

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790036

研究課題名(和文) 神経幹細胞分化制御物質ライブラリーの構築と機能解明

研究課題名(英文) Construction and elucidating of neural stem cell differentiation control substance library

研究代表者

久保 美和 (KUBO, Miwa)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00330754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：申請研究では、これまで見出してきた神経栄養因子様活性天然物の研究を発展させ、生存する神経細胞の修復機能だけでなく、失われた神経細胞を復活させる新生能力、すなわち神経細胞の新生を促進する新たな活性物質を探索した。その結果、ホーノキオール、ジアジフェノライドは神経幹細胞の神経細胞への分化を促進させることがわかった。インドネシア産ショウガから見出したフェニルブテノイド二量体は海馬領域の神経新生を促進させることが分かった。

研究成果の概要(英文)：As part of our continuing studies on neurotrophic-like active compounds in natural products, we investigated the chemical compounds with neurogenesis activities, resulting in the discovery of four compounds. Especially, jiadifenolide and honokiol significantly enhance neurite outgrowth in the primary cell cultures of fetal rat cortical neurons, respectively. These are worthy of note that both compounds have potential to significantly promote differentiation of multipotent neural stem cell line MEB5 cells into neurons. Furthermore, chronic treatment of phenylbutenoid dimer from Indonesian ginger enhanced hippocampal neurogenesis in dementia model OBX mice.

研究分野：天然物化学，有機合成化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：神経栄養因子 神経幹細胞 PC12細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、成人の中枢神経系には組織再生能力は無いとされてきた。しかし、近年の神経科学の進歩により胎児脳だけでなく成熟脳にも神経幹細胞が存在し、新生ニューロンを生成していることがわかってきた。そこで、傷害された神経細胞に何らかの方法を用いれば神経組織再生が可能ではないかと考えられるようになってきた。神経再生法の1つとして、神経幹細胞を脳内へ移植する治療法があり、胎児脳組織移植によるパーキンソン病治療法が検討され改善効果が示されているが、倫理面やドナー確保の面で多くの問題が指摘されている。また、神経幹細胞は自己複製能はあるが、有限であり、神経細胞への分化誘導能が分裂回数を経るごとに著しく低下することが臨床応用への問題となっているため、神経細胞への分化誘導能を維持して幹細胞を増殖させる方法の開発が望まれている。一方、内在性神経幹細胞を活性化させる薬物として躁うつ病治療薬であるリチウムやカルバマゼピンに神経前駆細胞および神経細胞が活発に産生されることが報告されているが、臨床応用には至っていない。申請者の属する研究室では、ラット胎仔大脳皮質由来初代培養神経細胞と PC12 細胞を用いたアッセイ系を確立し、様々な植物資源から約 20 種類の神経栄養因子様活性天然物を見出している。これらは、成熟した神経細胞に対する突起伸展促進活性および細胞死保護活性を示す化合物群である。神経細胞の新生を促進する新たな活性物質が見つければ、神経細胞の一生に関わる各ステージをコントロールできる一連の薬物を開発できると考えられる。

2. 研究の目的

申請研究は、これまで見出してきた神経栄養因子様活性天然物の研究を発展させ、生存する神経細胞の修復機能だけでなく、失われた神経細胞を復活させる新生能力、すなわち神経細胞の新生を促進する新たな活性物質を探索して、神経再生能を有する神経栄養因子様物質を開発する事を目的とする。

(1)これまで見出してきた神経栄養因子様活性物質の中から、ホーノキオールとジアジフェノライドならびに NGF 非存在下で PC12 細胞の分化誘導を促進するフェニルブタノイド二量体、およびタラウミジンに焦点を絞り、これらの神経細胞成育に対する制御を検討する。

(2)神経栄養因子様活性の作用機序を解明する。

(3)新たに神経細胞新生促進化合物ライブラ

リーを構築する。

(4)様々な誘導体を合成し、より有用な化合物を開発する。

3. 研究の方法

(1) ホーノキオール、ジアジフェノライド、フェニルブタノイド二量体、タラウミジンの共存下、神経幹細胞を長期間培養させて、分化、発育、ネットワーク形成促進、細胞死保護活性などを評価し、神経細胞の一生に関わる各ステージをコントロールできるか検討する。

