

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05275

研究課題名(和文) 伝統医薬品をターゲットとした安全性および有効性に優れた抗認知症薬開発の新規戦略

研究課題名(英文) Construction of novel strategy for identifying effective anti-dementia drugs from traditional medicines

研究代表者

福地 守 (Fukuchi, Mamoru)

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：40432108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：記憶学習に関わる重要な因子であるBDNFの量の低下は、アルツハイマー病に代表される認知症の発症に関与することが示唆されている。そこで本研究では、BDNF発現を増加させる物質を簡単に探索可能な方法を構築し、この方法を用いて生薬などの伝統医薬品の中からBDNF発現を増加させるものをいくつか同定した。さらに、ある食用天然物の抽出物をマウスに投与すると、海馬におけるBDNF量が増加し、また、記憶学習が向上する結果が得られた。したがって、本方法は、加齢に伴う認知機能の低下やアルツハイマー病などの認知症発症を防止する薬物や天然物を探索する有効な探索方法である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会に突入した我が国において、認知症対策は急務である。本研究は、抗認知症戦略を構築する上でターゲットの一つとなりうるBDNFに着目した研究であり、神経細胞におけるBDNF発現を誘導する物質を迅速・簡便に探索可能な新たな方法である。この方法は、治療薬のシーズとなる化合物だけでなく、植物や天然物の抽出物の活性も評価可能である。そのため本研究は、将来的には、抗認知症薬の候補探索だけでなく、加齢に伴う脳機能の低下を予防・改善する機能性食品の開発にも貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：BDNF plays an important role in expression of higher brain functions such as learning and memory. Lower brain BDNF level is thought to be associated with dementia including Alzheimer's disease. Here we constructed a novel screening assay to identify neuronal BDNF expression, and found a series of active agents from traditional medicines. Furthermore, one of them increased hippocampal BDNF levels in mice and enhanced hippocampus-dependent learning and memory. Taken together, our novel screening assay is beneficial for identifying candidates of anti-dementia drugs.

研究分野：分子神経科学

キーワード：BDNF 抗認知症 スクリーニング 伝統医薬品

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、我が国では、高齢化社会に伴う認知症患者の増加が問題視されている。認知症による脳機能の低下は、患者本人の生活の質の重大な低下を招くだけでなく、介護に関わる周辺の家族などの生活にも多大な影響を与える。厚生労働省の推計では、認知症患者は2025年には700万人を突破するとされており、超高齢化社会に突入した我が国において、認知症による脳機能低下を改善する、また老化による脳機能低下を予防する、といった取り組みは急務であるといえる。

認知症を含む精神疾患の治療薬のターゲットの中心は、神経伝達物質およびその受容体である。例えば、アルツハイマー型認知症の治療薬ドネペジルは、神経伝達物質の1つであるアセチルコリンの分解を阻害することでその薬効を発揮する。そのため、精神疾患治療薬の候補を絞り込む初期の一次スクリーニングでは、神経伝達物質受容体の活性化によるセカンドメッセンジャー量変化を指標とした評価系がよく用いられる。しかし、このようなスクリーニング法で得られたシーズが、実際に薬効を発揮し、治療薬候補となる確率が極めて低いのも事実である。

(2) 記憶や学習に代表される高次脳機能の発現には、神経細胞におけるシナプス伝達に依存した遺伝子発現制御が必要であり、また、この制御系の異常や破綻は、様々な神経系の疾患の原因となることが指摘されている。シナプス伝達により惹起された細胞内情報伝達が核内へ伝えられると、高次脳機能発現に関わる一連の因子の発現が制御を受け、合成されたこれら因子により神経ネットワークやシナプス機能が調節されることで長期的な脳機能発現が実現する。申請者は、このようなシナプスと核の間のコミュニケーションに必須の神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) に着目し、BDNF 遺伝子発現制御機構の解明に取り組んできた。この中で申請者は、精神疾患治療薬候補の探索や研究開発においても、単に神経伝達物質受容体の機能調節 (シナプスでのイベント) だけでなく、BDNF 遺伝子発現 (核でのイベント) にも着目することで、効果的に候補薬を同定可能ではないかと考えた。すなわち、積極的に BDNF 遺伝子発現誘導活性に着目して候補薬の探索・開発に取り組むことで、BDNF の有する強力な神経保護作用を介して認知症による神経ネットワークやシナプス機能の破綻を予防または修繕し、脳機能を改善する「抗認知症薬」の開発に繋がるのではないかと考えた。しかし、神経細胞において BDNF 遺伝子発現誘導剤を効率よく探索可能な手法は、これまで存在しなかった。最近申請者は、ホタルの発光酵素ルシフェラーゼを利用して BDNF 遺伝子発現変化を発光により計測可能な遺伝子改変マウス「BDNF-Luc マウス」を用いて、BDNF 遺伝子発現制御に関する新たな機構を解明するとともに、BDNF-Luc マウス由来初代培養神経細胞を用いて BDNF 遺伝子発現誘導活性を測定する多検体スクリーニング系を構築した (図1)。

