

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23228001

研究課題名(和文)カイコ冬虫夏草由来のマウス海馬修復因子の構造解析とヒトへの応用開発

 研究課題名(英文) Structure and function of an improving factor in hippocampal impairment originated from the silkworm-parasitic fungus (*Paecilomyces tenuipes*) and practical use for human brain

研究代表者

鈴木 幸一 (Suzuki, Koichi)

岩手大学・その他部局・特任教授

研究者番号：20003791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 159,100,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ冬虫夏草ハナサナギタケの熱水抽出物から同定した新規の生物活性分子は、マウス海馬に発生したアストログリオーシス(神経膠症)修復の最有力候補であり、その分子メカニズムを解明することでヒトへの応用開発を進めた。

その結果、培養アストロサイトに新規生物活性因子を添加することで、神経成長因子と神経成長因子誘導体の遺伝子が発現し、さらに神経初代細胞への効果として神経突起形成を誘導した。このin vitroの分子機構に基づいて、老化促進マウスの脳機能は向上し、ヒトのアルツハイマー型認知症患者の前臨床試験でも改善効果が確認され、新しい機能性食品と医薬品候補を提案した。

研究成果の概要(英文)：A novel and biologically active molecule originated from the extract of entomopathogenic fungus (*Paecilomyces tenuipes* = *Isaria japonica*) was identified as a promising factor which is responsible for improving astrogliosis in the CA3 area of hippocampus of aged mice. This finding led us to the understanding of molecular mechanism: we found that the agent enhances astrocyte proliferation and significantly activates astrocyte-derived NGF and VGF genes, and in primary cultured neurons it accelerates the neurocyte dendrite formation. The in vitro multipotency stimulated us to evaluate the effects of oral administration of the agent on brain improvement in senescence-accelerated mice and preclinical trials with the oral administration of *I. japonica* powder for Alzheimer's dementia (AD). These results suggest that the agent and *I. japonica* powder are a promising astrocyte-targeting drug and new functional food for treating AD.

研究分野：昆虫バイオテクノロジー

キーワード：昆虫利用 機能開発 有用物質生産 養蚕イノベーション 病理解剖 生物有機化学 脳神経 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

最大の生物種を有する昆虫、または昆虫関連生産物を生物資源とする医薬品はこれまで開発されてこなかった。しかし、カメムシ科ツクツクボウシに寄生するツクツクボウシタケ (*Isaria sinclairii*) から単離された免疫抑制物質は抗真菌抗生物質マイオリシンと同じ構造であったが、構造改変が行われて毒性を軽減した FTY720 (フィンゴリモド) は多発性硬化症 (中枢神経系の慢性炎症性脱髄疾患で自己免疫疾患の1つ) の新しい治療薬として、2009年に米国食品医薬品局 (FDA) と欧州医薬品庁 (EMA) に承認申請した。FDAでは、医薬品優先審査を実施するとしているが、日本発の昆虫関連生産物に由来する新薬が誕生している。

京都大学薬学部の藤多哲朗名誉教授らにより20年の歳月を経て誕生したもので、生物資源である昆虫に寄生する糸状菌の子実体冬虫夏草の培養液からスタートし、ゲノム創薬による特定の標的分子を目指したアプローチではなく、昆虫関連生産物の生理活性を基盤とし有効生物活性分子の同定を目標にした古典的なアプローチによる成功例である。このアプローチであるからこそ、人類にとって有益で想像を超えた生物活性分子に辿りつく機会にも恵まれる (谷田, 2010)。

申請者を代表とする研究グループはこれまでに、ヤママユ由来の新規の天然ペプチドが可逆的な細胞増殖抑制を有することから細胞増殖制御剤として提案し (Peptides, 2010)、またコガタルリハムシ由来の新規の休眠特異的ペプチドの立体構造を明らかにし (41個のアミノ酸から構成、Biochemistry, 2006)、モルヒネ耐性に効果的な鎮痛剤として提案してきた。さらに、キイロスズメバチ巣由来の細胞殺傷性の新規のフェルギノール化合物の構造 (Biol. Pharm. Bull., 2008) を明らかにしてきた。しかし、これらの昆虫または昆虫関連生産物からの新規の生物活性分子は、ヒトの疾病を予防または治療を目標にしたリード化合物にまだ到達していない。