(2)これら一連の活性発現機序について、分子生物学的手法、遺伝子解析などを利用して活性発現機構を解明する。

(3)神経幹細胞および PC12 細胞を用いて約 20 種類の活性化合物と約 250 種の抽出物をスクリーニングし、神経幹細胞の分化も促進する他の化合物を見出し、神経細胞新生促進化合物ライブラリーを構築する。

(4)有効な活性化合物の誘導体を合成し、より活性の強い化合物を開発する。

4. 研究成果

(1)ホーノキオール、ジアジフェノライド、フェニルブタノイド二量体、タラウミジンの共存下、神経幹細胞 MEB5 細胞を培養させた。その結果、ホーノキオール、ジアジフェノライドは $1\mu\text{M}$ の濃度で神経幹細胞の神経細胞への分化を促進させることがわかった。インドネシア産ショウガから見出したフェニルブタノイド二量体は $1\sim 10\mu\text{M}$ の濃度では細胞毒性を示すが、 $0.01\mu\text{M}$ の低濃度では細胞数が多いことが観察された。このことは MEB5 細胞が EGF 除去によって引き起こされるアポトーシスを抑制していると推測される。詳細は現在解析中である。ホーノキオール、ジアジフェノライドはラット胎仔大脳皮質由来初代培養神経細胞に対して、神経突起伸展促進活性、細胞死保護活性も有することから、これらは、成熟した神経細胞に対する突起伸展促進活性および細胞死保護活性を示すだけでなく、神経細胞の新生を促進する化合物として、神経細胞の一生に関わる各ステージをコントロールできる薬物へ展開できると考えられる。現在、iPS 細胞に対する効果を検討中である。

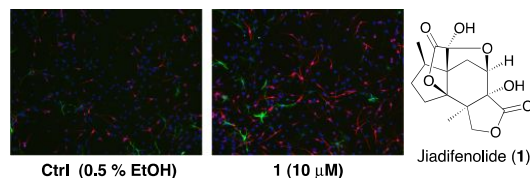


図1 ジアジフェノライドで処理したMEB5細胞(青:核、赤:神経細胞、緑:アストロサイト)

一方、フェニルブタノイド二量体を大量に合成することが可能になったため、神経変性疾患モデルマウスである嗅球摘出(OBX)マウス in vivo 実験を検討した。まず、8~9 齢 ddY マウスに対して嗅球摘出術を行い、術後 15 日

目からフェニルブテノイド二量体を1日1回2週間摂取させた。術後22日目から新生細胞マーカー-BrdUを1日1回腹腔内投与した。投与終了から2日後、脳を摘出して海馬領域の凍結切片を作成し、成熟神経細胞マーカー-NeuNの抗体とBrdUの抗体を用いた蛍光多重免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察し、一視野あたりの海馬歯状回顆粒細胞層に存在するBrdU-NeuN両陽性細胞をカウントした。その結果、コントロール群と比較して化合物投与群において陽性細胞数が有意に増加していることがわかった。

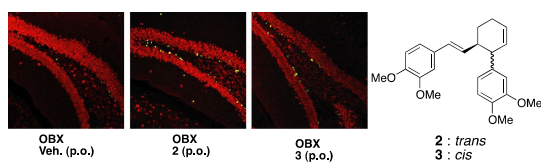
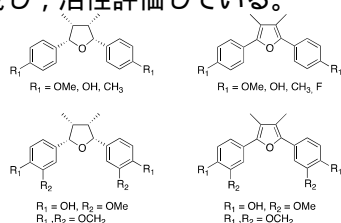


