

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 Factors to Discover a Therapeutic Agent for Alzheimer's Disease

令和3年度入学 平林 峻太郎 (Hirabayashi, Shuntaro)

Alzheimer's disease (AD)に伴う認知機能の低下は、患者および介護者の生活の質に深刻な影響を与える。認知機能低下のリスク因子は加齢であることから、社会の高齢化が進むにつれ患者数の増加が見込まれ、経済的な負担の増大も懸念されている。近年、ADの脳内で蓄積するアミロイド β ($A\beta$)に作用する抗体医薬品が承認された。しかし、治療対象となる患者は限定的であることから、異なる作用機序の治療薬の開発が求められている。本研究では、ADの新規治療法の開発に有効な知見として、 $A\beta$ 凝集抑制作用を持つ新規化合物の探索を行うと共に、 $A\beta$ とは異なる機序で神経機能低下をもたらす分子を見出すため、血管内皮細胞に由来するシナプス障害分子の探索を実施した。

1. ボタニイボタケ MeOH ext. からの抗 AD 活性化化合物の探索¹⁾

古来より天然物は創薬資源として用いられ、現在も低分子医薬品の70%は天然物に由来している。キノコは、分析技術の進展により少量の試料で解析が可能になったことで、近年新たな創薬資源として注目されている。さらに、キノコからは神経保護作用を持つ化合物が数多く見出されている。ゆえに、キノコからAD治療薬のシード化合物を発見できる可能性は十分にあると考え、そのスクリーニングを行った。

本研究では、A β による AD 病態形成機序に着目し、A β 生成酵素である β -secretase (BACE1) の阻害活性および A β の凝集抑制活性を示す化合物を探索した。BACE1 阻害活性は BACE1 FRET assay により、A β 凝集抑制活性は Th-T assay により評価した。本学生薬学研究室が所有する 64 種類のキノコから作製した抽出エキスについて、BACE1 阻害活性と A β 凝集抑制活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、ボタニイボタケ (*Thelephora aurantiotincta*) MeOH 抽出エキスは 64.7% の BACE1 阻害率と 35.3% の A β 凝集率を示した。そこで本抽出エキスを各種クロマトグラフィーにより分離したところ、7 種の化合物 (**1-7**) の単離に成功した。各化合物について、各種スペクトルにより構造解析した結果、**1-3** は Fig. 1 に示したような構造と決定し、新規化合物であったことからそれぞれ thelephantin P (**1**)、thelephantin Q (**2**)、thelephantin R (**3**) と命名した。また、**4-6** は NMR データが文献値と一致したことから、それぞれ thelephantin A (**4**)、terrestrin D (**5**)、thelephorin A (**6**)、および 4-hydroxybenzoic acid (**7**) と同定した。

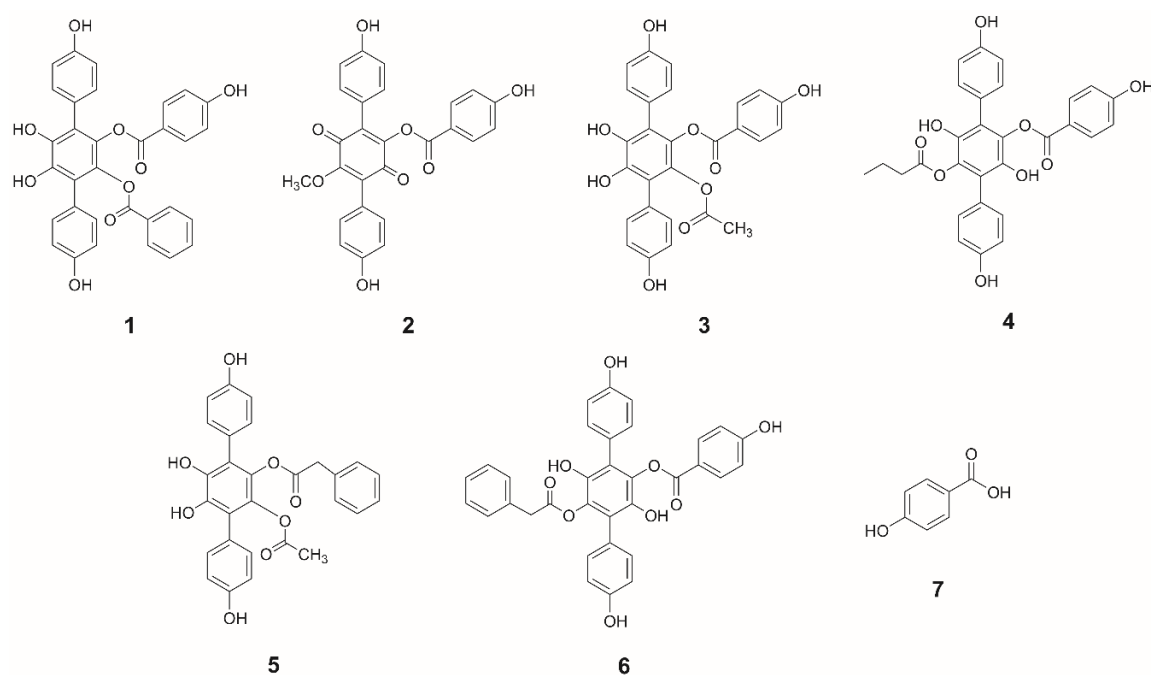


Figure 1. Compounds isolated from *T. aurantiotincta*.

