

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07143

研究課題名(和文)新規天然資源の開発とアルツハイマー病治療薬を目指した化合物の探索

研究課題名(英文)Development of new natural resources and discovery of novel medicinal seeds for anti-Alzheimer disease

研究代表者

高取 薫(木下薫)(Takatori, Kaoru (Kaoru Kinoshita))

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40247151

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)：アルツハイマー病治療薬の開発を目的に、新たな天然資源の開発を目指した。海洋由来真菌の物質生産に関わる遺伝子を活性化させたものとキノコ子実体を海洋由来真菌で発酵させたものに、新たな物質生産を確認した。アルツハイマー病の原因と考えられ、脳内で産生されるアミロイド(A β)の産生に関わる酵素BACE1の阻害またはA β 凝集抑制活性を示す化合物を、新たに開発した資源と既存の天然資源であるサボテン科植物、海洋由来真菌、およびキノコ子実体から探索した。その結果、サボテン科植物からA β 凝集抑制活性を示す数種の新規サボニン、海洋由来真菌とキノコ子実体からは両活性を示す化合物を単離し、構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、アルツハイマー病に対する根本的な治療薬はなく、症状の進行を抑える対処療法的な治療薬としてアセチルコリンエステラーゼ阻害薬などがあるのみである。従って根本的な治療薬の開発が急がれている。このような背景から、本研究ではアルツハイマー病の原因とされるアミロイド β の産生と凝集を阻害するという根本的な治療薬となりうる化合物を天然資源から見いだすことを目的としている。本研究では既存の資源から複数の作用点を有する抗アルツハイマー活性を有する化合物を見いだすことに成功したことから、新たなアルツハイマー病治療薬の開発に繋がる研究である。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of Alzheimer's disease is the production and aggregation of amyloid- β (A β) peptides in the brain. Amyloid- β is produced by the proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein by β -secretase (BACE1) and γ -secretase. In this study, we search the compounds which showed BACE-1 inhibitory activity and A β aggregation inhibitory activity from newly developed natural resources, cacti, marine-derived fungi and mushrooms. The new natural resources were developed using histone deacetylase (HDAC) inhibitor to activate the biosynthetic genes. Marine-derived fungi were cultured with HDAC inhibitors for the production of new secondary metabolites. The new compounds were produced from newly developed natural resources. Some new saponins isolated from cacti showed A β aggregation inhibitory activity and some compounds isolated from marine-derived fungi and mushrooms showed A β aggregation inhibitory activity and BACE1 inhibitory activity.

研究分野：天然物化学

キーワード：新規天然資源 アルツハイマー病 アミロイド β 凝集抑制 BACE1 サボテン科植物 キノコ子実体 海洋由来真菌 発酵

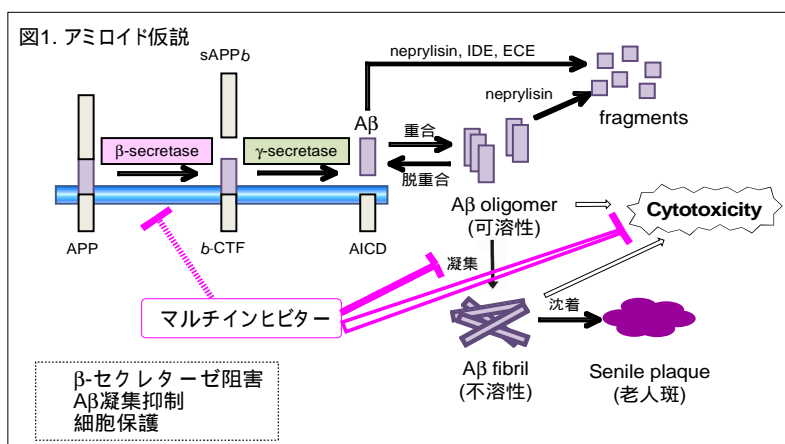
1. 研究開始当初の背景

(1)高齡化社会を迎えている日本では認知症患者が増加傾向にあるが、認知症の約7割がアルツハイマー病と推定されている。現在、アルツハイマー病の原因としてアミロイド仮説が有力となっている。これは、脳内でアミロイド前駆蛋白質(APP)からβ-セクレターゼ(BASE-1)およびγ-セクレターゼによって切り出されたアミロイドβ(Aβ)が、ネプリライシンなどによって分解されずに重合してAβ oligomerを形成し、さらにそれが凝集してAβ fibrilや老人斑として沈着することで神経細胞が死滅するという説である。そして、アルツハイマー病治療薬開発において本仮説に基づいた阻害剤が着目され、数多くの研究がなされている。すなわち、Aβの生成にかかわるBASE-1阻害活性物質の探索、Aβの凝集を阻害するメカニズムや阻害物質に関する研究、またAβによる細胞毒性を抑制する化合物 (curcumin, sciadopitysin, luteolin など)の研究が進められてきた。このように現在までのアルツハイマー病治療薬の開発では、アセチルコリンエステラーゼ阻害、BASE-1阻害、またはAβ凝集抑制などのうち1つの活性を指標として検討されているのみであり、単一活性を指標とした治療薬開発ではアルツハイマー病の根本的治療薬は見いだされていない。