図2 フェニルブテノイド二量体で処理したOBXマウス海馬歯状回層

(2)神経栄養因子様活性物質の1つであるタラウミジンのメカニズム解析をPC12細胞を用いて行った。タラウミジン処理後5分後にMAPKリン酸化, TrkAのリン酸化が亢進されることがわかった。各種阻害実験の結果から、タラウミジンはTrkAの自己リン酸化を誘導し、チロシンフォスファターゼを阻害することにより、TrkA自己リン酸化を亢進させ活性を示している可能性が明らかとなった。(3)PC12細胞を用いて、所有する植物抽出物ライブラリー250種類のうち、80種類の植物のスクリーニングを行った。その結果、17種類の抽出物に活性が認められた。センブリ、テンナンショウ、トベラ科植物、オガサワラグミ、エゴノキ、クスノキ、ヒカゲコはNGF非存在下で分化誘導活性を示し、センブリ、テンナンショウ、ヤマブシタケ、フクギ、コブシ、モンパノキ、ヤブコウジ、イボタクサギ、ホソバワダン、サカキカズラ、インドネシア産コショウCABE JAWA、ヤクモソウ、中国産医薬用茸 *Phellinus ribis* の抽出物はNGF存在下で時伸展促進活性を示した。センブリに含まれる分化誘導活性物質は現在探索中である。また、インドネシア産コショウCABE JAWAから新規アミド化合物、ヤクモソウからスピロ構造を有する新規トリテルペン、中国産医薬用茸 *Phellinus ribis* から新規ベンゾフラン誘導体を突起伸展促進活性物質として単離した。(4)タラウミジンの4つの立体化学における立体異性体を合成した。最も強力な活性を示したタラウミジンの立体構造を基盤とし、フラン環やベンゼン環上の置換基を変えた各種誘導体を合成した。現在、10種類の誘導体を合成し、活性評価している。



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11件)

1. Kubo, M.; Liu, Y.; Ishida, M.; Harada, K.; Fukuyama, Y. (2014). A new spiroindene pigment from the medicinal fungus *Phellinus ribis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 62, 122-124. 査読有, DOI: 10.1248/cpb.c13-00722.
2. Kubo, M.; Ishii, R.; Ishino, Y.; Harada, K.; Matsui, N.; Akagi, M.; Kato, E.; Hosoda, S.; Fukuyama, Y. (2013). Evaluation of Constituents of *Piper retrofractum* Fruits on Neurotrophic Activity. *J. Nat. Prod.*, 76 (4), 769-773. 査読有, DOI: 10.1021/np300911b.
3. Imagawa, H., Saijo, H., Yamaguchi, H., Maekawa, K., Kurisaki, T., Yamamoto, H., Nishizawa, M., Oda, M., Kabura, M., Nagahama, M., Sakurai, J., Kubo, M., Nakai, M.; Makino, K.; Ogata, M.; Takahashi, H.; Fukuyama, Y. (2012). Syntheses of structurally-simplified and fluorescently-labeled neovibsanin derivatives and analysis of their neurite outgrowth activity in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22(5), 2089-2093. 査読有, DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.01.006.
4. Kubo, M., Kobayashi, K., Huang, J.-M., Harada, K., Fukuyama, Y. (2012). The first examples of *seco*-prezizaane-type norsesquiterpenoids with neurotrophic activity from *Illicium jiadifengpi*. *Tetrahedron Lett.*, 53(10), 1231-1235. 査読有, DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.12.107.
5. Matsui, N., Kido, Y., Okada, H., Kubo, M., Nakai, M., Fukuishi, N., Fukuyama, Y., Akagi, M. (2012). Phenylbutenoid dimers isolated from *Zingiber purpureum* exert neurotrophic effects on cultured neurons and enhance hippocampal neurogenesis in olfactory bulbectomized mice. *Neuroscience Lett.*, 513(1), 72-77. 査読有, DOI: 10.1016/j.neulet.2012.02.010.