生物資源はCOP10においても最大のテーマであり、人類の持続的発展にとっては不可欠な基盤を形成する中で、申請者らは、カイコ蛹に寄生した冬虫夏草ハナサナギタケ (*Paecilomyces tenuipes* = *Isaria japonica*) からの熱水抽出画分を老化促進マウスに経口投与したところ、空間パターン認識を司る海馬CA3領域に発生したアストログリオーシス (神経膠症) が濃度依存的に消失し、老化促進ネズミにおける文脈・空間記憶学習機能が改善することを明らかにした (J. Insect Biotech. and Sericol., 2010; 特許出願, 2010-200352)。

2. 研究の目的

現代におけるヒトの認知症の本格的な治療薬は開発されておらず、アセチルコリン分解酵素の阻害剤による認知症進行の遅延作用のみである。本研究グループは、昆虫機能利用、病理解剖、生物有機科学、生体機能イメージング、そしてヒト患者を対象にした脳神経内科の各分野において研究実績のあるグループを形成し、わが国のオリジナルな生物資源であるカイコ冬虫夏草 (ハナサナギタケ) から老化促進ネズミの海馬修復因子を単離構造解析し、それをヒトの認知症患者で試験することにより、世界初の認知症に対応する機能性食品と医薬品候補物質を提案する。

3. 研究の方法

岩手大学鈴木グループは、カイコ冬虫夏草ハナサナギタケ熱水抽出物から海馬修復因子を単離精製し、その構造解析を大阪市立大学品田グループが担当し、メカニズムの解析は、岩手大学の鈴木グループと御領グループが生化学・分子生物学的手法と組織化学的手法で行った。一方、岩手大学から提供するカイコ冬虫夏草のサンプルについては、岩手医科大学寺山グループが、岩手医科大学の倫理申請審査結果通知書 (研究題名: カイコ冬虫夏草の乾燥粉末、熱水抽出画分の認知症患者の脳機能向上に及ぼす効果、2011年2月10日付) と被験者及び被験者家族の同意書を得て、ヒト試験を行った。また、ヒト試験における脳機能解析においては、大阪大学吉岡グループが参画し、磁気共鳴法を駆使しながら病態の統合評価 (構造、代謝、機能) を行った。さらに、熱水抽出物の急性毒性についてはマウス、亜慢性毒性についてはラットを用いて、岩手大学の鈴木グループと御領グループ、大阪市立大学品田グループ、岩手医科大学寺山グループが、一連の Chemical profile・行動・摂食・体重・各種血液パラメーター・病理組織の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 海馬修復因子の同定とメカニズム解析 (岩手大学鈴木グループと御領グループ、大阪市立大学品田グループ)

① 単離精製とバイオアッセイ系- これまでの主要な冬虫夏草はチベット産のコウモリガ寄生の *Ophiocordyceps sinensis* であり、生理活性物質として cordycepin, cordycepic acid, ergosterol, polysaccharides, nucleosides, peptides などが、同定されており、医薬品候補物質として期待されている (Yue et al., 2012)。しかし、これらの既知の生理活性物質とは全く異なり、本研究で単離同定に成功した新規物質は、カイコ乾燥蛹を菌床として子実体を形成したハナサナギタケ (*I. japonica*) の熱水抽出物から、2.5年間の歳月を要した精製法の試行錯誤の結果である (図1)。分子量は566.3で、水溶性のペプチド誘導体構造を有

する新規の物質であることを明らかにした（ナトリードと命名し、海外特許出願のために化学構造は未発表）。新規物質の構造決定のためのバイオアッセイ系は、新生児マウス大脳神経細胞初代培養より得られたアストロサイトを培養し、その増殖促進活性と特異的な免疫組織染色（GFAP 抗体陽性反応、図 2）を指標にすることで、確立することができた（特開 2013-184923）。

