

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06163

研究課題名(和文) スギ材ジテルペン成分の抗アルツハイマー病活性とその作用機構

研究課題名(英文) Anti-Alzheimer's disease activity of sugi wood diterpene component and its mechanism.

研究代表者

小藤田 久義 (Kofujita, Hisayoshi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40270798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病にはアミロイドペプチド(A β)が関与しており、A β は重合・凝集することにより毒性が発現する。本研究ではフェルギノールをはじめとするスギ揮発性ジテルペン類のA β 毒性緩和機能について検討した。スギ材より単離されたジテルペン類ではフェルギノールおよびデヒドロフェルギノールに活性が認められ、これまでにA β 毒性緩和作用が報告されている抗アルツハイマー病候補化合物(ギンコライドA、カルノシン酸、ロスマリン酸、モリン)とほぼ同程度の効果を示した。また、*in vitro*条件でのチオフラビンアッセイによりフェルギノールはモリンと同等のA β 凝集抑制作用を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで実用的に処方されてきたアルツハイマー治療薬はいずれも対症療法薬であり、重篤な患者を治癒させることは極めて困難であるとされている。したがって、発症する以前もしくは症状が軽微なうちに対処することが合理的といえる。フェルギノール等のテルペン類は揮発性であり、アロマオイルとして日常的にアルツハイマー病の予防に利用できることが期待される。一方、これらスギジテルペン類は、合板製造工程の乾燥廃液から大量かつ安価に分離回収することができるため、原料供給の面においても優れている。本研究結果により焼却処理されている廃液の有効利用が可能となり、ひいては国産材の利用促進につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： β -Amyloid (A β) peptide is involved in the onset of Alzheimer's disease, and toxicity develops due to the polymerization and aggregation of A β . In this study, we investigated the A β toxicity-reducing effect by volatile diterpenes such as ferruginol. Among diterpenes isolated from sugi wood, ferruginol and dehydroferruginol have been shown the effect, and the effect was the same as anti-Alzheimer's disease candidate compounds (ginkgolide A, carnosic acid, rosmarinic acid, morin) that have been reported previously. In addition, thioflavin assay under *in vitro* conditions revealed that ferruginol has an A β aggregation inhibitory effect equivalent to that of morin.

研究分野：木材化学

キーワード：アルツハイマー病 スギ テルペン アミロイド

1. 研究開始当初の背景

我が国の65歳以上の高齢者人口は総人口の27.3%に達し、世界でも類を見ない超高齢化社会が到来しつつある(平成29年版高齢社会白書)。認知症は高齢化にともなう最も深刻な社会問題の一つであり、2025年の患者数は700万人を超えるとの推計も発表されている。このうち、アルツハイマー病の患者数は466万人と見積もられ、将来の認知症患者の過半がアルツハイマー病になると予測されている(厚生労働省調べ)。

アルツハイマー病の病態機序には未だ不明な点も多いが、多くの状況証拠からA β がアルツハイマー病の病因であるとされている(アミロイド仮説)。A β は代謝産物として恒常的に生合成されるペプチドであり、36~43のアミノ酸残基を持ついくつかの種類が知られている。アルツハイマー病患者の脳では、特に凝集性の高いA β 42が過剰に生産され、重篤化した患者の脳内で老人斑と呼ばれる凝集体を形成する。

以上の知見に基づいて、A β 42やその凝集体を標的とした治療戦略が進められてきた。A β 42は構成アミノ酸であるチロシンの酸化によるラジカル生成反応を出発点として重合し、それが凝集・沈着していく過程で神経細胞毒性を発現する。また、A β の重合にともなう組織内の活性酸素濃度が上昇することも報告されており、重合したA β による酸化ストレスの亢進も神経毒性の発現に深く関わっていることが推定されている。

研究代表者は、生理活性を有するスギの抽出成分を広く検索し、フェルギノール等の顕著な抗酸化活性を有するいくつかのジテルペンを見出している。アルツハイマー症に対する薬剤の施用にあたっては、いかにして有効成分をターゲット部位である脳に到達させるかが鍵となる。揮発性と脂溶性を兼ね備えた抗酸化性スギジテルペン類の化学的特徴は、その効果が確認されたならば、経鼻/経皮投与などの幅広い形態で処方可能な薬剤としての可能性が拓けるものと期待されていた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、生理活性作用を有するスギ成分(揮発性抗酸化ジテルペン)をアルツハイマー病の発症防止ならびに病態改善に役立てることである。研究代表者らは、これまでにスギの抗酸化型ジテルペンの一つであるフェルギノールがA β の毒性緩和作用を示すこと、その活性は抗アルツハイマー病作用を持つ物質として知られているイチョウ葉抽出物に匹敵することを見出した。本研究の目的であるとともにその核心をなす学術的「問い」は、スギに含まれるこれらジテルペン類のA β 毒性緩和機能の有用性はどの程度で、その作用機構はどのようなものか?ということである。以上を踏まえた具体的な研究課題として、スギジテルペン類の抗アルツハイマー活性の検証、先行研究における他の候補化合物との比較、スギジテルペンによる作用機構の解明の3点を設定し、検討を行った。

