM1を阻害することによってNAD<sup>+</sup>量が回復し、ミトコンドリアでのエネルギー産生機能が改善した

## *in vivo* 疼痛モデルの痛覚過敏に対するSARM1阻害効果

C57BL/6Jマウスに対して、10 mg/kgで化合物Xを腹腔内投与、その2時間後に1 mg/kgでビンクリスチン(VCR)を腹腔内投与した。この投与を5日間連続で行い、投与開始から15日後に機械刺激に対する反応をvon Freyテストで、熱刺激に対する反応をHargreavesテストで測定した。



SARM1阻害剤は*in vivo*においても疼痛抑制効果を示した

## 想定される用途

既存の健康食品にSARM1を阻害する活性が確認できれば、  
NAD<sup>+</sup>やNMN（サプリメント）と同じ用途での利用が期待される

疼痛や老化の進行は数十年の長期にわたるので、  
持続的にSARM1の活性化を抑え、NAD<sup>+</sup>量を保つ

- ・ 機能性表示食品
- ・ 特定保健用食品

としての用途が想定される

## SARM1阻害によって期待できる効果

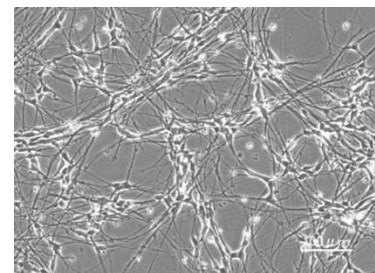
- 疼痛の予防（末梢神経の状態維持）
- 老化の進行抑制（NAD<sup>+</sup>量の低下抑制）
- 酸化ストレスの軽減（ミトコンドリア機能）
- 認知機能の維持（中枢神経作用）

# 共同研究のイメージ

- ① 健康食品成分等のライブラリーを用いてリン酸化SARM1を阻害する物質のスクリーニングを行う



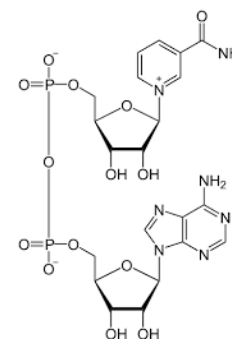
- ② ヒト神経細胞 (*in vitro*)、モデルマウス (*in vivo*) を用いてSARM1阻害効果を検証する



- ③ 臨床試験でSARM1阻害による疼痛や老化防止効果を検証する



- ④ 商品開発へつなげる



(②、③は、機能性表示食品として開発する場合の企業への提案事項)

## 実用化に向けた課題

- 現在、医薬品開発として、 $\mu\text{M}$ オーダーでSARM1阻害効果を示す化合物を保有しているが、機能性表示食品、特定保健用食品として開発できる**素材**が必要である
- 機能性表示食品、特定保健用食品として開発するための**臨床試験**が必要になる
- SARM1阻害成分の投与による疼痛や老化予防効果を今後検証していく

## 企業への期待

- ・ 企業保有の健康食品成分等を用いて、リン酸化SARM1を阻害する物質あるいは素材の探索を共同研究として実施
- ・ エイジングケア（**SARM1阻害によって期待できる効果**）に関する商品を開発中の企業へ本技術の導入を希望
  - ・ 疼痛の予防
  - ・ 老化の進行抑制
  - ・ 酸化ストレスの軽減
  - ・ 認知機能の維持

## 本技術に関する知的財産権

- 1) ・ 発明の名称 : リン酸化SARM1、抗体、SARM1リン酸化阻害剤、神経変性疾患の予防又は治療薬、スクリーニング方法、SARM1改変体及び使用
  - ・ 出願番号 : 特願2018-507366 (PCT/JP2017/011418)
  - ・ 出願人 : 岡山大学
  - ・ 発明者 : 村田 等、阪口 政清、木下 理恵、山本 健一
  
- 2) ・ 発明の名称 : SARM1阻害剤とその使用方法
  - ・ 出願番号 : 特願2021-135934
  - ・ 出願人 : 岡山大学、一般社団法人ファルマバレープロジェクト支援機構
  - ・ 発明者 : 村田 等、阪口 政清、安藤 隆幸、福田 達也、中村 仁



## お問い合わせ先

岡山大学

研究推進機構 知的財産本部

TEL : 086-251-8417

FAX : 086-251-8961

e-mail : [cr-ip@okayama-u.ac.jp](mailto:cr-ip@okayama-u.ac.jp)

URL : <http://www.orzd.okayama-u.ac.jp/>