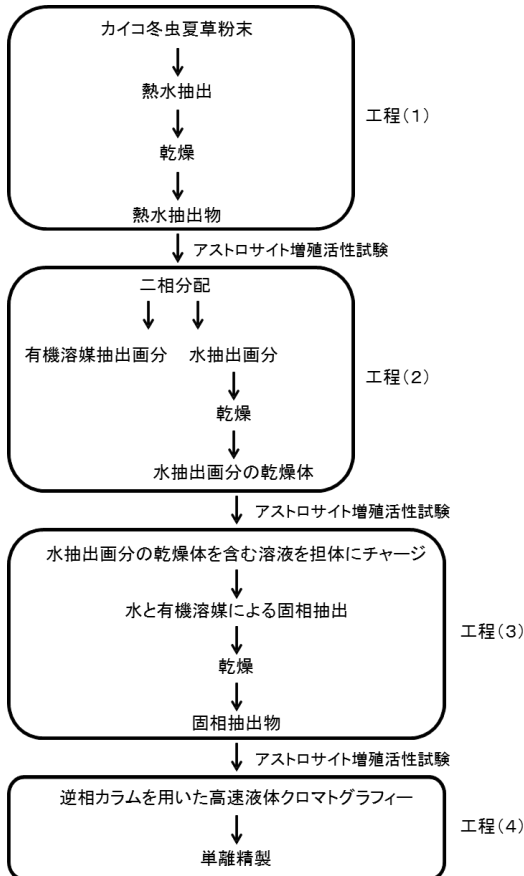
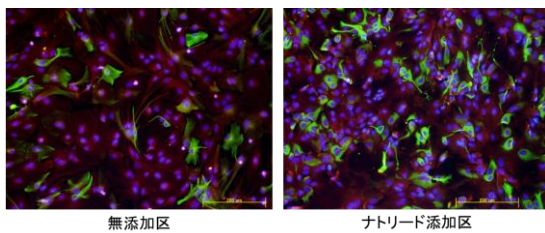


図 1. ナトリードの単離精製工程



赤:アストロサイト (EAAT2:グルタミン酸トランスポーター)
 緑:反応性アストロサイト (GFAP:グリア細胞線維性酸性タンパク質)
 青:核 (DAPI:核マーカー)

図 2. アストロサイトの免疫組織化学染色

② 分子作用機構- 精製単離物のナトリードをアストロサイトに添加培養し、免疫組織染色により細胞特性を明らかにすると、全アストロサイトの 39%がグリア線維性酸性タンパク (GFAP) 抗体陽性反応細胞 (反応性アストロサイト) で構成されていた。すなわち、EAAT2 (グルタミン酸トランスポーター) が大脳皮質・海馬に優位に発現することが知られていることから、アストロサイト増殖の

重要な機能性が考えられる。そこで、ナトリードと各種細胞の関連性を明らかにするために、ヒト正常皮膚線維芽細胞 (NHDF)、ヒト肝がん細胞 (HepG2)、ヒト白血病細胞 (K562) を用いて増殖を確認したところ、3 種とも増殖抑制があり、むしろアストロサイトにおける増殖が特異的であると考えられる (図 3)。さらに、ナトリードと遺伝子発現の関連性を明らかにするために、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、神経成長因子 (NGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A)、神経成長因子誘導タンパク質 (VGF) の遺伝子発現を解析したところ、NGF と VGF の遺伝子が大幅に発現した (図 4)。一方、*in vivo* 試験として老化促進マウス (SAMP8) の記憶学習に及ぼす影響を解析するために、ナトリードを経口投与し、モリス水迷路実験を行った。その結果、正常マウスと老化促進マウスの間で有意に空間学習記憶に違いがあり (標的クワドラント 1 での滞在時間)、ヒト認知症薬の塩酸ドネペジル (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) には効果が認められなかった。しかし、約 5 分の 1 濃度のナトリード (25 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) では有意に正常マウスレベルまで記憶学習が回復した (図 5)。以上の *in vitro* と *in vivo* 試験から、当初想定した海馬修復因子は、アストロサイト増殖因子 (ナトリード) \Rightarrow NGF・VGF の遺伝子活性化 \Rightarrow 神経細胞突起形成 \Rightarrow 記憶学習の改善という作用機構で展開しているものと考えた (外国特許出願、PCT/JP2015 76797)。

