

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07480

研究課題名(和文) 老年期うつ症状を改善する脳由来神経栄養因子を増加させる薬用植物由来の化合物の探索

研究課題名(英文) Search for Natural products from Medicinal Plants Increasing Brain-Derived Neurotrophic Factor To Improve Symptoms of Senile Depressions

研究代表者

尹 永淑 (Yun, Young Sook)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：00339102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：最近、うつ病患者において脳由来神経栄養因子(BDNF)が減少することが見出され、BDNFがうつ病の治療標的として注目されている。そこで、BDNFの発現を増加させる植物由来の化合物を探索によりうつ病様症状の改善させることを目的とし、植物抽出物ライブラリーを用いてBDNFのプロモーター活性をスクリーニングした。BDNFのプロモーター活性を示したマルバダイオウとムラサキツメクサから14種類の化合物が単離した。これらの化合物は抗うつ作用を示す化合物と類似していることから、これらの抽出物が抗うつ作用を示すことが裏つけられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

うつ病患者において脳由来神経栄養因子(BDNF)が減少することが見出され、BDNFがうつ病の治療標的として注目されている。BDNFプロモーター依存的転写活性を標的にスクリーニングを行った結果、マルバダイオウやムラサキツメクサの抽出物がBDNFプロモーター依存的転写活性を示した。これらの植物からスチルベンの配糖体やイソフラボノイドがそれぞれ単離された。前者は抗うつ作用を示すレスベラトールと類似しており、後者は植物性エストロゲンとして知られている。この2つの植物は食品として利用されているため、摂取することにより抗うつ作用につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is decreased in patients with depression, and BDNF has attracted attention as a therapeutic target for depression. Therefore, we screened the promoter activity of BDNF using a plant extract library with the aim of finding a plant-derived compound that increases BDNF expression and improves depression-like symptoms. Fourteen compounds were isolated from extracts of Rhubarb and Red Clover, which exhibit BDNF promoter activity. The chemical structures of these compounds were similar to those of compounds exhibiting antidepressant activity, supporting that these extracts exhibit antidepressant activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：脳由来の神経栄養因子 植物抽出物ライブラリー ルシフェラーゼアッセイ プロモーター依存的転写活性 うつ様症状

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢とともに増加するうつ病患者およびアルツハイマー病患者の脳では、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が減少されていることが知られている。さらに、うつ病様モデル動物は抗うつ薬の投与により減少した BDNF レベルが回復し、うつ病様な行動の改善が報告された (Autry A.E., Pharmacol. Rev., 2012)。

最近、抗うつ剤として使われている選択的モノアミン再取り込み阻害薬 (SSRI または SNRI) についてこれまでと異なる作用機構の仮説が立てられている。抗うつ剤によって上昇したモノアミンが CaMK、PKC、および PKA を活性化し、下流にある CREB のリン酸化や BDNF の発現を増加させる (D'Sa C, Bipolar Disord., 2002)。増加された BDNF は神経新生を促進し抗うつ作用を示すことが報告されている (Maya Vetencourt et al., Eur. J. Neurosci., 2011)。薬用植物から単離した化合物がマウス神経芽細胞腫の細胞において BDNF プロモーター依存的転写活性を活性化し、神経突起を伸長させることを見出した。 (Yun YS et al, J. Nat. Med. 2018)。これらのことから、BDNF は抗うつ作用の標的分子であることが考えられる。

2. 研究の目的

BDNF の発現はうつ病様症状や記憶・学習と関連するため、BDNF の発現誘導を老年期うつ病治療薬の開発ターゲットとして考えた。そこで、「BDNF の発現を増加させる薬用植物由来の化合物の探索し、うつ病様症状の改善させること」を目的とした。また、BDNF の発現を増加させる成分を含む可食性の植物や生薬は、老年期うつ病の予防に用いることが期待できる。したがって、直接 BDNF が増加すれば、今までの抗うつ薬より短時間で抗うつ薬効を示し、記憶や学習改善も見込まれることから老年期におけるうつ病様症状の改善が期待される。

3. 研究の方法

① 薬用植物の抽出物を用いた BDNF のプロモーターIV のスクリーニング

スクリーニングのために、pGL4.15[luc2P/Hygro] に BDNF promoter IV-Luc を組み込んだプラスミドをマウス神経芽細胞腫由来の細胞 Neuro 2a に導入した安定細胞株を作成した。約 11,700 種の植物抽出物ライブラリーを用い、ルシフェラーゼアッセイにより BDNF プロモーターIV 活性を測定した。さらに、再現性および濃度依存性などを検討して活性を示した植物抽出物を選抜した。また、マウス海馬由来の細胞 HT22、ヒト神経芽細胞腫由来の細胞SH-5YSY、およびグリア細胞C6においてもBDNF promoter IV のプロモーター活性を測定した。さらに qPCR やウェスタンブロッティングにより BDNF の mRNA やタンパク質発現を検討した。

