

Alzheimer's disease 治療薬の創出を目的とした、
キノコ子実体由来活性化合物と脳血管内皮細胞由来因子の機能解析

Functional analysis of Mushroom-derived Active Compounds and Cerebral
Vascular Endothelial Cell-derived Cognitive Decline Inducing Factors to
Discover a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease.

令和 3 年度入学

平林 峻太朗 (Hirabayashi, Shuntaro)

目次

序論	1
第1章 アルツハイマー病の現状	1
第1節 アルツハイマー病の病態	1
第2節 アルツハイマー病の病態機序研究と治療薬開発の潮流	2
第2章 アルツハイマー病の新規治療薬候補化合物の探索	13
第1節 天然物由来化合物の有用性	13
第2節 創薬資源におけるキノコ	15
第3章 アルツハイマー病の新規治療標的の探索	17
第1節 アルツハイマー病とシナプス変性	17
第2節 Neuro-vascular unit と血管内皮細胞由来因子	21
本論	23
第1章 本研究の目的	23
第2章 ボタンイボタケ (<i>Thelephora aurantiotincta</i>) MeOH ext. からの抗アミロイドカスケード活性化合物の探索	24
第1節 キノコ抽出エキスの抗アミロイドカスケード活性評価	24
第2節 ボタンイボタケ <i>Thelephora aurantiotincta</i>	27
第3節 ボタンイボタケ MeOH 抽出エキスの分離と単離化合物の構造決定	29
第4節 単離化合物の抗アミロイドカスケード活性評価	39
第5節 結果の考察	43
第3章 認知機能低下を誘導する血管内皮細胞由来因子の探索	45
第1節 アルツハイマー病進行に伴い発現増加する因子の探索	45
第2節 Cellular Communication Network factor 1 (CCN1)	47
第3節 CCN1 による初代海馬神経細胞の樹状突起スパイン密度の減少作用	48
第4節 AD モデルマウスにおける CCN1 発現抑制によるスパイン密度への影響	50
第5節 AD モデルマウスにおける CCN1 発現抑制によるグリア細胞活性化・アミロイド斑に対する影響	53

第6節 ADモデルマウスにおけるCCN1発現抑制による認知機能への影響	55
第7節 結果の考察	58
結語	60
実験の部	63
第1章 ボタンイボタケ (<i>Thelephora aurantiotincta</i>) MeOH ext. からの抗アルツハイマー病活性化合物の探索	63
第2章 認知機能低下を誘導する血管内皮細胞由来因子の探索	72
参考文献	83

略語一覽

AAV	Adeno-Associated Virus
A β	Amyloid beta
ACh	AcetylCholine
AD	Alzheimer's Disease
ADL	Activities of Daily Living
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid Receptor
APP	Amyloid Precursor Protein
ARIA	Amyloid-Related Imaging Abnormalities
BACE1	Beta-site APP Cleaving Enzyme 1 (beta-Secretase 1)
BBB	Blood-Brain Barrier
BChE	ButyrylCholinEsterase.
BPSD	Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia
Calcd.	Calculated
CCN1	Cellular Communication Network factor 1
CD31	Cluster of Differentiation 31 (also known PECAM)
ChAT	Choline O-AcetylTransferase
CHCl ₃	Chloroform
ChE	CholinEsterase
COSY	COrrrelation SpectroscopY
CT	Computed Tomography
d	doublet
dd	double doublet
DEG	Differentially Expressed Gene
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	DiMethyl SulfOxide
DQF-COSY	Double Quantum Filter COrrrelation SpectrometrY
ECM	ExtraCellular Matrix

EtOAc	Ethyl Acetate
ext.	Extract
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fear Conditioning test
FDA	Food and Drug Administration
Fr.	Fraction
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence spectrometry
HRESIMS	High Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
HRFABMS	High Resolution Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
LR-HSQMBC	Long-Range Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation
LTP	Long-Term Potentiation
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MCI	Mild Cognitive Impairment
MeOD	Deuterated Methanol (Methanol- <i>d</i> ₄)
MeOH	Methanol (methyl alcohol)
MRI	Magnetic Resonance Imaging
nAChR	nicotinic AcetylCholine Receptor
NFT	NeuroFibrillary Tangle
n-Hex	normal Hexane
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartate Receptor
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NORT	Novel Object Recognition Test
O/N	Over Night
ODS. C. C.	Octa Decyl Silyl Columun Chromatography

P/S	Penicillin / Streptomycin
PET	Positron Emission Tomography
PSD95	PostSynaptic Density protein 95
QOL	Quality of Life
RNAseq	RNA-Sequencing
rt	room temperature
rt-PA	recombinant tissue-type Plasminogen Activator
s	singlet
shRNA	short hairpin RNA
Si. C. C.	Silica gel Column Chromatography
Sox9	SRY-box transcription factor 9
t	triplet
Th-T	Thioflavin-T
tR	Retention time
vGlut1	Vesicular Glutamate Transporter 1
WT	Wild Type

Table 一覽

Table 1. Approved AD medicines based on the ACh hypothesis and the glutamate hypothesis.....	3
Table 2. Mutations in APP that affect the generation of A β and the mouse strains in which these mutations are introduced.....	6
Table 3. Clinically tested secretase inhibitors.....	9
Table 4. Natural compounds clinically tested for the treatment of AD.....	14
Table 5. Mushroom secondary metabolites with neuroprotective properties.....	16
Table 6. NMR spectral data of synthetic thelephantin G (natural type and non-natural type) and thelephantin P (1)	32
Table 7. NMR spectral data of compound 2.....	34
Table 8. NMR spectral data of compound 3.....	36
Table 9. NMR spectral data of compounds 4 and 6, and 5.....	38
Table 10. NMR spectral data of compound 7.....	38
Table 11. A β and BACE1 inhibitory activity (IC ₅₀ μ M), neuroprotection (EC ₅₀ μ M) and XLogP values of compounds 1, 2, 4-7, myricetin, inhibitor IV and aurasperone F.....	42
Table 12. Equipment and reagents for BACE1 inhibitory activity assay.....	65
Table 13. Instruments and reagents for Th-T assay.....	67
Table 14. Instruments and reagents for testing neuroprotective activity.....	69
Table 15. General laboratory equipment and reagents.....	70–71
Table 16. Antibodies used in immunohistochemical staining.....	74
Table 17. Antibodies used in immunocytochemical staining.....	76
Table 18. Primer sequences used in qPCR.....	77
Table 19. Reagent.....	80–81
Table 20. Experimental Instruments.....	82

Figure 一覽

Figure 1. Schematic diagram of the amyloid cascade hypothesis.....	4
Figure 2. Structure of APP ₇₇₀ and mutations around the A β region.....	5
Figure 3. Schematic diagram of A β structure and aggregation mechanism.....	7
Figure 4. Clinically tested anti-A β antibodies and their targets.....	11
Figure 5. Schematic of hippocampal neuron connections.....	18
Figure 6. Schematic diagram of dendrites and synaptic structures.....	19
Figure 7. Decreased dendritic spine in AD and Schematic diagram of the proposed mechanism of dendritic spine loss.....	20
Figure 8. Schematic diagram of the Neuro-vascular unit.....	21
Figure 9. Schematic diagram of BACE1 assay principle.....	25
Figure 10. Schematic diagram of Th-T assay measurement principle.....	25
Figure 11. Bioactive <i>p</i> -therphenyl compounds isolated from <i>Thelephora aurantiotincta</i>	28
Figure 12. The Isolation Procedure of MeOH extract from <i>Thelephora aurantiotincta</i>	29
Figure 13. Structure of Thelephantin G and Compound 1.....	31
Figure 14. Structure of compound 2 and 2D NMR correlations.....	34
Figure 15. Structure of compound 3 and 2D NMR correlations.....	37
Figure 16. Structure of Compounds 4–6.....	37
Figure 17. Structure of compound 7.....	38
Figure 18. BACE1 inhibition rate of active compounds.....	39
Figure 19. A β aggregation rate of active compounds.....	40
Figure 20. Relative cell viability of active compound relative to control.....	41
Figure 21. Phenolic hydroxyl compounds, which pass through BBB.....	44
Figure 22. Gene profiles of genes with altered expression in cerebral vascular endothelial cells from 6-month-old App ^{NL-G-F} mice compared to those from 3-month-old mice.....	46
Figure 23. In vascular endothelial cells, CCN1 expression increases with progression of AD.....	46
Figure 24. CCN1 structure.....	47
Figure 25. CCN1 reduced spine density in cultured hippocampal neurons.....	48
Figure 26. Gene expression changes in cultured hippocampal neurons exposed to CCN1....	49

Figure 27. Suppression of CCN1 expression in cerebral vascular endothelial cells by adeno-associated virus.....	51
Figure 28. Spine density is increased in APP ^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression.....	52
Figure 29. No change in glial cells in App ^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression.	53
Figure 30. CCN1 does not alter A β accumulation.....	54
Figure 31. App ^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression show higher spatial learning ability than the target group.....	55
Figure 32. App ^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression show higher working memory performance than the target group.....	56
Figure 33. Suppression of CCN1 expression alleviates spatial working memory deficits in App ^{NL-G-F} mice.....	57
Figure 34. Summary of exploratory research on compounds with anti-amyloid cascade activity from <i>Thelephora aurantiotincta</i>	60
Figure 35. Summary of research to identify factors derived from cerebral vascular endothelial cells that induce cognitive decline.....	61

序論

第1章 アルツハイマー病の現状

第1節 アルツハイマー病の病態

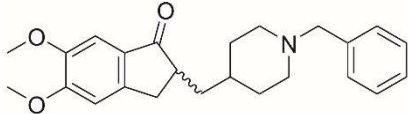
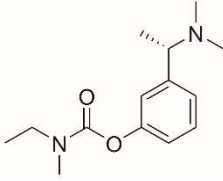
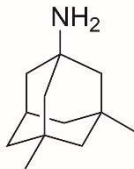
ヒトの認知機能は、身体の成長とともに20歳頃をピークとして発達し、以降は加齢とともに緩徐に低下する。¹⁾ 一方、後天的な脳の器質障害などにより、自然な老化現象による程度を超えて認知機能が持続的に低下すると、社会生活に支障をきたすようになり、この状態を認知症 (dementia) という。²⁾ 認知症の原因として様々な疾患が関与し、神経細胞が変性・脱落する神経変性疾患による変性性認知症、脳血管の異常による血管性認知症、その他の疾患に大別される。アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease, AD) は認知症の原因疾患として最も頻度が高い神経変性疾患であり、³⁾ 全世界における AD 患者数は 5740 万人 (2019 年) から 1 億 5280 万人 (2050 年) と大幅な増加が予想される。本邦における 2020 年の統計では、継続的に AD の治療を受けている総患者数は 79.4 万人と推計されている。⁴⁾ さらに、AD 患者数の増加に寄与する最大の因子は、老年人口の増加と推定されており、本邦における AD 患者数は今後も増加することが十分に予想される。⁵⁾

認知症の症状は中核症状 (core feature) と行動・心理症状 (Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia, BPSD) に大別される。中核症状は、脳の障害に直接起因し、すべての認知症患者に認められる症状で、記憶障害、見当識障害、失語、失行、失認、遂行機能障害などがある。AD では特に側頭葉 (嗅内野) と頭頂葉が障害されやすく、⁶⁾ これに起因した記憶障害や見当識障害、失語、失行が見られる。脳組織の障害は約 10 年をかけて緩徐に脳全体に進行し、障害された脳部位は萎縮する。病態が高度に進行すると、筋固縮や歩行障害を起こし、最終的には寝たきりになる。また、記憶障害の進行とともにうつ状態や幻覚・妄想、興奮・暴力、異食、徘徊などの BPSD が付随して出現する。BPSD は、性格や心理状況により個人差があるものの、患者の 80%に出現し、⁷⁾ 中核症状よりも患者や介護者の悩み・負担の原因になりやすい。⁸⁾ このように、中枢神経の障害により日常生活が多度に支障されることから、AD は非常に高いメディカルニーズを有していると言える。

第2節 アルツハイマー病の病態機序研究と治療薬開発の潮流

AD は、1906 年にドイツの精神医学者 Alois Alzheimer により初めて報告されて以来,⁹⁾ 世界中でその病態と発症機序が研究されている。White らの研究では、AD 患者脳でコリンアセチル転移酵素 (Choline O-acetyltransferase, ChAT) の活性低下が観察され,¹⁰⁾ さらに、大脳基底核のコリン作動性神経細胞の減少が示された。¹¹⁾ このことより、ChAT により合成されるアセチルコリン (Acetylcholine, ACh) の減少が AD 病態の本質と考える ACh 仮説が提唱され、日本では、ACh を分解するコリンエステラーゼ (Cholinesterase, ChE) 阻害薬の donepezil が 1999 年に承認された。^{12,13)} 以来、ChE 阻害薬は AD 治療薬のスタンダードとなり、2024 年現在、3 種の ChE 阻害薬が用いられている (Table 1)。ChE 阻害以外の機序を有する AD 治療薬としては、N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) 阻害薬である memantine がある (Table 1)。AD 患者脳では、グルタミン酸トランスポーターの発現が減少し、グルタミン酸クリアランスが低下している。過剰なグルタミン酸は、過剰な NMDAR の活性化を引き起こし、神経細胞内への過剰な Ca^{2+} 流入を惹起することで神経細胞障害を誘導すると考えられる。¹⁴⁾ したがって NMDAR 拮抗薬は、過剰な興奮性入力に対する神経保護作用を持つと期待され、AD 中等度～後期まで用いられている。¹⁵⁾

Table 1. Approved AD medicines based on the ACh hypothesis and the glutamate hypothesis.

一般名	構造	作用機序	適応
donepezil		ACh 阻害	AD, レビー小体型 認知症
galantamines		ACh 阻害, nAChR 増強	軽度および 中等度 AD
rivastigmine		AChE, BChE 阻害	軽度および 中等度 AD
memantine		NMDAR 阻害	中等度および 高度 AD

nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; BChE, butyrylcholinesterase.

AD の Computed Tomography (CT) や Magnetic Resonance Imaging (MRI) を用いた検査所見では、海馬や頭頂葉を含む大脳組織の萎縮が認められる。^{16,17)} 脳の萎縮は、神経細胞の変性、脱落によるものであるため、脳の萎縮度合いと認知機能の低下は相関すると考えられている。病理所見として、脳の萎縮部位には、神経細胞の脱落や反応性グリオシス、老人斑 (senile plaque) 神経原線維変化 (NeuroFibrillary Tangle, NFT) が認められる。¹⁸⁾ 1980 年代に生化学的手法が導入されたことにより、老人斑が Amyloid beta (A β),¹⁹⁻²¹⁾ NFT が tau^{22,23)} で主に構成されていることが同定された。A β と tau の蓄積は AD 患者の脳で共に認められることから、どちらが病態の本質であるかは長年議論されている。²⁴⁻²⁷⁾ しかしながら遺伝学的アプローチの向上により、家族性 AD の家系で A β の前駆タンパク質である Amyloid Beta Precursor Protein (APP) 遺伝子の変異が発見されたこと、²⁸⁾ A β 病変により tau 病変が増強されたこと²⁹⁾ などから、現在は A β の生成異常を AD 病態の本質とするアミロイドカス

ケード仮説^{30,31)} が主流となっている。A β は、1 回膜貫通型タンパク質である APP が、細胞外で β -セクレターゼ (β -secretase) として知られる BACE1 (Beta-site APP Cleaving Enzyme 1) により、細胞膜内で γ -セクレターゼ (γ -secretase) によりそれぞれ切断されることで産生され、細胞外に放出される。³²⁾ 生理条件下では、A β はカリウムチャネルの興奮抑制による神経細胞のアポトーシスの減少や、³³⁾ 海馬における長期増強 (Long-Term Potentiation, LTP) の促進による記憶力の向上³⁴⁻³⁶⁾ などの作用を示す。また、抗菌作用や血液脳関門の保持、外傷後の脳損傷からの回復促進などの作用が報告されている。³⁷⁾ アミロイドケード仮説においては、放出された A β は、正常な状態ではミクログリアによる取り込みや、^{38,39)} ネプリライシンによる分解、⁴⁰⁾ 脳リンパ管を介した排泄 (glymphatic system)^{41,42)} などにより脳内から排除される一方で、加齢や遺伝子変異などが原因で A β 排出の異常や A β 産生の増加が起きると、A β が過剰に蓄積して凝集し、老人斑の形成に寄与すると考えられている (Fig. 1)。A β 凝集体 (oligomer) は、直接あるいはミクログリアやアストロサイトの活性化を介して、神経細胞の恒常性を変化させることにより、キナーゼやフォスファターゼの活性を変化させる。これにより、リン酸化 tau (p-tau) の蓄積と NFT が誘導され、最終的に神経変性を引き起こすとされる。^{43,44)}

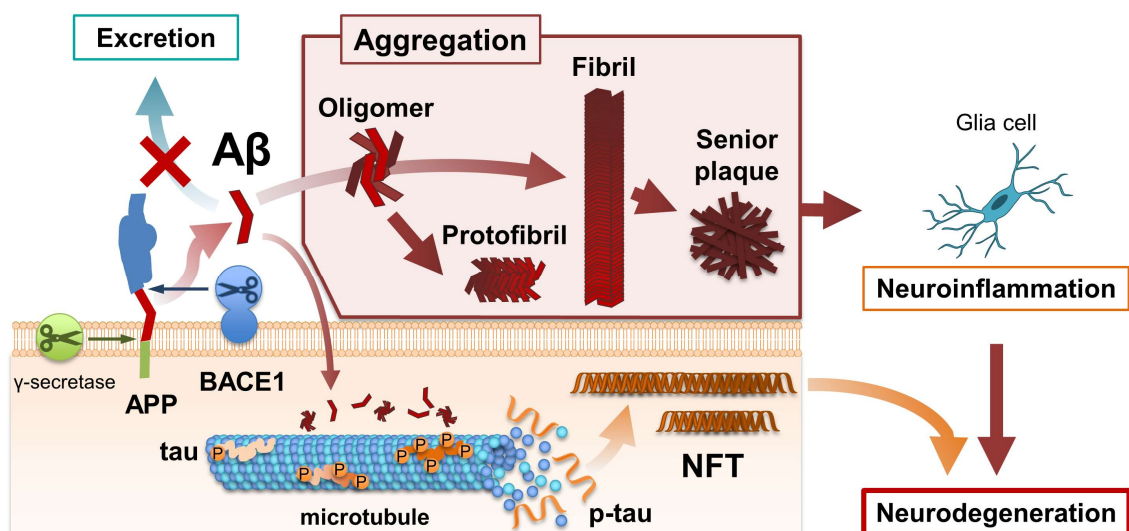


Figure 1. Schematic diagram of the amyloid cascade hypothesis. A β produced from APP by secretase is normally excreted and degraded, but when the amount of A β increases due to abnormal A β excretion or production, neuroinflammation is induced by the formation and deposition of aggregates, and NFTs are increased by the enhancement of tau phosphorylation, which is thought to induce neurodegeneration.

新規 AD 治療薬開発の機運の高まりとともに、アミロイドカスケード仮説で中心となる APP, BACE1, A β の特性についての研究も進展した. APP は体内に遍在する膜 1 回貫通型タンパク質で、受容体としてシグナルを伝達する一方で、セクレターゼにより APP から切り出された断片が、リガンドとして働くことも知られている.⁴⁵⁾ APP₇₇₀, APP₇₅₁, APP₆₉₅, などのアイソフォームがあり、脳内には APP₆₉₅ が最も豊富に存在する.⁴⁵⁾ APP は神経細胞では、軸索・樹状突起の両方に局在し、⁴⁶⁾ NMDAR と AMPAR を介した興奮伝達の制御により、神経発達や神経細胞の可塑性に関与していると考えられている.⁴⁷⁾ APP には酵素により切断される部位がいくつかあるが、APP₇₇₀ においては、672 残基の BACE1 サイトから 712 残基付近の γ -secretase サイトまでの領域は切断により A β を産生する. この領域のアミノ酸置換は、毒性 A β 種の産生増加や凝集能の増加を誘導し、AD の悪化因子として認識されており、⁴⁸⁾ APP 変異 AD モデルマウスは、この領域の変異を人工的に導入したものが多い⁴⁹⁾ (Fig. 2, Table 2). 一方で、A β の産生量が減少することにより認知機能低下が抑制される変異 (Icelandic 変異, A673T)⁵⁰⁾ も発見されており、AD 発症における A β の重要性を強調している.

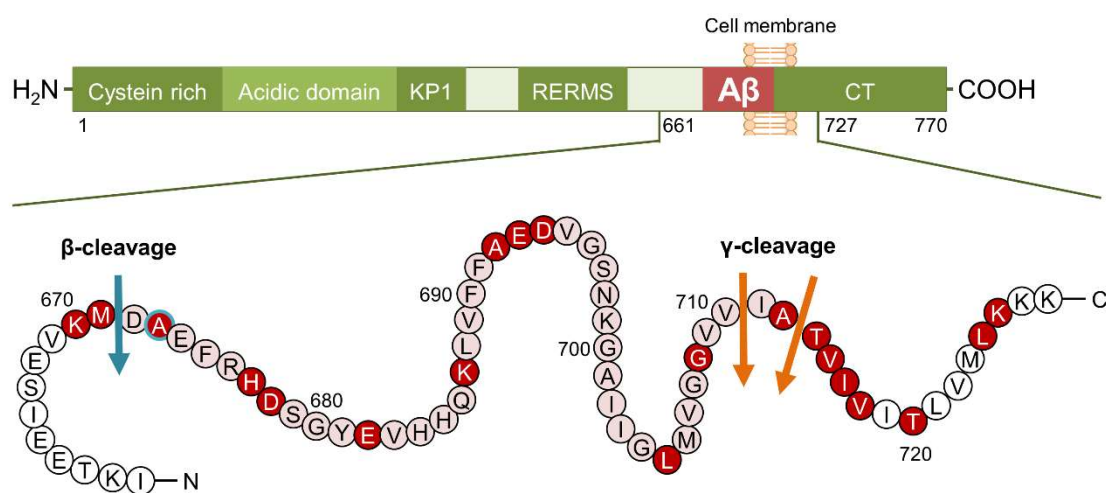


Figure 2. Structure of APP₇₇₀ and mutations around the A β region (light red). The amino acid variations shown in dark red affect the amount and ratio of A β produced.

Table 2. Mutations in APP that affect the generation of A β and the mouse strains in which these mutations are introduced.

変異	A β 生成への影響	変異導入マウス系統 ⁵¹⁾
KM670/671NL <i>Swedish</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\uparrow$ A β_{40}	Tg2576, 3xTg など多数
A673T	$\downarrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40}	
D678H <i>Taiwan</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\uparrow$ A β_{40}	
E682K <i>Leuven</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\uparrow$ A β_{40}	
K687N	$\uparrow$ A β_{40}	
A692G <i>Flemish</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\uparrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	
Δ E693 <i>Osaka</i>	$\downarrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40}	
E693K <i>Italian</i>	$\downarrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40}	
E693Q <i>Dutch</i>	$\downarrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40}	
E693G <i>Arctic</i>	$\downarrow$ A β_{42} / A β_{40}	APP ^{NL-G-F}
D694N <i>Iowa</i>	$\uparrow$ A β_{40} in plaques	
L705V <i>Italian</i>	$\downarrow$ Amyloid plaques	
G709S	$\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{38} , $\uparrow$ A β_{39}	
T714I <i>Austrian</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	
V715M <i>French</i>	$\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	
V715A <i>German</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	
I716V <i>Florida</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\uparrow$ A β_{38} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	5xFAD
I716F <i>Iberian</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	APP ^{NL-F} , APP ^{NL-G-F}
V717I <i>London</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	5xFAD
V717L <i>Indiana</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	
V717F <i>Indiana</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	PDAPP, J20, TgCRND8
L723P <i>Australian</i>	$\uparrow$ A β_{42}	
K724N <i>Belgian</i>	$\uparrow$ A β_{42} , $\downarrow$ A β_{40} , $\uparrow$ A β_{42} / A β_{40}	

BACE1 はアスパラギン酸プロテアーゼの一種で, APP の細胞外ドメインを切断する. APP 以外にも neuregulin 1 (NRG1), P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), 電位依存性ナトリウムチャネルなどが基質で, 軸索・髄鞘形成などに関与している.⁵²⁾ BACE1 は細胞膜上の脂質ラフトに局在して活性化するため, コレステロールの異常により脂質ラフトの形成が増加すると, 活性化 BACE1 が増加し, A β の産生が増加することが報告されている.⁵³⁾ BACE1 を含むアスパラギン酸プロテアーゼは, pH4-5 の酸性条件下でアスパラギン酸残基に水分子を配位させ, 水分子の求核反応を介してペプチド結合を切断していると考えられている.⁵⁴⁾

A β は, BACE1 および γ -secretase による APP の切断により生じるが, γ -secretase による切断部位の多様性により, いくつかのアイソフォームが存在する.⁵⁵⁻⁵⁷⁾ 中でも, A β_{42} は高い凝集能と毒性を示すことから精力的に研究されている.⁵⁸⁾ A β は特定の高次構造を持たず, pH や温度などの周辺環境により様々な構造を示すが, A β_{42} は特に β -sheet 構造を形成しやすく, 凝集核として他の A β ペプチドを巻き込みながら伸長し, fibril を形成する (Fig.3).⁵⁹⁾ これらの凝集体は, 物理的および酸化ストレス, 細胞膜微小環境の破壊, 細胞内シグナル伝達の阻害など様々な経路で神経変性を誘導する可能性が示されている.⁶⁰⁻⁶⁵⁾ 各機序がどの程度 AD における神経変性に寄与するかは議論の域を出ないが, いずれにおいても, A β 凝集は神経変性機序の重要な過程である.

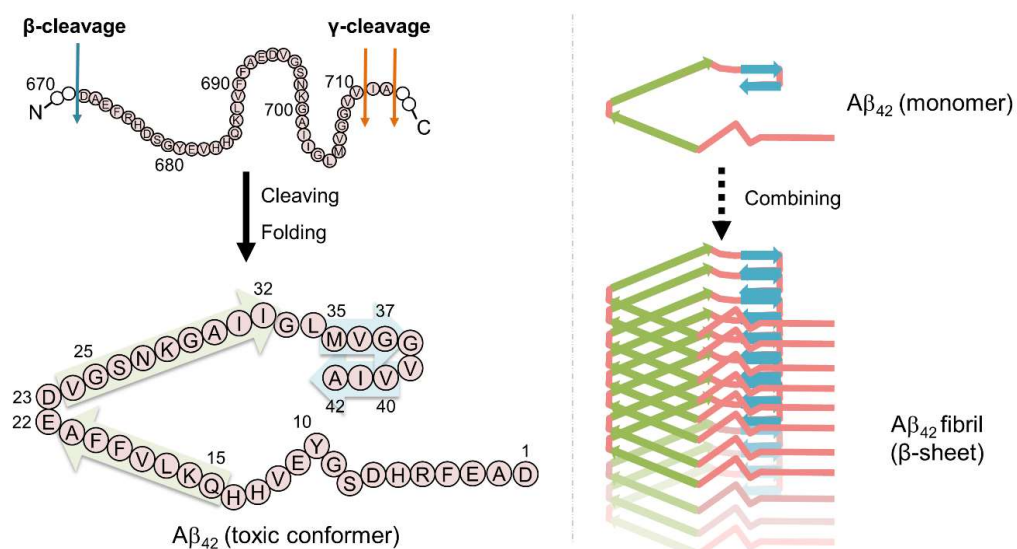
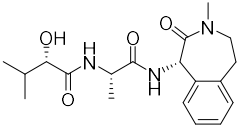
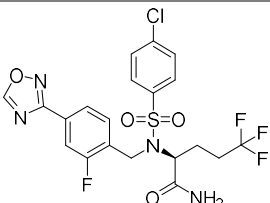
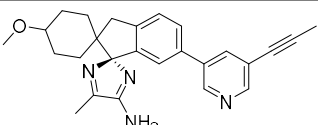
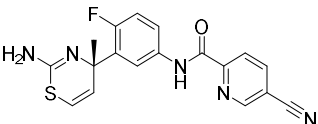
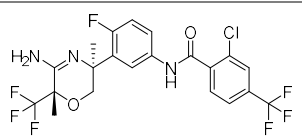
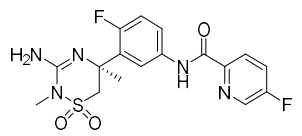
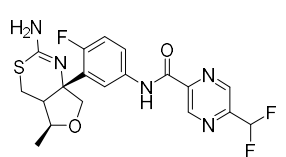


Figure 3. Schematic diagram of A β structure and aggregation mechanism. A β cut from APP, and aggregates and forms β -sheets structure.

アミロイドカスケード仮説に基づく、 $A\beta$ の生成、凝集を阻害することができれば、下流の神経変性を抑制することができる。したがって、最近の AD 治療薬開発では、 $A\beta$ の生成、凝集の阻害に焦点が当てられている。 $A\beta$ の生成阻害剤として、 γ -セクレターゼ阻害薬がはじめに考案されたが、 γ -セクレターゼの基質には Notch が含まれ、Notch シグナルの阻害は細胞の生存や機能に重大な影響を与える。⁶⁶⁾ γ -セクレターゼ阻害薬である semagacestat は第Ⅲ相試験まで進んだが、プラセボと比べて認知機能と日常生活動作 (Activities of Daily Living, ADL) の低下、皮膚がん発症リスクの亢進などにより開発が中止されている。⁶⁷⁾ $A\beta$ 生産への選択性をより高めた avagacestat も開発されたが、これも第Ⅱ相試験終了後、開発が中止されている (Table. 3)。⁶⁸⁾

$A\beta$ 産生抑制における別のアプローチとして、BACE1 阻害薬も開発された。Lanabecestat は、第Ⅰ相試験において脳脊髄液中の $A\beta$ を減少させる効果が報告されたことから、⁶⁹⁾ その後の臨床試験では軽度 AD 患者を対象に開発が進んだ。Atabecestat⁷⁰⁾ や umibecestat,⁷¹⁾ elenbecestat,⁷²⁾ verubecestat⁷³⁾ も同様の $A\beta$ 減少作用を示したことから、軽度 AD、軽度認知障害 (Mild Cognitive Impairment, MCI)、プレクリニカル AD を対象とした臨床試験が行われた。プレクリニカル AD は、自覚症状がないものの、 $A\beta$ の蓄積を陽電子放出断層撮影 (Positron Emission Tomography, PET) で認める状態を指す。^{43,44)} しかし、いずれも副作用による有害事象が発生した一方で、投与による有益性は見込まれないとする勧告を受けたことから、Ⅲ相試験以降の開発は中止された (Table 3)。これまでの結果をまとめると、セクレターゼ阻害による $A\beta$ 産生抑制は、脳内 $A\beta$ の減少効果を示すものの、病態の改善には至っていない。培養細胞を用いた解析では、APP の BACE1 切断部位の変異 (A637T, Icelandic 変異) により、 $A\beta$ の生成が約 40% 低下することが報告されている。⁵⁰⁾ また、標的組織に関して、中枢神経系のみならず、肝臓などの末梢で生産された $A\beta$ が脳内へ輸送されることが報告されている。⁷⁴⁾ 以上の知見を踏まえると、セクレターゼ阻害薬については、遺伝的介入による BACE1 および APP のアミノ酸置換や、末梢で薬効発現などを考慮することで、新たな治療薬候補の開発につながる可能性がある。⁷⁵⁾

Table 3. Clinically tested secretase inhibitors.