(3) 認知症治療薬や予防薬の服薬は長期にわたることが予想されるため、新規医薬品の開発を目指した場合、安全性や副作用の面などで越えるべきハードルが非常に高いことが考えられる。近年、医薬品開発においては、既存薬を別用途で使用するリポジショニングが注目されている。申請者は、このリポジショニングの概念に着目し、抗認知症活性を有する伝統医薬品の開発研究の着想に至った。生薬や漢方方剤、薬用植物などの伝統医薬品は、経験的に有効性が確立しており、また、長年の使用実績から比較的安全性が確保されている。今後、新たな科学的指標や根拠に基づき伝統医薬品の薬効を再評価し、経験的な有効性に加えて抗認知症活性を有する伝統医薬品を探索することにより、安全性・有効性の高い抗認知症薬の開発に繋がることを期待される。

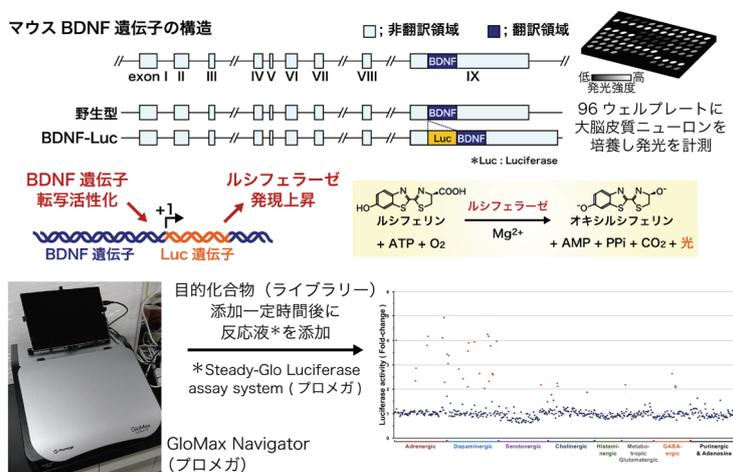


図1 BDNF 遺伝子発現誘導活性を評価する方法

2. 研究の目的

本研究では、BDNF 遺伝子発現誘導活性および伝統医薬品をキーワードとし、脳機能低下の改善や予防効果を有する伝統医薬品の同定・開発を行う。候補となる伝統医薬品は、BDNF 遺伝子発現誘導活性を *in vitro* における抗認知症活性の新たな科学的指標の1つとして、申請者が確立した BDNF 遺伝子発現誘導剤探索のための多検体スクリーニングを用いることで探索し、神経細胞の生存や発達の促進効果の有無と合わせて評価する。得られた候補薬は、老化促進マウスなどのモデル動物を使用し、記憶や学習、社会性などの行動解析により脳機能低下の改善や予防効果を評価する。以上の解析により、抗認知症活性を有する伝統医薬品または伝統医薬品をベースとした新規医薬品を創出し、有効性および安全性の高い新規認知症治療薬や予防薬 (抗認知症

薬)の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、BDNF が脳・神経系において強い神経保護作用を有することに着目し、BDNF 遺伝子発現誘導活性を *in vitro* における抗認知症活性の指標の1つとして、生薬や漢方方剤、薬用植物などの伝統医薬品から抗認知症薬の候補を探索する。得られた候補薬は、マウスに長期的に投与し、投与後の記憶や学習、認知機能などを含む脳機能に与える影響を測定することで候補をさらに絞り込む。最終的には、各種老化モデルマウスを用いて同様に脳機能を測定し、老化に伴い低下した脳機能の改善効果や脳機能低下の予防効果を有する伝統医薬品を同定する。以上の研究により、安全性・有効性の高い抗認知症薬の同定・開発を目指し、本研究を通じて抗認知症薬開発の基盤を構築する。