② 抽出物の分離・精製および化合物の単離と化学構造の解析

選抜された植物抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりフラクションに分画し、BDNF のプロモーターIV 活性を指標としながら活性を示したフラクションをさらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて精製し、化合物を単離した。単離された化合物について核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HMBC, HMQC, NOESY) や 質量分析 (MS) スペクトルデータの解析により化学構造を明らかにした。

4. 研究成果

① 薬用植物の抽出物を用いた BDNF のプロモーター IV のスクリーニング

11,700 種の植物抽出物を用い 1 次スクリーニングの結果、コントロールに対して 2 倍以上の BDNF pIV-Luc 発現誘導率を示した植物抽出物が 113 種得られ再現性の確認をした結果、8 種の植物抽出物をヒット植物とした。これらの中、マルバダイオウ (*Rheum raphaniticum* L.) の根やムラサキツメクサ (*Trifolium pratense* L.) の地上部を用い、活性成分を単離した。

② 抽出物の分離・精製および化合物の単離と化学構造の解析

②-1. マルバダイオウ (*Rheum raphaniticum* L.) の活性成分の単離

マルバダイオウのメタノール抽出物をヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールおよび水で順次分配を行い、それぞれの抽出物を得た。これらの抽出物について BDNF pIV-Luc 発現誘導率を調べた結果、酢酸エチル抽出物がもっとも BDNF のプロモーター IV の活性を示した。そのため、酢酸エチル抽出物を BDNF pIV-Luc 発現誘導率を指標としながらシリカゲルや ODS カラムクロマトグラフィーを用い分離した後、ODS-HPLC により精製を行い、5 つの化合物を単離した。これらの化合物について NMR および MS スペクトルデータの解析および文献値と比較した結果、化合物 1 は rhaponticin、化合物 2 は deoxyrhaponticin、化合物 3 は piceatannol 3'-*O*-β-D-glucopyranoside、化合物 4 は rhapontidenin 3'-3'-*O*-β-D-glucopyranosid、化合物 5 は *cis*-3,5-dihydroxy-4'-methoxystilbene 3'-*O*-β-D-glucopyranoside であると同定した (図 1)。また、これらの化合物の BDNF pIV-Luc 発現誘導率を測定した結果、図 2 に示したように化合物 1 および 2 が BDNF のプロモーター IV の活性を示した。

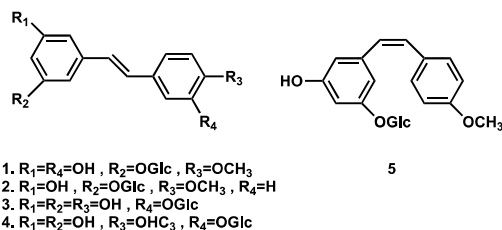


図 1. マルバダイオウから単離された化合物

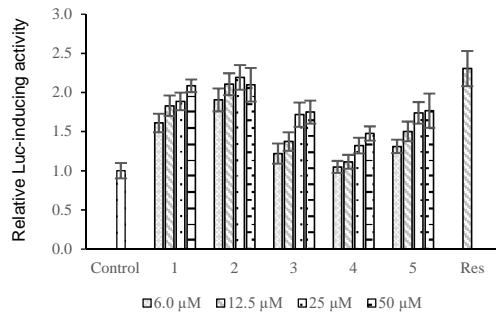


図 2. Neuro2A 細胞における化合物 1-5 の BDNF pIV-Luc 発現誘導率

マルバダイオウは食用として利用されていることから成分ではなくマルバダイオウの抽出物の活性を調べるために、HT22、SY-5YSY、および C6 細胞においても BDNF

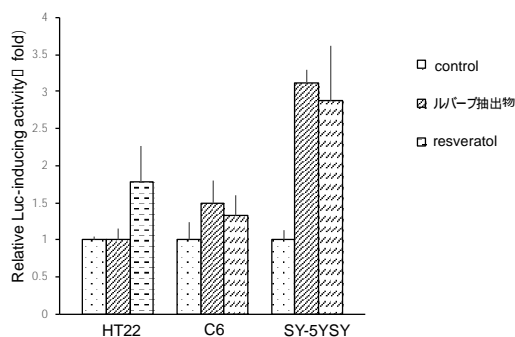
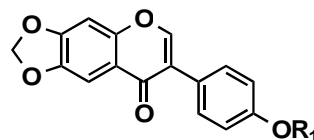
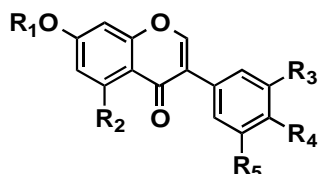