一般名	構造	標的分子	開発状況
semagacestat		γ -セクレターゼ	第Ⅲ相治験中止
avagacestat		γ -セクレターゼ	第Ⅱ相試験中止
lanabecestat		BACE1	第Ⅲ相治験中止
atabecestat		BACE1	第Ⅲ相治験中止
umibecestat		BACE1	第Ⅲ相治験中止
elenbecestat		BACE1	第Ⅲ相治験中止
verubecestat		BACE1	第Ⅲ相治験中止

アミロイドカスケード仮説において、 $A\beta$ の蓄積と AD 発症の間には、段階的・時間的乖離があるが、実際に $A\beta$ の蓄積は臨床症状の発症より 15~20 年先行することが、陽電子放出断層撮影 (Positron Emission Tomography, PET) などの画像検査で確かめられている。⁷⁶⁻⁷⁸⁾ したがって、治療的介入時には $A\beta$ が蓄積されている状態と考えられ、 $A\beta$ の産生抑制だけでは、既に産生された $A\beta$ による影響を排除することは出来ない。そこで蓄積した $A\beta$ の排出・分解促進を機序とする治療薬の開発が進められた。中でも特に開発が進んでいるのが、抗 $A\beta$ 抗体療法である (Fig. 4)。抗 $A\beta$ 抗体が $A\beta$ の凝集・蓄積を抑制する詳細な作用機序は未解明であるが、

A β monomer あるいは凝集体に結合し, A β の凝集を物理的に阻害するとともに,^{79,80)} ミクログリアによる A β の貪食を促進して凝集した A β を分解し,^{81,82)} 脳内の総 A β 量を減少させるためと考えられる. 抗 A β 抗体で初期に開発された solanezumab は, 第Ⅱ相試験でアミロイド PET の減少など, AD バイオマーカーを指標とした改善効果が認められたため,⁸³⁾ 軽度から中等度 AD を対象にした第Ⅲ相試験が行われ, 軽度 AD に限り認知機能低下の進行抑制が見られた.⁸⁴⁾ 現在は軽度 AD とプレクリニカル AD を対象とした第Ⅲ相試験が進行しているが, solanezumab の認知機能低下抑制効果はまだ確認されていない.⁸⁵⁾ Solanezumab は A β monomer を標的とする抗体であったため, A β oligomer や A β 線維などの凝集体を標的とした抗 A β 抗体が次に注目された. Aducanumab⁸⁶⁾ は A β oligomer を標的としており, MCI および軽度 AD 患者における第Ⅲ相試験ではアミロイド PET による A β プラークの減少と認知機能低下の進行抑制が示された.⁸⁷⁾ その後行われた大規模試験において, 中間解析では認知機能改善効果を示す可能性が低いと判断されて治験が中断するも, 全データ解析で高用量 (10 mg/kg) 投与群が認知機能低下の進行を有意に抑制していたことが示された. この結果を受けて, aducanumab は 2021 年 6 月にアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) で条件付き迅速承認され,⁸⁸⁾ 日本でも 2020 年に承認申請された. 承認については継続審議されていたものの, 米国での開発・販売が経営判断により 2024 年の第Ⅳ相試験終了とともに終了した.⁸⁹⁾ Lecanemab は, A β oligomer と A β 線維の中間に位置する, A β protofibril を標的としている. Lecanemab も aducanumab と同様に脳内アミロイド蓄積を減少させ,⁹⁰⁾ 有意な認知機能低下の進行抑制作用を示したことから,⁹¹⁾ 2023 年 7 月には FDA が承認し, 同年 9 月には, AD による MCI と軽度認知症に対する進行抑制薬として, 日本でも製造販売承認された.⁹²⁾ 2024 年現在, lecanemab (LEQEMBI[®], エーザイ) は日本, 米国, 中国, 韓国, 香港, イスラエルで承認を取得し, 日本, 米国, 中国で発売されている.⁹³⁾ Donanemab (KISUNLA[®], イーライリリー) も lecanemab に続く 2 例目の AD による MCI と軽度認知症に対する進行抑制薬として, 2024 年 9 月に日本で製造販売承認された.^{94,95)} Donanemab は, 不溶性 A β 凝集体に含まれる, N 末端が切断され脱水縮合したピログルタミル化 A β (N3pGA β) を標的としている (Fig. 4).^{96,97)} このように,

A β 凝集体を標的とした治療薬開発は、失敗の続いたアミロイドカスケード仮説に基づく治療薬開発の中で唯一結実し、後続の抗 A β 抗体の臨床試験も進んでいることから、今後の展開が注目されている。

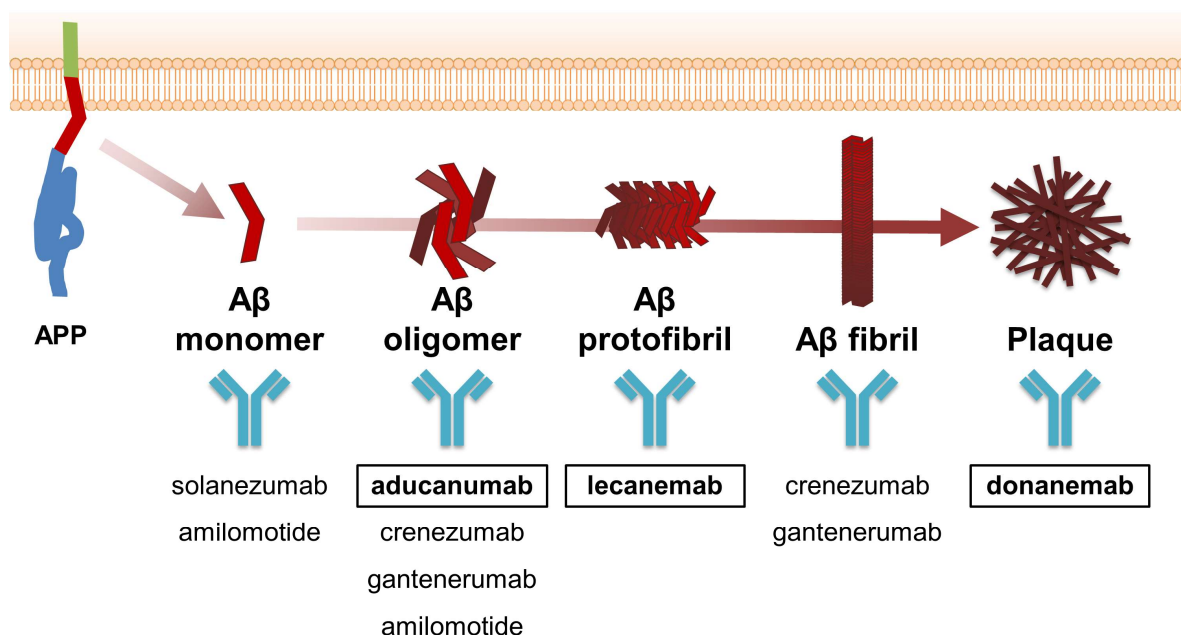


Figure 4. Clinically tested anti-A β antibodies and their targets. Antibodies in bold are approved.

一方で、抗 A β 抗体療法にも課題が残っている。特有の副作用である Amyloid-Related Imaging Abnormalities (ARIA) は、頭部 MRI で確認される脳画像の異常所見であり、血管原性浮腫 (edema) や浸出液貯留 (effusion) を反映する所見を ARIA-E、微小出血や脳表へモジデリン沈着 (hemosiderin) を反映する所見を ARIA-H と呼ぶ。⁹⁸⁾ Lecanemab の早期 AD を対象とした第Ⅲ相臨床試験結果によれば、ARIA-E は 12.6%、ARIA-H は 17.3% の lecanemab 投与患者に生じた。その 80%以上は無症候性であるが、^{91,99)} 頭痛やめまい、ふらつき、視野異常、歩行障害、稀に痙攣をきたす重症例も報告されている。ARIA の詳細なメカニズムは不明だが、血管壁に蓄積した A β に抗体が結合することで血管が脆弱化し、血中成分が脳実質に漏出するためと考えられている。¹⁰⁰⁾ したがって、抗 A β 抗体の投与により出血イベントリスクが増加する可能性があり、lecanemab 投与後に血栓溶解剤 (recombinant tissue-type Plasminogen Activator, rt-PA) を使用して、多発性脳出血を発症し死亡した例が報告

されている。¹⁰¹⁾ 日本脳卒中学会は, ARIA 所見のある場合は lecanemab 使用中の rt-PA の使用を禁忌とし, 所見がない場合は慎重投与とする指針を規定し, 添付文書でも抗凝固薬・抗血小板薬は併用注意とされている. また lecanemab 投与には, minimal state examination (MMSE) スコア 22 点以上の認知機能を有し, 臨床認知症評価尺度 (clinical dementia rating : CDR) 0.5 または 1 であること, 金属製医療機器の体内留置が無く MRI 検査が実施できること, アミロイド PET または脳脊髄液検査により A β 病理を示唆する所見が確認できることが必要である.¹⁰²⁾ この投与基準を満たす AD 患者は, 臨床試験の条件で地域別コホートにより検討すると, 早期 AD 患者の 8%と推計され, 限られた患者にしか用いることができない.¹⁰³⁾ さらに, 標準的な 18 ヶ月の治療でかかる lecanemab の薬剤費が約 400 万円であり, donepezil と比べて約 50 倍高額であること,¹⁰⁴⁾ 投与方法が点滴静注のみであることなどの課題もある. したがって, 抗 A β 抗体もほとんどの AD 患者のニーズを満たす治療薬とは考え難く, 大多数の AD 患者に適応でき, 安価で多様な投与経路に適した治療薬は, 今後も探索される必要がある.

また, AD の病態を考慮すると, 患者の大多数を占める高齢者への投与を念頭に置く必要がある. 高齢者においては, AD 以外にも併発疾患がある可能性が高く, 基本的に多剤併用による治療が前提となる. また, AD 患者は病識や併発疾患などにより服薬アドヒアランスが不良の傾向が高く,¹⁰⁵⁾ さらに, 高度に AD が進行した場合は寝たきりの状態である可能性が高いため, 介護者による服薬の管理が必要な場合が多い. したがって, 薬物相互作用や服薬アドヒアランスの観点からも, AD の発症に関わる複数の作用点を同時に阻害する化合物は, 単剤かつ少量で効果を示すという点で, より有用な治療薬の候補となる. 一方で, 化合物が複数の作用を示す場合, 副作用や選択性の欠如が懸念されるが, これらは化合物の構造を詳細に検討し, これまでに臨床試験された化合物と比較することにより, 一定の予測が可能と考えられる.

第2章 アルツハイマー病の新規治療薬候補化合物の探索

第1節 天然物由来化合物の有用性

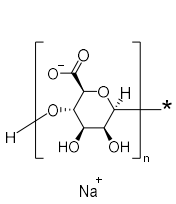
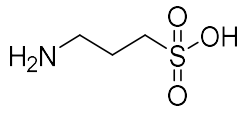
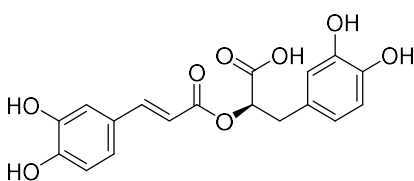
古来より人類は、天然物を医薬品として用いており、生薬はその最たる例と考えられる。天然物に含まれる有効成分を探る研究は、抽出・分離・同定技術の向上とともに、創薬の中心となった。実際に、1981年から2019年までに開発された医薬品のうち、全体の約50%が天然物に由来し、低分子医薬品に限れば約70%が天然物に由来していることが報告されている。¹⁰⁶⁾ 合成技術の革新により化合物の合成が容易になった1980年代には、医薬品における天然物由来化合物の割合は減少傾向であったが、2010年以降は増加傾向にあり、今後も天然物は創薬における重要な資源であると言える。¹⁰⁶⁾ 天然物が現在も注目される理由のひとつに、生物種によって生息環境や遺伝的多様性が大きく異なることで、独特な構造や生理活性を示す天然物由来化合物を生成することが挙げられる。天然物由来化合物はその多様な化学構造から、合成化合物ライブラリとは異なるケミカルスペースを有しており、上市された医薬品の構造多様性は天然物の多様性に由来することが示されている。¹⁰⁷⁾ さらに、天然物由来化合物ライブラリをデータベース化し、医薬品シード化合物探索を効率化する動きもある。^{108,109)}

医薬品に利用される天然物由来化合物の多くは、化学的な修飾を受けることで活性の増強や副作用の減弱がなされ、天然物誘導体となり上市されている。¹¹⁰⁾ その際、構造の修飾により、経口投与をはじめとした、さまざまな投与経路に対して最適化することができ、服薬アドヒアランスの向上が期待できる。

実際に、多くの天然由来化合物がAD治療薬候補として提案され、いくつかの臨床試験が行われている。¹¹¹⁾ 褐藻類のクロメ (*ecklonia cava ssp. kurome*) から単離された sodium oligomannate は、フェニルアラニンとイソロイシン濃度を低下させることで、炎症性ヘルパーT1細胞の活性化を抑制し、ADで見られるような神経炎症を緩和する効果を示す。¹¹²⁾ Sodium oligomannate はGV-971として2019年11月に中国でAD治療薬として承認された。¹¹³⁾ 紅藻類に含まれる tramiprosate はGABA類似化合物で、A β monomer に結合して安定化させることでA β 凝集を抑制する効果が報告されている。¹¹⁴⁾ 第II相試験で軽度AD患者における認知機能の維持・改善効果が認

められたが、第Ⅲ相試験ではプラセボ群と比較して有意な差が得られなかった。¹¹⁵⁾ シソ科の植物に含まれる **rosmarinic acid** は、ポリフェノール的一种であり、 $A\beta$ の凝集を強力に抑制するほか、海馬内の JNK シグナルを負に制御して炎症を抑制することで、認知機能を改善する効果が見込まれる。¹¹⁶⁾ **Rosmarinic acid** は第Ⅲ相試験まで試験されたが、プラセボ群と比較して実薬群に有意な差は見られなかった (Table 4).¹¹⁷⁾ イチョウ (*Ginkgo biloba*) 葉エキス (egb761) は、数種類のフラボノイドとテルペノイドを含み、抗酸化作用と $A\beta$ 凝集抑制効果を示すことから認知症に対するサプリメントとして用いられている。しかしこれも、臨床試験ではプラセボ群と比較して有意な認知機能改善効果は見られなかった。^{118,119)}

Table 4. Natural compounds clinically tested for the treatment of AD.

一般名	構造	作用機序	開発状況
sodium oligomannate		T1 細胞活性化	承認済 (中国)
tramiprosate		$A\beta$ 凝集抑制	第Ⅲ相 治験中止
rosmarinic acid		$A\beta$ 凝集抑制 JNK シグナル抑制	第Ⅲ相 治験中止

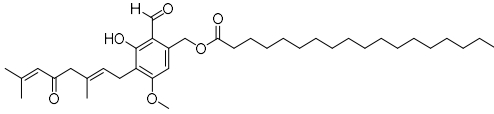
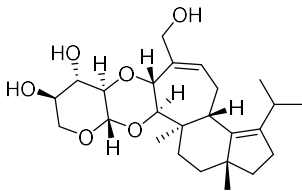
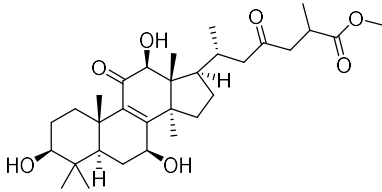
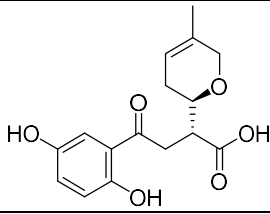
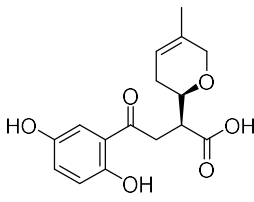
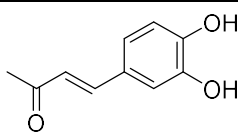
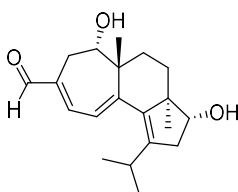
第2節 創薬資源におけるキノコ

前述のとおり、天然物は創薬の中心として長年研究されてきたが、多くは入手が容易である植物などの天然資源を対象としており、探索研究の進展とともにこれらの天然資源からは新規のシード化合物を得ることが困難になりつつある。¹²⁰⁾ さらに、回収しやすい成分は既に研究され尽くしていることから、これらの天然資源から新規化合物が得られたとしても、収量はごく少量であることが想定される。新規化合物の生理活性研究や構造展開研究には、評価に十分な化合物量を確保する必要があることを考慮すると、大量の資源を消費してしまう可能性が高い。このような背景から、新規化合物探索源の天然資源として、キノコが近年注目されている。

キノコは、一部の真菌が胞子を形成、放出するために形成する大型の器官を指す。真菌に分類される生物は生物5界説の中で菌界 (fungi) に属しており、植物界 (metaphyta) や動物界 (metazoa) とは遺伝的に大きく異なる。¹²¹⁾ 胞子で増える菌界の生物の多くは、菌糸という糸状で分岐する栄養体で構成され、菌糸が蔓延した状態を”カビ”と呼ぶことが多い。菌界の中でも、子囊菌門 (ascomycota) と担子菌門 (basidiomycota) に属する菌は、特定の時期に胞子を放出する大型の器官である子実体を形成する。この子実体を一般的に「キノコ」と呼称している。子実体から放出された胞子は生育に適した環境で発芽し、再び菌糸体となる。¹²²⁾ 子実体を形成する担子菌門だけでも3万を超える種が存在している。¹²³⁾ キノコの多くは、形成時期が限られるために入手が安定せず、十分な量を確保することが難しいため、これまで研究があまり進展してこなかった。しかし、分離・分析技術の向上により、従来よりも少量での研究が可能になったことで、キノコから有用な活性を持つ二次代謝産物の報告が増えてきている。¹²⁴⁻¹²⁶⁾ ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) に含まれる hericenone D や erinacine C は神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) の誘導活性を持ち、神経軸索の伸長や神経伝達物質の合成を促進する。^{127,128)} 霊芝 (*Ganoderma lucidum*) から単離された methyl ganoderate G1, lingzhine E, lingzhine F は、A β が誘導する活性酸素を除去して神経毒性を軽減することにより、神経保護作用を示すことが報告された。¹²⁹⁾ Chaga (*Inonotus obliquus*, カバノアナタケ) に含まれる多糖類は、A β ₄₂ と p-tau の沈着を有意に減少させ、AD モデルマウス (APP/PS1 マウス) で観察さ

れる空間記憶障害の緩和を示した。¹³⁰⁾ さらに、同じキノコから単離された 3,4-dihydroxybenzalacetone は, Nrf/glutathion 抗酸化経路の活性化と Akt/PI3K の阻害により, 神経保護作用を示す。¹³¹⁾ マツバハリタケ科の *Sarcodon cyrneus* から単離された cyrneine A は, Rac1 を活性化し, アクチン動態の制御による神経突起先端の伸長を誘導することが明らかにされている (Table 5).¹³²⁾

Table 5. Mushroom secondary metabolites with neuroprotective properties.

化合物名	構造	基原	作用
hericenone D		ヤマブシタケ	NGF 誘導活性
erinacine C		ヤマブシタケ	NGF 誘導活性
methyl ganoderate G1		霊芝	活性酸素除去
lingzhine E		霊芝	活性酸素除去
lingzhine F		霊芝	活性酸素除去
3,4-dihydroxybenzalacetone		カバノアナタケ	抗酸化経路 活性化
cyrneine A		<i>Sarcodon cyrneus</i>	神経突起伸長

第3章 アルツハイマー病の新規治療標的の探索

第1節 アルツハイマー病とシナプス変性

抗A β 抗体製剤の登場により,A β 抑制による認知機能低下抑制効果が示されたが,治療効果が得られる時期はAD病態の早期に絞られており,中等度AD以降の治療薬は従前と変わらない.このような状況を打開するため,tau 仮説や神経炎症,酸化ストレス,エストロゲン仮説など,アミロイドカスケード仮説以外のアプローチによる創薬も並行して進められている.¹³³⁾しかしながら,認知機能障害を誘導する神経変性の機序はまだ十分に解明されていない.

脳の高次機能は,神経回路の結びつきにより神経細胞の電氣的興奮が情報として伝達・処理されることで形成される.記憶や学習などの認知機能は,側頭葉にある海馬を中心とした神経回路により形成されていると考えられている.^{134,135)}海馬が記憶において重要であることは,患者 H.M.の症例により明らかとなった.¹³⁶⁾別の研究では,海馬-脳弓-乳頭体-乳頭体視床路-視床前核-視床帯状回投射-帯状回-帯状束-嗅内野-海馬と伝達される papez 回路がエピソード記憶形成に重要であることが示された.^{137,138)}Papez 回路に含まれる領域が障害されると,前向き健忘をきたす.近接する記憶回路に,扁桃核を中心とした yakovlev 回路があり,¹³⁹⁾この回路に海馬は含まれないが,情動記憶の形成には papez 回路と yakovlev 回路の連携が必要とされる.¹⁴⁰⁾また,両方の回路に対して,マイネルト基底核や内側中隔核を含む前脳基底部から ACh 作動性神経が投射しており,これらの ACh 作動性神経は AD で脱落することが知られている.¹⁴¹⁾

海馬は,歯状回 (dentate gyrus, DG),海馬支脚 (subiculum),前海馬支脚 (presubiculum),傍海馬支脚 (parasubiculum),嗅内皮質 (entorhinal cortex)とともに,海馬体を構成している.海馬は顆粒細胞や錐体細胞などにより構成されており,錐体細胞の大きさと形状から CA1-3 (cornu ammonis, CA: アンモン角に由来する) の3つの領域に分類される.¹⁴²⁾CAに見られる錐体細胞は,細胞体が3~6個積み重なる層を形成し,平仮名の「つ」のように並ぶ形態学的特徴を示す.細胞体層の上下方向には樹状突起が伸びており,細胞体から海馬の中心方向へ伸びる長い(apical dendrite)と細胞体から外側に伸びる短い基底樹状突起 (basal dendrite)に分けられる.

CA 錐体細胞の軸索は領域によって出力先が異なっている. CA3 の錐体細胞は, 嗅内野から伸びる神経線維から尖端樹状突起に入力された情報を, 反回側枝(recurrent collateral) により別の CA3 錐体細胞へ出力するか, シャッフアー側枝 (Schaffer collaterals) と呼ばれる軸索を介して CA1 に出力する. 一方, CA1 錐体細胞は軸索を海馬台へ伸ばし, 海馬台から脳弓を介して乳頭体へつながる神経線維へ情報を伝達する (Fig. 5).¹⁴³⁾

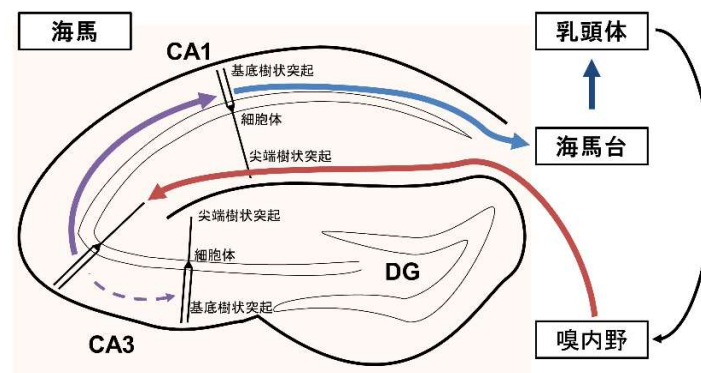


Figure 5. Schematic of hippocampal neuron connections.

神経細胞同士はシナプスを介して接続し, 複雑なネットワークである神経回路を形成している. 錐体細胞は, 神経線維上の棘状構造でシナプスを形成しており, この構造は特に, 樹状突起スパイン (dendritic spine) と呼ばれている (Fig. 6).¹⁴⁴⁾ 樹状突起スパインには, 興奮性のシナプスを形成しており, スパイン頭部の膜上には AMPAR や NMDAR などのイオンチャネル型グルタミン酸受容体を発現している. これらの受容体は, シナプス後肥厚 (Post Synaptic Density, PSD) タンパク 95 (PSD-95) などにより細胞膜上に保持されている.¹⁴⁵⁾ また, スパイン内は神経線維に比べてアクチンが高密度に存在し, 内部から強固に支持されているが, このアクチン線維は, アクチン結合タンパクのほか RhoA, Rac などの低分子 GTP 結合タンパク質により制御されることが知られている.¹⁴⁶⁾ 注目すべき点として, 樹状突起スパインは, 入力される神経活動刺激に応じて伝達効率を変化させる, シナプス可塑性を有している.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾ すなわち, 長期間または反復した活動刺激がスパインに入力されると, スパインの肥大化やグルタミン酸受容体のシナプス後部膜への集積などが起き, 長

期増強 (Long-Term Potentiation, LTP) と呼ばれる数時間～数ヶ月に及ぶ伝達効率の増強が誘導される。^{150,151)} あるいは, 活動刺激の減少によりスパインが縮小し, 長期抑圧 (Long-Term Depression, LTD) が誘導されるほか, グリア細胞によりスパインが除去されることもある。^{151,152)} このようなシナプス可塑性は, 反復した学習により長期的な記憶が形成される過程や忘却の過程と類似しており, 学習と記憶の基盤的機構と考えられる。

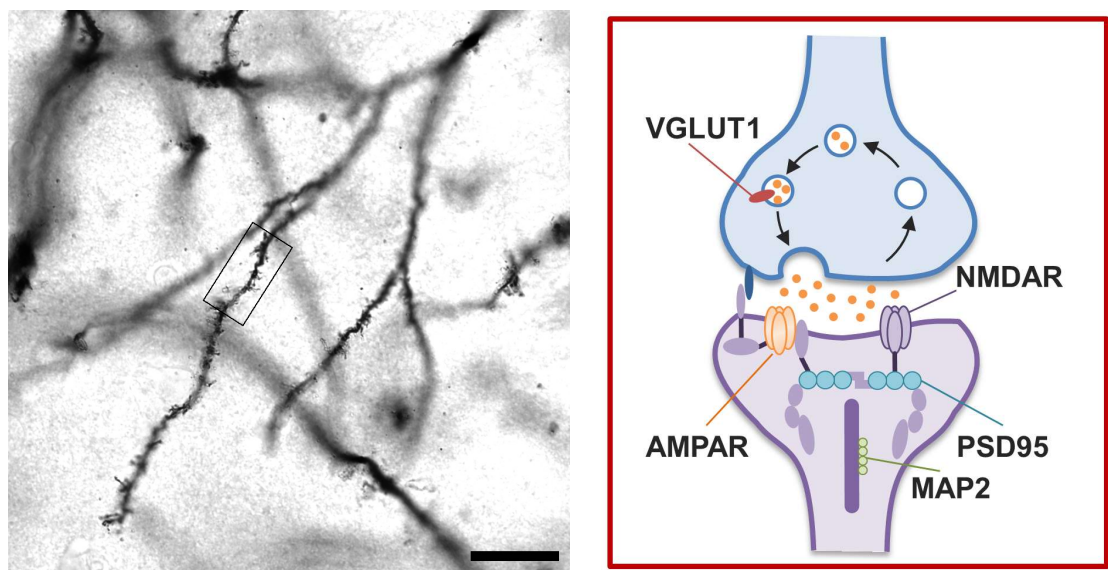


Figure 6. Schematic diagram of dendrites (left, scale bar: 20 μm) and synaptic structures (right) of Golgi stained mouse hippocampal pyramidal cells.¹⁴⁵⁾ A structure that protrudes from a dendrite like a spine is a dendritic spine.

AD において, 海馬は最初期に萎縮がみられる領域であり,^{153,154)} 海馬のシナプス密度およびシナプス前およびシナプス後タンパク質のレベルは正常な脳に比べ低下していることが示唆されている。¹⁵⁵⁾ さらに, シナプスの減少は細胞死に先立って起こり, AD だけでなく MCI 患者にも見られる (Fig. 7).¹⁵⁶⁾ これらのことから, 神経変性の前に, シナプスの密度を低下させるような機構が存在することが示唆された。神経変性疾患における, シナプス喪失メカニズムはいくつか示されている。例えば, 補体 C1q や C3 による古典的補体経路を介したミクログリアの貪食によるシナプスの除去の誘導,¹⁵⁷⁾ 活性酸素によるシナプスのアポトーシス誘導, 過剰なグルタミン酸による浸透圧異常, ミトコンドリアの機能異常とオートファジーの誘導¹⁵⁸⁾などが

報告されている (Fig. 7). しかしながら AD において、神経変性の前にシナプスがどのようなメカニズムで減少しているかは完全には解明されていない。¹⁵⁵⁾

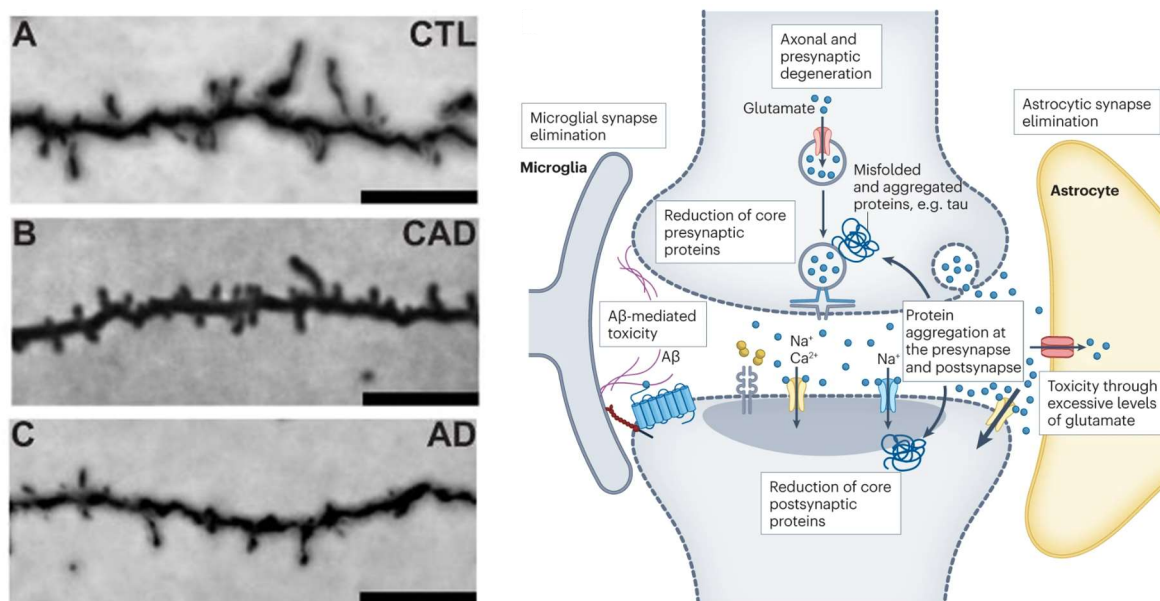


Figure 7. (Left) Decreased dendritic spine in AD.¹⁵⁹⁾ (Scale bar: 5 μm) The number of dendritic spines is reduced in patients diagnosed with AD compared to controls; CTL: controls (healthy subjects); CAD: patients with AD pathology but normal cognitive function; AD: patients diagnosed with AD. (Right) Schematic diagram of the proposed mechanism of dendritic spine loss.¹⁶⁰⁾

第2節 Neuro-vascular unit と血管内皮細胞由来因子

脳血管系は、脳に十分な酸素と代謝物質を供給する重要な役割を担っているため、健康維持に不可欠である。機能的、形態学的にも正常な脳血管は血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB) を構成し、脳内への循環内容物の漏出を厳重に制御している。また、“Neuro-vascular unit” という概念の進歩により、血管内皮細胞を含む複数の細胞タイプの相互作用が脳機能に不可欠であることが認識されている。Neuro-vascular unit は、主に血管内皮細胞、神経細胞、グリア細胞で構成されており、これらの構成要素間の相互作用は、BBB の維持、脳血流の調節、周囲の細胞への栄養供給、タンパク質の排出など、多くの機能に寄与している (Fig. 8).¹⁶¹⁾

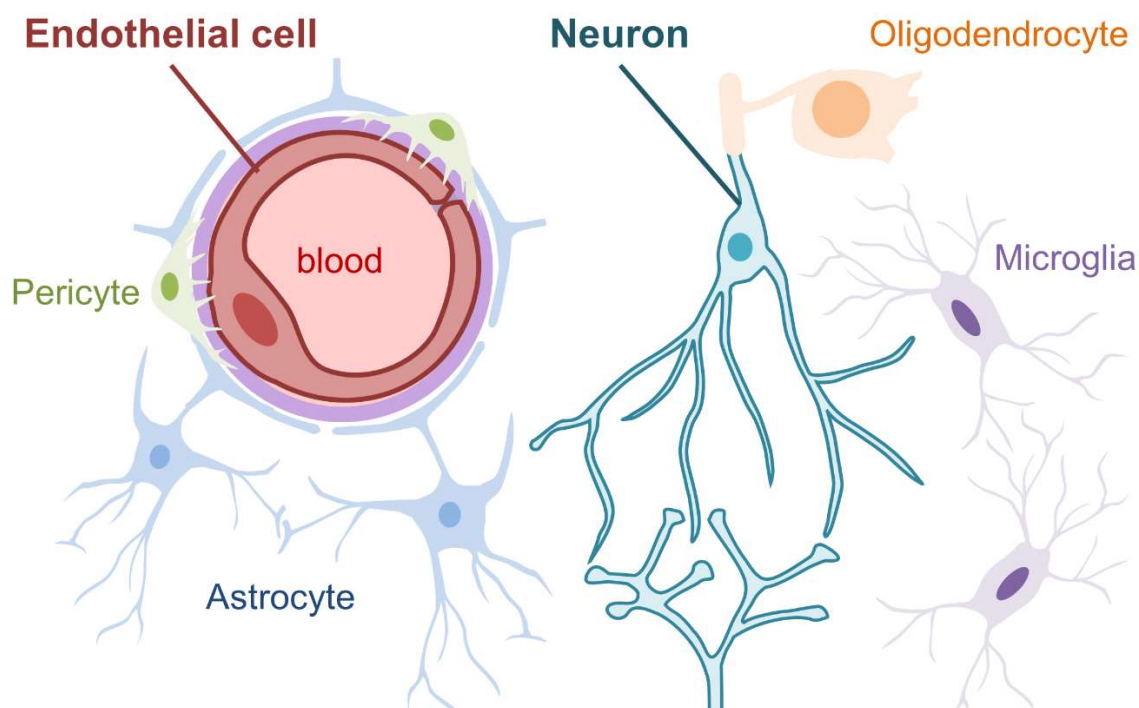


Figure 8. Schematic diagram of the Neuro-vascular unit.

正常な血管はアストロサイト、平滑筋細胞、周皮細胞などの血管周囲細胞によって覆われているが、病的な状況下では血管周囲細胞が損失する場合があります、血管内皮細胞と周囲のニューロンとの直接的なコミュニケーションが可能となる。¹⁶²⁾ 血管機能障害は AD の早期に現れ、脳血流の低灌流により BBB の崩壊や脳内物質の排出不全を介して神経炎症や神経変性を招き、AD 病理を加速することが示唆され

ている。¹⁶³⁾ 加えて, apolipoprotein E (APOE) や phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein (PICALM), phospholipase C gamma 2 (PLCG2) など, 多くの AD リスク因子が AD 患者の血管内皮細胞で発現することが報告されており, 発現が変動する遺伝子の一部は, タンパク質の輸送や適応免疫反応などの血管機能に関与していることが示唆される。¹⁶⁴⁾ また, AD 患者の血管内皮細胞で発現変動する遺伝子には炎症性サイトカインなどの分泌因子が多く含まれ, これが Neuro-vascular unit の構成細胞など, 血管内皮細胞以外の細胞にも影響を及ぼし, AD の病態に寄与する可能性が考えられる. 以上を踏まえると, 血管内皮細胞由来の AD 病態制御因子を探索することで, 新たな AD 治療薬の標的を見出すことが可能であると期待できる.

本論

第1章 本研究の目的

これまでに述べたとおり, AD は, 神経変性により認知機能が低下する疾患で, 高齢人口の増加とともに患者数が増加することが推計されることから, 治療薬開発が急務とされていた. AD の原因仮説として最も支持されるアミロイドカスケード仮説に基づいて, 抗 A β 抗体療法が初の AD 疾患修飾薬として開発されたが, 特有の副作用や投与基準に適格な患者が少数などの課題を有している. したがって, 幅広い AD 患者に投与が可能な AD 疾患修飾薬の開発は, 依然として課題である. そこで本研究では, 新規 AD 治療薬の開発を目的に, 大きく 2 つの研究を行うこととした.

第一の研究は, アミロイドカスケード仮説の中心である A β に対する活性化合物の探索である. アミロイドカスケード仮説に基づく医薬品開発のこれまでの知見から, AD の病態に関与する複数の標的を同時に阻害する化合物であれば, 単体の標的に対する活性よりも強力な治療効果を示すと考え, multi-acting な化合物の探索を試みた. 化合物の探索資源は, 経済性や服薬アドヒアランスを考慮して天然物とし, 天然物の中でも研究が未開拓なキノコに注目した.