4. 研究成果

(1) BDNF 遺伝子発現誘導活性を有する物質の探索

本研究では、BDNF-Luc マウス由来初代培養神経細胞を用いて、BDNF 遺伝子発現を誘導する既知薬理活性物質 (1280 種類)、生薬熱水抽出物 (120 種類)、生薬由来化合物 (96 種類)、漢方方剤エキス (42 種類) などの探索を行った。96 ウェル培養プレートを用いて調製した培養 13 日目の BDNF-Luc マウス由来大脳皮質神経細胞初代培養系に、各種化合物やエキスを添加し、添加 6 時間後に各ウェルのルシフェラーゼ活性を測定した。溶媒を添加した場合のルシフェラーゼ活性と比較して、2 倍以上にルシフェラーゼ活性が増加したものを探索した結果、18 種類の既知薬理活性物質、5 種類の生薬熱水抽出物、6 種類の生薬由来化合物、2 種類の漢方方剤エキスを BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められた (図 2 (生薬熱水抽出物の例))。また、実際に活性が認められた化合物や抽出物については、同様の培養条件で培養した大脳皮質神経細胞初代培養系において内在的な BDNF mRNA 発現を誘導することを確認している。

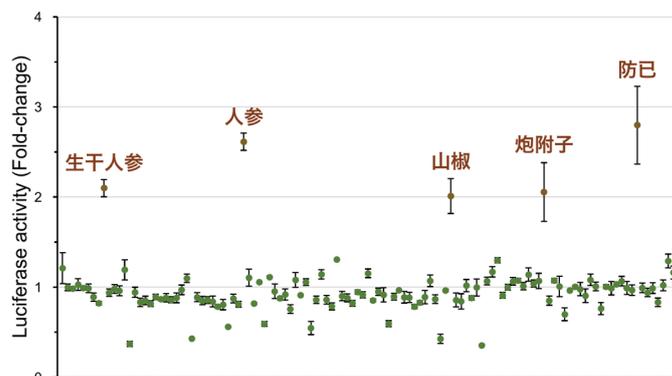


図2 BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬熱水抽出物の探索

(2) 人参熱水抽出物中の活性成分の同定

人参は古くより高齢者の滋養強壮を目的として伝統的に使用されている生薬の一つであり、漢方方剤の構成生薬として用いられるだけでなく、食用の生薬としても用いられる。本研究において、人参熱水抽出物に BDNF 遺伝子発現誘導活性が認められること、また、この発現誘導には、記憶学習との関わりが深い転写制御因子である CREB (cAMP-response element-binding protein) を介した転写活性化が関与することが示唆された。そこで、人参熱水抽出物に含まれる BDNF 遺伝子発現誘導活性を有する活性化合物の同定を試みた。Ginsenoside は、人参に含有される活性成分の代表例である。そこで、Ginsenoside Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rf、Rg1、Rg2 の 8 種類について活性を評価したが、いずれも BDNF 遺伝子発現誘導活性は認められなかった。近年、LPA 受容体を活性化する Gintonin が人参に含有される新たな活性成分であることが報告された。しかし、LPA 受容体アゴニストは BDNF 遺伝子発現に影響を与えず、また、LPA アンタゴニストは人参熱水抽出物による BDNF 遺伝子発現誘導に影響を与えなかった。したがって、Gintonin には BDNF 遺伝子発現誘導活性を持たないことが示唆された。さらに、LPA アゴニストや複数種類の Ginsenoside の混合物の活性も評価したが、いずれも活性は認められなかった。以上のことから、人参熱水抽出物中の未知の活性成分が BDNF 遺伝子発現を誘導することが予想された。現在、人参熱水抽出物中の活性成分のさらなる同定を試みている。また、山椒についても、同様の解析を進め、熱水抽出物よりもメタノール抽出物の方が高い BDNF 遺伝子発現誘導活性を有していることを見出した。これについても同様に活性成分の同定を試みている。

(3) BDNF 遺伝子発現を誘導する天然物抽出物がマウスの記憶学習に与える影響

上記の解析により、*in vitro* で BDNF 遺伝子発現を誘導する生薬や天然物の抽出物をいくつか同定した。そこで、これら抽出物をマウスに投与後、記憶学習能の変化を検討した。記憶学習能を評価する方法としては、海馬依存的な記憶とされる文脈性恐怖条件付け試験や物体位置認識試験を用いた。人参および山椒の熱水抽出物については、1日1回1週間または2週間、いくつ

かの用量でマウスに経口投与し、文脈性恐怖条件付け試験により評価を行ったが、記憶学習能に顕著な変化は認められなかった。また、これら生薬熱水抽出物投与後のマウス海馬の BDNF mRNA 発現変化を解析したが、顕著な変化は認められなかった。