次に、単離した 6 種の化合物(**1,2,4-7**)の活性を評価した (Table 1)。

BACE1 阻害活性において、**1** および **4** は、ポジティブコントロールである myricetin より弱いながら活性を示した。A β 凝集抑制活性では、**1** と **5** が myricetin に匹敵する活性を示した。各化合物の特徴を更に評価するため、A β が誘導する神経毒性に対する神経細胞保護効果を SH-SY5Y 細胞を用いて評価した結果、**1**、**2**、**5** に細胞保護効果が認められた。さらに、これら化合物の血液脳関門 (Blood-Brain Barrier, BBB)透過性を予測するために、各化合物の水／オクタノール分配係数 (logP)を求めた。その結果、**1**、**2**、**4-6** の logP 値は 4.0–6.5 であり、置換基の疎水性と相関していることが分かった (Table 1)。*p*-Terphenyl 化合物の BBB 透過性に関する報告はまだないが、天然ポリフェノールである honokiol (logP = 5.0)などが BBB を透過することが報告されている。²⁾ **1**、**2**、**4-6** は、それらと近い logP 値を持つことから、BBB を通過して脳実質へ輸送される可能性があると考えられる。

Table 1. Results of activity tests and logP values for each compound.

化合物名	A β aggregation (IC ₅₀ , μ M)	BACE1 inhibition (IC ₅₀ , μ M)	Neuro- protection (EC ₅₀ , μ M)	LogP
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 ³⁾	2.8 ⁴⁾	>25 ⁵⁾	1.2
β -Secretase Inhibitor IV	>100 ³⁾	0.015 ³⁾	-	-

2. 認知機能低下を誘導する血管内皮細胞由来因子の探索⁶⁾

認知等の脳機能は神経細胞間のネットワークにより維持されており、その接続はシナプスにより維持される。AD では、発症早期からシナプスの形態異常が認められることから、その形態異常を抑制する

ことは症状の進行の抑制に繋がる可能性が期待される。シナプスの維持や発達には脳内の様々な細胞・分子が寄与するが、その中の一つに血管系の関与があげられる。ADにおける血管系とシナプスの関連は不明であるが、AD患者由来の脳血管内皮細胞では対照群と異なる遺伝子発現を示すことが知られる。そこで本研究では、ADの脳血管内皮細胞で発現が変動する分子がシナプス形態に影響を与えるという仮説のもと、ADモデルマウスの脳血管内皮細胞における遺伝子発現変動を解析し、一部の変動遺伝子のシナプスに与える機能的な変化について検討した。ADモデルマウスとして、本研究では変異ヒト化アミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein, App)を発現する *App*^{NL-G-F} マウスを使用した。まず、ADの進行に伴い血管内皮細胞で発現変動する遺伝子を探索するため、3か月齢と6か月齢の *App*^{NL-G-F} マウスから採取した脳血管内皮細胞を用いて RNA-seq により網羅的に遺伝子発現解析した。発現増加する分子のうち、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、演者は Cellar Communication Network factor 1 (CCN1)に注目した。CCN1は細胞外マトリックスに結合し、細胞表面の様々な integrin 受容体と相互作用することにより、細胞接着、遊走、細胞老化などの細胞機能を誘導する分子である。まず、CCN1が神経細胞に与える影響を検討した。マウス初代海馬神経細胞を培養し、シナプス形成後に CCN1 を添加した。処理 24 時間後に、シナプス前終末 (Vesicular Glutamate Transporter 1, VGLUT1)、シナプス後膜 (postsynaptic density protein 95, PSD95)、および樹状突起 (Microtubule-associated protein 2, MAP2)を免疫細胞化学染色により標識・検出した。MAP2 陽性の樹状突起に接する VGLUT1 と PSD95 の共局在をシナプ