第二の研究は, 新規 AD 治療標的の探索である. A β の蓄積後, 神経変性が起きる前にシナプス数が減少する可能性が示唆されているが, その機序は未だ完全には解明されていない. シナプス制御を含む神経機能の制御機構として, neuro-vascular unit 内の細胞間相互作用の関与が示唆されている. 本研究では, 血管内皮細胞から放出される液性因子には, 神経細胞の発生, 発達, シナプス形成を制御するものが存在すること,¹⁶⁵⁻¹⁶⁷⁾ また, AD の血管内皮細胞では液性因子を含む様々な遺伝子が発現変動することから,¹⁶⁸⁾ AD のシナプス減少に血管内皮細胞由来の液性因子が関与する可能性を考えた. そのため, AD モデルマウスの血管内皮細胞で発現変動する液性因子を探索し, シナプスに与える作用を検討した,

第2章 ボタンイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) MeOH ext. からの抗アミロイドカスケード活性化化合物の探索

第1節 キノコ抽出エキスの抗アミロイドカスケード活性評価

本研究では AD の病態に関与する複数の標的として、アミロイドカスケード仮説に基づき、 $A\beta$ 生成酵素である BACE1 の阻害活性、生成した $A\beta$ の凝集阻害活性、および $A\beta$ による神経毒性からの保護活性に着目した。これら3点の活性をまとめて「抗アミロイドカスケード活性」と呼称する。抗アミロイドカスケード活性を示す化合物を効率的に探索するため、本研究ではまず、キノコ抽出エキスの状態における活性に注目した。明治薬科大学生薬学研究室で保有する 64 種のキノコを乾燥し粉砕した後、 $CHCl_3$ と MeOH で順次抽出した。これらのキノコ抽出エキスに対して、佐々木らは BACE1 FRET assay に基づく BACE1 阻害活性について、荒幡らは改変された Thioflavin-T (Th-T) assay^{169,170)} に基づく $A\beta$ 凝集抑制活性についてスクリーニングを実施した。

BACE1 FRET assay は、蛍光ドナー (rhodamine 誘導体) とクエンチングアクセプター間での蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)¹⁷¹⁾ を利用した評価系であり、ドナーとアクセプターで修飾された APP-Swedish 変異配列を有するペプチド鎖を用いる。これに 530–545 nm の励起光を照射すると、通常の状態では FRET によりエネルギーが移動して消光されるが、BACE1 によりペプチド鎖が切断されると、ドナーとアクセプターの距離が変化して FRET が起こらなくなるため、530–545 nm の励起光照射で 570–590 nm の蛍光を検出することができる (Fig. 9)。蛍光強度は基質の分解率に比例することから、BACE1 の活性を評価できる。本研究では、BACE1 阻害活性のポジティブコントロールとして、 β -Secretase Inhibitor IV^{172,173)} (IC_{50} : 0.015 μ M) を用い、コントロールの蛍光強度に対するサンプルの蛍光強度から BACE1 阻害率を算出した。

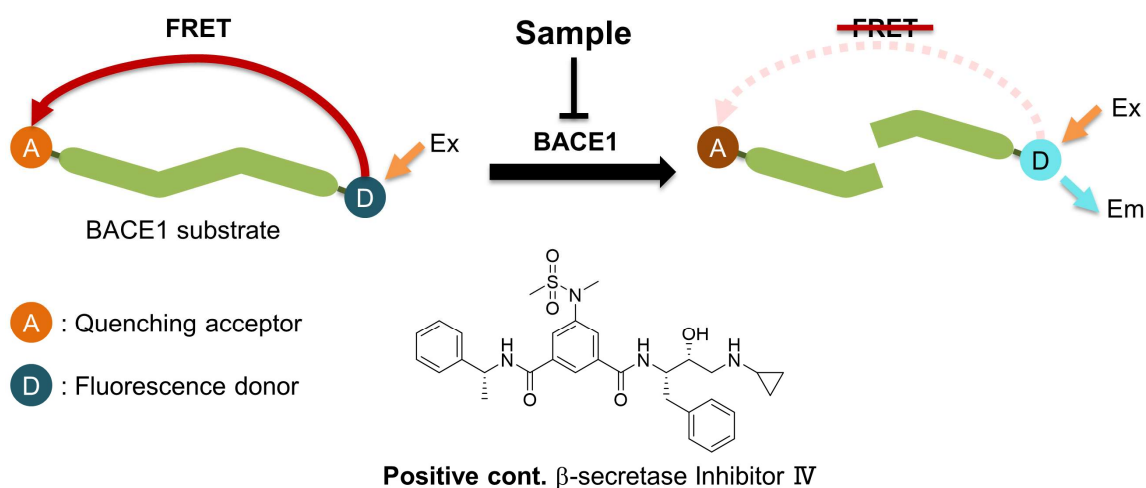


Figure 9. Schematic diagram of BACE1 assay principle. Ex indicates Excitation and Em indicates Emission.

Th-T assay は, Th-T が $A\beta$ fibril の β -sheet 構造中に存在する特異的結合部に結合すると, Th-T の軸回転によるエネルギー緩和が立体障害により起こせなくなることによって共役系が固定され, 446–450 nm の励起光に対して 480–490 nm の蛍光を発することを利用している (Fig.10).¹⁷⁰⁾ 蛍光強度は $A\beta$ fibril の存在量に比例することから, コントロールの蛍光強度に対するサンプルの蛍光強度から $A\beta$ 凝集率を算出した. なお, 本研究で用いた Th-T assay では, 先行研究で $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ を使用した結果に有意差が認められなかったこと,¹⁷⁴⁾ および操作性, 経済性の観点から $A\beta_{40}$ を用い, 反応 24 時間後の凝集率を比較した. ポジティブコントロールには myricetin (IC_{50} : 9.9 μ M) を用いた.

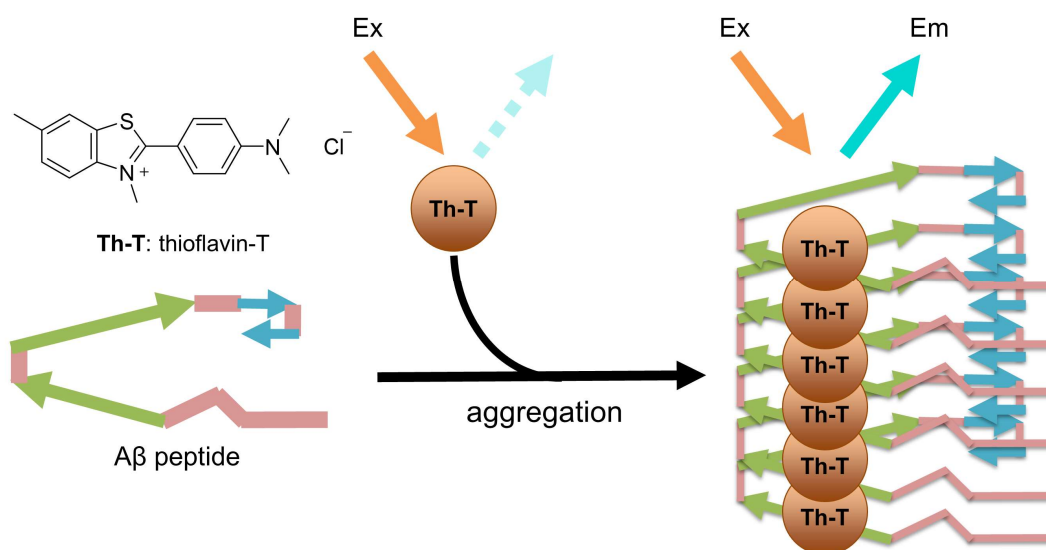


Figure 10. Schematic diagram of Th-T assay measurement principle. Ex indicates Excitation and Em indicates Emission.

本学生薬学研究室が所有する 64 種類のキノコの CHCl_3 , および MeOH 抽出エキスを BACE1 FRET assay および Th-T assay により, それぞれ BACE1 および $\text{A}\beta$ 凝集阻害活性を評価した. スクリーニングの結果, ボタニイボタケ *Thelephora aurantiotincta* MeOH 抽出エキスを BACE1 阻害活性 (10 $\mu\text{g/mL}$ での BACE1 阻害率: 64.7%) および $\text{A}\beta$ 凝集抑制活性 (10 $\mu\text{g/mL}$ での $\text{A}\beta$ 凝集率: 35.3%) を見出したことから, 本研究ではボタニイボタケ *Thelephora aurantiotincta* MeOH 抽出エキスを着目し, 研究を行った.

第2節 ボタンイボタケ *Thelephora aurantiotincta*

ボタンイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) はイボタケ目 (Thelephorales) イボタケ科 (Thelephoraceae) イボタケ属に属する担子菌類である。アカマツなどの根本に子実体を形成し、その大きさは高さ 5~8 cm, 幅 5~10 cm ほどである。本邦においては薬用、食用に供されることはないと言われるが、中国では「橙黄革菌」と呼ばれ、健胃、去風、駆瘀血などの生薬として用いられるほか、特に分布する雲南省西部では「黄甘巴」と呼ばれ喫食されることもある。含有成分についてはいくつかの先行研究があり、多数の *p*-therphenyl 化合物が報告されている (Fig. 11).¹⁷⁵⁻¹⁷⁷⁾ Aurantiotinin A は 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性が報告されており、その活性は、活性酸素除去活性が知られる α -tocopherol (EC_{50} : 0.25 mM) と同等の EC_{50} : 0.27 mM を示した。¹⁷⁸⁾ また, thelephantin O と vialinin A は、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いた抗肝臓癌活性試験において、肝臓癌選択的な抗癌活性を示す。¹⁷⁹⁾ これは、細胞内の Fe^{2+} イオンを *p*-therphenyl がキレートすることによると考えられている。¹⁸⁰⁾ さらに, vialinin A はユビキチン特異的プロテアーゼ 4 (Ubiquitin-Specific Protease 4, USP4) の強力な阻害剤として報告されており,¹⁸¹⁾ ドッキングスタディにより thelephantin O や aurantiotinin A も特徴的な USP4 結合能を持つことが示唆されている。¹⁸²⁾ USP4 は細胞増殖や浸潤などに影響を与え, TNF- α を介して, 癌や炎症性疾患において病態悪化因子として働くことが知られている。¹⁸³⁾ したがって, aurantiotinin A や thelephantin O, vialinin A などの *p*-therphenyl 化合物は, 抗癌剤や抗炎症薬の候補としても注目されている。このように, ボタンイボタケに含まれる *p*-therphenyl 化合物は, 物理的特性と生物的特性の両面で様々な生理活性を有していることから, BACE1 阻害活性および $A\beta$ 凝集抑制活性においても, これら *p*-therphenyl 化合物が活性に寄与することが期待される。

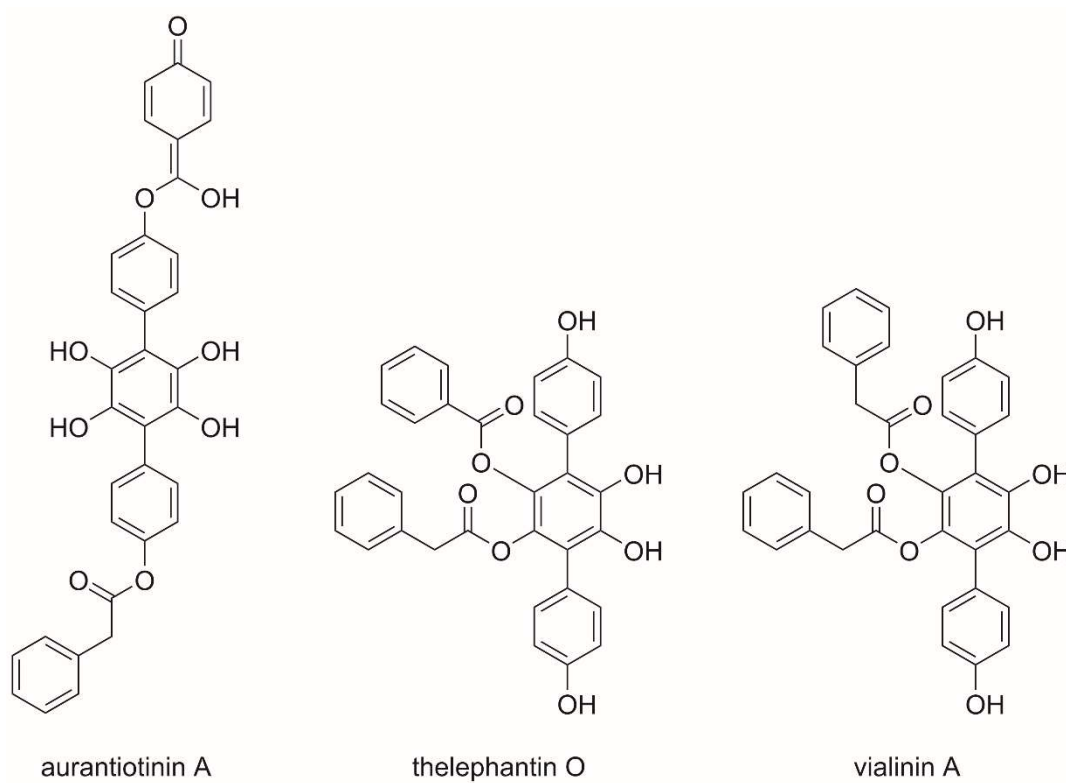


Figure 11. Bioactive *p*-terphenyl compounds isolated from *Thelephora aurantiotincta*.

Thelephora aurantiotincta MeOH 抽出エキスを Silica gel Columun Chromatography (Si. C. C.), Octa Decyl Silyl Columun Chromatography (ODS C.C.), および分取 HPLC で分離精製し, 3 種の新規 *p*-terphenyl 化合物を単離し thelephantin P (**1**), thelephantin Q (**2**), および thelephantin R (**3**) と命名した. また, 4 種の既知化合物 thelephantin A (**4**), terrestrin D (**5**), thelephorin A (**6**), 4-hydroxybenzoic acid (**7**) を単離, 同定した (Fig. 12).



Thelephantin P (**1**) は無色のアモルファスとして得られ、その分子式は HRESIMS により $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_9$ と推定された. IR からはヒドロキシ基 (3184 cm^{-1}) とカルボニル基 (1733 cm^{-1}) の存在が示唆された. **1** の CD_3OD における $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおい

て, 3 つの 1,4-二置換芳香族プロトン δ_{H} 6.58 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), δ_{H} 6.72 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), δ_{H} 6.73 (2H, d, $J = 8.6$ Hz), δ_{H} 7.24 (4H, d, $J = 8.6$ Hz), δ_{H} 7.59 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), そして芳香族プロトンとして, δ_{H} 7.26 (2H, t, $J = 7.8$ Hz), δ_{H} 7.44 (1H, t, $J = 7.5$ Hz), δ_{H} 7.72 (2H, dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz) を示した. ^{13}C -NMR, DEPT 135, DEPT 90 スペクトルから, δ_{C} 166.5 (C=O $\times$ 2) に 2 つ分のカルボニル炭素, δ_{C} 163.9, δ_{C} 158.00, δ_{C} 157.97, δ_{C} 142.7, δ_{C} 142.5, および δ_{C} 135.1 (C $\times$ 2) に酸素と結合した 7 つの sp^2 炭素, および 23 個の sp^2 炭素シグナル δ_{C} 134.6 (CH), δ_{C} 133.2 (CH $\times$ 2), δ_{C} 132.6 (CH $\times$ 4), δ_{C} 130.7 (CH $\times$ 2), δ_{C} 130.2 (C), δ_{C} 129.4 (CH $\times$ 2), δ_{C} 125.1 (C), δ_{C} 125.0 (C), δ_{C} 124.2 (C), δ_{C} 124.1 (C), δ_{C} 120.8 (C), δ_{C} 116.04 (CH $\times$ 2), δ_{C} 115.95 (CH $\times$ 4) 観測された (Table 6). 2DNMR の結果は Fig. 13 に示した. δ_{H} 6.58 (2H, d, $J = 8.9$ Hz) は δ_{C} 116.04 と, δ_{H} 7.59 (2H, d, $J = 8.9$ Hz) は δ_{C} 133.2 との HMQC 相関が得られた. また, δ_{H} 6.58 (H-4', 6') から δ_{C} 120.8 (C-2') および δ_{C} 163.9 (C-5') に, δ_{H} 7.59 (H-3', 7') から δ_{C} 166.5 (C-1') および δ_{C} 163.9 (C-5') への HMBC 相関も得られた. これらに加えて, δ_{C} 163.9 (C-5') と δ_{C} 166.5 (C-1' の C=O) の化学シフトから, *p*-hydroxybenzoate unit の存在が示唆された. 次に, δ_{H} 7.26 (2H, t, $J = 7.8$ Hz) は δ_{C} 129.4 と, δ_{H} 7.44 (1H, t, $J = 7.5$ Hz) は δ_{C} 134.6 と, δ_{H} 7.72 (2H, dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz) は δ_{C} 130.7 との HMQC 相関が観測された. さらに, δ_{H} 7.26 (H-4'', 6'') から δ_{C} 130.2 (C-2'') および δ_{C} 130.7 (C-3'', 7''), δ_{H} 7.44 (H-5'') から δ_{C} 130.7 (C-3'', 7''), δ_{H} 7.72 (H-3'', 7'') から δ_{C} 166.5 (C-1'') への HMBC 相関も得られた. さらに, C-1'' に帰属した δ_{C} 166.5 の化学シフトはカルボニル炭素であると考えられ, 以上から benzoate unit の存在が示唆された. さらに, δ_{H} 6.72 (2H) は δ_{C} 115.95 と, δ_{H} 6.73 (2H) は δ_{C} 115.95 と, δ_{H} 7.24 (4H) は δ_{C} 132.6 との HMQC 相関が認められた. そして δ_{H} 6.72 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2, 6 or H-15, 17) と δ_{H} 7.24 (4H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3, 5 and H-14, 18), δ_{H} 6.73 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-15, 17 or H-2, 6) と δ_{H} 7.24 (4H, d, $J = 8.6$ Hz, H-14, 18 and H-3, 5) に 1,4-二置換の芳香族プロトン間と考えられる ^1H - ^1H COSY 相関が観測された. HMBC 相関は, δ_{H} 6.72 (H-2, 6 or H-15, 17) から δ_{C} 125.0 (C-4 or C-13) および δ_{C} 157.97 (C-1 or C-16), δ_{H} 7.24 (H-3, 5 and H-14, 18) から δ_{C} 124.1 (C-7 or C-10) および δ_{C} 157.97 (C-1 or C-16), δ_{H} 6.73 (H-15, 17 or H-2, 6) から δ_{C} 125.1 (C-13 or C-4) および δ_{C} 158.00 (C-16 or C-1), δ_{H} 7.24 (H-14, 18 and H-3, 5) か

ら δ_c 124.2 (C-10 or C-7) および δ_c 158.00 (C-16 or C-1) が観測された. **1** の分子式から, 残りの 4 つの 4 級炭素 (δ_c 135.2, δ_c 135.2, δ_c 142.5, δ_c 142.7) は, δ_c 124.1 (C-7) および δ_c 124.2 (C-10) とともに 6 置換芳香環を形成していることが示唆された. さらに, δ_c 157.97 (C-1 or C16) と δ_c 158.00 (C-16 or C-1) の化学シフトから, *p*-terphenyl 骨格の存在が示唆された. 以上の **1** のスペクトルデータは, 既知の *p*-terphenyl 化合物である thelephantin G¹⁷⁶⁾ と良い一致を示した. Thelephantin G と **1** の構造の違いは, thelephantin G が 2 つの *p*-hydroxybenzoate unit を持つのに対し, **1** は 1 つの *p*-hydroxybenzoate unit と 1 つの benzoate unit を持つことである. Thelephantin G は構造が修正されており, その際に天然化合物および合成された 2 つの位置異性体の ¹H および ¹³C-NMR データが報告されている.¹⁸⁴⁾ そこで, これらのデータと **1** の実測値を比較したところ **1** は, 天然の thelephantin G の NMR データと良い一致を示した (Table 6). そこで, Fig. 15 に示したように, thelephantin P (**1**) の置換基の位置は thelephantin G と同じであると決定した (Fig. 13).

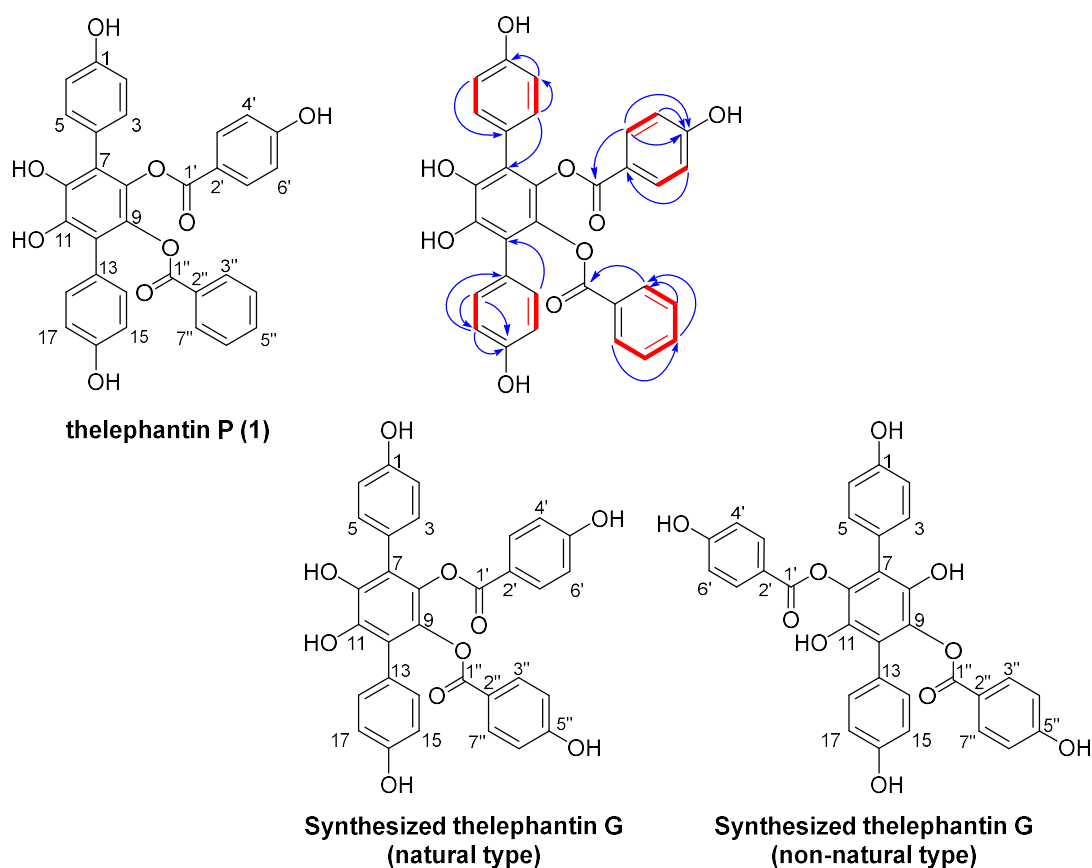


Figure 13. Structure of Thelephantin G and Compound **1**.
HMBC (blue arrows), ¹H-¹H COSY (red bonds).

Table 6. NMR spectral data (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C in CD_3OD) of synthetic thelephantin G (natural type), thelephantin G (non-natural type) and thelephantin P (**1**).

synthesized thelephantin G (natural type)				synthesized isomer of thelephantin G (non-natural type)			Thelephantin P (1)		
Position	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)
1	158.0	C		157.7	C		157.97 ^{a)}	C	
2,6	115.9	CH	6.75 d (8.8)	115.9	CH	6.73 d (8.8)	115.95 ^{b)}	CH	6.72 d (8.6) ^{l)}
3,5	132.6	CH	7.26 d (8.8)	132.7	CH	7.22 d (8.8)	132.6	CH	7.24 d (8.6)
4	125.1	C		125.3	C		125.0 ^{c)}	C	
7	124.1	C		125.7	C		124.1 ^{d)}	C	
8	142.4	C		141.3	C		142.5 ^{e)}	C	
9	142.4	C		137.2	C		142.7 ^{e)}	C	
10	124.1	C		125.7	C		124.2 ^{d)}	C	
11	135.1	C		141.3	C		135.1	C	
12	135.1	C		137.2	C		135.1	C	
13	125.1	C		125.0	C		125.1 ^{e)}	C	
14,18	132.6	CH	7.26 d (8.8)	132.7	CH	7.22 d (8.8)	132.6	CH	7.24 d (8.6)
15,17	115.9	CH	6.75 d (8.8)	115.9	CH	6.73 d (8.8)	115.95 ^{b)}	CH	6.73 d (8.6) ^{l)}
16	158.0	C		157.9	C		158.00 ^{a)}	C	
1'	166.5	C		166.6	C		166.5	C	
2'	120.9	C		121.6	C		120.8	C	
3',7'	133.1	CH	7.62 d (8.8)	133.4	CH	7.80 d (8.8)	133.2	CH	7.59 d (8.9)
4',6'	116.0	CH	6.62 d (8.8)	116.0	CH	6.77 d (8.8)	116.04	CH	6.58 d (8.9)
5'	163.8	C		163.8	C		163.9	C	
1''	166.5	C		166.6	C		166.5	C	
2''	120.9	C		121.6	C		130.2	C	
3'',7''	133.1	CH	7.62 d (8.8)	133.4	CH	7.80 d (8.8)	130.7	CH	7.72 dd (7.8, 1.4)
4'',6''	116.0	CH	6.62 d (8.8)	116.0	CH	6.77 d (8.8)	129.4	CH	7.26 t (7.8)
5''	163.8	C		163.8	C		134.6	CH	7.44 t (7.5)

Thelephantin Q (**2**) は褐色のアモルファスとして単離され, HRESIMS から分子式 $C_{26}H_{18}O_8$ を有することが判明した. IR からは, ヒドロキシ基 (3443 cm^{-1}) とカルボニル基 ($1721, 1660\text{ cm}^{-1}$) の存在が示唆された. CD_3OD の 1H -NMR スペクトルにおいて, δ_H 3.83 (3H, s) にメトキシ基のメチルプロトンに由来するシグナル, δ_H 6.79 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$), δ_H 6.83 (2H, d, $J = 7.7\text{ Hz}$), δ_H 6.85 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$), δ_H 7.22 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), δ_H 7.27 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), δ_H 7.88 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) に 12 個の 1,4-二置換の芳香環に由来するシグナルを観測した. これらのデータから, 3 つの *p*-hydroxybenzoate unit が存在することが示唆された. ^{13}C -NMR と DEPT スペクトルでは, δ_C 184.5 と δ_C 182.5 に 2 つのカルボニル炭素, δ_C 165.7 にエステルカルボニル炭素, δ_C 164.6, δ_C 159.9, δ_C 159.2, δ_C 156.3, δ_C 148.5 には酸素が結合していると考えられる 5 つの sp^2 炭素, δ_C 134.7 (C), δ_C 133.8 ($CH \times 2$), δ_C 133.3 ($CH \times 2$), δ_C 132.9 ($CH \times 2$), δ_C 129.3 (C), δ_C 122.1 (C), δ_C 120.9 (C), δ_C 120.1 (C), δ_C 116.5 ($CH \times 2$), δ_C 115.9 ($CH \times 2$), δ_C 115.7 ($CH \times 2$) に 17 個の芳香族炭素, および δ_C 61.8 ($-OCH_3$) にメトキシ基のメチル炭素を含む, 合計 26 の炭素シグナルが観測された (Table 7). **2** の 1H および ^{13}C -NMR スペクトルは, δ_C 184.5 および δ_C 182.5 の 2 つのカルボニル炭素と, δ_C 61.8 のメトキシ基のシグナルを除いて, thelephantin P (**1**) と類似しており, **2** は *p*-terphenyl 誘導体であることが示唆され, δ_C 184.5 と δ_C 182.5 の 2 つのカルボニル炭素は, *p*-quinone unit の存在を示唆した. さらに, **2** のスペクトルは, ベンゾイル基を除いて, thelephantin I¹⁸⁵⁾のスペクトルと非常に類似していた. したがって, **2** の構造は, **1** のベンゾイル基が *p*-hydroxybenzoate に置換された構造であると推定された. そこで, HMQC, HMBC, および 1H - 1H COSY 相関を用いて, **2** の構造の詳細な解析を行った (Fig. 14). HMQC において, δ_H 6.79 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$) と δ_C 115.9, δ_H 7.27 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) と δ_C 132.9, δ_H 7.22 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) と δ_C 133.3, δ_H 6.83 (2H, d, $J = 7.7\text{ Hz}$) と δ_C 115.7, δ_H 7.88 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) と δ_C 133.8, δ_H 6.85 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$) と δ_C 116.5 に相関が得られた (Table 7). HMBC では, δ_H 6.79 (H-2, 6) から δ_C 132.9 (C-4) および δ_C 120.9 (C-3 および 5), δ_H 7.27 (H-3, 5) から δ_C 159.9 (C-1) および δ_C 134.7 (C-7), δ_H 7.22 (H-14, 18) から δ_C 159.2 (C-16) および δ_C 122.1 (C-13), δ_H 6.83 (H-15, 17) から δ_C 159.2 (C-16) および δ_C 122.1 (C-13), δ_H 7.88 (H-3', 7') から δ_C 165.7 (C-1') および

δ_{C} 164.6 (C-5'), δ_{H} 6.85 (H-4', 6') から δ_{C} 120.1 (C-2') および δ_{C} 164.6 (C-5'), δ_{H} 3.83 から δ_{C} 156.3 (C-11)への相関が観測された. 1,4-二置換芳香族プロトン間の ^1H - ^1H COSY では, δ_{H} 6.79 (2H, d, J = 8.6 Hz) と δ_{H} 7.27 (2H, d, J = 8.9 Hz), δ_{H} 6.83 (2H, d, J = 7.7 Hz) と δ_{H} 7.22 (2H, d, J = 8.9 Hz), δ_{H} 7.88 (2H, d, J = 8.9 Hz) と δ_{H} 6.85 (2H, d, J = 8.6 Hz) の相関が得られた. 以上より, thelephantin Q (**2**)の構造は Fig. 14 のように決定した. *p*-Quinone unit は多くの場合, *p*-hydroquinone 部分の空気酸化によって形成されることが知られている.¹⁸⁶⁾ したがって, **2** においても抽出あるいは分離工程中に酸化された artifact である可能性は否定できない.

Table 7. NMR spectral data of compound **2** (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C in CD_3OD)

Thelephantin Q (2)							
Position	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	Position	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)
1	159.9	C		1'	165.7	C	
2,6	115.9	CH	6.79 d (8.8)	2'	120.1	C	
3,5	132.9	CH	7.27 d (8.8)	3',7'	133.8	CH	7.88 d (8.8)
4	120.9	C		4',6'	116.5	CH	6.85 d (8.8)
7	134.7 ^{a)}	C		5'	164.6	C	
8	148.5 ^{a)}	C		11-OCH ₃	61.8	CH ₃	3.83 s
9	182.5 ^{b)}	C					
10	129.3	C					
11	156.3	C					
12	184.5 ^{b)}	C					
13	122.1	C					
14,18	133.3	CH	7.22 d (8.3)				
15,17	115.7	CH	6.83 d (8.3)				
16	159.2	C					

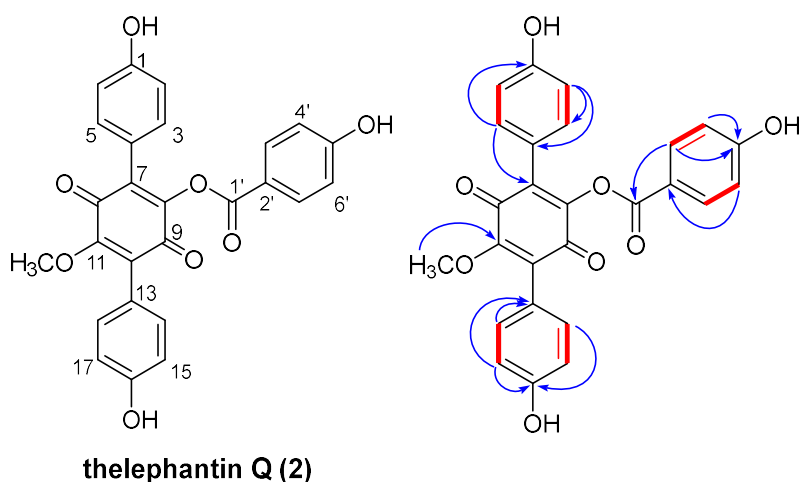


Figure 14. Structure of compound **2** and 2D NMR correlations. HMBC (blue arrows), ^1H - ^1H COSY (red bonds).