一方、日本では東北～北海道に自生するある食用植物の抽出物が、*in vitro* において BDNF 遺伝子発現誘導活性を有することが明らかとなった。そこで、この抽出物をマウスに1週間経口投与した結果、海馬における BDNF mRNA 発現が濃度依存的に増加することが明らかとなった(図3左)。そこで、同様のスケジュールで抽出物を投与し、文脈性恐怖条件付け試験を行った結果、濃度依存的にすく

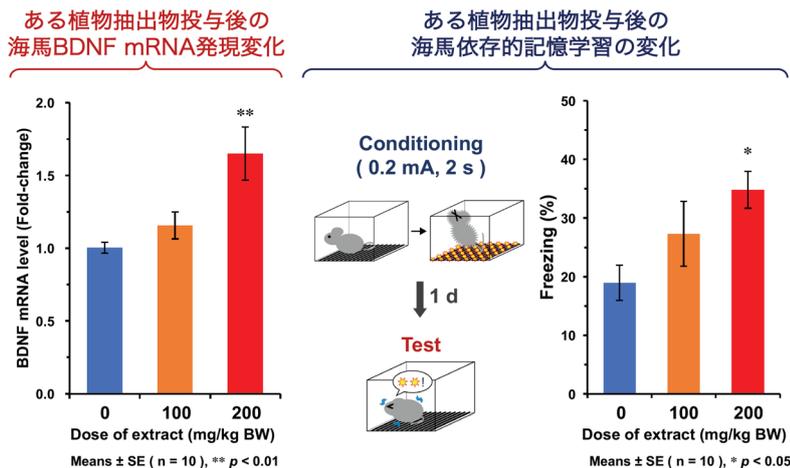
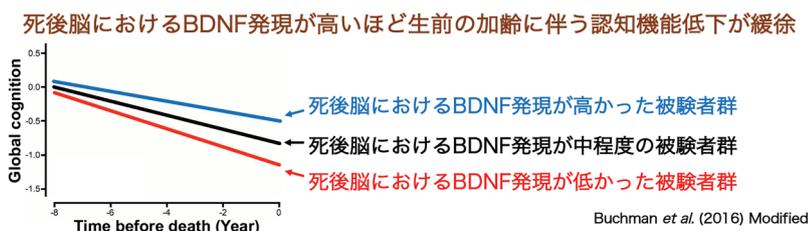


図3 ある植物抽出物がマウス海馬 BDNF mRNA 発現および海馬依存的な記憶学習に与える影響

み反応が増加する。すなわち記憶学習能が向上することが明らかとなった(図3右)。この記憶学習能の向上は、物体位置認識試験においてもその傾向が認められている。

(本研究の総括と展望)

本研究により、BDNF 遺伝子発現誘導活性に基づく脳機能改善薬の探索方法の基盤 (*in vitro* でのスクリーニングから *in vivo* での記憶学習の評価まで) を樹立することに成功した。また、本研究課題が採択された年度の前後で、ヒトにおける BDNF と認知機能との関連性に関する臨床研究がいくつか報告された(図4)。例えば、脳脊髄液中の BDNF 量の低下は、アルツハイマー病患者で有意に認められ



アルツハイマー病患者では脳脊髄液中のBDNF量が低い

Baseline diagnosis	df	Statistics	p value*
Healthy control			
Mild cognitive impairment			
Alzheimer's disease			
CSF BDNF (pg/ml)	2,127	6.49	0.002

脳脊髄液中BDNF量の低下はMCIからアルツハイマー病への進行と関連

Prognosis	df	F	p value
MCI-S			
MCI-AD			
CSF BDNF (pg/ml)	1,71	4.13	0.04*

Forlenza et al. (2015) Modified

All data are presented as mean ± standard deviation

図4 BDNF と認知機能との関連；ヒトを対象とした近年の研究報告

るだけでなく、軽度認知障害からアルツハイマー病への進行にも関連することが報告されている。さらに、脳内(背側前頭前皮質を対象とした解析) BDNF 発現量が高いほど、加齢に伴う認知機能の低下がより緩徐であることも報告されている。これらの報告は、BDNF 遺伝子発現誘導活性に基づき抗認知症薬を開発する本研究の趣旨を支持するものである。