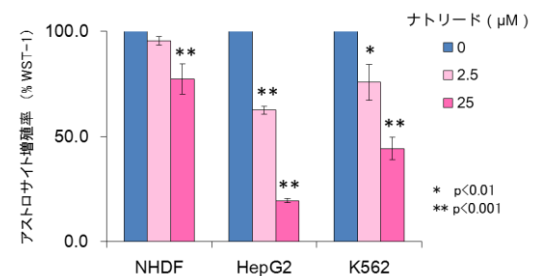


図 3. ナトリードが各種細胞増殖に及ぼす影響

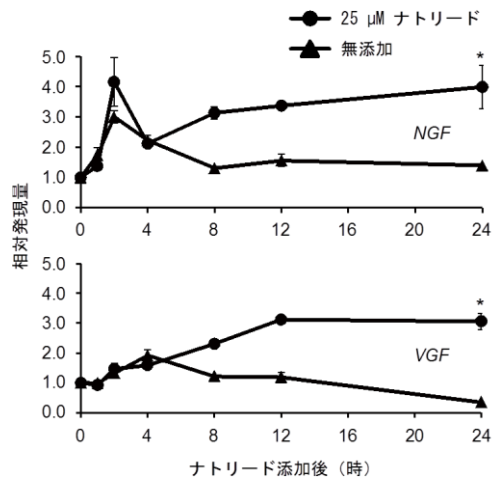


図 4. ナトリードがアストロサイトの 2 遺伝子の発現に及ぼす影響

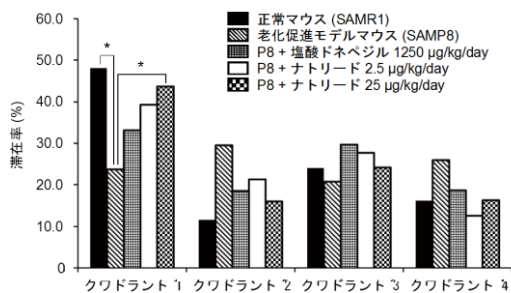


図5. ナトリードが老化促進モデルマウスの記憶に与える影響

(2) 構造解析と合成系 (大阪市立大学品田グループ)

機器分析を駆使したナトリードの構造解析を行い、その構造を推定した。その結果、非天然型アミノ酸3種を含む5つのアミノ酸から構成されている極めて特異な構造を有すること、ならびに、新規な天然物であることが示唆された。そこで、推定構造が正しいかどうかを検証・確認するために全合成研究を行った。まず、ナトリードの部分構造が含まれる構造類似の天然物の全合成研究を行いフラグメント合成を達成した(論文③)。また、ナトリードの全合成に直結する、含窒素および炭素環状構造体の構築研究に取り組んだ(論文②、⑥)。新たな合成法を導入することで、複雑な構造を有するナトリードの効率的な合成基盤が構築できた。これらの研究成果をもとにナトリードの全合成が最終局面を迎えている。また、合成中間体の化合物データとナトリードのデータの比較から、推定構造が正しいことがほぼ確実となっている。現在、全合成による量的供給と分子標的の解析を含めた誘導体合成を進めている。

(3) ヒト試験と核磁気共鳴による統合診断法 (岩手医科大学寺山グループ、大阪大学吉岡グループ)

カイコ冬虫夏草ハナサナギタケ乾燥粉末 1.6 g/subject/day を経口投与した結果、骨髄中のアセチルコリン濃度が対照群と比較して有意に高く、コリン濃度には有意差が認められなかった(図6)。すなわち、アルツハイマー症の重要な改善指標である骨髄中のアセチルコリン濃度上昇に、クルード状態でも効果を発揮できるということは、カイコ冬虫夏草ハナサナギタケには医薬品候補物質が含有されていることを証左するものであり、本研究成果の新規物質との関連性がますます重要課題になった(論文①)。一方、岩手医科大学と大阪大学のグループでは、神経疾患モデルマウスの病態とMRIによる画像解析を対応させることに成功し、アルツハイマー症患者に応用する基盤を構築することができた(図7、論文⑨)。

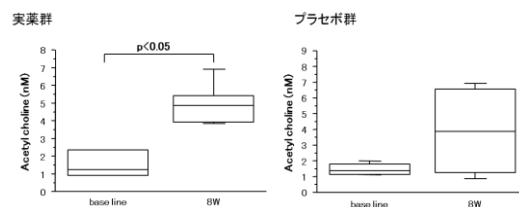


図6. Alzheimer型認知症患者における髄液Ach濃度

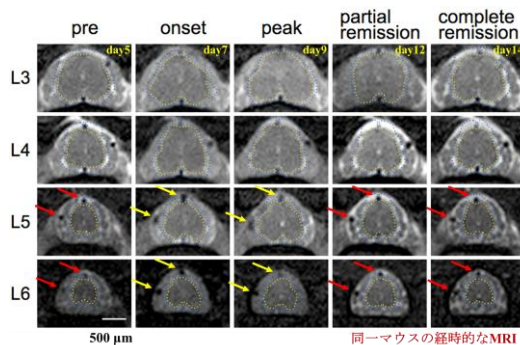


図7. 超高磁場MRIを用いて撮影した中枢神経系疾患モデルマウスの画像

(4) 安全性評価試験 (岩手大学の鈴木グループと御領グループ、大阪市立大学品田グループ、岩手医科大学寺山グループ)