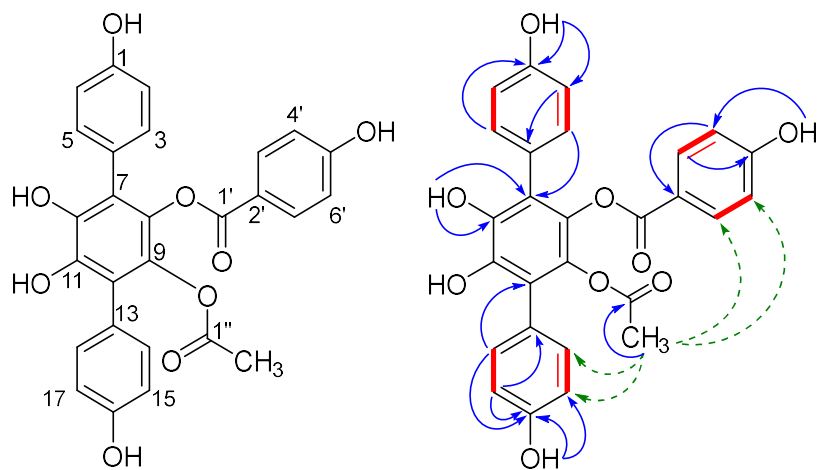
Thelephantin R (**3**) は無色のアモルファスとして単離され, neg. HRESIMS から分子式 $C_{27}H_{20}O_9$ であることがわかった. IR 吸収からヒドロキシ基 (3191 cm^{-1}) とカルボニル基 ($1733, 1716\text{ cm}^{-1}$) の存在が示唆された. これまでの化合物と同様に, **3** も ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルから *p*-terphenyl 化合物であることが示唆された. DMSO- d_6 中の ^1H -NMR スペクトルは, δ_{H} 1.66 (3H, s, 2'-CH₃) にメチルプロトンに由来するシグナルが観測され, δ_{H} 6.65 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), δ_{H} 6.75 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$), δ_{H} 6.78 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), δ_{H} 7.04 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), δ_{H} 7.08 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$), δ_{H} 7.66 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) に 12 個の 1,4-二置換の芳香族プロトンに由来するシグナルを, δ_{H} 8.37 (2H, s), δ_{H} 9.32 (1H, s), δ_{H} 9.45 (1H, s), および δ_{H} 10.40 (1H, s) に 4 つのヒドロキシル基由来のシグナルが観測された. ^{13}C -NMR, DEPT 135, DEPT 90 スペクトルから, δ_{C} 168.3 と δ_{C} 163.7 に 2 つのカルボニル炭素, δ_{C} 162.5, δ_{C} 156.6, δ_{C} 156.4, δ_{C} 141.4, δ_{C} 141.3, δ_{C} 133.3, δ_{C} 133.2 に酸素が結合していると考えられる 7 つの炭素, δ_{C} 131.8 (CH $\times 2$), δ_{C} 131.1 (CH $\times 2$), δ_{C} 131.0 (CH $\times 2$), δ_{C} 123.22 (C), δ_{C} 123.18 (C), δ_{C} 122.8 (C), δ_{C} 122.5 (C), δ_{C} 118.9 (C), δ_{C} 115.5 (CH $\times 2$), δ_{C} 114.8 (CH $\times 2$) および δ_{C} 114.7 (CH $\times 2$) に 17 個の sp^2 炭素ならびに δ_{C} 19.8 にメチル基に由来すると考えられるシグナルを含む合計 27 個の炭素が観測された (Table 8). 以上を示したように, **3** の ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルデータは, terrestrin D (**5**)¹⁸⁷⁾ および concrescenin A¹⁸⁸⁾ と類似していた. Terrestrin D は phenylacetoxoy unit を有するが, **3** は分子量と ^1H および ^{13}C -NMR データから *p*-hydroxybenzoate unit を有すると推察された. そこで, HMQC, HMBC, ^1H - ^1H COSY, および差 NOE を測定し, **3** の構造の詳細な解析を行った. HMQC では, δ_{H} 6.65 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) と δ_{C} 114.7, δ_{H} 7.08 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$) と δ_{C} 131.1, δ_{H} 7.04 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$) と δ_{C} 131.0, δ_{H} 6.75 (2H, d, $J = 8.6\text{ Hz}$) と δ_{C} 114.8 に相関が得られた. ^1H - ^1H COSY では, δ_{H} 6.65 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-2, 6 or H-15, 17) と δ_{H} 7.08 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-3, 5 or H-14, 18) の間に, δ_{H} 6.75 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-15, 17 or H-2, 6) と δ_{H} 7.04 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-14, 18 or H-3, 5) の間に, δ_{H} 6.78 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-4', 6') と δ_{H} 7.66 (2H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$, H-3', 7') の間にそれぞれ 1,4-二置換芳香族プロトン間の相関が得られた. HMBC では δ_{H} 6.65 から δ_{C} 123.18, δ_{H} 6.75 から δ_{C} 123.22 と δ_{C} 156.6, δ_{H} 7.04 から δ_{C} 122.5 と δ_{C} 156.6, δ_{H} 7.08 から δ_{C} 122.8 および δ_{C}

156.4 への相関が観測され, δ_{H} 9.32 (1H, s, -OH) から δ_{C} 114.7 および δ_{C} 156.4, δ_{H} 9.45 (1H, s, -OH) から δ_{C} 114.8 と δ_{C} 156.6 への HMBC 相関も観測された. **3** の分子式も考慮し, 4 つの 4 級炭素 (δ_{C} 133.2, δ_{C} 133.3, δ_{C} 141.3 および δ_{C} 141.4) が δ_{C} 122.8 (C-7) および δ_{C} 122.5 (C-10) とともに六置換芳香環を形成していることが示唆され, これらのシグナルは *p*-terphenyl 骨格のものであることが示唆された. また, δ_{H} 6.78 から δ_{C} 118.9, δ_{H} 7.66 から δ_{C} 162.5, δ_{H} 10.40 (1H, s, -OH) から δ_{C} 115.5 および δ_{C} 163.7 のカルボニル炭素への HMBC 相関から, *p*-hydroxybenzoate unit の構造が, δ_{H} 1.66 (3H, s) から δ_{C} 168.3 への HMBC 相関から acethyl unit の存在が示唆された. *p*-Hydroxybenzoate unit と acethyl unit の位置は, 差 NOE 相関が δ_{H} 1.66 (2'-CH₃) と δ_{H} 6.75 (H-15, 17 or H-2, 6), δ_{H} 6.78 (H-4', 6'), δ_{H} 7.04 (H-14, 18 or H-3, 5) および δ_{H} 7.66 (H-3', 7') に観測されたことから決定した. さらに, C-8 と C-9 (δ_{C} 133.2 と δ_{C} 133.3) および C-11 と C-12 (δ_{C} 141.3 と δ_{C} 141.4) の化学シフト値が **1** と同じ値であったこと, δ_{H} 8.37 (2H, s, -OH) のヒドロキシプロトンから, δ_{C} 141.3, δ_{C} 141.4, δ_{C} 122.5, および δ_{C} 122.8 へ HMBC 相関が観測されたことから, **3** の構造は Fig. 15 に示したように決定した.

Table 8. NMR spectral data of compound **3** (500 MHz for ¹H, 125 MHz for ¹³C in DMSO-*d*₆)

Thelephantin Q (2)							
Position	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)	Position	δ_{C}	type	δ_{H} (J in Hz)
1	156.4 ^{a)}	C		1'	163.7	C	
2,6	114.7 ^{b)}	CH	6.65 d (8.8) ^{b)}	2'	118.9	C	
3,5	131.1 ^{c)}	CH	7.08 d (8.8) ^{b)}	3',7'	131.8	CH	7.66 d (8.9)
4	123.18 ^{d)}	C		4',6'	115.5	CH	6.78 d (8.9)
7	122.8 ^{e)}	C		5'	162.5	C	
8	133.2 ^{f)}	C		1''	168.3	C	
9	133.3 ^{f)}	C		2''	19.8	CH ₃	1.66 s
10	122.5 ^{e)}	C		1-OH			9.32 s
11	141.3 ^{g)}	C		11, 12-OH			8.37 2H, s
12	141.4 ^{g)}	C		16-OH			9.45 s
13	123.22 ^{d)}	C		5'-OH			10.40 s
14,18	131.0 ^{c)}	CH	7.04 d (8.8) ^{b)}				
15,17	114.8 ^{b)}	CH	6.75 d (8.8) ^{b)}				
16	156.6 ^{a)}	C					

a)-i): Assignments may be interchanged.



thelephantin R (3)

Figure 15. Structure of compound **3** and 2D NMR correlations. HMBC (blue arrows), ^1H - ^1H COSY (red bonds), and difference NOE (green dashed arrows).

化合物 **4**, **5**, **6** および **7** は, 先行研究との比較により, thelephantin A (**4**),¹⁷⁷⁾ terrestrin D (**5**),¹⁸⁷⁾ thelephorin A (**4**),¹⁸⁹⁾ 4-hydroxybenzoic acid (**7**)¹⁹⁰⁾ と同定した. (Fig. 16, 17, Table 9, 10)

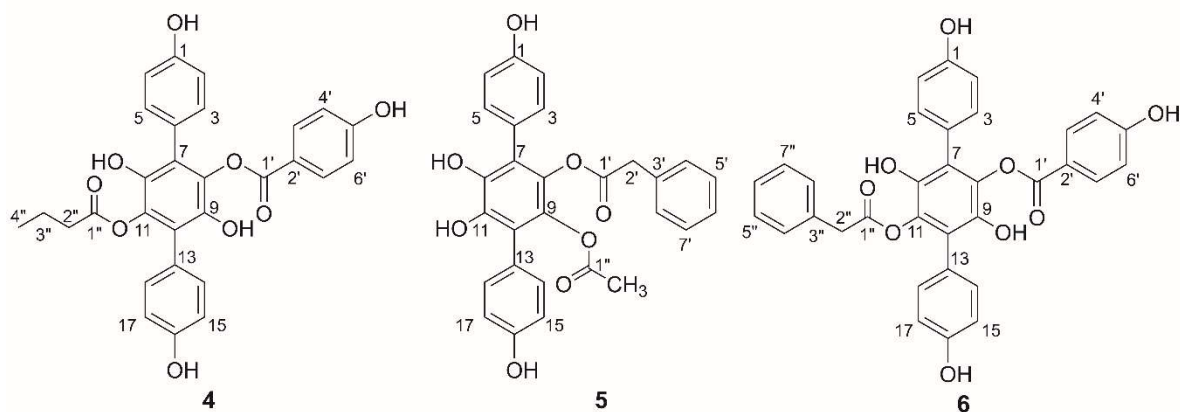


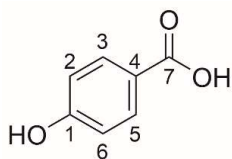
Figure 16. Structure of Compounds **4–6**.

Table 9. NMR spectral data of compounds **4** and **6** (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C in CD_3OD), and **5** (400 MHz for ^1H , 100 MHz for ^{13}C in CD_3OD).

Thelephantin A (4)				Terrestrin D (5)			Thelephorin A (6)		
Position	δ_{C}	type	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	type	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)
1	157.8	C		158.1	C		157.8	C	
2,6	116.3	CH	6.71 d (8.8)	116.0	CH	6.81 d (8.7)	116.3	CH	6.72 d (8.6)
3,5	132.6	CH	7.23 d (8.8)	132.6	CH	7.13 d (8.7)	132.6	CH	7.21 d (8.6)
4	125.0	C		124.9	C		124.9	C	
7	124.1	C		123.8	C		124.0	C	
8	135.0	C		134.8	C		134.9	C	
9	142.3	C		134.8	C		142.4	C	
10	123.9	C		123.8	C		123.8	C	
11	135.0	C		142.6	C		135.0	C	
12	142.3	C		142.6	C		142.5	C	
13	125.0	C		125.0	C		124.9	C	
14,18	132.6	CH	7.17 d (8.6)	132.6	CH	7.14 d (8.8)	132.6	CH	7.16 d (8.6)
15,17	116.0	CH	6.80 d (8.6)	116.1	CH	6.81 d (8.8)	116.1	CH	6.81 d (8.6)
16	158.1	C		158.2	C		158.1	C	
1'	166.2	C		170.6	C		166.2	C	
2'	120.9	C		20.0	CH_3	1.62 s	120.9	C	
3',7'	115.9	CH	6.74 d (8.6)				133.3	CH	7.70 d (8.6)
4',6'	133.3	CH	7.73 d (8.6)				115.9	CH	6.77 d (8.6)
5'	164.1	C					164.0	C	
1'''	173.3	C		171.2	C		171.4	C	
2'''	36.3	CH_2	1.97 t (7.1)	41.5	CH_2	3.34 s	41.2	CH_2	3.30 s
3'''	19.0	CH_2	1.28 dd (7.1, 7.5)	134.7	C		134.3	C	
4'''	13.6	CH_3	0.55 t (7.5)	130.4	CH	7.08 dd (8.1, 1.5)	130.1	CH	6.79 m
5'',7''				129.6	CH	7.22-7.26 m	129.3	CH	7.00 t (8.7)
6''				128.2	CH	7.22-7.26 m	127.9	CH	7.02 t (8.7)
8''				130.4	CH	7.08 dd (8.1, 1.5)	130.1	CH	6.79 m

Table 10. NMR spectral data of compound **7** (500 MHz for ^1H , 125 MHz for ^{13}C in CD_3OD)

4-hydroxybenzoic acid (7)			
Position	δ_{C}	type	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)
1	121.9	C	
2,6	131.5	CH	7.77 d (6.9)
3,5	115.1	CH	6.80 d (6.9)
4	161.5	C	
7	167.4	C	



7

Figure 17. Structure of compound **7**

第4節 単離化合物の抗アミロイドカスケード活性評価

第1節で述べたように *Thelephora aurantiotincta* MeOH ext. は BACE1 阻害活性と A β 凝集阻害活性を示しており、いくつかの *p*-terphenyl 化合物は BACE1 阻害活性と A β 凝集阻害活性を示すことが報告されていることから,¹⁹¹⁾ 単離した化合物についてもこれらの活性を評価することとした。しかしながら,**3**はその収量が活性評価に必要な量を下回っていたため、化合物 **1,2** および **4-7** の6化合物について検討した。

BACE1 阻害活性は、スクリーニングと同様にポジティブコントロールとして β -secretase inhibitor IV を用い、BACE1 FRET assay により評価した。その結果、特に化合物 **1** ($IC_{50} = 6.3 \mu M$) と **4** ($IC_{50} = 17.0 \mu M$) は BACE1 に対して、ポジティブコントロールの myricetin より若干弱いながらも、阻害活性を示した (Fig. 18)。その他の化合物の IC_{50} 値は Table 11 にまとめた。

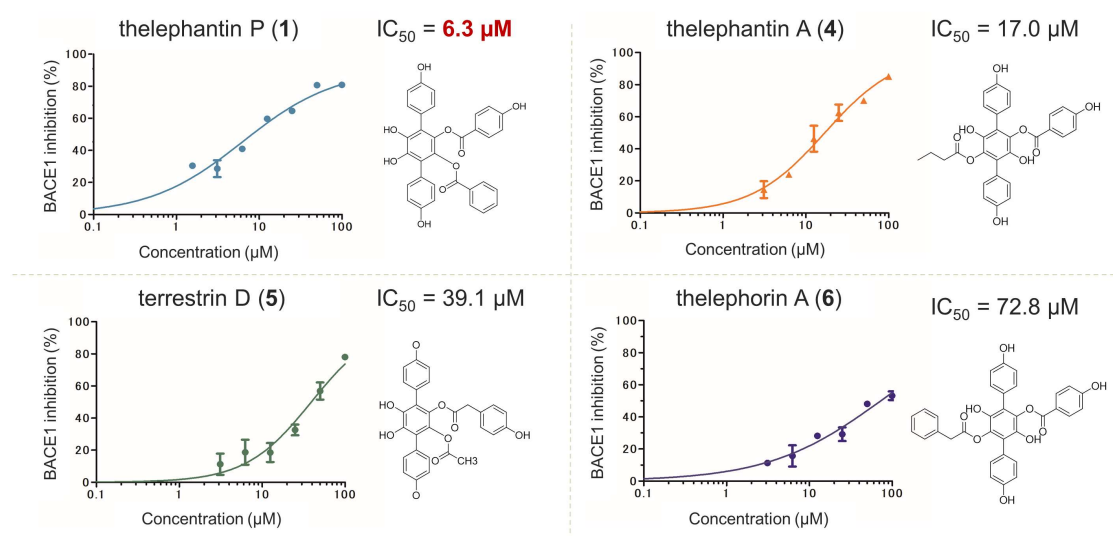


Figure 18. BACE1 inhibition rate of active compounds. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. (n = 3)

A β 凝集阻害活性は、スクリーニングと同様に Th-T 法により A β の凝集を検出することで評価した。*p*-Terphenyl 化合物は 1–100 μM の範囲で濃度依存的な活性を示し、特に **1** ($IC_{50} = 12.9 \mu M$) と **5** ($IC_{50} = 4.4 \mu M$) はポジティブコントロールである myricetin ($IC_{50} = 9.9 \mu M$)¹⁹²⁾ に匹敵する活性を示した (Fig. 19)。他の化合物の活性については Table 11 に示した。

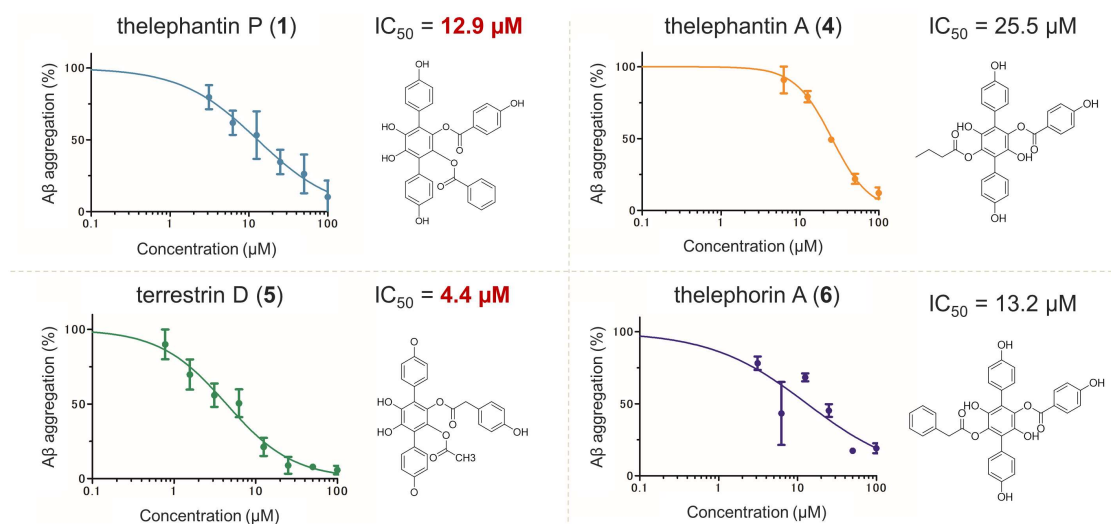


Figure 19. A β aggregation rate of active compounds. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. (n = 3)

ここまでの検討で、今回単離した *p*-terphenyl 化合物のほとんどは、BACE1 阻害活性と A β 凝集抑制活性の両方を持つことが示されたが、各化合物の特徴をさらに理解するため、神経細胞に対する影響を検討することとした。BACE1 によって生成された A β は細胞毒性によって神経変性を引き起こすことが報告されている。^{30,193)} また、A β は発症前から蓄積することが報告されており、¹⁹⁴⁾ 蓄積した A β による神経毒性は、すでに AD の症状を呈している患者に対する治療薬の開発において、考慮すべき治療標的のひとつである。そこで、本研究で単離した化合物の A β_{42} 細胞毒性に対する神経細胞死抑制効果を、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて評価した。¹⁹⁵⁾ 神経細胞死抑制効果を評価する前に、各化合物が持つ潜在的な細胞毒性を SH-SY5Y 細胞を用いて検討し、いずれの化合物においても暴露前と比較して化合物暴露後に 80%以上の細胞数が観察された濃度を上限として神経保護作用を評価した。その結果、化合物 **1**, **2**, **5** は、無添加のものに比べ、A β_{42} 暴露後の SH-SY5Y 細胞の生存率を 50%以上改善することがわかった (Fig. 20)。各化合物の 50%効果濃度 (half maximal (50%) effectiveconcentration; EC₅₀)を比較したところ、化合物 **1** はすべての化合物の中で最も低い濃度 (EC₅₀ = 8.0 μ M) で神経細胞死作用を示した (Table 11)。

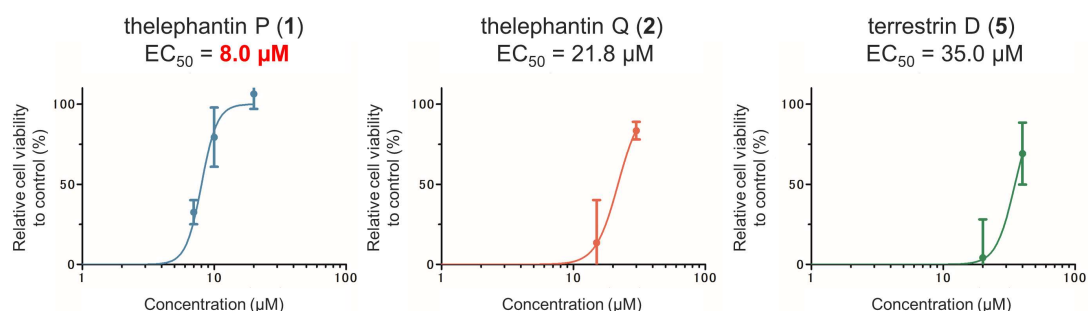


Figure 20. Relative cell viability of active compound relative to control. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation. (n = 3)

また, A β 凝集阻害活性評価において, ポジティブコントロールとして用いていた myricetin の神経保護作用も試験したが, 25 μ M までは A β ₄₂ に対する SH-SY5Y 細胞の保護効果を示さなかった. さらに, 25 μ M 以上の高濃度では myricetin 自体が示す 450 nm 付近の吸光が問題となり, 活性を正確に評価することができなかった. そこで, 抗アミロイドカスケード活性を比較するためのポジティブコントロールとして aurasperone F を用いた.^{196,197)} Aurasperone F は海洋真菌 *Aspergillus* sp. MPUC239 から単離され, SH-SY5Y 細胞において A β 凝集および BACE1 阻害活性、ならびに A β 毒性に対する保護作用を示した化合物である.

本研究では, *Thelephora aurantiotincta* から単離した 6 種類の化合物に, A β ₄₀ 凝集阻害活性, BACE1 阻害活性, A β ₄₂ 誘発神経毒性に対する神経細胞死抑制活性を見出した. アミロイドカスケード仮説に基づいて AD を治療する場合, これらの活性は脳実質で効果を発揮する必要がある. しかし, 血流から脳実質に到達するためには, BBB を通過しなければならない. そこで, 単離化合物の BBB 透過性を予測するために, 水/オクタノール分配係数 (LogP) を, XlogP を用いて計算した. その結果, **1, 2, 4-6** の XLogP 値は 4.0-6.5 と予想された (Table 11).

Table 11. A β and BACE1 inhibitory activity (IC₅₀ μ M), neuroprotection (EC₅₀ μ M) and XLogP values of compounds **1**, **2**, **4-7**, myricetin, inhibitor IV and aurasperone F.

	A β aggregation	BACE1	Neuroprotecti on	XLogP
Thelephantin P (1)	12.9	6.3	8.0	6.2
Thelephantin Q (2)	30.2	>100	21.8	4.0
Thelephantin A (4)	25.5	17.0	>30	5.4
Terrestrin D (5)	4.4	39.1	35.0	4.9
Thelephorin A (6)	13.2	72.8	>30	6.2
4-hydroxybenzoic acid (7)	>100	>100	>60	1.6
Myricetin	9.9 ¹⁹²⁾	2.8 ¹⁹⁸⁾	>25 ¹⁹⁵⁾	1.2
Inhibitor IV	>100 ¹⁹²⁾	0.015 ¹⁹²⁾	-	-
Aurasperone F	8.1 ¹⁹⁶⁾	28.0 ¹⁹⁶⁾	37.3 ¹⁹⁷⁾	5.1

第5節 結果の考察

本章の研究では、ボタンイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) MeOH 抽出エキスより、3 種の新規 *p*-terphenyl 化合物および 4 種の既知化合物を単離、同定した。さらに、これらの化合物のうち、thelephantin P (**1**) は A β 凝集抑制、BACE1 阻害活性、A β ₄₂ による神経細胞死抑制作用のすべての活性を細胞毒性濃度以下で示した。

本研究で注目した抗アミロイドカスケード活性をすべて示したのは **1** および **5** のみであった。この 2 つの化合物は、*p*-terphenyl 構造の中央のベンゼン環おけるヒドロキシ基が、他の化合物とは異なり、*o*-位に存在していた。したがって、抗アミロイドカスケード活性を示すには、このカテコール構造が重要である可能性が考えられる。また、神経細胞死抑制活性試験では A β と同時に化合物を暴露させたことから、化合物が示した細胞死抑制効果は、A β の凝集抑制による毒性 A β 凝集体の生成阻害の寄与が大きいものと考えられる。しかしながら **1** と **5** では、A β 凝集抑制作用と神経細胞死抑制作用の結果が逆転していた。**1** と **5** は *p*-terphenyl 構造の中央のベンゼン環に結合する置換基の構造のみが相違していることから、置換基による A β 凝集抑制以外の作用が存在する可能性が示唆された。今後、A β と化合物の暴露タイミングをずらした神経細胞死抑制活性試験を検討することにより、**1** と **5** の活性の違いを作用機序の面から考察できると考えられる。また、本研究では活性評価ができなかった **3** や、既知の *p*-terphenyl 化合物を用いた構造活性相関を検討することで、より興味深い結果が得られるであろう。

p-Terphenyl 化合物の BBB 透過性に関する報告はまだないが、いくつかの天然ポリフェノールやその代謝物が BBB を透過することが報告されている。¹⁹⁹⁾ 厚朴の基原植物であるシナホウノキ (*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.) の樹皮に含まれる honokiol は、BBB を通過して不安障害や神経障害に効果があることが知られており、²⁰⁰⁾ その LogP は 5.0 である。天然の stilbene である pterostilbene は、高い生物学的利用能と神経保護作用を含む様々な生理活性を有することが報告されており、その LogP は 3.8 で BBB を透過することができる。²⁰¹⁾ さらに、多くのフェノール性水酸基を持つフラボノイドの中には、hesperetin (LogP: 2.4),²⁰²⁾ genistein (LogP: 2.7),²⁰³⁾ fisetin (LogP: 2.0),²⁰⁴⁾ 4'-demethylnobiletin (LogP : 2.7)²⁰⁵⁾ など、BBB を透過するもの

があることが報告されている (Fig. 21).²⁰⁶⁾ LogP が近い honokiol や、水酸基を多くもつフラボノイドが BBB を通過していることから、化合物 **1, 2** および **4-6** は、血流から BBB を通過して脳へ輸送される可能性がある。したがって、化合物 **1, 2** および **4-6** は、前例のない多活性型の AD 治療薬候補となる可能性が示唆された。

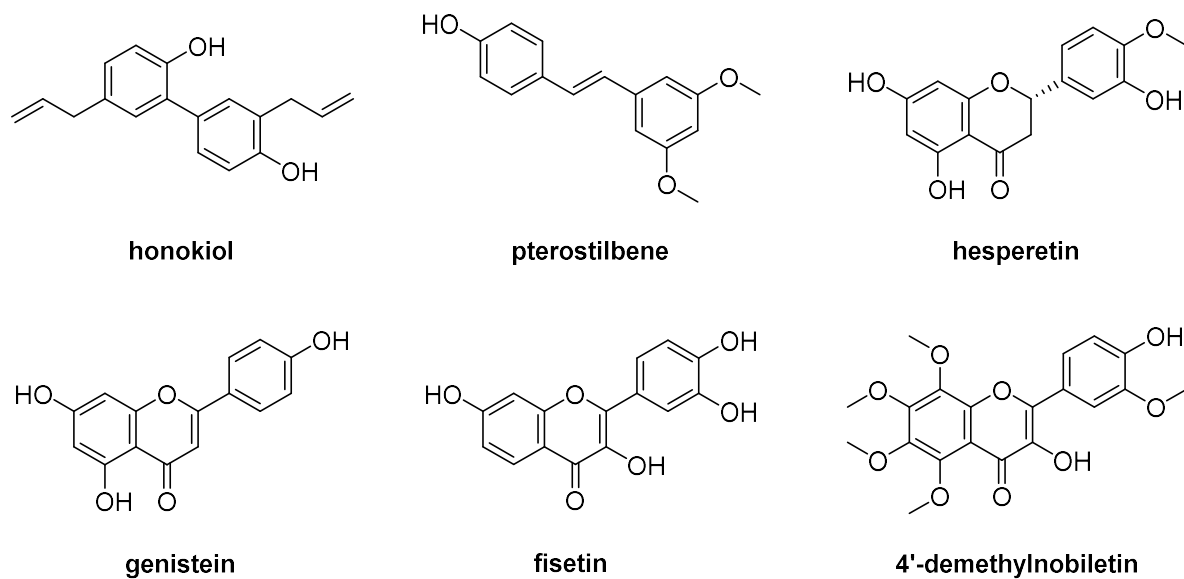


Figure 21. Phenolic hydroxyl compounds, which pass through BBB.

第3章 認知機能低下を誘導する血管内皮細胞由来因子の探索

第1節 アルツハイマー病進行に伴い発現増加する因子の探索

序論で述べたとおり,AD ではシナプス数の減少が観察されるが,そのメカニズムの全容は明らかでない.本章では,血管-神経間相互作用に着目し,AD病態時の血管内皮細胞で発現変動する液性因子の探索,および,そのシナプス変性作用について解析した.これまでに様々なADモデルマウスが開発されているが,²⁰⁷⁾本研究では *App*^{NL-G-F} マウスを用いた.*App*^{NL-G-F} マウスは,*App* 遺伝子が,Swedish 変異²⁰⁸⁾ (KM670/671NL), Arctic 変異²⁰⁹⁾ (E693G), Iberian 変異²¹⁰⁾ (I716F) の3種類の家族性AD変異型のヒトAPP配列に改変されたマウスであり,APPを過剰に発現することなく,高い比率で毒性Aβ種(Aβ₄₂)を産生する.アミロイド斑の形成は若齢(3ヶ月齢)から始まり,その後加齢とともに増加する.6ヶ月齢頃から認知機能低下などの神経症状が現れることが確認されている.²¹¹⁾

まず,AD病態時に血管内皮細胞で発現上昇する液性因子を探索するため,3ヶ月齢と6ヶ月齢の*App*^{NL-G-F}マウスから大腦を回収し,Magnetic cell sorting (MACS)によりCD31陽性細胞を単離したのち,RNA-seqを用いて脳血管内皮細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した.3ヶ月齢と比較して,6ヶ月齢では発現が増加する遺伝子が324種,発現が低下する遺伝子が9種抽出された(Fig. 22A).発現変動遺伝子についてGene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行った結果,6ヶ月齢マウスの血管内皮細胞では,炎症および神経炎症に関連する遺伝子セットに含まれる遺伝子が上方制御されていることが明らかになった(Fig. 22 B, C).

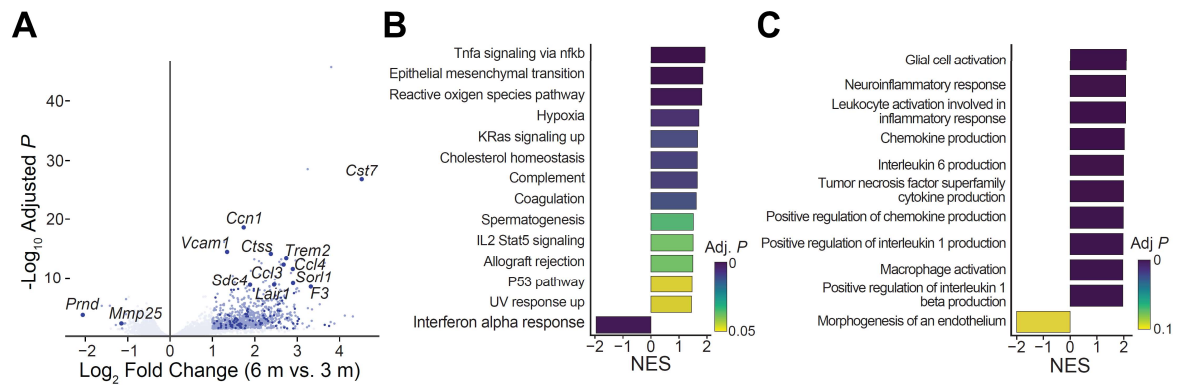


Figure 22. Gene profiles of genes with altered expression in cerebral vascular endothelial cells from 6-month-old App^{NL-G-F} mice compared to those from 3-month-old mice. (A) Volcano plot showing RNA-seq results. (B, C) Results of GSEA using DEGs in A. (B) Bar graphs showing the normalized enrichment score (NES) of the bias of DEGs in each gene set in (B) inflammation-related gene set and (C) neuroinflammation-related gene set.

次に、発現変動する分子のうち、液性因子をコードするものは遠位の細胞に作用しやすいと考え、変動遺伝子の性質を調査した。調査した中で、本研究では、6ヶ月齢で約 1.68 倍の発現増加が認められ、液性分子である Cellular Communication Network factor 1 (CCN1) に着目した。免疫組織化学染色により、 App^{NL-G-F} マウス脳の $CD31^{+}$ 血管内皮細胞における CCN1 の発現を確認したところ (Fig. 23A), 6ヶ月齢における発現量は 3ヶ月齢よりも高いことが示された (Fig. 23B)。一方、血管の形態については、両群間に有意な差は認められなかった (Fig. 23C)。

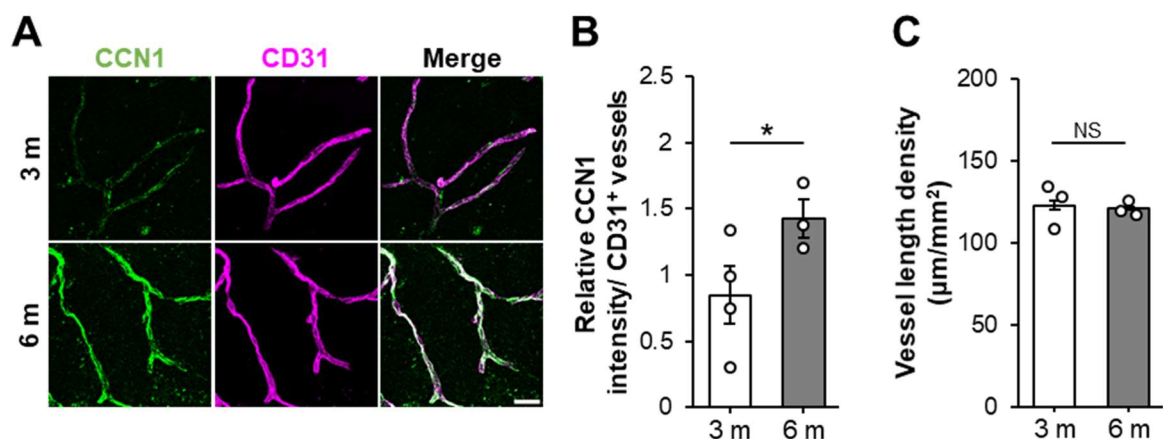


Figure 23. In vascular endothelial cells, CCN1 expression increases with progression of AD. (A) Stained images of CCN1 (green) and CD31 (magenta, cerebral vascular endothelial cells) in the hippocampus of 3-month-old (3m) and 6-month-old (6m) App^{NL-G-F} mice. Scale bar indicates 20 μm . (B, C) Bluff quantifying (B) relative fluorescence intensity of CCN1 and (C) length per unit area (μm) (4 at n = 3 m, 3 at 6 m) of CD31 positive endothelial cells in hippocampus. Data are presented as mean $\pm$ standard error. Student's t-test was conducted and * $p < 0.05$ is considered as significant difference. NS is not significant.