3. 研究の方法

本研究では、スギ材由来の単離ジテルペン類を試料として、線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いたバイオアッセイを行った。*C. elegans*は、寿命が短く世代交代が早い(短期間での評価が可能)、供試個体を凍結保存できる(随時に復元可能)、ヒト病気遺伝子の65%を保持(病態類似性が高い)、身体の透明性が高い(顕微鏡による視覚的観察が容易)等の優れた特徴を有している。抗アルツハイマー活性の評価試験には、A β ペプチド遺伝子導入線虫*C. elegans* CL4176系統を用いた。CL4176系統には温度依存性のA β 合成遺伝子が組み込まれており、25℃では筋組織特異的にA β が発現し麻痺状態となる。このとき抗アルツハイマー活性物質を投与することにより、A β の毒性が緩和され、麻痺の発生頻度が減少することが報告されている。本試験では、温度上昇後に麻痺状態になった個体の数を、試料投与群と対照群(餌である大腸菌のみを与えた線虫)とで比較し、統計的有意差を検定した。検討項目および実施方法は以下のとおりとした。

(1) スギジテルペン類の抗アルツハイマー活性の検証：スギ材にはフェルギノールと類似構造を持つ多種の機能性ジテルペン類が存在する。それらのA β 毒性緩和活性はフェルギノールと比較してどの程度なのか、また、高い活性を有する化合物間に共通する化学的な傾向や、分子構造と活性の相関関係の有無についても、検討・評価した。

(2) 先行研究における他の候補化合物との比較：これまでにA β 毒性緩和活性を有する天然有機化合物がいくつか報告されているが、いずれも本研究とは手法の異なる生物試験法により機能評価がなされている。これらを本研究と同じ評価系で比較した場合の活性の違いはどの程度なのか、また、各化合物の抗酸化活性とA β 毒性緩和活性には相関があるのかについて検討・評価した。

(3) スギジテルペンによる作用機構の検証：スギジテルペンのA β 毒性緩和作用は抗酸化反応(ラジカル捕捉反応)によるA β 重合抑制効果に由来するものと推定されているが、実証がなされていない。そこで、A β の重合物と特異的に反応して蛍光を発するチオフラビンのアッセイ系を利用してA β 凝集抑制作用の定量的評価を行った。

1. 研究成果

(1) スギジテルペン類の抗アルツハイマー活性の検証：

フェルギノールと類似構造を持つジテルペン類をスギ材抽出物から単離精製し、抗AD活性試験を行ったところ、抗酸化型ジテルペンであるデヒドロフェルギノールにフェルギノールと同程度に有意な効果が認められた。一方、類似の構造を有する他の非酸化型ジテルペンでは効果が見られなかったことから、線虫の体内では前2者のみが抗酸化作用を発現したことにより抗A効果がもたらされたものと推測された。このことは両者の共通構造であるイソプロピルフェノール部位に由来するラジカル捕捉作用が抗アルツハイマー活性を発現するための鍵となっていることを示唆しており、当初の目的である高い活性を有する化合物間に共通する分子構造および化学的な傾向と活性の相関関係についてある程度明らかにできたものと思われる。