図 3. 様々な細胞における BDNF pIV-Luc 発現誘導率

pIV-Luc 発現誘導率を調べた。その結果、SY-5YSY 細胞における BDNF のプロモーター IV の活性を示した (図 3)。しかし、マルバダイオウのメタノール抽出物や化合物 2 は mRNA やタンパク質の発現の増加は見られなかった。

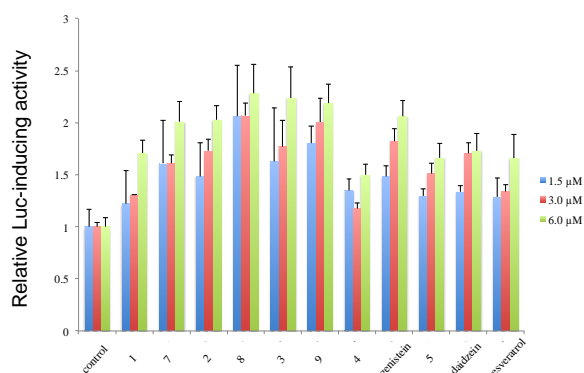
②- 2 . ムラサキツメクサ (*Trifolium pratense* L.) の活性成分単離

ムラサキツメクサ(地上部)のメタノール抽出物をヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールおよび水で分配し、pBDNF の活性誘導評価を行なった結果、*n*-ブタノール抽出物がレポーターの発現を誘導した。そのため、*n*-ブタノール抽出物を HP20、シリカゲル、および ODS カラムクロマトグラフィーを行い、ODS-HPLC を用いて分離・精製を行なった結果、9つの化合物が単離された(1-9)。これらの化合物について NMR や MSを用いて構造解析を行い、これらはイソフラボノイドであると同定した(図4)。



1. R₁ = Glc, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OCH₃, R₅ = H, **ononin**
3. R₁ = Glc, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OCH₃, R₅ = H, **sissotrin**
4. R₁ = Glc, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH, R₅ = H, **genistin**
5. R₁ = Glc, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OH, R₅ = H, **daidzin**
6. R₁ = Glc, R₂ = H, R₃ = OCH₃, R₄ = H, R₅ = OH, **3'methoxy-5'-hydroxy-isoflavone-7-O-β-glucoside**
7. R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H, R₄ = OCH₃, R₅ = H, **formononetin**
9. R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OCH₃, R₅ = H, **biochanin A**
2. R₁ = Glc, **irilone 4'-O-β-glucoside**
8. R₁ = H, **irilone**

図 4. ムラサキツメクサから単離された化合物



これらの化合物のBDNF pIV-Luc発現誘導率を測定した結果、図5に示したように化合物 8 が低濃度でも BDNF のプロモーターIV の活性を示したことがわかった。

図 5. Neuro2A 細胞における化合物 1-9 の BDNF pIV-Luc 発現誘導率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yun YoungSook, Shioura Mariko, Hitotsuyanagi Yukio, Yotsumoto Satoshi, Takahashi Yuji, Aoyagi Yutaka, Kinoshita Takeshi, Takeya Koichi, Inoue Hideshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Garcinielliptone G from Garcinia subelliptica Induces Apoptosis in Acute Leukemia Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2422 ~ 2422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26092422	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 Yun Young Sook, Takeda Yukari, Fukaya Haruhiko, Fuchino Hiroyuki, Kawahara Nobuo, Takahashi Shigeru, Takahashi Yuji, Inoue Hideshi	4. 巻 59
2. 論文標題 A new ent-norabietant diterpenoid from roots of Euphorbia lathyris L.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 2813 ~ 2815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.06.017	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 Yun, Y.S., Noda, S, Takahashi, S., Takahashi, Y., and Inoue, H,	4. 巻 72(1)
2. 論文標題 Piperine-like alkaloids from Piper nigrum induce BDNF promoter and promote neurite outgrowth in Neuro-2a cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 238-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-017-1140-3	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 大真, 尹 永淑, 淵野 裕之, 川原 信夫, 高橋 勇二, 井上 英史
2. 発表標題 マルバダイオウ (Rheum rhaponticum L.) 由来 stilbene 配糖体は BDNF promoter IV 活性を誘導する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------