第2節 Cellular Communication Network factor 1 (CCN1)

CCN ファミリーは脊椎動物にのみ存在し, **cysteine** に富んだ細胞機能を制御するタンパク質の6つのメンバーからなる. CCN1 は, 最初期遺伝子の産物であり, 生物種間における高度な配列相同性と保存された4つのドメインを持つ40 kDa の分泌タンパク質である.²¹²⁾ その構造は, N 末端のシグナルペプチドに続いて, 4つの保存された構造ドメインから構成されている (Fig. 24). 分泌された CCN1 は細胞膜や細胞外マトリックス (Extracellular matrix , ECM) に結合し, 様々な細胞表面の **integrin** 受容体と相互作用することにより, 細胞接着, 遊走, 増殖, 生存, アポトーシス, 細胞分化・老化, 腫瘍浸潤などの多様な細胞機能を引き起こす.²¹²⁾ CCN1 は胚発生に必須であるが,²¹³⁾ 成体でも発現しており, 脳においては血管内皮細胞に発現がみられる.²¹⁴⁾ CCN1 の発現は加齢とともに増加することが知られているが,²¹⁵⁾ 加齢に伴う神経疾患に対する CCN1 の役割は明らかではない. そこで, 以降は CCN1 のシナプスに対する作用, および AD モデルマウスにおける機能を解析した。

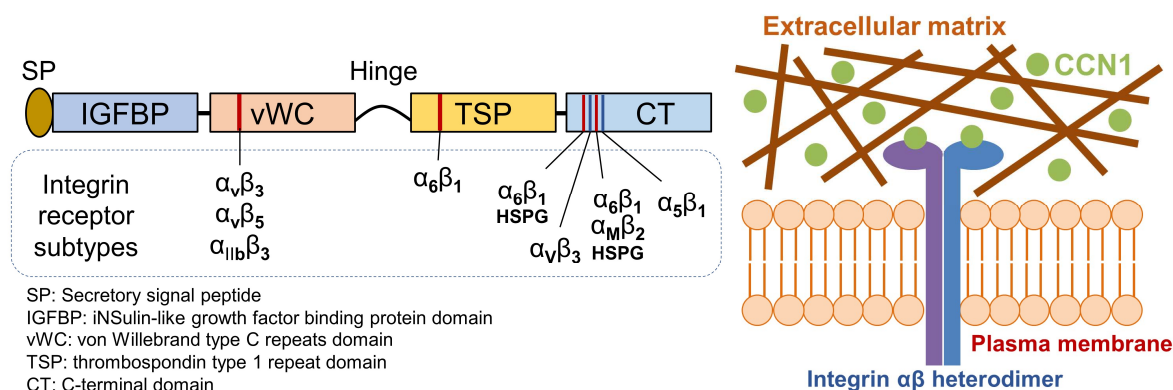


Figure 24. CCN1 structure (left, modified from Chen et al., *Int. J Biochem. Cell. Biol.*, 2009) and localization (right, modified from Alyloo et al., *Nueron*, 2022).

第3節 CCN1による初代海馬神経細胞の樹状突起スパイン密度の減少作用

次に, CCN1 の発現増加が神経細胞に影響を与えるか検討した. 胎生 17 日齢の野生型マウス (Wild type, WT) から, 海馬神経細胞の初代培養を行った. 14 日間培養して, シナプスを形成させた後, 培養液に CCN1 を添加した. 24 時間後に固定して免疫細胞化学染色を行った. 神経線維の微小管マーカである microtubule-associated protein 2 (MAP2) 陽性樹状突起上に見られる, シナプス前膜マーカー (Vesicular glutamate transporter1, VGULT1) とシナプス後膜マーカー (Postsynaptic density protein 95, PSD95) の共局在を興奮性シナプス数として評価した. CCN1 添加により VGULT1 と PSD95 が共標識された輝点の数が減少する様子が観察され (Fig. 25A, B), CCN1 がシナプス数を減少させる作用を持つことが示唆された. 一方, MAP 陽性細胞数には差は見られず (Fig. 25A, C), 神経細胞の生存には影響しない可能性が考えられた.

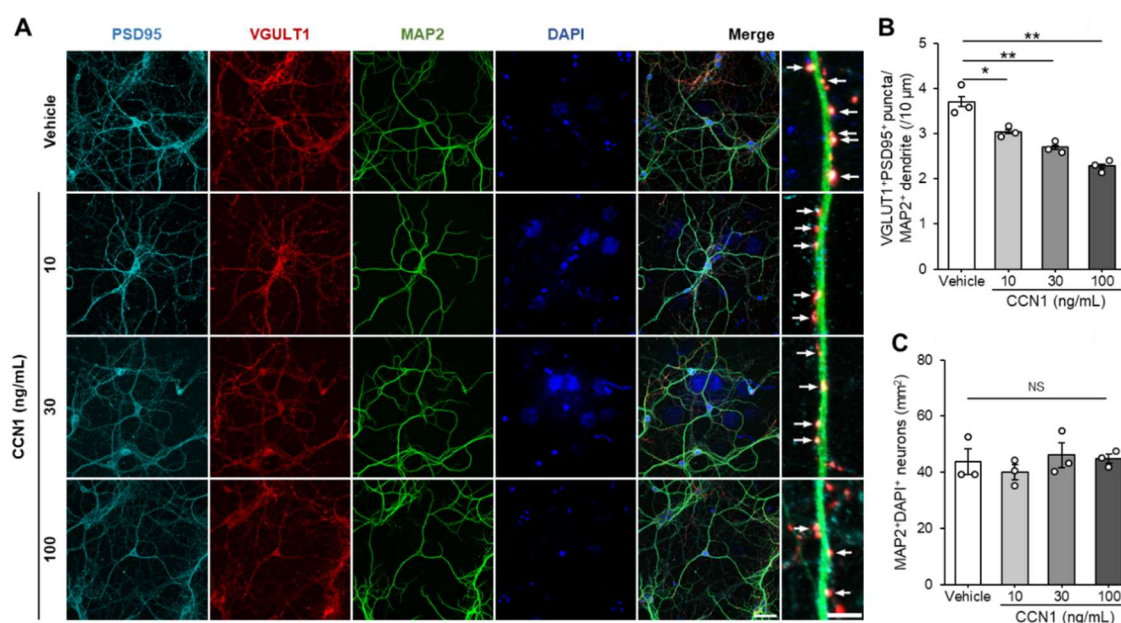


Figure 25. CCN1 reduced spine density in cultured hippocampal neurons.

(A) Representative images showing PSD95 (cyan), VGULT1 (red), MAP2 (green), and DAPI (blue) staining of cultured hippocampal neurons. Cells were treated with CCN1 for 24 hours. Arrows indicate PSD95 and VGULT1 co-labeled punctures on MAP2-positive neurites. Scale bars indicate 50 μ m for low magnification and 5 μ m for high magnification. (B) Quantification of the number of PSD95 and VGULT1 positive punctures on MAP2 positive neurites ($n = 3$ for each). (C) Quantification of the number of MAP2-positive and DAPI-positive cells ($n = 3$ each). Data represent means $\pm$ standard error. Analysis of variance by Tukey's post hoc test is performed. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ are considered as significant differences. NS is not significant.

続いて, CCN1 が培養海馬神経細胞のシナプスを減少させる機序を考察するため, CCN1 の暴露による遺伝子発現変化を網羅的に解析した. RNA-seq を実施した結果, CCN1 暴露により有意に変動する遺伝子が検出された (Fig. 26A). 変動遺伝子について Gene ontology 解析を行った結果 (Fig. 26B, C), 発現が上方制御された遺伝子にはリボソーム生合成に関与する遺伝子群 (GO: 0042254) が豊富に含まれていた (Fig. 26B). この経路はシナプス維持などの局所的タンパク質合成に関連する.²¹⁶⁾

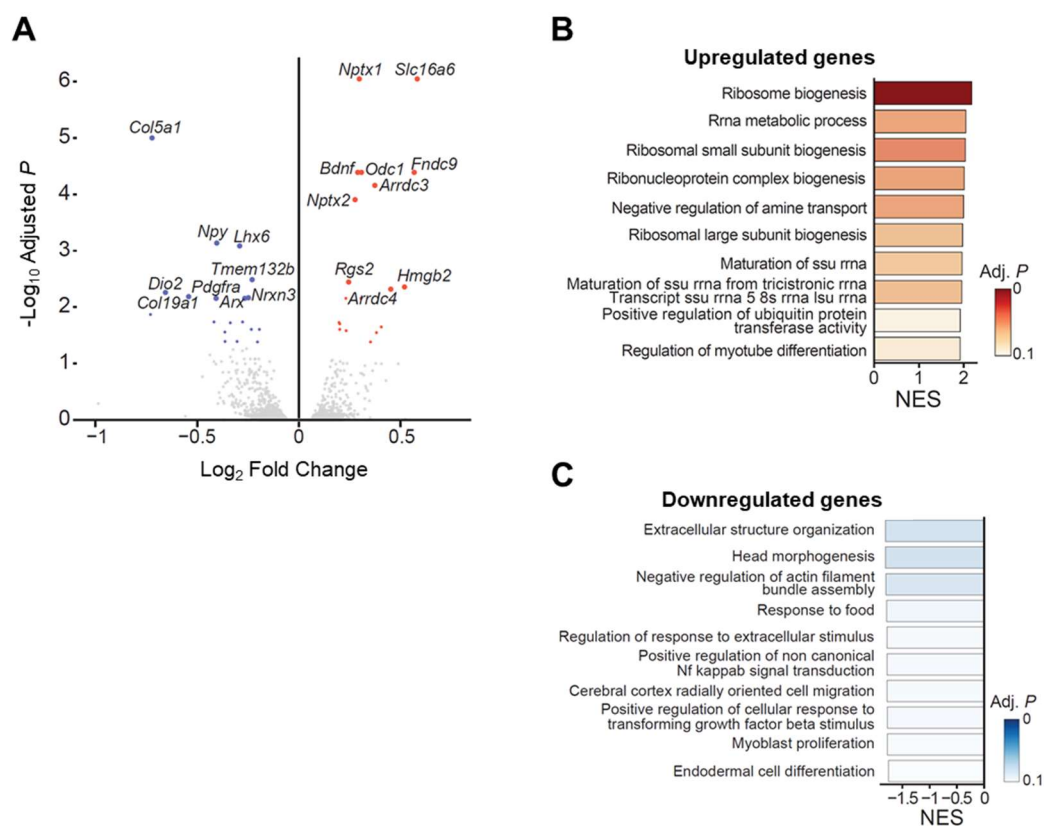


Figure 26. Gene expression changes in cultured hippocampal neurons exposed to CCN1. (A) Volcano plot showing gene expression changes in cultured hippocampal neurons exposed to CCN1 (n = 3). Red dots indicate upward regulated genes and blue dots indicate downward regulated genes. (B, C) Bar graphs showing the results of Gene ontology analysis of genes whose expression changes are up- (B) or down- (C) regulated.

第4節 ADモデルマウスにおけるCCN1発現抑制によるスパイン密度への影響

続いて,ADモデルマウスにおける血管内皮由来のCCN1の役割を調べるため,アデノ随伴ウイルス (Adeno-Associated Virus, AAV) ベクターを使用したCCN1の発現抑制を実施した. 具体的には, 中枢神経系の血管内皮細胞に指向性がある血清型であるAAV-BR1に,²¹⁷⁾ 血管内皮細胞特異的なCD144プロモーター下で, 蛍光タンパク質GFPと, CCN1を標的とするmicro-RNA (miRNA) を発現する配列を組み込み, 脳血管内皮細胞特異的にCCN1を発現抑制するウイルス (AAV-BR1-*miCcn1*) を作成した (Fig. 27A). 6ヶ月齢のApp^{NL-G-F}マウスにAAV-BR1-*miCcn1* またはコントロールAAV (AAV-BR1-*miCtrl*) を静脈注射により全身投与し, 3週間後に大脳からCD31陽性血管内皮細胞をMagnetic cell separation (MACS) により単離し, *Ccn1* のmRNAの発現量を, 定量ポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR)で確認した. その結果, AAV-BR1-*miCcn1* 投与マウスではmRNAレベルでも*Ccn1*の発現が抑制された (Fig. 27B). さらに, 免疫組織化学染色を用いてCCN1発現量の変化を比較したところ, AAV-BR1-*miCcn1* 投与群の脳CD31陽性血管内皮細胞におけるCCN1の発現は, コントロール投与群と比較して低下した (Fig. 27C, D). 一方, 群間におけるCD31陽性血管の長さには有意な差は検出されなかった (Fig. 27E). このことから, CCNは脳血管内皮細胞の形態には影響しないことが示唆された.

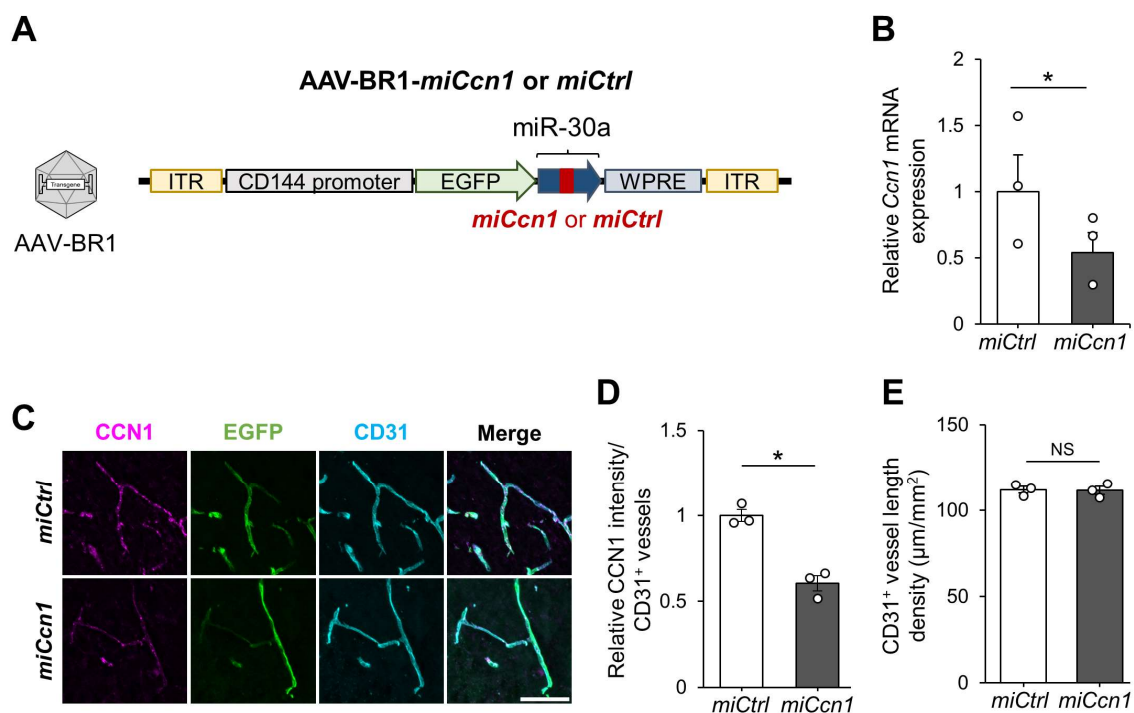


Figure 27. Suppression of CCN1 expression in cerebral vascular endothelial cells by adeno-associated virus.

(A) Schematic diagram of AAV-BR1-miCcn1 or AAV-BR1-miCtrl. (B) Graph quantifying the relative expression of Ccn1 mRNA in CD31-positive cells isolated from APPNL-G-F mice treated with AAV-BR1-miCcn1 or -miCtrl ($n = 3$). (C) Stained images of CCN1 (magenta), EGFP (green) and CD31 (cyan) in the hippocampus of APPNL-G-F mice treated with AAV-BR1-miCcn1 or -miCtrl. Scale bar indicates 20 μ m. (D) Graph of quantified CCN1 relative fluorescence intensity (miCtrl = 1) on CD31-positive vascular endothelial cells ($n = 3$). (E) Graph of quantified length of CD31-positive vessels ($n = 3$). Data are shown as mean $\pm$ standard error. Student's t-test was performed and * $p < 0.05$ is considered as significant difference, NS is not significant.

続いて、CCN1 が樹上突起上のスパイン数に与える作用を検討した。6 ヶ月齢の App^{NL-G-F} マウスに対して上述の AAV を投与して CCN1 を発現抑制した後、大脳神経細胞を Goldi-Cox 染色法²¹⁸⁾ を用いて標識し、海馬 CA1 領域のスパインを観察した (Fig. 28A)。脳血管内皮細胞特異的に CCN1 を発現抑制した App^{NL-G-F} マウスでは、対照群と比較し、スパインの密度が高かった (Fig. 28B)。このことから、AD モデルマウスにおいて、血管内皮細胞由来の CCN1 はスパイン数の減少に寄与する可能性が推察された。

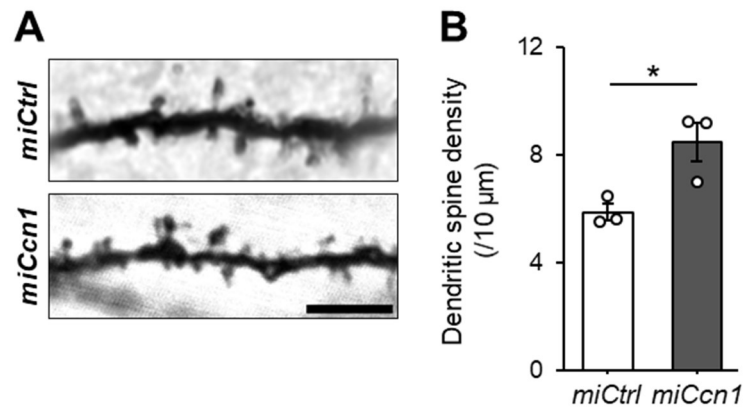


Figure 28. Spine density is increased in APPNL-G-F mice with suppressed CCN1 expression (A) Golgi stained images of spines on apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal cells from APPNL-G-F mice treated with AAV-BR1-miCcn1 or miCtrl. Scale bar indicates 5 μ m. (B) Graph of quantified spine density. Data represent mean $\pm$ standard error. Student's t-test was performed and * p < 0.05 is considered as significant difference.

第5節 ADモデルマウスにおけるCCN1発現抑制によるグリア細胞活性化・アミロイド斑に対する影響

App^{NL-G-F} マウスでは、アミロイド斑の蓄積やシナプスの減少に加えて、グリア細胞の増加が観察される.²¹⁾ グリア細胞の過剰な活性化による神経炎症はADの代表的な組織学的特徴である.²¹⁾ そこで次に、血管内皮細胞由来のCCN1がグリア細胞に影響を与えるか検討した。AAV-BR1-miCCN1を投与したApp^{NL-G-F} マウスの海馬CA1またはDGにおいて、Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) 陽性ミクログリア/マクロファージとSRY-box transcription factor 9 (Sox9) 陽性アストロサイトの数を免疫組織化学染色により解析したところ (Fig. 29A, C), いずれもコントロールと同程度であった (Fig. 29B, D)。

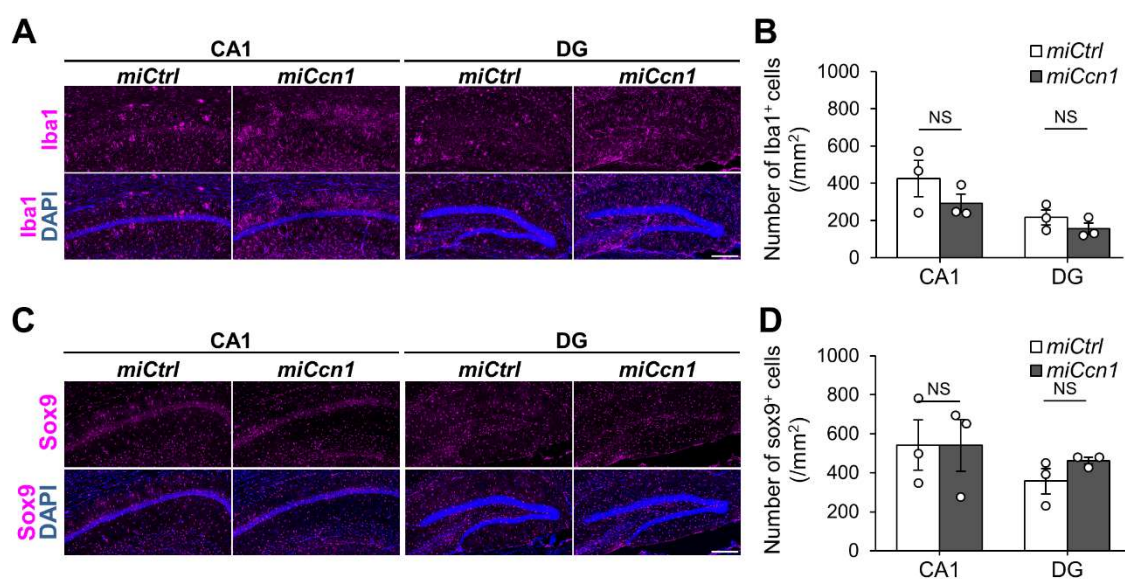


Figure 29. No change in glial cells in App^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression (A) Iba1 (magenta) and DAPI (blue) staining in hippocampal CA1 and DG of App^{NL-G-F} mice treated with AAV-BR1-miCtrl or miCcn1. (B) Quantification of the number of Iba1-positive cells per unit area (n=3). (C) Sox9 (magenta) and DAPI (blue) staining in hippocampal CA1 and DG of App^{NL-G-F} mice treated with AAV-BR1-miCtrl or miCcn1. (D) Quantification of the number of Sox9-positive cells per unit area (n=3). Scale bar indicates 200 μ m. Data are shown as mean $\pm$ standard error. Student's t-test was performed. $p < 0.05$ is considered as significant difference, NS is not significant.

また、アミロイド斑に対する影響も検討したが、CCN1抑制後のCA1およびDGにおけるA β ₄₂陽性領域の割合にも有意な差は認められなかった (Fig. 30A, B)。

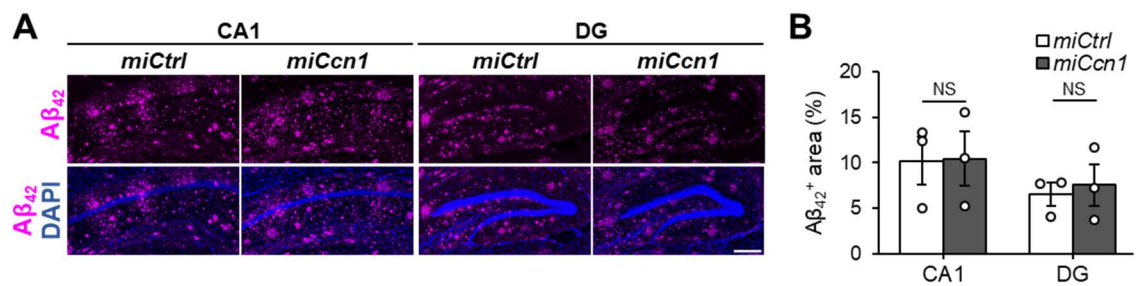


Figure 30. CCN1 does not alter $A\beta$ accumulation.

(A) $A\beta_{42}$ (magenta) and DAPI (blue) staining in hippocampal CA1 and DG of App^{NL-G-F} mice treated with AAV-BR1-miCtrl or miCcn1. (B) Quantification of $A\beta_{42}$ region ($n=3$). Scale bar indicates 200 μm . Data are shown as mean $\pm$ standard error. Student's t-test was performed. $p < 0.05$ is considered as significant difference. NS indicates not significant.

これらのことから、血管内皮由来の CCN1 は APP^{NL-G-F} マウスの神経膠症や $A\beta$ 蓄積には関与しないことが示唆された。

第6節 ADモデルマウスにおけるCCN1発現抑制による認知機能への影響

最後に、血管内皮細胞で発現するCCN1の認知機能への影響を評価するため、App^{NL-G-F}マウスで障害されると報告のある認知機能について、²¹⁹⁾ CCN1発現抑制による変化を検討した。まず、空間学習・記憶能力を評価するため、バーンズ円形迷路試験 (Barnes maze test, BM) ²²⁰⁾ を実施した。この試験では、マウスを穴の空いた円盤上に置き、逃避箱につながる穴の位置を記憶するまでの過程を評価する。各施行日におけるエラーの平均回数を算出したところ、miCcn1投与群では、コントロールと比較して、最終日のエラー数が有意に少なかった (Fig. 31A, B)。一方で、24時間後のプローブ試験では、目標穴の周辺に滞在した時間に群間で有意差は認められなかった (Fig. 31C)。このことから、血管内皮細胞のCCN1を発現抑制すると、APP^{NL-G-F}マウスの空間学習能力が改善する一方で、短期間の空間記憶力には影響しない可能性が考えられた。

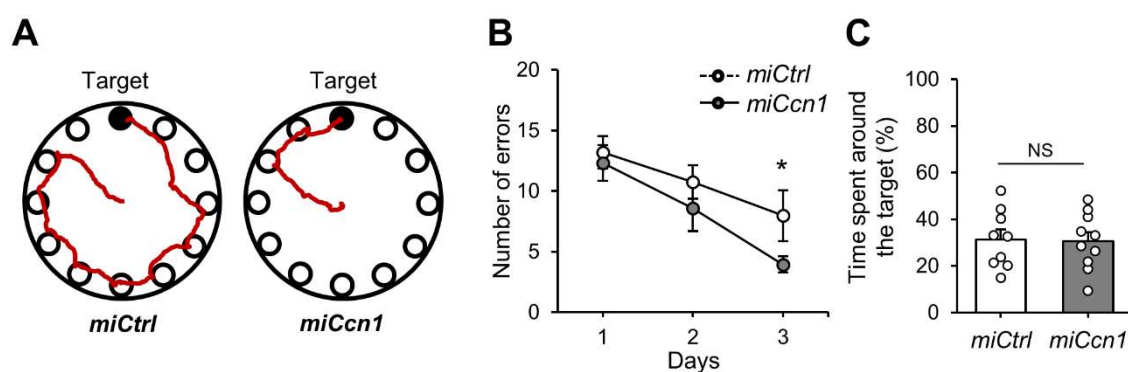


Figure 31. App^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression show higher spatial learning ability than the target group.

(A) Trajectories of 6-month-old App^{NL-G-F} mice treated with miCtrl or miCcn1 in the Barnes maze test (day 3 of training). Black circles indicate target locations. (B) Quantitative results of the number of errors in searching other holes before entering the escape box (means of 6 trials/day). (C) Quantitative results of the time spent around the target in the probe test 24 hours after the last training. $n = 9$ (miCtrl) or 10 (miCcn1) animals. Data are shown as means $\pm$ standard error. In (B), Tukey's post test was conducted after two-way repeated measures analysis of variance, and in (C), Student's t test was conducted, with $*p < 0.05$ significant difference. NS is not significant.

続いて、作業記憶能力を評価するため、新奇物体探索試験 (Novel Object Recognition Test, NORT) を実施した。この試験は、新しく目にした物体ほど、マウスがより興味を示すという原理に基づいている。2 つの類似した物体に慣れさせた後、一方を新奇物体に置き換えると、健常なマウスでは新奇物体を探索する時間が長くなる。6 ヶ月以上の App^{NL-G-F} マウスでは、新奇物体と馴染みのある物体の探索時間の差が消失することが知られている。²¹⁹⁾ しかし、CCN1 を発現抑制したマウスでは、同年齢のコントロールと比較して新奇物体に対する探索時間の割合が高かった (Fig. 32A, B)。一方で、総探索時間に有意な群間差は認められなかったことから (Fig. 32C)、血管内皮細胞由来の CCN1 は作業記憶を障害することが示唆された。

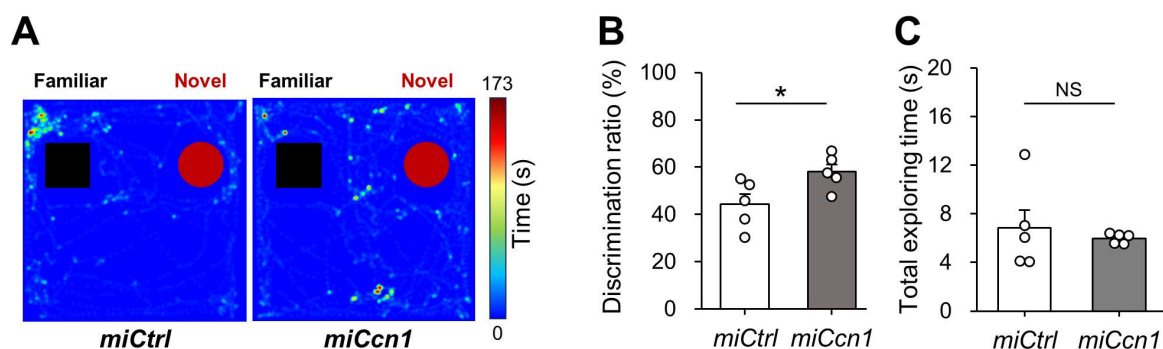


Figure 32. App^{NL-G-F} mice with suppressed CCN1 expression show higher working memory performance than the target group.

(A) Heatmap showing the exploration results when presented with a novel object in the NORT test of 6-month-old App^{NL-G-F} mice treated with *miCtrl* or *miCcn1*. The color red indicates longer residence time. (B) Quantitative results of the percentage of time spent exploring around the novel object out of the total exploration time in the NORT test. (C) Total time (in seconds) spent searching for any object during the NORT test. $n = 5$ animals. Student's t-test was conducted and $*p < 0.05$ was considered as significant difference. NS is not significant.

作業記憶への影響をさらに評価するため、Y 字型迷路試験 (強制選択課題) を実施した。^{221,222)} CCN1 を発現抑制したグループでは、対照群と比較して、新規の通路に滞在する時間が長かった (Fig. 33A, B)。一方で、グループ間の総移動距離に有意差は認められなかったため (Fig. 33C)、この探索時間の増加は、運動量の増加ではなく空間作業記憶障害が緩和したためと考えられる。

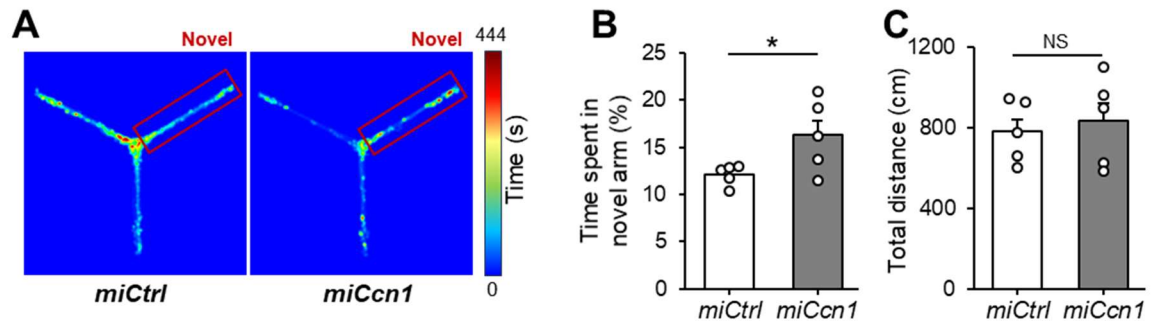


Figure 33. Suppression of CCN1 expression alleviates spatial working memory deficits in App^{NL-G-F} mice.

(A) Heatmap showing exploration results in the Y-maze test of 6-month-old APPNL-G-F mice treated with *miCtrl* or *miCcn1*. Red indicates longer residence time. (B) Quantitative results of the percentage of time spent exploring the novel passage out of the total exploration time in the Y-maze test. (C) Total distance traveled during the Y-maze test (cm). $n = 5$ animals. Student's t-test was conducted and $*p < 0.05$ was considered as significant difference. NS is not significant.

第7節 結果の考察

本章の研究では, CCN1 が AD モデルマウスの血管内皮細胞で発現上昇することを見出した. CCN1 は分泌タンパク質であり, ECM および細胞表面と密接に関連している.²²³⁾ CCN1 は発見当初, 成長因子によって誘導される最初期遺伝子として認識されており,²²⁴⁾ 胚発生における心血管系の発生に不可欠な分子であることが報告されている.²²⁵⁾ また乳がんの侵襲性に関与するとの報告もあり, これは CCN1 が VEGF の発現を増加させることなどを介して, 腫瘍の脈管形成を増加させるためと考えられる.²²⁶⁾ CCN1 の発現を制御する機構については, 近年, 細胞老化により CCN1 の発現が増加することが示唆されている.^{215,227,228)} 注目すべきことに, 老化したマウスの脳血管では, guanine 四重鎖 (G4, 老化細胞に蓄積する核酸の 2 次構造) によって CCN1 の転写が制御され, 発現が上昇することが示唆されている.²¹⁵⁾ G4 の蓄積は, AD を含むさまざまな神経変性疾患の病原性因子であると考えられており, (229-231) AD の神経細胞でも G4 の蓄積増加が観察されている.^{232,233)} さらに, AD 患者および AD マウスモデルでは脳血管内皮細胞の老化が亢進していることが報告されており,²³⁴⁾ AD の進行に伴う脳内皮細胞における CCN1 発現の増加は, 細胞老化に伴う G4 蓄積に依存している可能性が考えられる.

本研究の *in vitro* 実験では, 培養海馬神経細胞において, CCN1 がシナプス数を減少させることを示した. 処理におけるシナプス数の減少は, 新規のシナプス形成の阻害, または形成後のシナプスの維持の阻害, あるいはシナプスが分解によるものと考えられる. CCN1 が結合する integrin のうち, integrin β_1 および β_3 はシナプス調節因子としての機能がよく解析されている.²³⁵⁻²³⁸⁾ 本研究では, CCN1 が媒介するシナプス数減少の分子メカニズムを特定することはできなかったが, RNA-seq の結果に基づく可能性の一つとして, 局所的なタンパク質翻訳を制御するリボソーム機能の関与が考えられる.²³⁹⁾ 局所的なリボソーム翻訳はシナプス形成に必要であり,²⁴⁰⁾ リボソーム機能の異常は AD の初期段階の特徴である.²⁴¹⁾

in vivo の実験では, 脳血管内皮細胞における CCN1 発現の抑制により, AD モデルマウスの海馬におけるシナプス数が増加し, 認知機能障害が改善する可能性が示唆された. AD モデルマウスの脳血管内皮細胞において CCN1 発現の抑制がグリオ-

シスに影響をしなかったことと, *in vitro* 研究の結果から, 血管由来の CCN1 は *in vivo* で直接的に神経細胞に影響を与えることが想定される. 一方で, CCN1 に対する受容体である integrin $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha M\beta 2$ の発現は, 神経細胞だけでなくアストロサイトおよびミクログリアでも検出されており,²⁴²⁾ これらのグリア細胞における活性化は一般的に神経機能を変化させる.^{243,244)} CCN1 に対する受容体は血管内皮細胞にも発現しており, CCN1 は血管新生²⁴⁵⁾ や血管の走化性²⁴⁶⁾ を含む血管機能も変化させることが示唆されている. 今回の研究では, 血管内皮細胞由来の CCN1 が血管内皮細胞に作用して機能を変化させ, その結果, 神経細胞に作用する可能性を否定していない. したがって, 血管内細胞由来の CCN1 は, 直接的に神経細胞影響を与える以外にも, 他の細胞を介して神経機能を制御している可能性が考えられる. また, 中枢神経系における CCN1 の主な供給源は血管内皮細胞であることが報告されているが,²⁴⁷⁾ アストロサイトも CCN1 を発現しており, 老化したアストロサイトでは CCN1 の発現が増加する.²⁴⁸⁾ したがって, 血管内皮由来の CCN1 の, AD における認知機能障害への寄与は部分的である可能性が考えられる. 今後, CCN1 による AD 病態形成機構や, 他の細胞の関与を詳細に明らかにすることで, CCN1 の AD の新規治療標的としての有用性を検証する必要がある.