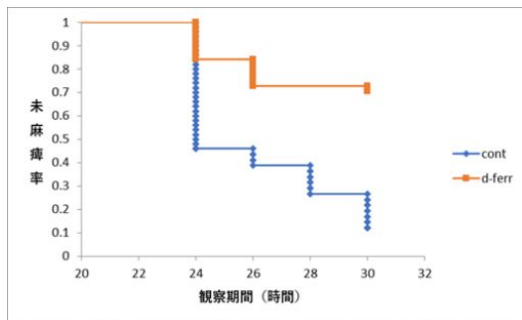


図1 デヒドロフェルギノールの麻痺率

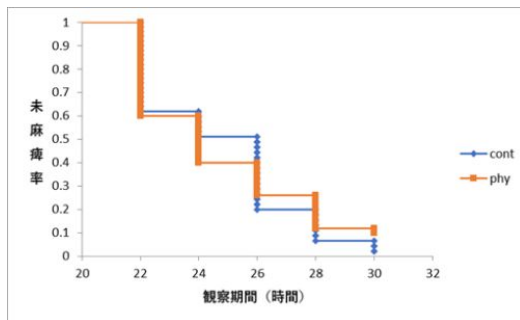


図2 フィロクラデン類の麻痺率

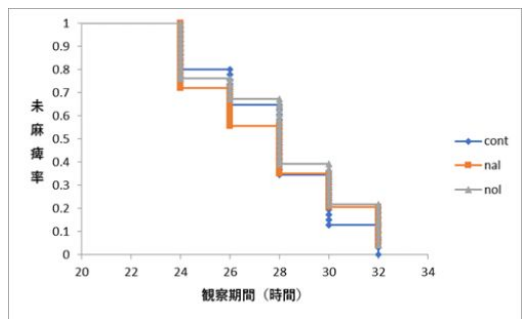


図3 サンダラコピナリナール/ノールの麻痺率

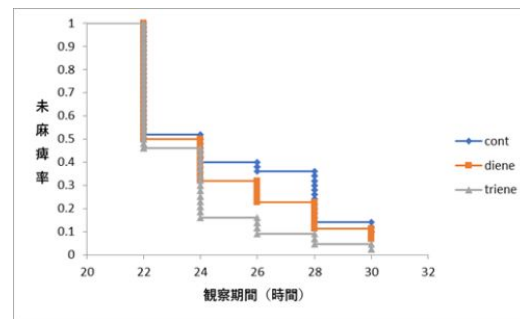


図4 アビエタジエン/トリエンの麻痺率

(2) 先行研究における他の候補化合物との比較：

これまでにA 毒性緩和作用が報告されている抗アルツハイマー病候補化合物（ポジティブコントロール4種類：ギンコライドA、カルノシン酸、ロスマリン酸、モリン）を用いて同様の試験を行い、A 毒性緩和作用の比較を行った。その結果、フェルギノールとポジティブコントロール4種には同等のA 毒性緩和作用が認められ、いずれの試料間の比較においても有意な差が認められなかった。これよりフェルギノールは以前の研究で報告されている他の天然系活性物質と同等の抗アルツハイマー病作用を有するものと推察された。また、ポジティブコントロールのうちギンコライドAを除く3種に顕著な抗酸化活性が認められたことから、あらためてA 毒性緩和作用と抗酸化活性との関連性が示唆された。