(2)一方、現在までに多くの天然資源から生物活性成分が報告されてきたが、近年、新規化合物の発見の鈍化と天然資源の枯渇が危惧されていることから、新規生物活性物質の発見を目指し、新たな天然資源が求められるようになってきた。そのため、多くの研究者により既存の資源を酵母や細菌などによる発酵や菌類同士の共培養、さらに休眠状態にある生合成遺伝子活性化による新規二次代謝産物の生産が検討、報告されている。

2. 研究の目的

現在使用されているアルツハイマー病治療薬は対処療法を主とするものであり、根本的な治療薬は存在しない。現在までのアセチルコリンエステラーゼ阻害、BASE-1阻害、またはAβ凝集抑制など単一活性を指標としたアルツハイマー病治療薬の開発では、アルツハイマー病の根本的治療薬は見いだされていない。一方、近年、天然資源からの新規生物活性化合物の発見のスピードが鈍り、



天然資源の枯渇も危惧されていることから、新たな薬用資源開発を行うこととした。すなわち、海洋由来真菌によるキノコ子実体など既存の資源の発酵、または休眠状態にある真菌の生合成遺伝子を活性化、発現させることで今までにない新しい生物活性化合物(二次代謝産物)を生産する新たな天然資源を開発することとした。

本研究では、既存の天然資源、および本研究で開発する新たな天然資源から、アルツハイマー病の原因に関わる複数の作用点に対して抑制活性を有する、今までにないユニークな化合物を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)申請者の所属研究室で保有する海洋由来真菌約12種をヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤5種 [*N*-hydroxy-*N'*-phenyloctanediamide (SAHA), sodium valproate (VPA), splitomicin (SP), sodium phenylbutyrate (SPB), nicotinamide (NA)] を添加し、26°C、暗所、静置の条件で培養を行った。培養した菌体および培地について、酢酸エチルおよびメタノールエキス(計120種)をそれぞれ作成し、二次代謝産物の変化をTLCとLC/MSにて検証した。新たな物質生産が認められたエキスについて、大量培養後、各種クロマトグラフィーを用いて分離を行い、新たに産生された化合物を分離、精製した。単離した化合物の構造は各種スペクトル解析で決定した。

(2)サボテン科植物の雷神閣(*Polaskia chichipe*)、及び入鹿(*Stenocereus eruca*)をそれぞれ凍結乾燥し、クロロホルムで抽出後、メタノールで抽出してメタノールエキスを作成した。得られたメタノールエキスを各種クロマトグラフィーで繰り返し分離することでサポニンを単離し、各種スペクトルの解析により構造を決定した。単離したサポニンのAβ凝集抑制活性とヒト由来神経細胞株SH-SY5Y細胞を用いたAβによる細胞毒性抑制活性を検討した。

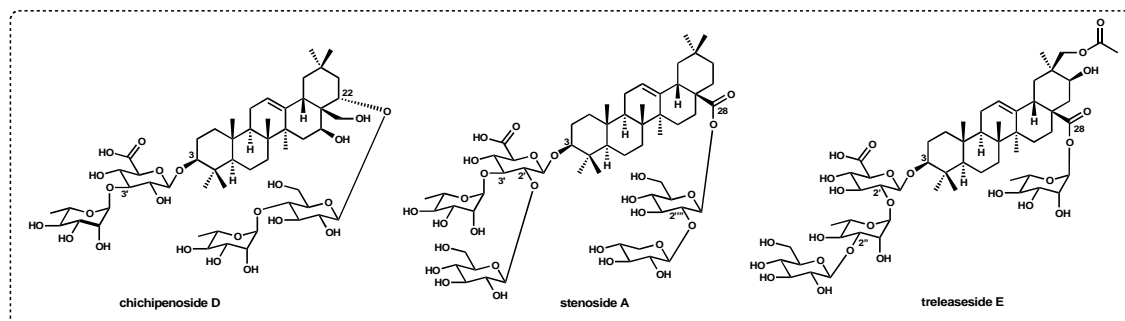
(3)Aβ凝集抑制活性を指標としたスクリーニングにより、活性の認められた海洋由来真菌および

キノコ子実体抽出エキスを各種クロマトグラフィーで繰り返し分離することで化合物を単離し、各種スペクトルの解析により構造を決定した。単離した $A\beta$ の凝集抑制活性化合物については BASE-1 阻害活性と、SH-SY5Y 細胞を用いた $A\beta$ による細胞毒性抑制活性も評価、検討した。