結語

本論文は、AD 治療薬の創出を目的に、未開拓天然資源に着目した、アミロイドカスケードに対する広範な活性を示す化合物の探索と、²⁴⁹⁾ 病態進行時における神経機能障害を誘導する因子に着目した、新規治療標的候補の探索研究について述べた。

第1章では、ボタンイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) MeOH ext. より、3 種の新規 *p*-terphenyl 化合物, thelephantin P (1), thelephantin Q (2), thelephantin R (3) および 4 種の既知化合物, thelephantin A (4), terrestrin D (5), thelephorin A (6), 4-hydroxybenzoic acid (7) を単離、同定した。さらに、これらの化合物の抗アミロイドカスケード活性と LogP を評価したところ, thelephantin P (1) は A β 凝集抑制 (IC_{50} = 12.9 μ M), BACE1 阻害活性 (IC_{50} = 6.3 μ M), 神経保護作用 (EC_{50} = 8.0 μ M) のすべての活性を細胞毒性濃度以下で示し、かつ、BBB 透過が報告される化合物と同等の LogP を示した。本研究で単離した *p*-terphenyl 化合物は、各化合物が非常に類似した構造を有しており、同様の thelephantin 類における構造活性相関を検討することで、アミロイドカスケードにおける multi-active な活性に必要な化学構造について知見が得られると期待できる。本研究で単離した化合物は、アミロイドカスケードのすべての段階で活性を示すことから、MCI から AD 後期までの幅広い患者にとって、有用な疾患修飾薬となることが期待される。

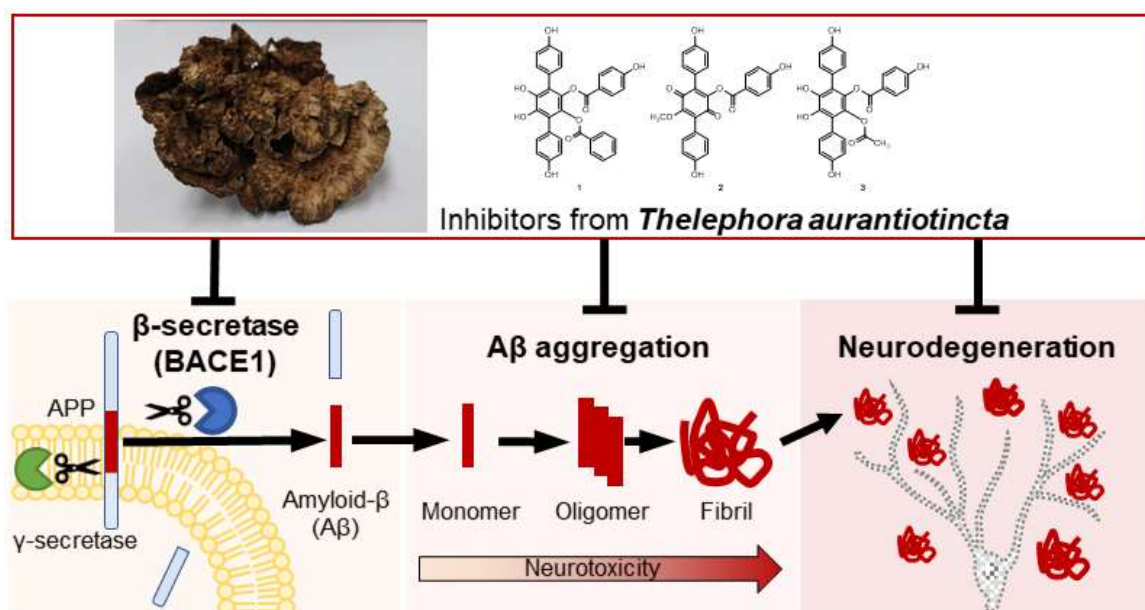


Figure 34. Summary of exploratory research on compounds with anti-amyloid cascade activity from *Thelephora aurantiotincta*.

第2章では、海馬ニューロンの樹状突起スパインの減少に着目し、AD 進行における CCN1 の役割を特定した。AD モデルマウスの脳内皮細胞のトランスクリプトーム解析では、CCN1 発現が病態の進行とともに増加することを発見した。さらに CCN1 処理により、培養海馬ニューロンのスパイン数が減少することを示した。また、脳の血管内皮細胞における CCN1 の発現を抑制すると、AD モデルマウスの樹状突起スパインの減少と認知機能障害が緩和されることを示した。これらの結果より、CCN1 は AD の病態進行において、樹状突起スパインの密度低下を介して認知機能低下を誘導する因子であり、CCN1 が AD の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

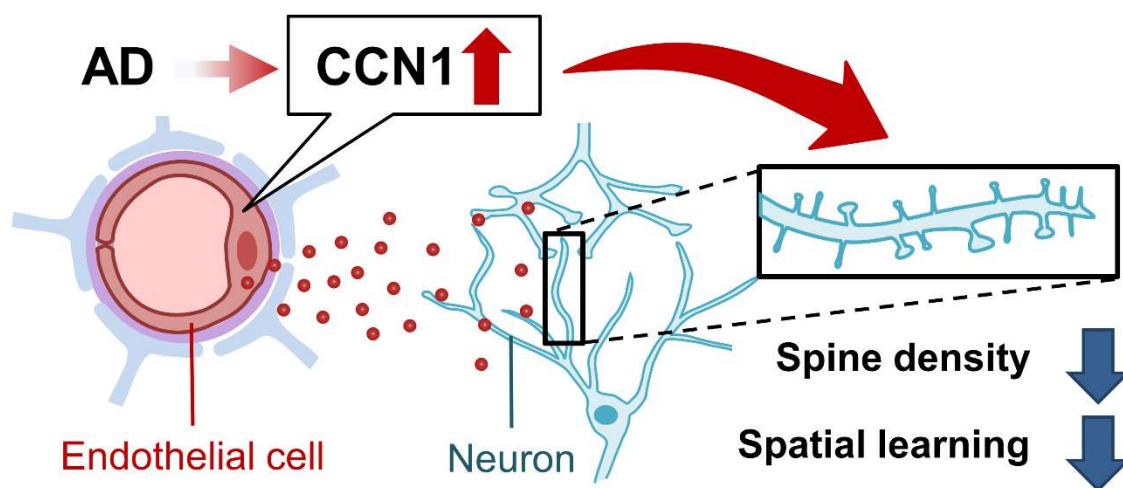


Figure 35. Summary of research to identify factors derived from cerebral vascular endothelial cells that induce cognitive decline.

抗 A β 抗体の製造承認により、AD 治療薬に疾患修飾薬の選択肢が登場したものの、A β 抗体療法では対象症例が限定的であることや医療費の大幅な増大が懸念されている。今後さらに世界中で AD 患者が急激に増加することを考えると、広範囲な活性示す低分子治療薬や新たな治療標的の開発は、引き続き取り組まれるべき課題であると考えられる。本研究では、A β 凝集を軸とした新たな AD 治療薬シード化合物と新規 AD 治療標的の開発につながる基礎的な知見を明らかにした。今後、単離化合物についてモデルマウスを用いた *in vivo* データの収集、あるいは血管内皮細胞の CCN1 を抑制する化合物の探索により、本研究はより進展すると考えられる。さらに本研究成果は、血管内皮細胞の機能や遺伝子発現を制御することで、BBB の透

過を考慮しなくてもよい医薬品の開発や、血流を介した末梢臓器と脳血管内皮細胞の連関を利用した脳機能の制御など、血管内皮細胞を介した神経機能の調節に着目したこれまでにない AD 治療薬の開発アプローチに応用することができると考えられる。が 本研究で得られた成果が天然物化学と神経薬理学の発展に寄与することを願い結語とする。

実験の部

第1章 ボタンイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) MeOH ext. からの抗アルツハイマー病活性化合物の探索

材料の入手 2016 年 9 月に山梨県で *Thelephora aurantiotincta* の子実体を採集した. バウチャー標本 (TA-2016) は明治薬科大学薬学部生薬学研究室に寄託された. 種の同定は, 同研究室の小山によって確認された.

エキスの抽出と分離 乾燥した *Thelephora aurantiotincta* (414.0 g) を破碎したのち, 十分量の CHCl_3 に 1 晩浸漬し, ろ過した破砕片を再び浸漬抽出することを合計 3 回繰り返した. CHCl_3 で抽出した破砕片に対して同様の浸漬抽出を MeOH で合計 3 回繰り返し, MeOH をエバポレートすることで濃縮して MeOH ext. 44.0 g を得た.

T. aurantiotincta MeOH ext. を遮光 Si. C. C. を用いて CHCl_3 -MeOH (100:1, 50:1, 25:1, 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, MeOH 100%) で分画し, 4 つのフラクション (A: 10.7 mg, B: 2.2 g, C: 4.8 g, D: 28.5g) を得た. Fr. D (28.5 g) をさらに Si. C. C. を用いて CHCl_3 -MeOH (30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, MeOH 100%) で分画し, 7 種類のフラクション (D1-D7) を得た.

Fr. D4 (6.2 g) を (1) Si. C. C., CHCl_3 -MeOH (30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, MeOH 100%), (2) ODS C.C., MeOH- H_2O (MeOH 50%, 60%, 70%, 100%), および (3) 分取 HPLC, MeOH- H_2O (70%, 100%) の 3 段階のクロマトグラフィーで分離し, 化合物 **2** (11.1 mg, tR 18 min) および **5** (5.2 mg, tR 16 min) を得た.

Fr. D5 (7.2 g) を (1) Si. C. C., EtOAc-MeOH (100:1, 75:1, 50:1, MeOH 100%) および (2) ODS C. C., MeOH- H_2O (MeOH 50%, 100%) の 2 段階のクロマトグラフィーで分画し, 7 つのフラクション (D5A1-7) を得た. Fr. D5A4 (152.0 mg) を (1) ODS C.C., MeOH- H_2O (MeOH 40%, 50%, 60%, 100%) および (2) フェニルカラムを用いた分取 HPLC, MeOH- H_2O (MeOH 65%) により, **1** (5.2 mg, tR 27.2 分) および **4** (8.2 mg, tR 20.4 分) を得た. Fr. D5A6 (842.2 mg) を CHCl_3 -MeOH で再沈殿させ, **6** (617.1 mg) を得た. Fr. D5A2 (103.4 mg) を Si. C. C. を用いて n-Hex-EtOAc-MeOH (100 : 100 : 1, 75 : 75 : 1, 50 : 50 : 1, 40 : 40 : 1, 30 : 30 : 1, 20 : 20 : 1, 10 : 10 : 1, 9 : 9 : 1, 8 : 8 : 1, 7:7:1,

6:6:1, 5:5:1, 4:4:1, 3:3:1, 2:2:1, 1:1:1, 0:1:1, MeOH 100%) から 5 つのフラクション (D5A2A-F) を得た. Fr. D5A2B (3.9 mg) を MeOH-H₂O (MeOH 40%)で溶出する分取 HPLC で精製し, **7** (2.6 mg, tR 16.0 min) を得た. Fr. D5A2D (49.6 mg) をさらに (1) ODS C.C., MeOH-H₂O (MeOH40%, 50%, 60%, 100%), (2) 分取 HPLC, MeOH-H₂O (MeOH50%), および (3) フェニルカラムによる分取 HPLC, MeOH-H₂O (MeOH60%) を行い, **3** (1.6 mg, tR 12.8 分) を得た.

単離した化合物のスペクトルデータ

Thelephantin P (**1**): Colorless amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 229 (4.37), 236 (4.36), 242 (4.37), 248 (4.37) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3184, 1733, 1608, 1524 cm⁻¹; ¹H and ¹³C-NMR, see Table 2; neg. HRESIMS m/z 549.1183 [M-H]⁻ (calcd for C₃₂H₂₁O₉, 549.1186); pos. HRESIMS m/z 573.1139 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₂H₂₂O₉Na, 573.1162).

Thelephantin Q (**2**): brown amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (4.24), 249 (4.33) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3443, 3260, 2518, 2159, 2033, 1977, 1721, 1660, 1639, 1606 cm⁻¹; ¹H and ¹³C-NMR, see Table 2; pos. HRESIMS m/z 481.08931 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₆H₁₈O₈Na, 481.0839).

Thelephantin R (**3**): Colorless amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 203 (3.40), 262 (3.17) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3278, 3119, 2804, 1733, 1717, 1608, 1525 cm⁻¹; ¹H and ¹³C-NMR, see Table 2; neg. HRESIMS m/z 487.1026 [M-H]⁻ (calcd for C₂₇H₁₉O₉, 487.1029).

Thelephantin A (**4**): Colorless amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (4.22), 265 (4.14) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3239, 2916, 2032, 1977, 1611 cm⁻¹; ¹H and ¹³C-NMR, see Table 4; neg. HRESIMS m/z 515.1333 [M-H]⁻ (calcd for C₂₉H₂₃O₉, 515.1342); pos. HRESIMS m/z 539.1303 [M+Na]⁺ (calcd for C₂₉H₂₄O₉Na, 539.1318).

Terrestrin D (**5**): brown amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 216 (4.22), 265 (4.14) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3190, 2160, 2032, 1977, 1611 cm⁻¹; ¹H and ¹³C-NMR, see Table 4; pos. HRFABMS m/z 487.1386 [M+H]⁺ (calcd for C₂₈H₂₃O₈, 486.1393).

Thelephorin A (**6**): Grayish amorphous; UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 231 (4.38), 255 (4.38), 283 (4.34) nm; IR (ATR) $\nu_{\max}$ 3239, 2916, 2848, 2522, 2519, 2031, 1977, 1744 cm⁻¹; ¹H and

¹³C-NMR, see Table 4; neg. HRESIMS *m/z* 563.1344 [M-H]⁻ (calcd for C₃₃H₂₃O₉, 563.1342); pos. HRESIMS *m/z* 587.1282 [M+Na]⁺ (calcd for C₃₃H₂₄O₉Na, 587.1318).

4-Hydroxybenzoic acid (7): Colorless amorphous; ¹H and ¹³C-NMR see Table 5; HREIMS *m/z* 138.0316 [M]⁺ (calcd for C₇H₆O₃, 138.0317).

BACE1 FRET Assay BACE1 assay は, BACE1 FRET assay kit, Red (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて行った. 9 μL の被験試料, 9 μL の 750 nM BACE1 基質 (50 mM 重炭酸アンモニウム中の Rh-EVNNLDAEFK-Quencher), および 9 μL の BACE1 酵素 (1U/mL) を黒色 384 ウェルポリプロピレンプレート上で混合し, 室温で 1 時間反応させた. 蛍光強度は, Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek, USA) を用いて, 励起 540 nm, 発光 590 nm で測定した. BACE1 阻害率は以下の式で算出した:

$$\text{BACE1 inhibition rate (\%)} = [1 - \{(S - S_0) - (B - B_0)\} / \{(C - C_0) - (B - B_0)\}] \times 100$$

C は反応開始 1 時間後のコントロール (10%DMSO assay buffer, 基質, 酵素) における蛍光強度, C₀ は反応開始直後のコントロールにおける蛍光強度を示す. B は反応開始 1 時間のブランク (10%DMSO assay buffer, 基質, 酵素を含まない assay buffer) における蛍光強度, B₀ は反応開始直後のブランクにおける蛍光強度である. S は反応開始 1 時間後の被検試料 (試料の 10%DMSO assay buffer 溶液, 基質, 酵素) における蛍光強度, S₀ は反応開始直後の被検試料における蛍光強度である. IC₅₀ 値は Prism (version 5.02; GraphPad, USA) で算出した.

Table 12. Equipment and reagents for BACE1 inhibitory activity assay.

	機器・試薬名 (販売者)
試薬	BACE1 (β-Secretase) FRET Assay Kit, red (P2985, Thermo Scientific)
	β-Secretase Inhibitor IV (565788, Sigma-Aldrich)

その他の機器・試薬は, 一般及び他の活性試験と同様.

Th-T Assay Thioflavin-T (FUJIFILM Wako Purechemical Co., Ltd., Japan) および A β ₄₀ (Peptide Institute, Japan) を用いて、抽出物、画分および単離された化合物の Th-T assay を行った. A β の凝集は, Naiki らによって開発された Th-T 法¹⁶⁹⁾ を改変したものをを用いて評価した. pH 7.4 で 100 mM NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 80 μ L を 0.5mL チューブに分注し, DMSO で溶解した各試料 10 μ L を加えた. A β ₄₀ (0.02% NH₄OH に 250 mM になるよう溶解) 溶液 10 μ L をチューブに加え, 最終濃度が 25 mM A β ₄₀ となるよう調製した. すべての操作は氷上で行った. 得られた溶液を 37°C で 24 時間反応させ, 5.0 mM Gly-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) に溶解した 5.0 mM Th-T を 300 μ L 加えて混合した. 混合物を 96 ウェルプレートに 100 μ L ずつ移し, 30 分間穏やかにボルテックスした. 蛍光強度は Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek, USA) を用いて励起 440 nm, 発光 485 nm で測定した. A β 凝集率は以下の式で算出した:

$$\text{A}\beta \text{ aggregation rate (\%)} = (S - B)/(C - B) \times 100$$

C は 24 時間インキュベーション後の DMSO コントロール (assay バッファー, 25 mM A β ₄₀, 被験試料を含まない DMSO) の蛍光強度, B はインキュベーションしていないブランク (assay バッファー, 25 mM A β ₄₀, 被験試料を含まない DMSO) の蛍光強度, S は被験試料 (assay バッファー, 25 mM A β ₄₀, 被験試料を含む DMSO) の 24 時間インキュベーション後の蛍光強度である. ポジティブコントロールとして myricetin (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japan) を用いた. IC₅₀ 値は Prism (version 5.02; GraphPad, USA) を用いて算出した.

Table 13. Instruments and reagents for Th-T assay.

	機器・試薬名 (販売者)
インキュベーター	Fine 小型インキュベーターFF-10 (TGK Co., Ltd.)
ローテーター	Mini Disk Rotor BC-710 (BIO CRAFT)
蛍光プレートリーダー	Synergy HTX Multi-Mode Reader (Bio Teck)
ボルテックス	MS3 digital (IKA)
プレートミキサー	Micro Plate Mixer NS-P (ASONE)
pH メーター	pH METER D-13 (HORIBA)
96 穴蛍光プレート	96F Nontreated Black Microwell Si (Thermo Scientific)
マイクロピペット	Pipetman (P20, P100, P200, P1000, P10mL, GILSON)
マイクロチューブ	Treff Lab (0.5 mL, Nolato), QSP (1.5mL, Thermo Scientific)
コーニング管	15 mL, 50 mL, 100 mL (IWAKI)
試薬	Amyloid β -protein (Human, 1-40) 0.54 mg/vial (PEPTIDE INSTITUTE, INC.) Myricetin (529-44-2, TCI chemical trading Co., Ltd.) Thioflavin-T (202-01002, Fujifilm Wako) Dimethyl sulfoxide (10378-00, Kanto Chemical) 25% Ammonia Solution (017-03176, Fujifilm Wako) Potassium Dihydrogen Phosphate (169-04245, Fujifilm Wako) Glycine (077-00735, Fujifilm Wako) Phthalate pH Standard Solution pH4.01 (028-03185, Fujifilm Wako) Phosphate pH Standard Equimolal Solution pH6.86 (025-03195, Fujifilm Wako)

細胞培養 ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は ATCC から購入し, 10% fetal bovine serum (FBS), 30 U/mL penicillin, 30 µg/mL streptomycin, 15 mM HEPES を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium (DMEM/F12) で培養した. 細胞は T75 flasks で培養し, 37 °C, 5% CO₂ のインキュベーター内で維持した.

SH-SY5Y 細胞における Aβ₄₂ 毒性に対する保護作用試験 各化合物は DMSO に溶解した. 培養液中の最終 DMSO 濃度は 0.1%未満であり, この濃度は SH-SY5Y 細胞の生存に影響を与えなかった (データ未掲載). 試験では, 培養した SH-SY5Y 細胞を Type I collagen-coated 96-well cell culture plates (Nippi Inc., Tokyo, Japan) に 3.0×10^4 cells/100 µL/well の密度で播種した. 72 時間培養後, 通常の培地を除去し, 2% FBS, 30 U/mL penicillin, 30 µg/mL streptomycin を添加した phenol red-free medium に各濃度のサンプル, 0.02% NH₄OH に溶解した 250 µM Aβ₄₂ (Aβ₄₂ の最終濃度は 10 µM) を混合した培地に入れ替えた. 5% CO₂, 37°C で 24 時間反応した後, 細胞生存率を WST-8 Assay (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて, 製造元の指示に従って測定した. 簡単にまとめると, 10 µL の WST-8 試薬を各 well に加えて, プレートに 5% CO₂, 37°C で 3 時間反応した後, Synergy HTX Multi-Mode Reader を用いて 450nm の吸光度 (reference: 655 nm) を測定した. 各サンプルの吸光度 (450-655 nm) を, サンプル無添加のコントロールの吸光度と比較することで相対細胞生存率を算出し, 相対細胞生存率が 80%を下回る直前の最低濃度を細胞毒性濃度と定義した. 神経保護作用は以下の式で算出した:

$$\text{relative cell viability to control (\%)} = \{(\text{ABS}_S - \text{ABS}_V) / (\text{ABS}_C - \text{ABS}_V)\} \times 100$$

ここで, ABS_S は 3 時間反応後の試験サンプル(0.1% DMSO, NH₄OH 中の Aβ₄₂, サンプル溶液含む試験培地) の吸光度, ABS_V は 3 時間反応後の vehicle (0.1% DMSO, NH₄OH 中の Aβ₄₂, 試験培地) の吸光度, ABS_C は 3 時間反応後の Aβ₄₂ 無添加コントロール(0.1% DMSO, 試験培地) の吸光度である. ec₅₀ 値は Prism (version 5.02; GraphPad, USA) を用いて計算した.

Table 14. Instruments and reagents for testing neuroprotective activity.

	品名 (販売者)
電動ピペット	Pipet-Aid XP2 (Drummond)
ディスポーザブルピペット	5 mL, 10 mL (IWAKI), 50 mL (VWR)
細胞培養用容器	T75 tissueculture flask (TPP) 96-well cell culture plate (353072, FALCON)
試薬名 (販売者)	
SH-SY5Y (American Typeculturecollection, 本学分析化学研究室より拝受)	
Amyloid β -protein (Human, 1-42) 0.55 mg/vial (PEPTIDE INSTITUTE, INC.)	
HEPES, L-glutamine, DMEM/F12 (1:1) (Thermo Scientific)	
HEPES, L-glutamine, no phenol red DMEM/F12 (1:1) (Thermo Scientific)	
Fetal bovine serum (Thermo Scientific)	
PBS (-) (166-23555, Fujifilm Wako)	
0.53 mM EDTA 含有 0.05%トリプシン (nacalai tesque)	
Penicillin-Streptomycin, Liquid (Thermo Fisher Scientific)	
Cell Counting Kit-8 (343-07623, DOJINDO)	
LDH Cytotoxicity Detection Kit (MK401, TaKaRa)	

LogP 予測値の計算 化合物の水／オクタノール分配係数 (LogP) は, PubChem で検索するか, XlogP3 (v3.2.2.)²⁵⁰⁾ を使用して計算した.

Table 15. General laboratory equipment and reagents.

	機器・試薬名 (販売者)
赤外吸収 (IR) スペクトル測定	FT-IR Nicolet iS5 spectrophotometer (Thermo Scientific)
紫外吸収 (UV) スペクトル測定	GENESYS 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific)
質量分析 (MS); FABMS	JEOL JMS-700 spectrometer (JEOL Ltd.)
ESIMS	JEOL JMS-T100LC spectrometer (JEOL Ltd.)
核磁気共鳴 (NMR) スペクトル測定	JEOL JNM-ecS 400 MHz (JEOL Ltd.)
	JEOL JNM-ecZ 500 MHz (JEOL Ltd.)
NMR サンプルチューブ	Willmad Lab Glass (5φ×7-inch, Kanto Chemical)
NMR 測定溶媒; DMSO- <i>d</i> ₆	dimethyl sulfoxide- <i>d</i> ₆ 99.9% D with 0.03% TMS (Kanto Chemical)
CD ₃ OD	methanol- <i>d</i> ₄ 99.8% D with 0.03% TMS (Kanto Chemical)
¹ H-NMR および ¹³ C-NMR における化学シフトの基準値については、それぞれの溶媒に由来するシグナルの化学シフト値 (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ _H 2.49 ppm, δ _C 39.5 ppm; CD ₃ OD, δ _H 3.30 ppm, δ _C 49.0 ppm) を基準値とした。	
凍結乾燥機	PDU-1100 (EYELA)
分取 HPLC; 機器	SSC-3461 pomp and SSC-5410 UV detector (Senshu Scientific Co., Ltd.)
	Jasco PU-2080 Plus pomp and Jasco UV-2075 Plus UV detector (Jasco Co.)
HPLC カラム (10φ×250 mm)	InertSustain C ₁₈ column (GL Sciences Inc.)
	InertSustain Phenyl 5 μm column (GL Sciences Inc.)
	Senshu Pak ODS-4251-N (Senshu Scientific Co., Ltd.)

Table 15. Continued

オープン C. C. 用シリカゲル	Silica gel 60N (63-210 µm; Kanto Chemical)
	ODS silica gel YMC-GEL ODS-A (75 µm; YMC Co., Ltd.)
	Sephadex LH-20 (GE Healthcare)
	Chromatorex COOH MB100-75/200 (100 µm; Fuji Silysia Chemical Ltd.)
薄層クロマトグラフィー	Silica Gel 60 F254 (Merck)
	RP-18 F254s (Merck)
分離溶媒	Chloroform (07278-80, Kanto Chemical)
	Methanol (136-01837, Fujifilm Wako)
	Ethyl acetate (056-00367, Fujifilm Wako)
	<i>n</i> -Hexane (18041-81, Kanto Chemical)
	Sulfuric acid (192-04696, Fujifilm Wako)

第2章 認知機能低下を誘導する血管内皮細胞由来因子の探索

実験動物 野生型マウスとして, C57BL/6J マウスを東京実験動物と日本 SLC より購入した. AD モデルマウスとして用いた App^{NL-G-F} マウスは理化学研究所脳神経科学研究センターより入手した.²¹¹⁾ マウスは 22°Cの温度管理された環境で飼育し, 12 時間の明暗サイクルに従い, 食物および水は制限なく摂取できるようにした. また, Specific pathogen free (SPF) 環境の施設内で飼育・繁殖した. すべての動物実験は, 国立精神・神経医療研究センター神経研究所動物実験倫理委員会の承認を得た (2021011R2).

CD31 陽性細胞の単離と RNA-seq 血管内皮細胞は, 3 か月齢と 6 か月齢の App^{NL-G-F} マウスから得た. マウスは, メデトミジン塩酸塩(0.3 mg/kg, Orion Pharma), ミダゾラム(4 mg/kg, Maruishi Pharmaceutical), ブトルファノール(5 mg/kg, Meiji Animal Health)を含む混合麻酔で深く麻酔し, 氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で経頭蓋的に灌流した. 大脳皮質を PBS 溶液中で眼科ハサミを用いて細かく切り, Neural dissociation kit (P) (Miltenyi Biotec)で処理して細胞懸濁液を調製した. 細胞懸濁液を Myelin removal kit (Miltenyi Biotec)で処理した後, CD31 Microbeads (Miltenyi Biotec)で処理して, Magnetic cell sorting (MACS)により血管内皮細胞を単離した.

単離した血管内皮細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて全 RNA を回収した. 次に, NEBNext poly(A) mRNA magnetic isolation module (New England Biolab)を用いて全 RNA から Poly A mRNA を単離し, NEBNext Ultra RNA Library Prep kit for Illumina (New England Biolabs) を用いて RNA-seq ライブラリを作成した. ライブラリは NovaSeq (Illumina)を用いてシーケンスした. リードは STAR²⁵¹⁾ によりヒトゲノム hg38 にマッピングされた. RNA-Seq データの発現解析は HOMER²⁵²⁾ を用いて行い, 発現変動解析は DESeq2²⁵³⁾ を用いて行った. 発現変動遺伝子解析では, いずれかのサンプルでカウント数が 20 未満の遺伝子は除外した. 培養海馬神経細胞のデータセットについては, バッチ効果を除去するために sva²⁵⁴⁾ を使用した. GSEA^{255,256)} は, 遺伝子を $\log(\text{fold-change}) \times \log_{10}(\text{P 値})$ の値をもとにランク付けして実施した.

免疫組織化学染色 マウスを麻酔下において PBS で経心的に灌流したのち、脳を回収した。回収した脳は 4% paraformaldehyde (PFA, Merck)-PBS で 3 時間後固定し、その後、4℃の 30% sucrose / PBS 液に浸した。その後、脳を Optimal Cutting Temperature コンパウンド (Tissue-Tek, Sakura Finetek Japan Co., Ltd) に包埋して凍結し、クライオスタット (Leica, CM1860) を用いて 25μm の切片を作成し、スライドガラス (Matsunami Glass) に貼り付けた。切片は、0.3% の Triton X-100 (12967-45, Nacalai Tesque) と 3% の正常ロバ血清 (NDS; IHR-8135, ImmunoBioScience) を含む PBS を滴下して室温で 1 時間ブロッキングおよび透過処理を行い、その後、同じ組成の PBS 溶液で希釈した一次抗体とともに一晩反応させた。その後、PBS (-) で 10 分間の wash を 3 回行い、切片を室温かつ暗箱中で 1 時間、蛍光標識二次抗体溶液を反応させた。再度 PBS (-) で 10 分間の wash を 3 回行った後、室温で 5 分間、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 mg/ml, Dojindo Laboratories) で細胞核を染色した。画像は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV3000; Olympus) を用いて、ブレグマ-1.3 mm から -2.8 mm の範囲を 150 μm 間隔で、少なくとも 10 個の切片から撮影した。画像の解析、定量は Image J 画像解析ソフトウェア (Fiji, ver1.54g) を用いた。CD31⁺ 血管内皮細胞における CCN1 の蛍光強度は、CD31⁺ 血管内皮細胞の画像を二値化したのち、境界を選択範囲として取り出し、CCN1⁺ 画像中の選択範囲内の蛍光強度を measure プラグインで定量した。1 群あたり 3 個体を解析し、1 個体あたり 300 本 (Fig. 23) および 500 本 (Fig. 27) の血管で定量した。CA1 および DG 領域における、グリア細胞数および Aβ plaque 面積は、DAPI⁺ 画像で CA1 または DG 領域を選択したのち、選択範囲内における各種マーカー陽性の数を analyze particles でカウント、または measure プラグインで面積を定量した。1 群あたり 3 個体で解析した。使用した抗体は Table 16 に示した。

Table 16. Antibodies used in immunohistochemical staining

一次抗体	型番, 販売元	希釈度
Anti- β Amyloid (1-42)-Conformation Specific, Rabbit-Poly	GTX134510, Gene tex	1:400
CYR61/CCN1 Polyclonal antibody	26689-1-AP, Proteintech	1:400
BD Pharmingen™ Purified Rat Anti-Mouse CD31	557355, BD Biosciences	1:1000
Anti-GFP antibody (Goat polyclonal)	ab6673, Abcam	1:400
Anti Iba1, Goat	011-27991, Wako	1:400
Anti-Sox9 Antibody	ab5535, Abcam	1:600
二次抗体	型番, 販売元	希釈度
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	A-11055, Thermo Fisher Scientific	1:2000
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568	A-11057, Thermo Fisher Scientific	1:2000
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	A-21206, Thermo Fisher Scientific	1:2000
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568	A-10042, Thermo Fisher Scientific	1:2000
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	A-31573, Thermo Fisher Scientific	1:2000
Donkey anti-Rat IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 647	A-48272, Thermo Fisher Scientific	1:2000

海馬神経細胞の初代培養 胎生 17 日目の C57 BL/6J マウスの海馬を摘出し、眼科ハサミを用いて細かく刻んだ。0.125% trypsin (15090-046, Thermo Fisher Scientific) および 1mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA; 6381-92-6, Dojindo) を含む PBS に細切した海馬を入れ、37°C で 5 分間反応させた。反応後の細胞懸濁液に、10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 12800082, Thermo Fisher Scientific) を等量加えて trypsin を失活させた後、70 μ m のセルストレイナーでろ過した。懸濁液を 408 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後、細胞を Neurobasal 培地 (2% B27 (17504-004, Thermo Fisher Scientific), 2 mM L-glutamine (35050061, Thermo Fisher Scientific), および 0.5 mg/ml penicillin / streptomycin (164-25251, Wako) を混合した Neurobasal (21103-049, Thermo Fisher Scientific) に再懸濁した。Poly-L-lysine (P4707, Sigma-Aldrich) でコーティングした 24 ウェルプレートに 1.0×10^5 個の細胞を播種し、3–4 日ごとに培地を交換しながら、37°C, 5% CO₂ で 14 日間培養した。

培養 14 日後に、ヒト組換え型 CCN1 (ab50074, Abcam) を Neurobasal 培地に添加し、指定した最終濃度の CCN1 で細胞を刺激した。細胞はさらに 24 時間 (免疫細胞化学的分析用) および 8 時間 (RNA-seq 用) 培養した。培養神経細胞を用いた RNA-seq も、前述のセクションで説明したように行った。

免疫細胞化学染色 細胞は、室温で 30 分間、4% PFA を含む PBS で固定し、その後室温で 30 分間、ブロッッキング溶液 (3% NDS および 0.1% Triton X-100 を含む PBS) で処理した。サンプルは、ブロッッキング溶液で希釈した一次抗体とともに 4°C で一晩反応させた。一次抗体は、PBS で希釈した蛍光二次抗体を用いて室温で 2 時間反応させて検出した。蛍光画像は共焦点顕微鏡 (FV3000, Olympus) を用いて取得した。定量分析には、各濃度 20 個のニューロンについて、細胞体から 40–80 μ m 離れた場所にある少なくとも 3 本の樹状突起を分析し、シナプスマーカーの共局在を検討した。使用した抗体は Table 17 に示した。

Table 17. Antibodies used in immunocytochemical staining

一次抗体	型番, 販売元	希釈度
Anti-MAP2 antibody	GTX133109, GeneTex	1:1000
VGLUT1 antibody	135304, Synaptic Systems	1:1000
Anti-Post Synaptic Density Protein 95 Antibody, clone 6G6-1C9	MAB1596, Millipore	1:500
二次抗体	型番, 販売元	希釈度
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488	A-21206, Thermo Fisher Scientific	1:1000
Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 568	A-11075, Thermo Fisher Scientific	1:1000
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	A-31571, Thermo Fisher Scientific	1:1000

アデノ随伴ウイルス(AAV) ベクターの作成と投与 脳内皮細胞を標的とする AAV-BR1 の rep 遺伝子と cap 遺伝子をコードするプラスミドは, Jakob Körbelin 博士からご提供いただいた.²¹⁷⁾ 組換え AAV-BR1 ベクターを作成するために, AAV-BR1 プラスミド, CD144 プロモーターの制御下で EGFP と CCN1 を標的 (*miCcn1*) とする (または非標的 (*miCtrl*) の) microRNA (miRNA) を発現する配列 (5'-GCGAACTTCTGTCAAAGGACAAG-3') をコードする pAAV-CD144-EGFP-mir30a プラスミド, およびアデノウイルスヘルパープラスミド(pHelper; Takara Bio Inc.) を, polyethyleneimine とともに 2:2:5 の比率で AAVpro-HEK 細胞 (632273, Takara Bio Inc.) にトランスフェクションした. 細胞はトランスフェクション後 96 時間で回収し, AAV は AAVpro Purification Kit (Takara Bio Inc.) を用いて精製した. 力価は, 2 種の

プライマー (ITR forward: GGAACCCCTAGTGATGGAGTT; ITR reverse: CGGCCTCAGTGAGCGA) を用いた定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) により評価した. マウスには, 組織学的および行動実験の 3 週間前に, 上記で作成した AAV 溶液 100 μ l (力価: 5.0×10^{11} genomecopy) を尾静脈投与した.