6. Liu, Y., Kubo, M., Fukuyama, Y. (2012). Spirocyclic nortriterpenoids with NGF-potentiating activity from the fruits of *Leonurus heterophyllus*. *J. Nat. Prod.*, **75**(7), 1353-1358. 査読有, DOI : 10.1021/np300287f.
7. Liu, Y., Kubo, M., Fukuyama, Y. (2012). Nerve growth factor-potentiating benzofuran derivatives from the medicinal fungus *Phellinus ribs*. *J. Nat. Prod.*, **75**(12), 2152-2157. 査読有, DOI : 10.1021/np300566y.
8. Matsuda, H., Nakamura, S., Iwami, J., Li, X., Pongpiriyadacha, Y., Nakai, M., Kubo, M., Fukuyama, Y., Yoshikawa, M. (2011). Invasion inhibitors of human fibrosarcoma HT 1080 cells from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*: structures of phenylbutanoids, cassumunols *Chem. Pharm. Bull.*, **59**(3), 365-370. 査読有, DOI : 10.1248/cpb.59.365.
9. Kubo, M., Shima, N., Harada, K., Hioki, H., Fukuyama, Y. (2011). New prenylated C6-C3 compounds from the twigs of *Illicium anisatum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **59**(7), 898-901. 査読有, DOI : 10.1248/cpb59.898.
10. Harada, K., Hirouchi, H., Tanabe, K., Carter, R. G., Esumi, T., Kubo, M., Hioki, H., Fukuyama, Y. (2011). Asymmetric synthesis of (-)-chicanine using a highly regioselective intramolecular Mitsunobu reaction and revision of its absolute configuration. *Tetrahedron Lett.*, **52** (23), 3005-3008. 査読有, DOI : 10.1016/j.tetlet.2011.03.154.
11. Harada, K., Kubo, N., Tanabe, K., Kubo, M., Esumi, T., Hioki, H., Fukuyama, Y. (2011). Asymmetric synthesis of (+)-machilin F by unusual stereoselective mitsunobu reaction. *Heterocycles*, **82**(2), 1127-1132. 査読有, DOI : 10.3987/COM-10-S(E)88.
1. 牧野宏章、原田研一、島尚喜、奥山春香、江角朋之、久保美和、日置英彰、福山愛保 (2013) . Pd 触媒反応を活用したビアリール結合を有する大環状ビスベンジル類の合成研究、第 55 回天然有機化合物討論会、京都 .
2. 原田研一、久保美和、松井敦聡、山田恵子、座波克圭、今井顕子、堀内宏樹、江角朋之、日置英彰、赤木正明、福山愛保 (2013). Systematic synthesis of stereoisomers of (-)-talaumidin and their neurotrophic activities、第 23 回日仏医薬精密化学会議、長崎 .
3. 原田研一、今井顕子、久保美和、福山愛保. Pd 触媒反応を活用した神経栄養因子様物質ジアジフェニンの形式合成、日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014.3.28-3.31.
4. インドネシア産ショウガ科食用植物 BANGLE の老化促進モデルマウスに対する空間学習記憶改善作用、仲井めぐみ、飯塚美知郎、平田歩、八木祐助、常風邪興平、横田淳子、吉岡三郎、原田研一、久保美和、福山愛保、宮村充彦、日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014.3.28-3.31.
5. インドネシア産食用植物 CABE JAWA (*Piper retrofractum* Vahl.)の神経栄養因子様化合物の探索(2)、久保美和、石野陽一、石井利奈、原田研一、福山愛保、日本薬学会第 134 年会 (熊本), 2014.3.28-3.31.
6. 光親和性標識を持つネオビブサニン誘導体の合成、山口仁美、小松加奈、柳井翠、杉本実希子、葛西祐介、久保美和、山本博文、福山愛保、今川洋、日本薬学会第 134 年会(熊本), 2014.3.28-3.31.
7. 岩瀬瑠美、原田研一、久保美和、福山愛保 (2013). ヒオウギ (*Belmacanda chinensis*) 種子の神経栄養因子様活性物質の探索研究、日本薬学会第 133 年会、横浜.
8. 久保美和、馬場皓平、原田研一、福山愛保 (2013). ジャワショウガ BANGLE から得られた新規フェニルブテノイド二量体とクルクミン誘導体の構造、日本薬学会第 133 年会、横浜.

[学会発表](計 28 件)