4. 研究成果

(1) 海洋由来真菌 (MPUC) 12 種に HDAC 阻害剤 5 種 [N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide (SAHA), sodium valproate (VPA), splitomicin (SP), sodium phenylbutyrate (SPB), nicotinamide (NA)] をそれぞれ添加して培養を行い、作成した計 120 種の抽出エキスのうち 9 種のエキスを TLC または LC/MS による分析で新たな化合物の産生が確認できた。9 種のエキスのうち MPUC313 に HDAC 阻害剤として SP を添加したものと、および MPUC248 に HDAC 阻害剤 SAHA を添加したものについて大量培養を行い、培地の酢酸エチル抽出エキスから新たに産生された化合物を単離し、構造を明らかにしたが、海洋由来真菌由来の化合物ではなく、試薬由来、もしくは培地由来成分の発酵生成物であることが明らかとなった。また、キノコ子実体を海洋由来真菌で発酵させることにより、新たな二次代謝産物の産生を見いだした。これら化合物の $A\beta$ 凝集抑制活性は今後検討する。

(2) サボテン科植物、朝霧閣 (*Stenocereus pruinosus*) から新規サポニン 6 種を含む計 9 種のサポニンを単離し、構造を明らかにした。単離化合物の $A\beta$ 凝集抑制活性とヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y 細胞を用いた $A\beta$ による細胞毒性抑制活性を評価した結果、2 種の新規サポニン (chichipenoside D と stenoside A) に弱いながらも $A\beta$ 凝集抑制活性を見いだした。入鹿 (*Stenocereus eruca*) からは、既に単離報告している 10 種のサポニンに加え、今回新たに 4 種の新規サポニンを単離した。17 種のサポニンのうち量的に評価可能であった 7 種のサポニンの $A\beta$ 凝集抑制活性を検討した結果、treleaseside E と命名した新規サポニンに弱い活性を見いだした。また、雷神閣 (*Polaskia chichipe*) からは新たに新規サポニン 4 種を単離し、 $A\beta$ 凝集抑制活性を評価したが、活性は認められなかった。さらに、単離したサポニンのアグリコン部であるトリテルペンには $A\beta$ 凝集抑制活性は認められなかったことから、活性発現にはサポニンの構造が必要であることが明らかとなった。



(3) 海洋由来真菌とキノコ子実体の抽出エキスについて $A\beta$ 凝集抑制活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果、活性を見いだした海洋由来真菌 MPUC398 について活性を指標に分離を行った結果、7 種のペプチド化合物を単離、構造決定した。これらの化合物は $A\beta$ 凝集抑制活性を示し、さらにヒト由来神経細胞株 SH-SY5Y 細胞を用いた $A\beta$ による細胞毒性抑制活性も示した。また、イボタケ科キノコ子実体からも活性化合物として新規化合物 1 種を含む計 4 種の化合物を単離し、構造を明らかにした。単離した 5 種の化合物について $A\beta$ 凝集抑制活性、SH-SY5Y 細胞を用いた $A\beta$ による細胞毒性抑制活性および BASE-1 阻害活性を検討した結果、全ての活性を示す化合物を見いだすことができた。

本研究では、複数の作用点を有する抗アルツハイマー活性を有する化合物を見いだすことに成功したことから、これらをリード化合物とした新たなアルツハイマー病治療薬の開発が期待されるものである。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koji Fujihara, Takuya Shimoyama, Ryo Kawazu, Hiroaki Sasaki, Kiyotaka Koyama, Kunio Takahashi, Kaoru Kinoshita	4. 巻 75
2. 論文標題 Amyloid aggregation inhibitory activity of triterpene saponins from the cactus <i>Stenocereus pruinosus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Natural Medicine	6. 最初と最後の頁 284-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-020-01463-0	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原恒司、小池 伸、小笠原裕樹、佐々木寛朗、小山清隆、高橋邦夫、木下 薫
2. 発表標題 サボテン科植物からのサポニン成分と神経細胞保護効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本拓実、杉田 隆、小山 清隆、佐々木寛朗、木下 薫
2. 発表標題 海洋由来真菌 <i>Aspergillus</i> sp. からのアミロイド (A) 凝集抑制活性成分の探索 - 2
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村岡佳奈、柳津茂慧、木下 薫、佐藤準一、紀 嘉浩
2. 発表標題 ピフラボノイドによる遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原恒司、小池 伸、小笠原裕樹、小山清隆、木下 薫
2. 発表標題 Polaskia chichipe (雷神閣) のサポニン成分の探索とアミロイド 凝集抑制活性 第2報
3. 学会等名 日本生薬学会第66年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本拓実、杉田 隆、紀 嘉浩、佐藤準一、木下 薫、小山清隆
2. 発表標題 海洋由来真菌 Aspergillus sp. からのアミロイド (A) 凝集抑制活性成分の探索
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 藤原恒司、小池 伸、小笠原裕樹、小山清隆、木下 薫
2. 発表標題 サボテン科植物からのサポニン成分と神経細胞保護効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------	---------