一方、*in vitro* で認められた BDNF 遺伝子発現誘導活性が必ずしも *in vivo* には当てはまらないこと、などの問題点は未解決のままである。これらの問題点は、① *in vitro* スクリーニングの際に血液脳関門通過能を加味した方法の開発、② 活性の認められた物質をマウスに投与した際に脳内 BDNF 発現変化を迅速・簡便かつ確実に評価する方法の開発、などにより解決される可能性がある。①については、近年、*in vitro* で血液脳関門を再現可能な優れたアッセイキットが市販されているため、このアッセイキットを応用することで対応が可能である。②に関しては、研究代表者は近年、近赤外領域の発光を利用した生体イメージングにより、脳内 BDNF 発現変化を生きたマウスで計測・可視化可能な方法を樹立し、この方法により対応が可能である。今後、これらの新たな方法・技術を利用することで、本研究で構築した研究戦略を改良可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukuchi M	4. 巻 524
2. 論文標題 Identifying inducers of BDNF gene expression from pharmacologically validated compounds; antipyretic drug dipyrone increases BDNF mRNA in neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 957 ~ 962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuchi M, Okuno Y, Nakayama H, Nakano A, Mori H, Mitazaki S, Nakano Y, Toume K, Jo M, Takasaki I, Watanabe K, Shibahara N, Komatsu K, Tabuchi A, Tsuda M	4. 巻 9
2. 論文標題 Screening inducers of neuronal BDNF gene transcription using primary cortical cell cultures from BDNF-luciferase transgenic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-48361-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukuchi M, Izumi H, Mori H, Kiyama M, Otsuka S, Maki S, Maehata Y, Tabuchi A, Tsuda M	4. 巻 7
2. 論文標題 Visualizing changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression using bioluminescence imaging in living mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05297-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukuchi M, Tsuda M	4. 巻 22
2. 論文標題 Convergence of neurotransmissions at synapse on IEG regulation in nucleus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)	6. 最初と最後の頁 1052-1072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2741/4533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fukuchi M, Saito R, Maki S, Hagiwara N, Mitazaki S, Mori H
2. 発表標題 Visualizing activity-dependent BDNF expression in living mouse brain
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (Annual Meeting of Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福地 守, 齊藤 亮平, 牧 昌次郎, 萩原 なみ, 三反崎 聖, 森 寿
2. 発表標題 近赤外発光を利用した生体マウス脳内における活動依存的なBDNF遺伝子発現誘導の可視化
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会, 第62回日本神経化学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福地 守
2. 発表標題 神経細胞においてBDNF遺伝子発現を誘導する既知薬理活性物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三反崎 聖, 福田 桃子, 松本 聡, 福地 守
2. 発表標題 アミノチオネインはBDNF発現を活性化させ記憶・学習行動を増強する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田 桃子, 三反崎 聖, 松本 聡, 福地 守
2. 発表標題 タモギダケ熱水抽出物含有製品「アミノチオネイン」がBDNF遺伝子発現および記憶学習に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukuchi M.
2. 発表標題 Visualization of changes in Bdnf expression in vivo and construction of drug screening using luciferase-based bioluminescence
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 佑香, 三反崎 聖, 福地 守.
2. 発表標題 脳由来神経栄養因子BDNF遺伝子発現を誘導する生薬抽出物の探索.
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福地 守, 森 寿, 柴原 直利, 田淵 明子, 津田 正明
2. 発表標題 BDNF-Luciferaseトランスジェニックマウス由来大脳皮質ニューロン初代培養系を利用したBDNF遺伝子転写活性化剤のスクリーニング
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Fukuchi M, Izumi H, Mori H, Kiyama M, Otsuka S, Maki S, Maehata Y, Tabuchi A, Tsuda M
2. 発表標題 Visualizing changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression using bioluminescence imaging in living mice
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福地 守, 和泉 宏謙, 森 寿, 木山 正啓, 大塚 智史, 牧 昌次郎, 田淵 明子, 津田 正明
2. 発表標題 生物発光を利用したBDNF遺伝子発現変化の計測
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福地 守
2. 発表標題 生物発光を利用したBDNF遺伝子発現変化の可視化および創薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福地 守, 前畑 陽祐, 森 寿, 牧 昌次郎, 田淵 明子, 津田 正明
2. 発表標題 BDNF-Lucマウスを利用したBDNF遺伝子発現変化の可視化およびBDNF遺伝子発現誘導剤の探索
3. 学会等名 第38回日本生物学的精神医学会 59回日本神経化学学会大会 合同大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 福地 守
2. 発表標題 神経可塑性の分子基盤を担う遺伝子発現制御系の解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第128回例会（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高崎健康福祉大学薬学部分子神経科学研究室（福地研） https://www.facebook.com/pg/UHWMoINeurosci/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考