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) CD31⁺細胞から RNeasy Micro Kit (74004, QIAGEN) を用いて total RNA を単離し, QuantAccuracy[®], RT-RamDA[®] cDNA Synthesis Kit (RMQ-101, TOYOBO) を用いて相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) を合成した. cDNA 断片は, マウス *Ccn1* プライマーを用いて KAPA SYBR Fast qPCR Mix (KK4602, Kapa Biosystems) で増幅した. qPCR では鋳型として Fasmac 社で合成した以下のプライマーを使用した.

Table 18. Primer sequences used in qPCR

名称	配列
<i>Ccn1</i> forward	AGCTCCACCGCTCTGAAAGG
<i>Ccn1</i> reverse	CCACGGCGCCATCAATACAT
<i>Actb</i> forward	AGTGTGACGTTGACATCCGTA
<i>Actb</i> reverse	GCCAGAGCAGTAATCTCCTTC

サーマルサイクルは, 98°C で 120 秒間の初期変性から始まり, その後 98°C で 10 秒間, 60°C で 10 秒間, 68°C で 30 秒間のサイクルを 40 回繰り返した. 増幅の特異性を評価するために, PCR を使用して融解分析を行った. mRNA の相対的発現は, 同サンプル内の *Actb* アクチンの mRNA 量で標準化し, $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて決定した.

$$(\text{対照群に対するサンプルの遺伝子発現比}) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{reference, sample}}) - (Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{reference, control}})$$

Ct_{sample} : サンプルにおける目的遺伝子の Ct 値

$Ct_{\text{reference, sample}}$: サンプルにおけるリファレンス遺伝子 (*Actb*) の Ct 値

Ct_{control} : 対照群における目的遺伝子の Ct 値

$Ct_{\text{reference, control}}$: 対照群におけるリファレンス遺伝子 (*Actb*) の Ct 値

行動解析 バーンズ円形迷路は、高さ 1 m、直径 1 m で、縁に 12 個の穴が等間隔に開いた白い円形のプラットフォームで構成される。縁の穴うち、特定の 1 つの穴の下に逃避箱を設置し、逃避箱が設置された穴を目標穴とした。各マウスにはセッション全体を通して固定の目標穴が割り当てられ、プラットフォームは毎日 90°回転させた。プラットフォームの中央の光度は少なくとも 800 lux に設定した。各セッションの終了時には、プラットフォームを 70% ethanol で清拭した。

マウスは 3 日間 (1 日 6 回) 訓練した。訓練段階では、マウスをプラットフォームの中央にある白いアクリル製円筒 (高さ 14 cm、直径 11 cm) 内に 30 秒間入れた。30 秒後に円筒を取り除き、マウスに迷路を 5 分間探索させた。すべてのマウスが目標穴から逃避箱に入った後、30 秒間ボックス内に留まらせた。その後、マウスを逃避箱から取り出し、待機ケージに入れた。マウスが目標穴を見つけられなかった場合は、手動で穴まで誘導し、ボックスに入らせた。最終トレーニングセッションの 24 時間後にプローブテストを実施し、マウスに逃避箱が無いプラットフォームを 3 分間自由探索させた。マウスの行動は自動画像追跡システム (SMART3.0, Panlab) を使用して録画し、逃避箱に入るまでのエラー数 (別の穴を覗いた回数) を計測した。

新奇物体認識テストは白いボックス (50 × 50 × 30 cm) の中で実施した。使用した物体は、立方体 (10 × 10 × 10 cm) と円柱 (Φ10 × 10 cm) である。物体はボックスの壁から 10 cm 離れた位置に配置し、20 cm 間隔で配置した。ボックス中心部の光度は最低 50 lux に維持した。各セッションの終了時には、物体とボックスの両方を 70% ethanol で清拭し、嗅覚刺激を排除した。トレーニングセッション中、各マウスをボックスに導入し、10 分間自由に物体を探索させ、探索行動を記録した。24 時間の間隔を空けた後、各マウスをボックスに 5 分間再導入するテストセッションを実施した。このセッションでは、見慣れた物体を同じ色ではあるが異なる形状の新しい物体と交換した。訓練およびテストセッション中に、見慣れた物体と新しい物体を探索する時間を測定することで、行動データを収集した。探索率は実験グループごとに算出した。

Y 字型迷路の位置非見本照合課題は、灰色プラスチック製の Y 字型迷路装置を使用して実施した。この迷路は、中央の三角エリア (5 × 5 × 5 cm) から放射状に伸びる

3つのアーム (5 × 25 cm) で構成されている。迷路の中央部の光度は 100±5 lux に維持された。各セッション終了後、迷路は 70% ethanol で清拭し、嗅覚刺激を排除した。各セッション中、すべてのマウスは同じスタート地点から探索を開始した。

トレーニングセッションの間、各マウスは 10 分間迷路を自由に探検することができるが、1つのアームをプラスチックプレートで遮断し、進入できないようにした。2 時間のインターバルの後、遮断プレートを取り除き、マウスが迷路全体を自由に探索できるテストセッションを実施した。各マウスの行動を記録し、テストセッション中に新しいアームに滞在した時間を測定した。

ゴルジ染色 ゴルジ染色は、FD Rapid Golgi Stain kit (PK401, FD Neuro Technologies) を使用して実施した。経心的に PBS を灌流したマウスから全脳を摘出し、Golgi-Cox 溶液を含浸させた。含浸溶液は翌日に新しいものに交換し、暗所で 2 週間含浸させた後、脳組織を凍結保護溶液に移し替え、暗所、室温で保存した。1 週間のインキュベーション後、ブレグマ-1.0 mm から -3.0 mm の範囲の脳を厚さ 80 µm で切片化し、Gelatin-Coated Slides (PO101, FD Neuro Technologies) 上に配置した。暗所、室温で一晩乾燥させた後、切片は現像液での染色、エタノール勾配での脱水、Histo-Clear (HS-200, National Diagnostics) による透徹を経て、Permount medium (SP15-100-1, Falma) でマウントして観察した。画像は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV3000; Olympus) を用いて、レーザー波長 640 nm、微分干渉観察で撮影した。画像の解析は Image J 画像解析ソフトウェア (Fiji, ver1.54g) を用いた。CA1 領域の先端樹状突起における樹状突起のスパインの数を、1 個体あたり少なくとも 50 本の樹状突起について SNT (4.2.0) プラグインを使用してカウントした。

統計解析 統計解析は Excel (Microsoft, バージョン 1808) または R (バージョン 4.2.0) を用いて行った。データは平均値±標準誤差 (standard error of the mean, SEM) で示した。各群間の統計的有意差は、スチューデントの *t* 検定または一元配置分散分析 (ANOVA) により決定し、その後、チューキー・クレーマー検定による

事後比較を行った。P 値が 0.05 未満の場合、有意差があるとみなした(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

一般試薬および実験機器 Table 19, 20 に示した.

Table 19. Reagent

品名	品番 (販売元)
1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octane	#D2522-25G (Sigma)
10 x RB	#74004 (Qiagen)
100 x Glutamax	#35050-061(Thermo Fisher Scientific)
100 x Penicillin/ Streptomycin	#164-25251 (Wako)
20% Triton X-100	#12967-45 (Nacalai Tesque)
2-propanol	#166-04836 (Wako)
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	#D1306 (Thermo Fisher Scientific)
50 x B-27 supplement	#17504-004 (Thermo Fisher Scientific)
AAVpro purification kit maxi	#6666 (Takara Bio. Inc.)
Butorphanol tartrate	(Meiji seika pharma)
CD31 Micro Beads	#130-097-418 (Miltenyi Biotec)
Chloroform	#038-02606 (Wako)
DNaseI	#79254 (Qiagen)
Dulbecco's modified Eagle's medium	#12800082 (Thermo Fisher Scientific)
EDTA · 2Na	#6381-92-6 (Dojindo)
Ethanol (99.5%)	#057-00456 (Wako)
FD Rapid Golgi stain kit	#PK401 (FD Neuro Technologies)
Fetal bovine serum (FBS)	# F7524 (Sigma-Aldrich)
Glycerol	#058-00986 (Wako)
Histo-clear	#HS-200 (National Diagnostics)
KAPA SYBR Fast qPCR Mix	#KK4602 (Kapa Biosystems)

Table 19. Continued

名称 (組成)	品番 (販売元)
KCl	#163-03545 (Wako)
KH ₂ PO ₃	#166-04255 (Wako)
Luria Broth Base	#12795-027 (Thermo Fisher Scientific)
Medetomidine Hydrochloride	(Orion Pharma)
Midazolam	(Maruishi Pharmaceutical)
Myelin Removal Beads II	#130-096-733 (Miltenyi Biotec)
Na ₂ HPO ₃ · 12H ₂ O	#196-02835 (Wako)
NaCl	#191-01665 (Wako)
Neural Tissue Dissociation Kit (P)	#130-092-628 (Miltenyi Biotec)
Neurobasal medium	#21103-049 (Thermo Fisher Scientific)
Normal donkey serum	#IHR-8135 (ImmunoBioSciencecorp)
NucleoBound Xtra maxi	# 740414 (Takara Bio. Inc.)
Optimal cutting temperaturecompound	#45833 (Sakura finetek japan)
Paraformaldehyde (PFA)	#104005 (Merck)
PEI Max (in dH ₂ O, pH 7.2)	#24765-1 (Polysciences, Inc.)
Permout medium	#SP15-100-1 (Falma)
Poly-L-lysine (PLL)	# P4707 (Sigma-Aldrich)
Proteinase K	#29442-14 (Nacalai Tesque)
RNeasy Micro Kit	#74004 (Qiagen)
RT-RamDA cDNA Synthesis Kit	#RMQ-101 (Toyobo)
Sodium acetate	#192-01075 (Wako)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	#196-14045 (Wako)
Sucrose	#193-00025 (Wako)
Tris-HCl (pH 8.0)	#013-16385 (Wako)
Trypsin (2.5%)	#15090-046 (Thermo Fisher)

Table 20. Experimental Instruments

品名	型番 (製造元)
Cryostat	CMC1860 (Leica)
Confocal microscope	FV3000 (Olympus)
Microvolume Spectrophotometer	ND-2000 (SCRUM Inc.)
Thermal cycler (cDNA synthesis)	TP-600 (Takara Bio. Inc.)
Thermal cycler (qPCR)	CFX connect (Bio-rad)

参考文献

- 1) Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chetelat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM: Alzheimer's disease. LANCET, 397: 1577-1590, 2021.
- 2) Guideline: 認知症疾患診療ガイドライン 2017. 株式会社 医学書院, 2017.
- 3) Gauthier S., Rosa-Neto P., Morais JA., Webster C. World Alzheimer Report 2021. (Alzheimer's Disease International, 2021).
- 4) 厚生労働省. 令和2年（2020）患者調査. (2022).
- 5) Collaborators GBD 2019 Dementia Forecasting: Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. Lancet Public Health, 7: e105-e125, 2022.
- 6) Self W. K., Holtzman D. M.: Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease. Nat Med, 29: 2187-2199, 2023.
- 7) Cerejeira J., Lagarto L., Mukaetova-Ladinska E. B.: Behavioral and psychological symptoms of dementia. Front Neurol, 3: 73, 2012.
- 8) Kumagai R., Sonoda Y., Kowa H.: Survey on the current situation for early diagnosis of dementia and contributing factors in Japan. Psychogeriatrics, 24: 312-321, 2024.
- 9) Alzheimer A.: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. All Z Psychiatr, 64: 146-148, 1997.
- 10) White P., Hiley C. R., Goodhardt M. J., Carrasco L. H., Keet J. P., Williams I. E., Bowen D. M.: Neocortical cholinergic neurons in elderly people. Lancet, 1: 668-671, 1977.
- 11) Davies P., Maloney A. J.: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. Lancet, 2: 1403, 1976.
- 12) Dawson G. R., Iversen S. D.: The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory. Behav Brain Res, 57: 143-153, 1993.
- 13) エーザイ株式会社. 医薬品インタビューフォーム_アリセプト. (2024).

- 14) Pellegrini J. W., Lipton S. A.: Delayed administration of memantine prevents N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity. *Ann Neurol*, 33: 403-407, 1993.
- 15) Kishi T., Matsunaga S., Oya K., Nomura I., Ikuta T., Iwata N.: Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Alzheimers Dis*, 60: 401-425, 2017.
- 16) Jack C. R., Bennett D. A., Blennow K., Carrillo M. C., Dunn B., Haeberlein S. B., Holtzman D. M., Jagust W., Jessen F., Karlawish J., Liu E., Molinuevo J. L., Montine T., Phelps C., Rankin K. P., Rowe C. C., Scheltens P., Siemers E., Snyder H. M., Sperling R., Contributors: NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14: 535-562, 2018.
- 17) Belder C. R. S., Boche D., Nicoll J. A. R., Jaunmuktane Z., Zetterberg H., Schott J. M., Barkhof F., Fox N. C.: Brain volume change following anti-amyloid β immunotherapy for Alzheimer's disease: amyloid-removal-related pseudo-atrophy. *Lancet Neurol*, 23: 1025-1034, 2024.
- 18) Taipa R., Pinho J., Melo-Pires M.: Clinico-pathological correlations of the most common neurodegenerative dementias. *Front Neurol*, 3: 68, 2012.
- 19) Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K.: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 4245-4249, 1985.
- 20) Glenner G. G., Wong C. W.: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120: 885-890, 1984.
- 21) Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina N., Ihara Y.: Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13: 45-53, 1994.
- 22) Ihara Y., Nukina N., Miura R., Ogawara M.: Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem*, 99: 1807-1810, 1986.
- 23) Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y. C., Quinlan M., Wisniewski H. M., Binder L. I.:

- Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 4913-4917, 1986.
- 24) Liu P. P., Xie Y., Meng X. Y., Kang J. S.: History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther*, 4: 29, 2019.
 - 25) Frisoni G. B., Altomare D., Thal D. R., Ribaldi F., van der Kant R., Ossenkoppele R., Blennow K., Cummings J., van Duijn C., Nilsson P. M., Dietrich P. Y., Scheltens P., Dubois B.: The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat Rev Neurosci*, 23: 53-66, 2022.
 - 26) Granzotto A., Sensi S. L.: Once upon a time, the Amyloid Cascade Hypothesis. *Ageing Res Rev*, 93: 102161, 2024.
 - 27) Selkoe D. J., Hardy J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8: 595-608, 2016.
 - 28) Goate A., Chartier-Harlin M. C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L.: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349: 704-706, 1991.
 - 29) Lewis J., Dickson D. W., Lin W. L., Chisholm L., Corral A., Jones G., Yen S. H., Sahara N., Skipper L., Yager D., Eckman C., Hardy J., Hutton M., McGowan E.: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293: 1487-1491, 2001.
 - 30) Hardy J. A., Higgins G. A.: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256: 184-185, 1992.
 - 31) Kepp K. P., Robakis N. K., Høilund-Carlsen P. F., Sensi S. L., Vissel B.: The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain*, 146: 3969-3990, 2023.
 - 32) Sinha S., Lieberburg I.: Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 11049-11053, 1999.
 - 33) Yu H. B., Li Z. B., Zhang H. X., Wang X. L.: Role of potassium channels in Aβ(1-40)-activated apoptotic pathway in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res*, 84: 1475-1484, 2006.

- 34) Puzzo D., Privitera L., Leznik E., Fà M., Staniszewski A., Palmeri A., Arancio O.: Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*, 28: 14537-14545, 2008.
- 35) Puzzo D., Privitera L., Fa' M., Staniszewski A., Hashimoto G., Aziz F., Sakurai M., Ribe E. M., Troy C. M., Mercken M., Jung S. S., Palmeri A., Arancio O.: Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol*, 69: 819-830, 2011.
- 36) Morley J. E., Farr S. A., Banks W. A., Johnson S. N., Yamada K. A., Xu L.: A physiological role for amyloid-beta protein:enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*, 19: 441-449, 2010.
- 37) Brothers H. M., Gosztyla M. L., Robinson S. R.: The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10: 118, 2018.
- 38) Shi Q., Gutierrez R. A., Bhat M. A.: Microglia, Trem2, and Neurodegeneration. *Neuroscientist*: 10738584241254118, 2024.
- 39) Ries M., Sastre M.: Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*, 8: 160, 2016.
- 40) Iwata N., Higuchi M., Saido T. C.: Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther*, 108: 129-148, 2005.
- 41) Reeves B. C., Karimy J. K., Kundishora A. J., Mestre H., Cerci H. M., Matouk C., Alper S. L., Lundgaard I., Nedergaard M., Kahle K. T.: Glymphatic System Impairment in Alzheimer's Disease and Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus. *Trends Mol Med*, 26: 285-295, 2020.
- 42) Ishida K., Yamada K., Nishiyama R., Hashimoto T., Nishida I., Abe Y., Yasui M., Iwatsubo T.: Glymphatic system clears extracellular tau and protects from tau aggregation and neurodegeneration. *J Exp Med*, 219, 2022.
- 43) Ono K., Yamada M.: Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 117: 19-28, 2011.

- 44) Viola K. L., Klein W. L.: Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*, 129: 183-206, 2015.
- 45) Belyaev N. D., Kellett K. A., Beckett C., Makova N. Z., Revett T. J., Nalivaeva N. N., Hooper N. M., Turner A. J.: The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a $\{\beta\}$ -secretase-dependent pathway. *J Biol Chem*, 285: 41443-41454, 2010.
- 46) Hick M., Herrmann U., Weyer S. W., Mallm J. P., Tschäpe J. A., Borgers M., Mercken M., Roth F. C., Draguhn A., Slomianka L., Wolfer D. P., Korte M., Müller U. C.: Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPs α in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol*, 129: 21-37, 2015.
- 47) Müller U. C., Deller T., Korte M.: Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*, 18: 281-298, 2017.
- 48) Hunter S., Brayne C.: Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*, 23: 81-93, 2018.
- 49) 斉藤 貴志, 西道 隆臣: アルツハイマー病のモデルマウス. *Folia. Pharmacol. Jpn.*, 144: 250-252, 2014.
- 50) Jonsson T., Atwal J. K., Steinberg S., Snaedal J., Jonsson P. V., Bjornsson S., Stefansson H., Sulem P., Gudbjartsson D., Maloney J., Hoyte K., Gustafson A., Liu Y., Lu Y., Bhangale T., Graham R. R., Huttenlocher J., Bjornsdottir G., Andreassen O. A., Jönsson E. G., Palotie A., Behrens T. W., Magnusson O. T., Kong A., Thorsteinsdottir U., Watts R. J., Stefansson K.: A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488: 96-99, 2012.
- 51) Qian Z., Li Y., Ye K.: Advancements and challenges in mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 30: 1152-1164, 2024.
- 52) Wang H., Li R., Shen Y.: β -Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 34: 215-225, 2013.
- 53) Marquer C., Devaues V., Cossec J. C., Liot G., Lécart S., Saudou F., Duyckaerts C., Lévêque-Fort S., Potier M. C.: Local cholesterol increase triggers amyloid precursor

- protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J*, 25: 1295-1305, 2011.
- 54) Suguna K., Padlan E. A., Smith C. W., Carlson W. D., Davies D. R.: Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 7009-7013, 1987.
 - 55) Polanco J. C., Li C., Bodea L. G., Martinez-Marmol R., Meunier F. A., Götz J.: Amyloid- β and tau complexity - towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nat Rev Neurol*, 14: 22-39, 2018.
 - 56) Takami M., Nagashima Y., Sano Y., Ishihara S., Morishima-Kawashima M., Funamoto S., Ihara Y.: gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci*, 29: 13042-13052, 2009.
 - 57) Portelius E., Price E., Brinkmalm G., Stiteler M., Olsson M., Persson R., Westman-Brinkmalm A., Zetterberg H., Simon A. J., Blennow K.: A novel pathway for amyloid precursor protein processing. *Neurobiol Aging*, 32: 1090-1098, 2011.
 - 58) Haass C., Selkoe D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 101-112, 2007.
 - 59) Willbold D., Strodel B., Schröder G. F., Hoyer W., Heise H.: Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids. *Chem Rev*, 121: 8285-8307, 2021.
 - 60) Perluigi M., Di Domenico F., Butterfield D. A.: Oxidative damage in neurodegeneration: roles in the pathogenesis and progression of Alzheimer disease. *Physiol Rev*, 104: 103-197, 2024.
 - 61) Lee S. J., Nam E., Lee H. J., Savelieff M. G., Lim M. H.: Towards an understanding of amyloid- β oligomers: characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chem Soc Rev*, 46: 310-323, 2017.
 - 62) Hansson Petersen C. A., Alikhani N., Behbahani H., Wiehager B., Pavlov P. F.,

- Alafuzoff I., Leinonen V., Ito A., Winblad B., Glaser E., Ankarcrona M.: The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 13145-13150, 2008.
- 63) Arbor S. C., LaFontaine M., Cumbay M.: Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med*, 89: 5-21, 2016.
- 64) Han S., Kollmer M., Markx D., Claus S., Walther P., Fändrich M.: Amyloid plaque structure and cell surface interactions of β -amyloid fibrils revealed by electron tomography. *Sci Rep*, 7: 43577, 2017.
- 65) Gómez-Isla T., Frosch M. P.: Lesions without symptoms: understanding resilience to Alzheimer disease neuropathological changes. *Nat Rev Neurol*, 18: 323-332, 2022.
- 66) Cheng Y. L., Choi Y., Sobey C. G., Arumugam T. V., Jo D. G.: Emerging roles of the γ -secretase-notch axis in inflammation. *Pharmacol Ther*, 147: 80-90, 2015.
- 67) Extance A.: Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat Rev Drug Discov*, 9: 749-751, 2010.
- 68) Coric V., Salloway S., van Dyck C. H., Dubois B., Andreasen N., Brody M., Curtis C., Soininen H., Thein S., Shiovitz T., Pilcher G., Ferris S., Colby S., Kerselaers W., Dockens R., Soares H., Kaplita S., Luo F., Pachai C., Bracoud L., Mintun M., Grill J. D., Marek K., Seibyl J., Cedarbaum J. M., Albright C., Feldman H. H., Berman R. M.: Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*, 72: 1324-1333, 2015.
- 69) Sakamoto K., Matsuki S., Matsuguma K., Yoshihara T., Uchida N., Azuma F., Russell M., Hughes G., Haeberlein S. B., Alexander R. C., Eketjäll S., Kugler A. R.: BACE1 Inhibitor Lanabecestat (AZD3293) in a Phase 1 Study of Healthy Japanese Subjects: Pharmacokinetics and Effects on Plasma and Cerebrospinal Fluid A β Peptides. *J Clin Pharmacol*, 57: 1460-1471, 2017.
- 70) Timmers M., Streffer J. R., Russu A., Tominaga Y., Shimizu H., Shiraishi A., Tatikola K., Smekens P., Börjesson-Hanson A., Andreasen N., Matias-Guiu J., Baquero M., Boada M., Tesseur I., Tritsmans L., Van Nueten L., Engelborghs S.:

- Pharmacodynamics of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor in patients with early Alzheimer's disease: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Alzheimers Res Ther*, 10: 85, 2018.
- 71) Neumann U., Ufer M., Jacobson L. H., Rouzade-Dominguez M. L., Huledal G., Kolly C., Löönd R. M., Machauer R., Veenstra S. J., Hurth K., Rueeger H., Tintelnot-Blomley M., Staufenbiel M., Shimshek D. R., Perrot L., Frieauff W., Dubost V., Schiller H., Vogg B., Beltz K., Avrameas A., Kretz S., Pezous N., Rondeau J. M., Beckmann N., Hartmann A., Vormfelde S., David O. J., Galli B., Ramos R., Graf A., Lopez Lopez C.: The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med*, 10, 2018.
 - 72) Lynch Shau Yu, Kaplow June, Zhao Jim, Dahadda Shobha, Luthman Johan, Albala Bruce: ELENBECESTAT, E2609, A BACE INHIBITOR: RESULTS FROM A PHASE-2 STUDY IN SUBJECTS WITH MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND MILD-TO-MODERATE DEMENTIA DUE TO ALZHEIMER'S DISEASE. *Alzheimers Dement*, 14: P1623, 2018.
 - 73) Egan M. F., Kost J., Voss T., Mukai Y., Aisen P. S., Cummings J. L., Tariot P. N., Vellas B., van Dyck C. H., Boada M., Zhang Y., Li W., Furtek C., Mahoney E., Harper Mozley L., Mo Y., Sur C., Michelson D.: Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 380: 1408-1420, 2019.
 - 74) Zeng F., Liu Y., Huang W., Qing H., Kadowaki T., Kashiwazaki H., Ni J., Wu Z.: Receptor for advanced glycation end products up-regulation in cerebral endothelial cells mediates cerebrovascular-related amyloid β accumulation after *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Neurochem*, 158: 724-736, 2021.
 - 75) 小野 賢二郎: 抗 A β 療法の現状と展望. *神経治療学*, 39: 5, 2022.
 - 76) Bateman R. J., Xiong C., Benzinger T. L., Fagan A. M., Goate A., Fox N. C., Marcus D. S., Cairns N. J., Xie X., Blazey T. M., Holtzman D. M., Santacruz A., Buckles V., Oliver A., Moulder K., Aisen P. S., Ghetti B., Klunk W. E., McDade E., Martins R. N., Masters C. L., Mayeux R., Ringman J. M., Rossor M. N., Schofield P. R., Sperling

- R. A., Salloway S., Morris J. C., Network Dominantly Inherited Alzheimer: Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 367: 795-804, 2012.
- 77) Jack C. R., Holtzman D. M.: Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron*, 80: 1347-1358, 2013.
 - 78) Jack C. R., Knopman D. S., Jagust W. J., Petersen R. C., Weiner M. W., Aisen P. S., Shaw L. M., Vemuri P., Wiste H. J., Weigand S. D., Lesnick T. G., Pankratz V. S., Donohue M. C., Trojanowski J. Q.: Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol*, 12: 207-216, 2013.
 - 79) Solomon B., Koppel R., Frankel D., Hanan-Aharon E.: Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 4109-4112, 1997.
 - 80) Taguchi H., Planque S., Nishiyama Y., Symersky J., Boivin S., Szabo P., Friedland R. P., Ramsland P. A., Edmundson A. B., Weksler M. E., Paul S.: Autoantibody-catalyzed hydrolysis of amyloid beta peptide. *J Biol Chem*, 283: 4714-4722, 2008.
 - 81) Wilcock D. M., Munireddy S. K., Rosenthal A., Ugen K. E., Gordon M. N., Morgan D.: Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis*, 15: 11-20, 2004.
 - 82) Guo X., Yan L., Zhang D., Zhao Y.: Passive immunotherapy for Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 94: 102192, 2024.
 - 83) Farlow M., Arnold S. E., van Dyck C. H., Aisen P. S., Snider B. J., Porsteinsson A. P., Friedrich S., Dean R. A., Gonzales C., Sethuraman G., DeMattos R. B., Mohs R., Paul S. M., Siemers E. R.: Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 8: 261-271, 2012.
 - 84) Doody R. S., Thomas R. G., Farlow M., Iwatsubo T., Vellas B., Joffe S., Kieburtz K., Raman R., Sun X., Aisen P. S., Siemers E., Liu-Seifert H., Mohs R., Committee Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering, Group Solanezumab Study: Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 370:

- 311-321, 2014.
- 85) Sacks C. A., Avorn J., Kesselheim A. S.: The Failure of Solanezumab - How the FDA Saved Taxpayers Billions. *N Engl J Med*, 376: 1706-1708, 2017.
- 86) Sevigny J., Chiao P., Bussière T., Weinreb P. H., Williams L., Maier M., Dunstan R., Salloway S., Chen T., Ling Y., O'Gorman J., Qian F., Arastu M., Li M., Chollate S., Brennan M. S., Quintero-Monzon O., Scannevin R. H., Arnold H. M., Engber T., Rhodes K., Ferrero J., Hang Y., Mikulskis A., Grimm J., Hock C., Nitsch R. M., Sandrock A.: The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537: 50-56, 2016.
- 87) Budd Haeberlein S., Aisen P. S., Barkhof F., Chalkias S., Chen T., Cohen S., Dent G., Hansson O., Harrison K., von Hehn C., Iwatsubo T., Mallinckrodt C., Mummery C. J., Muralidharan K. K., Nestorov I., Nisenbaum L., Rajagovindan R., Skordos L., Tian Y., van Dyck C. H., Vellas B., Wu S., Zhu Y., Sandrock A.: Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis*, 9: 197-210, 2022.
- 88) Research FDA Center for Drug Evaluation and. FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. (2021).
- 89) Biogen. Biogen to Realign Resources for Alzheimer's Disease Franchise. (2024).
- 90) Abbasi J.: Promising Results in 18-Month Analysis of Alzheimer Drug Candidate. *JAMA*, 320: 965, 2018.
- 91) van Dyck C. H., Swanson C. J., Aisen P., Bateman R. J., Chen C., Gee M., Kanekiyo M., Li D., Reyderman L., Cohen S., Froelich L., Katayama S., Sabbagh M., Vellas B., Watson D., Dhadda S., Irizarry M., Kramer L. D., Iwatsubo T.: Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 388: 9-21, 2023.
- 92) エーザイ株式会社. レケンビ点滴静注 200mg／レケンビ点滴静注 500mg. (2024).
- 93) エーザイ株式会社. EUにおけるレカネマブの承認審査状況について. (2024).
- 94) 日本イーライリリー株式会社. ケサンラ点滴静注 350mg. Vol. 2024 (2024).

- 95) Sims J. R., Zimmer J. A., Evans C. D., Lu M., Ardayfio P., Sparks J., Wessels A. M., Shcherbinin S., Wang H., Monkul Nery E. S., Collins E. C., Solomon P., Salloway S., Apostolova L. G., Hansson O., Ritchie C., Brooks D. A., Mintun M., Skovronsky D. M., Investigators TRAILBLAZER-ALZ 2: Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 330: 512-527, 2023.
- 96) Demattos R. B., Lu J., Tang Y., Racke M. M., Delong C. A., Tzaferis J. A., Hole J. T., Forster B. M., McDonnell P. C., Liu F., Kinley R. D., Jordan W. H., Hutton M. L.: A plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron*, 76: 908-920, 2012.
- 97) Iwata N., Tsubuki S., Sekiguchi M., Watanabe-Iwata K., Matsuba Y., Kamano N., Fujioka R., Takamura R., Watamura N., Kakiya N., Mihira N., Morito T., Shirotani K., Mann D. M., Robinson A. C., Hashimoto S., Sasaguri H., Saito T., Higuchi M., Saido T. C.: Metabolic resistance of A β 3pE-42, a target epitope of the anti-Alzheimer therapeutic antibody, donanemab. *Life Sci Alliance*, 7, 2024.
- 98) Hampel H., Elhage A., Cho M., Apostolova L. G., Nicoll J. A. R., Atri A.: Amyloid-related imaging abnormalities (ARIA): radiological, biological and clinical characteristics. *Brain*, 146: 4414-4424, 2023.
- 99) 岩坪 威: Alzheimer 病に対する治療法開発の最前線 : lecanemab を中心に. *神経治療学*, 41: 116-120, 2024.
- 100) Honig L. S., Barakos J., Dhadda S., Kanekiyo M., Reyderman L., Irizarry M., Kramer L. D., Swanson C. J., Sabbagh M.: ARIA in patients treated with lecanemab (BAN2401) in a phase 2 study in early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*, 9: e12377, 2023.
- 101) Castellani R. J., Shanes E. D., McCord M., Reish N. J., Flanagan M. E., Mesulam M. M., Jamshidi P.: Neuropathology of Anti-Amyloid- β Immunotherapy: A Case Report. *J Alzheimers Dis*, 93: 803-813, 2023.
- 102) 厚生労働省. 最適使用推進ガイドライン レカネマブ(遺伝子組換え). (厚

生労働省, 2023).