9. 座波克圭、今井顕子、原田研一、久保美和、松井敦聡、山田恵子、赤木正明、福山愛保 (2013). Talaumidin の誘導体合成と神経栄養因子様活性、日本薬学会第 133 年会、横浜.
10. 石田麻美、劉玉紅、原田研一、久保美和、福山愛保 (2013). 中国産薬用茸 *Phellinus ribis* の生理活性成分研究、日本薬学会第 133 年会、横浜.
11. 牧野宏章、原田研一、久保美和、福山愛保、大環状ビスビベンジルカビクラリンの合成研究、日本薬学会第 133 年会、横浜.
12. 牧野宏章、原田研一、島尚喜、奥山春香、江角朋之、久保美和、日置英彰、福山愛保 (2013). Pd 触媒反応を活用したビアリール結合を有する大環状ビスビベンジル類の合成研究、第 55 回天然有機化合物討論会、京都 .
13. 原田研一、久保美和、松井敦聡、山田恵子、座波克圭、今井顕子、堀内宏樹、江角朋之、日置英彰、赤木正明、福山愛保 (2013). Systematic synthesis of stereoisomers of (-)-talaumidin and their neurotrophic activities、第 23 回日仏医薬精密化学会議、長崎 .
14. 久保美和、仲井めぐみ、原田研一、城戸悠希、岡田秀樹、松井敦聡、赤木正明、福山愛保 (2012). インドネシア産ショウガ科植物 BANGLE の神経変性疾患モデルマウスに対する神経新生作用、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
15. 劉玉紅、久保美和、原田研一、福山愛保 (2012). Novel Nortriterpenes from the Fruits of *Leonurushetero phyllus*、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
16. 牧野宏章、久保美和、原田研一、福山愛保 (2012). 大環状 Bis(bibenzyls) 類 Riccardin C の分子内酸化カップリングによる Astererin A の全合成、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
17. 増田都子、小林加奈、原田研一、久保美和、福山愛保 (2012). 中国産シキミ (*Illicium jiadifengpi*) から得られた新規 *seco-prezizaane* 型ノルセスキテルペンの □構造、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
18. 石野陽一、石井利奈、久保美和、原田研一、福山愛保 (2012). インドネシア産食用植物 CABE JAWA (*Pireretrofructum* Vahl.) の神経栄養因子様化合物の探索、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
19. 宮北秋菜、久保美和、原田研一、福山愛保 (2012). 神経栄養因子様物質ホーノキオールの効果的合成法の開発、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
20. 今井顕子、久保美和、原田研一、福山愛保 (2012). Pd 触媒反応を活用したセコブレジザン型セスキテルペン ジアジフェニンの合成開発 (2)、第 132 回日本薬学会年会、札幌.
21. 久保美和、仲井めぐみ、儀間美乃里、原田研一、城戸悠希、岡田秀樹、松井敦聡、赤木正明、福山愛保 (2012). インドネシア産ショウガ科植物 BANGLE の神経栄養因子様活性物質、第 54 回天然有機化合物討論会、東京.
22. 福山愛保、劉玉紅、久保美和 (2012). 益母草の果実から得られた NGF 作用増強活性を有するノルトリテルペノイド、第 56 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、鹿児島.
23. 久保美和、仲井めぐみ、儀間美乃里、原田研一、城戸悠希、岡田秀樹、松井敦聡、赤木正明、福山愛保 (2012). インドネシア産ショウガ科植物 BANGLE の神経栄養因子物質、第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、松江.
24. 久保美和、仲井めぐみ、原田研一、松井敦聡、赤木正明、加藤榮信、福山愛保

(2012). ジャワショウガ BANGLE の神経栄養因子様活性作用、第 15 回日本補完代替医療学会学術集会、東京.

25. 久保美和、石井利奈、石野陽一、原田研一、福山愛保 (2011). インドネシア産コショウ CABE JAWA に含まれる神経栄養因子様物質の探索研究、第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、筑波.
26. 久保美和、小林加奈、原田研一、福山愛保 (2011). 中国産シキミ (*Illicium jiadifengpi*) から得られた *seco-prezizaane* 型ノルセスキテルペンの構造、第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、筑波.
27. 島田麻理江、久保美和、福山愛保、大崎愛弓 (2011). アマミヒトツバハギ由来の新規アルカロイド成分、第 55 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、筑波.
28. Y. Fukuyama, M. Kubo (2011). Neurotrophic *seco-prezizaane*-type sesquiterpenoids from *Illicium jiadifengpi*, 50th Anniversary PSNA meeting, Kona, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：新規テトラヒドロフェニル
発明者：福山愛保，堂上（久保）美和，加藤榮信，細田真也
権利者：同上
種類：特許
番号：JP2012-087912
出願年月日：2012 年 4 月 21 日
国内外の別： 国内

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab02/fukuyama/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 美和 (KUBO, Miwa)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：00330754

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：