カイコ冬虫夏草熱水抽出物の Chemical profile では、NMR および MS の解析により既知の化学構造は認められなかった。また、急性毒性の評価においては、経口 LD_{50} は $>3,000$ mg/kg であり、28 日間の亜慢性毒性評価においては、25 mg/kg および 500 mg/kg 投与でも死亡個体は認められず、食物摂取量・各種の血液パラメーター・臓器の組織化学的観察において、コントロールと比較して有意差は認められなかった。以上の点から、カイコ冬虫夏草 (*I. japonica*) の熱水抽出物の経口投与では、安全性は確認されたものと考えられ機能性食品開発の基盤が構築された(論文④)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 75 件)

①寺山靖夫・大塚千久美・鈴木幸一: カイコ冬虫夏草の乾燥粉末のアルツハイマー型認知症脳機能向上に及ぼす影響. 岩手医学雑誌, 査読有, in press (2016) <http://ima.iwate-med.ac.jp/guidance.html>

②Nishimura E, Murakami S., Suzuki K., Amano, K., Tanaka R., Shinada, T.: Structure determination of monomeric phloroglucinol derivatives with a cinnamoyl group isolated from propolis of stingless bee, *Tetragonula carbonaria*. Asian Journal of Organic Chemistry, 査読有, in press (2016) DOI: 10.1002/ajoc.201600106

- ③ Yasuno Y, Nishimura A, Yasukawa Y, Karita Y, Ohfuné Y, Shinada T: The stereoselective construction of *E*- and *Z*- Δ -Ile from *E*-dehydroamino acid ester: the synthesis of the phomopsin A tripeptide side chain. *ChemComm*, 査読有, 52, 1478-1481 (2016) DOI: 10.1039/c5cc08458j
- ④ Sillapakong P, Goryo M, Sasaki J, Oda S, Hiraga T, Uchiyama S, Nishimura E, Shinada T, Ohtsuka C, Terayama Y, Suzuki K: Acute and sub-chronic toxicity analyses of hot-water extract of *Isaria japonica* from silkworm (*Bombyx mori*). *Current Traditional Medicine*, 査読有, 1, 184-192 (2015) DOI: 10.2174/221508380103151231145946
- ⑤ Paerhati Y, Ishiguro S, Ueda-Matsuo, R., Yang P, Yamashita T, Ito K, Maekawa H, Tani H, Suzuki K: Expression of AmGR10 of the gustatory receptor family in honey bee is correlated with nursing behavior. *PLOS ONE*, 査読有, 10, e142917(1-9) (2015) DOI:10.1371/journal.pone.0142917
- ⑥ Manabe A, Ohfuné Y, Shinada T: Toward the total synthesis of tetrodotoxin: stereoselective construction of the 7-oxanorbornane intermediate. *Tetrahedron Letters*, 査読有, 55, 6077-6080 (2014) DOI:10.1016/j.tetlet.2014.09.036
- ⑦ Mori Y, Chen T, Fujisawa T, Kobashi S, Ohno K, Yoshida S, Tago Y, Komai Y, Hata Y, Yoshioka Y: From cartoon to real time MRI: in vivo monitoring of phagocyte migration in mouse brain. *Scientific Reports*, 査読有, 4, 6997(1-7) (2014) DOI: 10.1038/srep06997
- ⑧ Ooi Y, Inui-Yamamoto C, Suzuki T, Nakadate H, Nagase Y, Seiyama A, Yoshioka Y, Seki J: In vivo magnetic resonance imaging at 11.7 Tesla visualized the effects of neonatal transection of infraorbital nerve upon primary and secondary trigeminal pathways in rats. *Brain Research*, 1579, 84-92 (2014) doi:10.1016/j.brainres.2014.07.013
- ⑨ Mori Y, Murakami M, Arima Y, Zhu D, Terayama Y, Komai Y, Nakatsuji Y, Kamimura D, Yoshioka Y: Early pathological alterations of lower lumbar cords detected by ultrahigh-field MRI in a mouse multiple sclerosis model. *International Immunology*, 26, 93-101 (2014) doi: 10.1093/intimm/dxt044
- ⑩ Abe S, Yamamoto K, An Y, Saeki J, Itagaki T, Kofujita H, Suzuki K: CO₂ anesthesia enhances infection rate of *Cordyceps militaris* (Hypocreales: Clavicipitales) on pupae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 査読有, 83, 77-81 (2014) DOI:10.11416/jibs.83.3.077