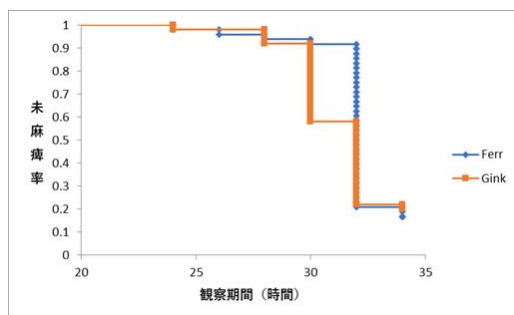


図5 ギンコライドAの麻痺率

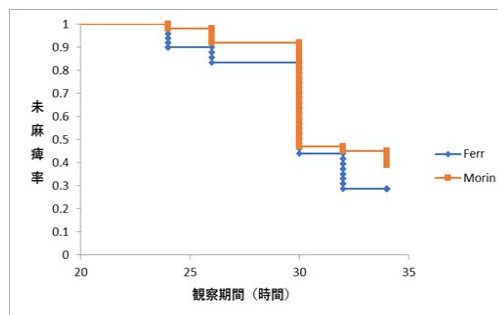


図6 モリンの麻痺率

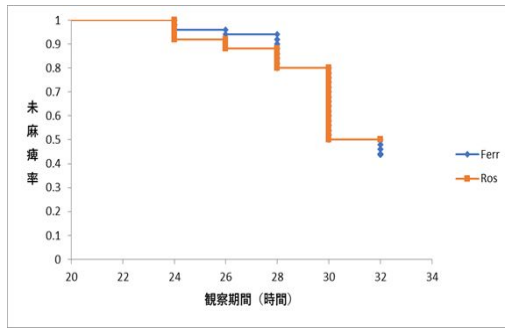


図5 ロスマリン酸の麻痺率

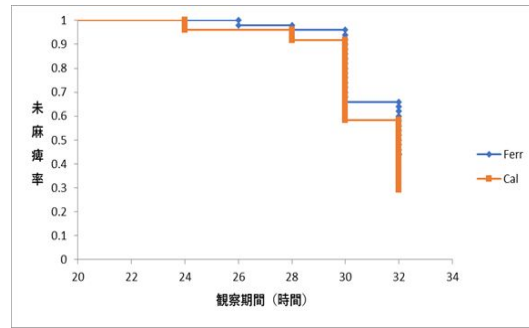


図6 カルノシン酸の麻痺率

(3) スギジテルペンによる作用機構の検証：

フェルギノールが有するA 毒性緩和活性の作用機構を解明するために、フェルギノールによるA ペプチドに対する凝集抑制作用について検討した。A 凝集抑制作用を検証するために、in vitro 条件での凝集状態をチオフラビンアッセイによりモニターしたところ、フェルギノールにはモリンと同等の活性が認められた。以上の結果から、フェルギノールはA 凝集ステージにおいて、チロシンの酸化による生じるラジカル種を強力な抗酸化能力によって捕捉・消去することによりそれ以降の病態の進行を阻止することで、結果として毒性緩和作用を示すことが推定された。

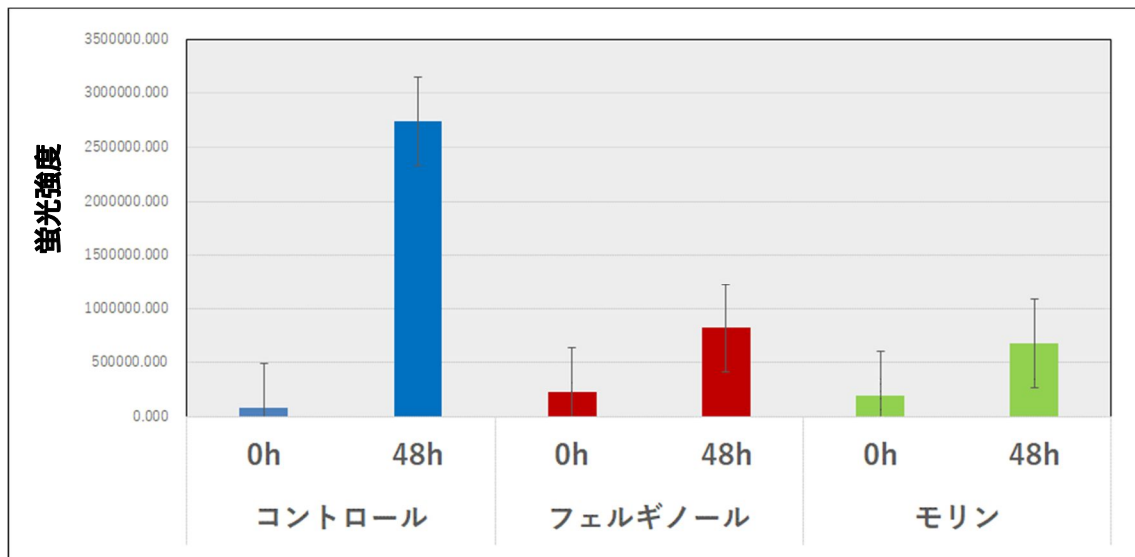


図7 フェルギノールのA 凝集抑制作用 (チオフラビンアッセイ法)

まとめ：

これまで様々なアルツハイマー治療薬が検討されてきたが、実用的に処方されているのはいずれも対症療法薬であり、重篤な患者を治癒させることは極めて困難であるとされている。したがって、アルツハイマー病への対抗策としては、発症する以前もしくは症状が軽微なうちに対処することが合理的である。本研究で利用対象としているフェルギノール等の抗酸化型スギジテルペン類は揮発性であるため、アロマオイルとして用いることで日常的にアルツハイマー病の予防に利用できることが期待される。

一方、これらスギジテルペン類は、合板製造工程で排出される乾燥廃液から大量かつ安価に分離回収することができるため、原料供給の面においてもきわめて優れた素材であるといえる。本研究成果のもう一つの側面としては、現在は廃棄物として焼却処理されているスギ材の乾燥廃液から収益性の高い商品を生み出すことによって、地域産業の活性化や国産材の利用促進に貢献することもあげられよう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamaji Yoshie, Wakabayashi Tokumitsu, Kofujita Hisayoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Potential of sugi wood diterpenes as an Alzheimer's disease preventive and therapeutic drug by the β -amyloid toxicity reduction effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 76-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-020-01923-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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中文悠、若林篤光、楠本倫久、小藤田久義
2. 発表標題 国内産樹木精油の抗アルツハイマー病作用
3. 学会等名 日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中文悠、若林篤光、小藤田久義
2. 発表標題 針葉樹揮発成分の抗アルツハイマー病作用
3. 学会等名 第2回抽出成分討論会（シンポジウム）
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
---------	---------