- 103) Pittock R. R., Aakre J. A., Castillo A. M., Ramanan V. K., Kremers W. K., Jack C. R., Vemuri P., Lowe V. J., Knopman D. S., Petersen R. C., Graff-Radford J., Vassilaki M.: Eligibility for Anti-Amyloid Treatment in a Population-Based Study of Cognitive Aging. *Neurology*, 101: e1837-e1849, 2023.
- 104) 厚生労働省. レカネマブ（レケンビ®点滴静注）について. Vol. 2024.
- 105) Haider B., Schmidt R., Schweiger C., Forstner T., Labek A., Lampl C.: Medication adherence in patients with dementia: an Austrian cohort study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 28: 128-133, 2014.
- 106) Newman D. J., Cragg G. M.: Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 83: 770-803, 2020.
- 107) Feher M., Schmidt J. M.: Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci*, 43: 218-227, 2003.
- 108) Chen Y., de Bruyn Kops C., Kirchmair J.: Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products. *J Chem Inf Model*, 57: 2099-2111, 2017.
- 109) Ertl P., Schuhmann T.: A Systematic Cheminformatics Analysis of Functional Groups Occurring in Natural Products. *J Nat Prod*, 82: 1258-1263, 2019.
- 110) Huffman B. J., Shenvi R. A.: Natural Products in the "Marketplace": Interfacing Synthesis and Biology. *J Am Chem Soc*, 141: 3332-3346, 2019.
- 111) Gao L., Yang X. N., Dong Y. X., Han Y. J., Zhang X. Y., Zhou X. L., Liu Y., Liu F., Fang J. S., Ji J. L., Gao Z. R., Qin X. M.: The potential therapeutic strategy in combating neurodegenerative diseases: Focusing on natural products. *Pharmacol Ther*, 264: 108751, 2024.
- 112) Wang X., Sun G., Feng T., Zhang J., Huang X., Wang T., Xie Z., Chu X., Yang J., Wang H., Chang S., Gong Y., Ruan L., Zhang G., Yan S., Lian W., Du C., Yang D., Zhang Q., Lin F., Liu J., Zhang H., Ge C., Xiao S., Ding J., Geng M.: Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial

- amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res*, 29: 787-803, 2019.
- 113) Syed Y. Y.: Sodium Oligomannate: First Approval. *Drugs*, 80: 441-444, 2020.
 - 114) Manzano S., Agüera L., Aguilar M., Olazarán J.: A Review on Tramiprosate (Homotaurine) in Alzheimer's Disease and Other Neurocognitive Disorders. *Front Neurol*, 11: 614, 2020.
 - 115) Aisen P. S., Gauthier S., Ferris S. H., Saumier D., Haine D., Garceau D., Duong A., Suhy J., Oh J., Lau W. C., Sampalis J.: Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch Med Sci*, 7: 102-111, 2011.
 - 116) Yamamoto S., Kayama T., Noguchi-Shinohara M., Hamaguchi T., Yamada M., Abe K., Kobayashi S.: Rosmarinic acid suppresses tau phosphorylation and cognitive decline by downregulating the JNK signaling pathway. *NPJ Sci Food*, 5: 1, 2021.
 - 117) Noguchi-Shinohara M., Hamaguchi T., Sakai K., Komatsu J., Iwasa K., Horimoto M., Nakamura H., Yamada M., Ono K.: Effects of Melissa officinalis Extract Containing Rosmarinic Acid on Cognition in Older Adults Without Dementia: A Randomized Controlled Trial. *J Alzheimers Dis*, 91: 805-814, 2023.
 - 118) Liu X., Hao W., Qin Y., Decker Y., Wang X., Burkart M., Schötz K., Menger M. D., Fassbender K., Liu Y.: Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 46: 121-131, 2015.
 - 119) Morató X., Marquié M., Tartari J. P., Lafuente A., Abdelnour C., Alegret M., Jofresa S., Buendía M., Pancho A., Aguilera N., Ibarria M., Diego S., Cuevas R., Cañada L., Calvet A., Antonio E. E., Pérez-Cordón A., Sanabria Á, de Rojas I., Nuñez-Llaves R., Cano A., Orellana A., Montreal L., Cañabate P., Rosende-Roca M., Vargas L., Bojaryn U., Ricciardi M., Ariton D. M., Espinosa A., Ortega G., Muñoz N., Lleonart N., Alarcón-Martín E., Moreno M., Preckler S., Tantinya N., Ramis M., Nogales A. B., Seguer S., Martín E., Pytel V., Valero S., Gurruchaga M., Tárraga L., Ruiz A.,

- Boada M.: A randomized, open-label clinical trial in mild cognitive impairment with EGb 761 examining blood markers of inflammation and oxidative stress. *Sci Rep*, 13: 5406, 2023.
- 120) 忠紘 竹田, 邦夫 高橋, 和季 斉藤, 義典 小林: 天然医薬資源学 第6版. 廣川書店, 東京, 2017.
- 121) Whittaker R. H.: New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163: 150-160, 1969.
- 122) Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P. M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P. B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Stalpers J. A., Vilgalys R., Aime M. C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G. L., Castlebury L. A., Crous P. W., Dai Y. C., Gams W., Geiser D. M., Griffith G. W., Gueidan C., Hawksworth D. L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R. A., Hyde K. D., Ironside J. E., Kõljalg U., Kurtzman C. P., Larsson K. H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J. M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J. D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schüssler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M. M., Winka K., Yao Y. J., Zhang N.: A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111: 509-547, 2007.
- 123) Gressler M., Löhr N. A., Schäfer T., Lawrinowitz S., Seibold P. S., Hoffmeister D.: Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. *Nat Prod Rep*, 38: 702-722, 2021.
- 124) Sandargo B., Chepkirui C., Cheng T., Chaverra-Muñoz L., Thongbai B., Stadler M., Hüttel S.: Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnol Adv*, 37: 107344, 2019.
- 125) Sharika R., Mongkolpobsin K., Rangsinth P., Prasanth M. I., Nilkhet S., Pradniwat P., Tencomnao T., Chuchawankul S.: Experimental Models in Unraveling the Biological

Mechanisms of Mushroom-Derived Bioactives against Aging- and Lifestyle-Related Diseases: A Review. *Nutrients*, 16, 2024.

- 126) Yadav S. K., Ir R., Jeewon R., Doble M., Hyde K. D., Kaliappan I., Jeyaraman R., Reddi R. N., Krishnan J., Li M., Durairajan S. S. K.: A Mechanistic Review on Medicinal Mushrooms-Derived Bioactive Compounds: Potential Mycotherapy Candidates for Alleviating Neurological Disorders. *Planta Med*, 86: 1161-1175, 2020.
- 127) Kawagishi H., Ando M., Sakamoto H., Yoshida S., Ojima F., Ishiguro Y., Ukai N., Furukawa S.: Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 32: 4561-4564, 1991.
- 128) H. Kawagishi, M. Ando, H. Sakamoto, S. Yoshida, F. Ojima, Y. Ishiguro, N. Ukai, S. Furukawa: Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Herichium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 35: 1569-1572, 1994.
- 129) Wang C., Liu X., Lian C., Ke J., Liu J.: Triterpenes and Aromatic Meroterpenoids with Antioxidant Activity and Neuroprotective Effects from. *Molecules*, 24, 2019.
- 130) Han Y., Nan S., Fan J., Chen Q., Zhang Y.: *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer's disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects. *Int J Biol Macromol*, 131: 769-778, 2019.
- 131) Gunjima K., Tomiyama R., Takakura K., Yamada T., Hashida K., Nakamura Y., Konishi T., Matsugo S., Hori O.: 3,4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway. *J Cell Biochem*, 115: 151-160, 2014.
- 132) Obara Y., Hoshino T., Marcotullio M. C., Pagiotti R., Nakahata N.: A novel cyathane diterpene, cyrneine A, induces neurite outgrowth in a Rac1-dependent mechanism in PC12 cells. *Life Sci*, 80: 1669-1677, 2007.
- 133) Prabha S., Sajad M., Hasan G. M., Islam A., Imtaiyaz Hassan M., Thakur S. C.: Recent advancement in understanding of Alzheimer's disease: Risk factors, subtypes,

- and drug targets and potential therapeutics. *Ageing Res Rev*, 101: 102476, 2024.
- 134) Moscovitch M., Nadel L., Winocur G., Gilboa A., Rosenbaum R. S.: The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol*, 16: 179-190, 2006.
 - 135) Burke S. N., Barnes C. A.: Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends Neurosci*, 33: 153-161, 2010.
 - 136) Corkin S., Amaral D. G., González R. G., Johnson K. A., Hyman B. T.: H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci*, 17: 3964-3979, 1997.
 - 137) Papez J. W.: A proposed mechanism of emotion. 1937. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 7: 103-112, 1995.
 - 138) Aggleton J. P., Nelson A. J. D., O'Mara S. M.: Time to retire the serial Papez circuit: Implications for space, memory, and attention. *Neurosci Biobehav Rev*, 140: 104813, 2022.
 - 139) YAKOVLEV P. I.: Motility, behavior and the brain; stereodynamic organization and neural coordinates of behavior. *J Nerv Ment Dis*, 107: 313-335, 1948.
 - 140) Cahill L., McGaugh J. L.: Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, 21: 294-299, 1998.
 - 141) Chen Y. S., Shu K., Kang H. C.: Deep Brain Stimulation in Alzheimer's Disease: Targeting the Nucleus Basalis of Meynert. *J Alzheimers Dis*, 80: 53-70, 2021.
 - 142) Lorente De Nó R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie* 46: 113-177, 1934.
 - 143) 松本 信圭, 坂口 哲也, 池谷 裕二: 海馬回路演算の機能と意義 -基礎から最新の知見まで-. *Japanese Psychological Review*, 56: 157-185, 2013.
 - 144) Bourne J. N., Harris K. M.: Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, 31: 47-67, 2008.
 - 145) Serrano M. E., Kim E., Petrinovic M. M., Turkheimer F., Cash D.: Imaging Synaptic

- Density: The Next Holy Grail of Neuroscience? *Front Neurosci*, 16: 796129, 2022.
- 146) Honkura N., Matsuzaki M., Noguchi J., Ellis-Davies G. C., Kasai H.: The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57: 719-729, 2008.
 - 147) Leuner B., Gould E.: Structural plasticity and hippocampal function. *Annu Rev Psychol*, 61: 111-140, C111-113, 2010.
 - 148) Berry K. P., Nedivi E.: Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96: 43-55, 2017.
 - 149) Stampanoni Bassi M., Iezzi E., Gilio L., Centonze D., Buttari F.: Synaptic Plasticity Shapes Brain Connectivity: Implications for Network Topology. *Int J Mol Sci*, 20, 2019.
 - 150) Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J.: Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33: 121-129, 2010.
 - 151) Ma H., Khaled H. G., Wang X., Mandelberg N. J., Cohen S. M., He X., Tsien R. W.: Excitation-transcription coupling, neuronal gene expression and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 24: 672-692, 2023.
 - 152) Stacho M., Manahan-Vaughan D.: The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. *Front Behav Neurosci*, 16: 806356, 2022.
 - 153) Gómez-Isla T., Price J. L., McKeel D. W., Morris J. C., Growdon J. H., Hyman B. T.: Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 16: 4491-4500, 1996.
 - 154) Whitwell J. L., Przybelski S. A., Weigand S. D., Knopman D. S., Boeve B. F., Petersen R. C., Jack C. R.: 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain*, 130: 1777-1786, 2007.
 - 155) Tzioras M., McGeachan R. I., Durrant C. S., Spires-Jones T. L.: Synaptic

- degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 19: 19-38, 2023.
- 156) Scheff S. W., Price D. A., Schmitt F. A., Mufson E. J.: Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 27: 1372-1384, 2006.
 - 157) Hong S., Beja-Glasser V. F., Nfonoyim B. M., Frouin A., Li S., Ramakrishnan S., Merry K. M., Shi Q., Rosenthal A., Barres B. A., Lemere C. A., Selkoe D. J., Stevens B.: Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352: 712-716, 2016.
 - 158) Dong X. X., Wang Y., Qin Z. H.: Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 30: 379-387, 2009.
 - 159) Boros B. D., Greathouse K. M., Gentry E. G., Curtis K. A., Birchall E. L., Gearing M., Herskowitz J. H.: Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 82: 602-614, 2017.
 - 160) Dejanovic B., Sheng M., Hanson J. E.: Targeting synapse function and loss for treatment of neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 23: 23-42, 2024.
 - 161) Schaeffer S., Iadecola C.: Revisiting the neurovascular unit. *Nat Neurosci*, 24: 1198-1209, 2021.
 - 162) Cunha S., Bicker J., Sereno J., Falcão A., Fortuna A.: Blood brain barrier dysfunction in healthy aging and dementia: Why, how, what for? *Ageing Res Rev*, 99: 102395, 2024.
 - 163) Kisler K., Nelson A. R., Montagne A., Zlokovic B. V.: Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 18: 419-434, 2017.
 - 164) Yang A. C., Vest R. T., Kern F., Lee D. P., Agam M., Maat C. A., Losada P. M., Chen M. B., Schaum N., Khoury N., Toland A., Calcuttawala K., Shin H., Pálovics R., Shin A., Wang E. Y., Luo J., Gate D., Schulz-Schaeffer W. J., Chu P., Siegenthaler J. A., McNerney M. W., Keller A., Wyss-Coray T.: A human brain vascular atlas reveals

- diverse mediators of Alzheimer's risk. *Nature*, 603: 885-892, 2022.
- 165) Tan C., Lu N. N., Wang C. K., Chen D. Y., Sun N. H., Lyu H., Körbelin J., Shi W. X., Fukunaga K., Lu Y. M., Han F.: Endothelium-Derived Semaphorin 3G Regulates Hippocampal Synaptic Structure and Plasticity via Neuropilin-2/PlexinA4. *Neuron*, 101: 920-937.e913, 2019.
 - 166) Quick S., Moss J., Rajani R. M., Williams A.: A Vessel for Change: Endothelial Dysfunction in Cerebral Small Vessel Disease. *Trends Neurosci*, 44: 289-305, 2021.
 - 167) Muramatsu R., Takahashi C., Miyake S., Fujimura H., Mochizuki H., Yamashita T.: Angiogenesis induced by CNS inflammation promotes neuronal remodeling through vessel-derived prostacyclin. *Nat Med*, 18: 1658-1664, 2012.
 - 168) Lau S. F., Cao H., Fu A. K. Y., Ip N. Y.: Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117: 25800-25809, 2020.
 - 169) Naiki H., Higuchi K., Hosokawa M., Takeda T.: Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*, 177: 244-249, 1989.
 - 170) LeVine H.: Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci*, 2: 404-410, 1993.
 - 171) Förster T.: Energy migration and fluorescence. 1946. *J Biomed Opt*, 17: 011002, 2012.
 - 172) Stachel S. J., Coburn C. A., Steele T. G., Jones K. G., Loutzenhiser E. F., Gregro A. R., Rajapakse H. A., Lai M. T., Crouthamel M. C., Xu M., Tugusheva K., Lineberger J. E., Pietrak B. L., Espeseth A. S., Shi X. P., Chen-Dodson E., Holloway M. K., Munshi S., Simon A. J., Kuo L., Vacca J. P.: Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *J Med Chem*, 47: 6447-6450, 2004.
 - 173) Ben Halima S., Mishra S., Raja K. M. P., Willem M., Baici A., Simons K., Brüstle O., Koch P., Haass C., Caflisch A., Rajendran L.: Specific Inhibition of β -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Rep*, 14: 2127-

2141, 2016.

- 174) Hirohata M., Ono K., Naiki H., Yamada M.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuropharmacology*, 49: 1088-1099, 2005.
- 175) Hu L., Liu J. K.: p-Terphenyls from the basidiomycete *Thelephora aurantiotincta*. *Z Naturforsch C J Biosci*, 58: 452-454, 2003.
- 176) Ngoc Quang D., Hashimoto T., Hitaka Y., Tanaka M., Nukada M., Yamamoto I., Asakawa Y.: Thelephantins D-H: five p-terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora aurantiotincta*. *Phytochemistry*, 63: 919-924, 2003.
- 177) Quang D. N., Hashimoto T., Nukada M., Yamamoto I., Hitaka Y., Tanaka M., Asakawa Y.: Thelephantins A, B and C: three benzoyl p-terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora aurantiotincta*. *Phytochemistry*, 62: 109-113, 2003.
- 178) Liu J. K., Hu L., Dong Z. J., Hu Q.: DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. *Chem Biodivers*, 1: 601-605, 2004.
- 179) Norikura T., Fujiwara K., Narita T., Yamaguchi S., Morinaga Y., Iwai K., Matsue H.: Anticancer activities of thelephantin O and vialinin A isolated from *Thelephora aurantiotincta*. *J Agric Food Chem*, 59: 6974-6979, 2011.
- 180) Norikura T., Fujiwara K., Yanai T., Sano Y., Sato T., Tsunoda T., Kushibe K., Todate A., Morinaga Y., Iwai K., Matsue H.: p-terphenyl derivatives from the mushroom *Thelephora aurantiotincta* suppress the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells via iron chelation. *J Agric Food Chem*, 61: 1258-1264, 2013.
- 181) Onose J., Xie C., Ye Y. Q., Sugaya K., Takahashi S., Koshino H., Yasunaga K., Abe N., Yoshikawa K.: Vialinin A, a novel potent inhibitor of TNF-alpha production from RBL-2H3 cells. *Biol Pharm Bull*, 31: 831-833, 2008.
- 182) Bailly C., Vergoten G.: Binding of Vialinin A and p-Terphenyl Derivatives to Ubiquitin-Specific Protease 4 (USP4): A Molecular Docking Study. *Molecules*, 27, 2022.

- 183) Hou X., Zhu F., Ni Y., Chen T., Du J., Liu X., Han Y., Liu Y., Du W., Li Y., Wang X., Li D., Liang R., Li B., Shi G.: USP4 is pathogenic in allergic airway inflammation by inhibiting regulatory T cell response. *Life Sci*, 281: 119720, 2021.
- 184) Ye Y. Q., Koshino H., Onose J., Negishi C., Yoshikawa K., Abe N., Takahashi S.: Structural revision of thelephantin G by total synthesis and the inhibitory activity against TNF- α production. *J Org Chem*, 74: 4642-4645, 2009.
- 185) Quang D. N., Hashimoto T., Hitaka Y., Tanaka M., Nukada M., Yamamoto I., Asakawa Y.: Thelephantins I-N; p-terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Hydnellum caeruleum*. *Phytochemistry*, 65: 1179-1184, 2004.
- 186) Hu Lin, Gao Jin-Ming, Liu Jikai: Unusual Poly(phenylacetyloxy)-Substituted 1,1' : 4' ,1'' -Terphenyl Derivatives from Fruiting Bodies of the Basidiomycete *Thelephora ganbajun*. *Helvetica Chimica Acta*, 84: 3342-3349, 2001.
- 187) Radulović N., Quang D. N., Hashimoto T., Nukada M., Asakawa Y.: Terrestrins A-G: p-terphenyl derivatives from the inedible mushroom *Thelephora terrestris*. *Phytochemistry*, 66: 1052-1059, 2005.
- 188) Wang S. M., Han J. J., Ma K., Jin T., Bao L., Pei Y. F., Liu H. W.: New α -glucosidase inhibitors with p-terphenyl skeleton from the mushroom *Hydnellum concrescens*. *Fitoterapia*, 98: 149-155, 2014.
- 189) Tsukamoto S., Macabalang AD., Abe T., Hirota H., Ohta T. Thelephorin A: a new radical scavenger from the mushroom *Thelephora vialis*. Vol. 58 1103-1105 (Elsevier, Tetrahedron, 2002).
- 190) Science National Institute of Advanced Industrial, Technology and. SDBS. Vol. 2021.
- 191) Nakabayashi S., Ishikura A., Fujihara K., Hirabayashi S., Koike S., Sasaki H., Ogasawara Y., Koyama K., Kinoshita K. Inhibition of Amyloid- β Aggregation by p-Terphenyls from the Mushroom *Polyozellus multiplex* and Their Neuroprotective Effects. Vol. 104 2025-2036 (HeteroCycles, 2022).
- 192) Masuda Y., Fujihara K., Hayashi S., Sasaki H., Kino Y., Kamauchi H., Noji M., Satoh

- J. I., Takanami T., Kinoshita K., Koyama K.: Inhibition of BACE1 and Amyloid- β Aggregation by Meroterpenoids from the Mushroom. *J Nat Prod*, 84: 1748-1754, 2021.
- 193) Braak H., Braak E.: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82: 239-259, 1991.
- 194) Villa C., Lavitrano M., Salvatore E., Combi R.: Molecular and Imaging Biomarkers in Alzheimer's Disease: A Focus on Recent Insights. *J Pers Med*, 10, 2020.
- 195) Fujihara K., Koike S., Ogasawara Y., Takahashi K., Koyama K., Kinoshita K.: Inhibition of amyloid β aggregation and protective effect on SH-SY5Y cells by triterpenoid saponins from the cactus *Polaskia chichipe*. *Bioorg Med Chem*, 25: 3377-3383, 2017.
- 196) Fujihara K., Hashimoto T., Sasaki H., Koyama K., Kinoshita K.: Inhibition of A β aggregation by naphtho- γ -pyrone derivatives from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. MPUC239. *J Nat Med*, 77: 516-522, 2023.
- 197) Fujihara K., Hashimoto T., Sasaki H., Koyama K., Kinoshita K.: Correction: Inhibition of A β aggregation by naphtho- γ -pyrone derivatives from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. MPUC239. *J Nat Med*, 77: 624, 2023.
- 198) Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H.: Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 819-825, 2008.
- 199) Feng J., Zheng Y., Guo M., Ares I., Martínez M., Lopez-Torres B., Martínez-Larrañaga M. R., Wang X., Anadón A., Martínez M. A.: Oxidative stress, the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases: The critical beneficial role of dietary antioxidants. *Acta Pharm Sin B*, 13: 3988-4024, 2023.
- 200) Lin J. W., Chen J. T., Hong C. Y., Lin Y. L., Wang K. T., Yao C. J., Lai G. M., Chen R. M.: Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase

- protease pathway. *Neuro Oncol*, 14: 302-314, 2012.
- 201) Dutta B. J., Rakshe P. S., Maurya N., Chib S., Singh S.: Unlocking the therapeutic potential of natural stilbene: Exploring pterostilbene as a powerful ally against aging and cognitive decline. *Ageing Res Rev*, 92: 102125, 2023.
 - 202) Parhiz H., Roohbakhsh A., Soltani F., Rezaee R., Iranshahi M.: Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res*, 29: 323-331, 2015.
 - 203) Chang H. C., Churchwell M. I., Delclos K. B., Newbold R. R., Doerge D. R.: Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, 130: 1963-1970, 2000.
 - 204) Krasieva T. B., Ehren J., O'Sullivan T., Tromberg B. J., Maher P.: Cell and brain tissue imaging of the flavonoid fisetin using label-free two-photon microscopy. *Neurochem Int*, 89: 243-248, 2015.
 - 205) Al Rahim M., Nakajima A., Saigusa D., Tetsu N., Maruyama Y., Shibuya M., Yamakoshi H., Tomioka Y., Iwabuchi Y., Ohizumi Y., Yamakuni T.: 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. *Biochemistry*, 48: 7713-7721, 2009.
 - 206) Jaeger B. N., Parylak S. L., Gage F. H.: Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. *Mol Aspects Med*, 61: 50-62, 2018.
 - 207) Sasaguri H., Nilsson P., Hashimoto S., Nagata K., Saito T., De Strooper B., Hardy J., Vassar R., Winblad B., Saido T. C.: APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*, 36: 2473-2487, 2017.
 - 208) Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L.: A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*, 1: 345-347, 1992.
 - 209) Nilsberth C., Westlind-Danielsson A., Eckman C. B., Condron M. M., Axelman K.,

- Forsell C., Stenh C., Luthman J., Teplow D. B., Younkin S. G., Näslund J., Lannfelt L.: The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*, 4: 887-893, 2001.
- 210) Guerreiro R. J., Baquero M., Blesa R., Boada M., Brás J. M., Bullido M. J., Calado A., Crook R., Ferreira C., Frank A., Gómez-Isla T., Hernández I., Lleó A., Machado A., Martínez-Lage P., Masdeu J., Molina-Porcel L., Molinuevo J. L., Pastor P., Pérez-Tur J., Relvas R., Oliveira C. R., Ribeiro M. H., Rogaeva E., Sa A., Samaranch L., Sánchez-Valle R., Santana I., Tàrraga L., Valdivieso F., Singleton A., Hardy J., Clarimón J.: Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol Aging*, 31: 725-731, 2010.
- 211) Saito T., Matsuba Y., Mihira N., Takano J., Nilsson P., Itohara S., Iwata N., Saido T. C.: Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 17: 661-663, 2014.
- 212) Chen C. C., Lau L. F.: Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 41: 771-783, 2009.
- 213) Mo F. E., Muntean A. G., Chen C. C., Stolz D. B., Watkins S. C., Lau L. F.: CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol*, 22: 8709-8720, 2002.
- 214) Zhang Y., Chen K., Sloan S. A., Bennett M. L., Scholze A. R., O'Keefe S., Phatnani H. P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S. A., Zhang C., Daneman R., Maniatis T., Barres B. A., Wu J. Q.: An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*, 34: 11929-11947, 2014.
- 215) Noh B., Blasco-Conesa M. P., Lai Y. J., Ganesh B. P., Urayama A., Moreno-Gonzalez I., Marrelli S. P., McCullough L. D., Moruno-Manchon J. F.: G-quadruplexes Stabilization Upregulates CCN1 and Accelerates Aging in Cultured Cerebral Endothelial Cells. *Front Aging*, 2: 797562, 2021.

- 216) Dastidar S. G., Nair D.: A Ribosomal Perspective on Neuronal Local Protein Synthesis. *Front Mol Neurosci*, 15: 823135, 2022.
- 217) Körbelin J., Dogbevia G., Michelfelder S., Ridder D. A., Hunger A., Wenzel J., Seismann H., Lampe M., Bannach J., Pasparakis M., Kleinschmidt J. A., Schwaninger M., Trepel M.: A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases. *EMBO Mol Med*, 8: 609-625, 2016.
- 218) Glaser E. M., Van der Loos H.: Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods*, 4: 117-125, 1981.
- 219) Mehla J., Lacoursiere S. G., Lapointe V., McNaughton B. L., Sutherland R. J., McDonald R. J., Mohajerani M. H.: Age-dependent behavioral and biochemical characterization of single APP knock-in mouse (APP. *Neurobiol Aging*, 75: 25-37, 2019.
- 220) Barnes C. A.: Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93: 74-104, 1979.
- 221) Crouch P. J., Hung L. W., Adlard P. A., Cortes M., Lal V., Filiz G., Perez K. A., Nurjono M., Caragounis A., Du T., Laughton K., Volitakis I., Bush A. I., Li Q. X., Masters C. L., Cappai R., Cherny R. A., Donnelly P. S., White A. R., Barnham K. J.: Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 381-386, 2009.
- 222) Burgess A., Dubey S., Yeung S., Hough O., Eterman N., Aubert I., Hynynen K.: Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology*, 273: 736-745, 2014.
- 223) Yang G. P., Lau L. F.: Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ*, 2: 351-357, 1991.

- 224) Lau L. F., Nathans D.: Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J*, 4: 3145-3151, 1985.
- 225) Lau L. F.: CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein. *Cell Mol Life Sci*, 68: 3149-3163, 2011.
- 226) Barreto S. C., Ray A., Ag Edgar P.: Biological characteristics of CCN proteins in tumor development. *J BUON*, 21: 1359-1367, 2016.
- 227) Quan T., Qin Z., Voorhees J. J., Fisher G. J.: Cysteine-rich protein 61 (CCN1) mediates replicative senescence-associated aberrant collagen homeostasis in human skin fibroblasts. *J Cell Biochem*, 113: 3011-3018, 2012.
- 228) Du J., Klein J. D., Hassounah F., Zhang J., Zhang C., Wang X. H.: Aging increases CCN1 expression leading to muscle senescence. *Am J Physiol Cell Physiol*, 306: C28-36, 2014.
- 229) Crenshaw E., Leung B. P., Kwok C. K., Sharoni M., Olson K., Sebastian N. P., Ansaloni S., Schweitzer-Stenner R., Akins M. R., Bevilacqua P. C., Saunders A. J.: Amyloid Precursor Protein Translation Is Regulated by a 3'UTR Guanine Quadruplex. *PLoS One*, 10: e0143160, 2015.
- 230) Wang E., Thombre R., Shah Y., Latanich R., Wang J.: G-Quadruplexes as pathogenic drivers in neurodegenerative disorders. *Nucleic Acids Res*, 49: 4816-4830, 2021.
- 231) Vijay Kumar M. J., Morales R., Tsvetkov A. S.: G-quadruplexes and associated proteins in aging and Alzheimer's disease. *Front Aging*, 4: 1164057, 2023.
- 232) Hanna R., Flamier A., Barabino A., Bernier G.: G-quadruplexes originating from evolutionary conserved L1 elements interfere with neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 12: 1828, 2021.
- 233) Comptdaer T., Tardivel M., Schirmer C., Buée L., Galas M. C.: Cell redistribution of G quadruplex-structured DNA is associated with morphological changes of nuclei and nucleoli in neurons during tau pathology progression. *Brain Pathol*: e13262, 2024.
- 234) Ting K. K., Coleman P., Kim H. J., Zhao Y., Mulangala J., Cheng N. C., Li W., Gunatilake D., Johnstone D. M., Loo L., Neely G. G., Yang P., Götz J., Vadas M. A.,

- Gamble J. R.: Vascular senescence and leak are features of the early breakdown of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease models. *Geroscience*, 45: 3307-3331, 2023.
- 235) Cingolani L. A., Thalhammer A., Yu L. M., Catalano M., Ramos T., Colicos M. A., Goda Y.: Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by β 3 integrins. *Neuron*, 58: 749-762, 2008.
- 236) Charrier C., Machado P., Tweedie-Cullen R. Y., Rutishauser D., Mansuy I. M., Triller A.: A crosstalk between β 1 and β 3 integrins controls glycine receptor and gephyrin trafficking at synapses. *Nat Neurosci*, 13: 1388-1395, 2010.
- 237) Pozo K., Cingolani L. A., Bassani S., Laurent F., Passafaro M., Goda Y.: β 3 integrin interacts directly with GluA2 AMPA receptor subunit and regulates AMPA receptor expression in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 1323-1328, 2012.
- 238) Lilja J., Ivaska J.: Integrin activity in neuronal connectivity. *J Cell Sci*, 131, 2018.
- 239) Holt C. E., Martin K. C., Schuman E. M.: Local translation in neurons: visualization and function. *Nat Struct Mol Biol*, 26: 557-566, 2019.
- 240) Koppers M., Holt C. E.: Receptor-Ribosome Coupling: A Link Between Extrinsic Signals and mRNA Translation in Neuronal Compartments. *Annu Rev Neurosci*, 45: 41-61, 2022.
- 241) Ding Q., Markesbery W. R., Chen Q., Li F., Keller J. N.: Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 25: 9171-9175, 2005.
- 242) Cui Y., Rolova T., Fagerholm S. C.: The role of integrins in brain health and neurodegenerative diseases. *Eur J Cell Biol*, 103: 151441, 2024.
- 243) Perry V. H., Holmes C.: Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 10: 217-224, 2014.
- 244) Santello M., Toni N., Volterra A.: Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nat Neurosci*, 22: 154-166, 2019.
- 245) Babic A. M., Kireeva M. L., Kolesnikova T. V., Lau L. F.: CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor

- growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6355-6360, 1998.
- 246) Grzeszkiewicz T. M., Lindner V., Chen N., Lam S. C., Lau L. F.: The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin $\alpha(6)\beta(1)$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology*, 143: 1441-1450, 2002.
 - 247) Yan L., Chaqour B.: Cysteine-rich protein 61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2) at the crosshairs of ocular neovascular and fibrovascular disease therapy. *J Cell Commun Signal*, 7: 253-263, 2013.
 - 248) Simmnacher K., Krach F., Schneider Y., Alecu J. E., Mautner L., Klein P., Roybon L., Prots I., Xiang W., Winner B.: Unique signatures of stress-induced senescent human astrocytes. *Exp Neurol*, 334: 113466, 2020.
 - 249) Hirabayashi S., Fujihara K., Saito T., Sasaki H., Koike S., Ogasawara Y., Koyama K., Kinoshita K.: Inhibition of amyloid β aggregation and BACE1, and protective effect on SH-SY5Y cells, by p-terphenyl compounds from mushroom *Thelephora aurantiotincta*. *J Nat Med*, 79: 268-277, 2024.
 - 250) Cheng T., Zhao Y., Li X., Lin F., Xu Y., Zhang X., Li Y., Wang R., Lai L.: Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model*, 47: 2140-2148, 2007.
 - 251) Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T. R.: STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29: 15-21, 2013.
 - 252) Heinz S., Benner C., Spann N., Bertolino E., Lin Y. C., Laslo P., Cheng J. X., Murre C., Singh H., Glass C. K.: Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*, 38: 576-589, 2010.
 - 253) Love M. I., Huber W., Anders S.: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 15: 550, 2014.
 - 254) Leek J. T., Storey J. D.: Capturing heterogeneity in gene expression studies by

- surrogate variable analysis. PLoS Genet, 3: 1724-1735, 2007.
- 255) Mootha V. K., Lindgren C. M., Eriksson K. F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstråle M., Laurila E., Houstis N., Daly M. J., Patterson N., Mesirov J. P., Golub T. R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E. S., Hirschhorn J. N., Altshuler D., Groop L. C.: PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nat Genet, 34: 267-273, 2003.
- 256) Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P.: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 15545-15550, 2005.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤な御指導ならびに有益なる御助言を賜りました本学生薬学教室、高取（木下）薫教授、本学分析化学研究室、小笠原裕樹教授、および国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部、村松里衣子部長、ならびに植田堯子室長に深謝致します。本論文作成にあたり、御指導ならびに御助言を頂きました本学病態生理学研究室、蒲生修治教授、本学病態 RNA 制御学研究室、紀嘉浩教授、および本学薬効学研究室、小川泰弘准教授に深謝致します。また、終始適切なる御指導と御助言を賜りました本学生薬学教室、小山清隆名誉教授、ならびに佐々木寛朗講師、本学分析化学研究室、小池伸講師に厚く御礼申し上げます。網羅的遺伝子発現解析を行うにあたり、多大なる御協力ならびに御助言を賜りました千葉大学大学院医学研究院疾患システム医学、真鍋一郎教授に厚く御礼申し上げます。

生物活性試験を行うにあたり、多大なる御指導ならびに御助言を頂きました本学生薬学教室、藤原恒司博士、増田優紀博士、山口剛賢修士に厚く御礼申し上げます。MS スペクトルならびに各種NMR スペクトルを測定して頂きました本学機器分析センター、斎坂ゆかり准教授、小関珠美助教、ならびに山田聖子助教に厚く御礼申し上げます。

本研究において御協力ならびに御助言頂きました本学生薬学教室、中林祥子博士、齊藤丈仁学士に厚く御礼申し上げます。

最後に、いつも励まし支えて下さいました本学生薬学研究室ならびに国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部の皆様、異分野の研究の視点を与えて頂きました友人達、そして大学院への進学を後押しし、研究生活を応援し続けて下さった家族に深い感謝を申し上げます。

令和7年3月