[学会発表] (計 116 件)

- ① 鈴木幸一他 10 名、カイコ冬虫夏草に由来する海馬修復因子の精製と機能解析、平成

- 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (日本蚕糸学会第 85 回大会)、2015. 10. 26-27、北海道大学農学部 (札幌)
- ② 鈴木幸一他 9 名、カイコ冬虫夏草の安全性試験、平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 (日本蚕糸学会第 86 回大会)、2016. 3. 17-18、京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス (京都)
- ③ Shinada T 他 2 名、Total synthesis of cirratinomycin A and B、日本化学会第 96 回春季年会、2016.3.24-27、同志社大学京田辺キャンパス (京都府)
- ④ Terayama Y 他 9 名、Amiroid imaging of dementia using the radioligand 18F-AV45(Florbetapir F18)、第 56 回日本神経学会学術集会、2015.5.20-23、ホテル日航新潟 (新潟)
- ⑤ 吉岡芳親、磁気共鳴スペクトロスコピーによるダイナミックなヒト脳内温度変化の非侵襲的測定、第 93 回日本生理学会、2016.3.22-24、札幌コンベンションセンター (札幌)

[図書] (計 4 件)

- ① Suzuki K; Elsevier Inc., *Handbook of Hormones-Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, 2016, pp.473-474.
- ② Suzuki K, Tsushima M, Goryo M, Shinada T, Yasuno Y, Nishimura E, Terayama Y, Mori Y, Yoshioka Y; Bentham Science, *Frontiers in Clinical Drug Research-Alzheimer Disorder* (Vol. 2), 2016, in press.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 6 件)
- ① 名称: 環状ペプチド誘導体とその製造法および組成物
発明者: 鈴木幸一、品田哲郎、寺山靖夫他 7 名
権利者: 国立大学法人岩手大学、大阪市立大学、岩手医科大学、(株) ロッテ
種類: 特許
番号: PCT/JP2015 76797
出願年月日: 2015 年 9 月 18 日
国内外の別: 外国
- ② 名称: 環状ペプチド誘導体とその製造法および組成物
発明者: 鈴木幸一、品田哲郎、寺山靖夫他 7 名
権利者: 国立大学法人岩手大学、大阪市立大学、岩手医科大学、(株) ロッテ
種類: 特許
番号: 特願 2014-194509
出願年月日: 2014 年 9 月 24 日
国内外の別: 国内
- ③ 名称: ハナサナギタケ由来抽出物と、これを含むアストロサイト増殖促進およびアストロサイト増殖促進剤の製造法
発明者: 鈴木幸一、山本圭一郎、福田拓斗、平賀貴志、対馬正秋、鈴木文夫、安田英之

権利者：国立法人岩手大学、東白農産企業組合、(株) ロッテ
種類：特許
番号：特願 2013-184923
国内外の別：国内
④名称：共振回路
発明者：吉岡芳親、朱大松
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2012 63325
出願年月日：2012年5月24日
国内外の別：外国

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

報道関連情報：2015年7月5日(土)のTBS「夢の扉+」で、「認知症をカイコ冬虫夏草の不思議パワーで治せ！」が放映され、鈴木幸一、寺山靖夫が出演した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 幸一 (SUZUKI, Koichi)
岩手大学・研究交流部・特任教授
研究者番号： 20003791

(2) 研究分担者

御領 政信 (GORYO, Masanobu)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号： 80153774

品田 哲郎 (SHINADA, Tetsuro)
大阪市立大学・理学研究科・教授
研究者番号： 30271513

寺山 靖夫 (TERAYAMA, Yasuo)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号： 70146596

吉岡 芳親 (YOSHIOKA, Yoshichika)
大阪大学・学内共同利用施設等・教授
研究者番号： 00174897