スとして定量した結果、CCN1 処理群ではシナプスの数が対象群と比較して減少した (樹上突起 10 μm あたりのスパイン数: Vehicle 群 3.7 ± 0.2 個、CCN1 100ng/mL 群 2.3 ± 0.2 個、各群 $n=3$)。このことから、CCN1 がシナプスの維持を阻害する、あるいはシナプスの障害を誘導することが示唆された。次に、CCN1 の *in vivo* での機能的な効果を解析するため、脳血管内皮細胞指向性アデノ随伴ウイルスベクター (Adeno-Associated Virus, AAV)-BR1 を用いて、血管内皮細胞の CCN1 を特異的に発現抑制する手法を確立した。同手法を 6 か月齢の *App*^{NL-G-F} マウスに適用し、Goldi-Cox 染色法を用いて海馬 CA1 領域の神経細胞を標識し、樹状突起のシナプス数を定量した。その結果、CCN1 発現抑制群では、対照群と比較してシナプス密度が高い傾向が観察された (樹上突起 10 μm あたりのスパイン数: 対照群 5.8 ± 0.6 個; CCN1 発現抑制群 8.4 ± 1.2 個、各群 $n=3$)。また、同手法を施したマウスの行動試験も実施した。バーンズ円形迷路試験において、CCN1 を発現抑制した *App*^{NL-G-F} マウスの空間学習能力は対照群と比較して有意に高かった (Fig. 2A)。新奇物体探索試験や Y 字型迷路試験 (強制選択課題)においては、CCN1 を発現抑制した *App*^{NL-G-F} マウスの作業記憶能力が対照群と比較して高い傾向が観察された (Fig. 2B,C)。

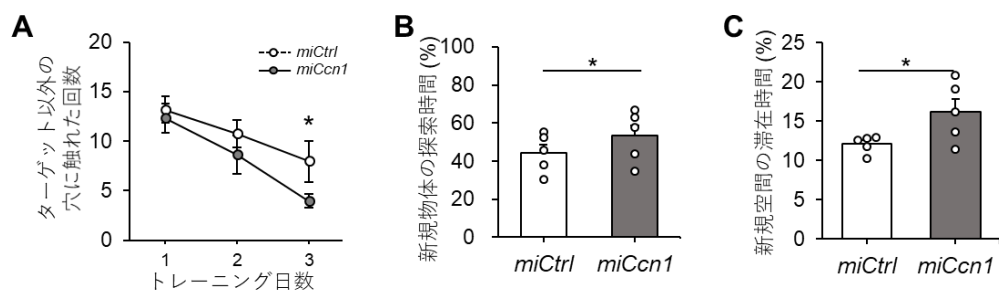


Figure 2. Cognitive function of *App*^{NL-G-F} mice suppressed *Ccn1*. Results of (A) Barnes maze (miCtrl: $n=9$, miCcn1: $n=10$), (B) novel object recognition test ($n=5$ per group), (C) Y-maze test ($n=5$ per group). Mean $\pm$ standard error is shown. * $p<0.05$ indicates two-way repeated measures analysis of variance and Tukey's post-test (A) or Student's *t*-test (B,C).

まとめとして、本研究では、新規 AD 治療薬の開発に向けて、シード化合物の探索を行うと共に、脳血管内皮細胞由来のシナプス障害分子の探索と機能解析を実施した。その結果、未開拓天然物のキノコに着目することで、A β 凝集抑制、BACE1 阻害、神経保護作用活性を示し、BBB を透過しうる thelephantin P (**1**)を発見した。¹⁾ 本化合物は、AD 病態に対する複数の活性を示すことから、広範な病期の AD 患者に投与可能な疾患修飾薬候補であり、今後、創薬に向けた研究が期待される。更に、脳血管内皮細胞と神経細胞の相互作用に着目して行った検討から、AD モデルマウスの脳血管内皮細胞で発現上昇する CCN1 が、海馬神経細胞のシナプス密度を減少させ、空間記憶障害を誘導する可能性を見出した。CCN1 がシナプス密度を減少させる機序については詳細な研究が必要であるが、本研究により、CCN1 の機能を阻害することで認知機能低下を抑制できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Hirabayashi S., Fujihara K., Saito T., Sasaki H., Koike S., Ogasawara Y., Koyama K., Kinoshita K., *J. Nat. Med.*, (2024).
- 2) Feng J., Zheng Y., Guo M., Ares I., Martínez M., Lopez-Torres B., Martínez-Larrañaga M. R., Wang X., Anadón A., Martínez M. A., *Acta. Pharm. Sin. B.*, **13**, 3988-4024 (2023).
- 3) Masuda Y., Fujihara K., Hayashi S., Sasaki H., Kino Y., Kamauchi H., Noji M., Satoh J. I., Takanami T., Kinoshita K., Koyama K., *J. Nat. Prod.*, **84**, 1748-1754 (2021).
- 4) Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 819-825 (2008).
- 5) Fujihara K., Koike S., Ogasawara Y., Takahashi K., Koyama K., Kinoshita K., *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3377-3383 (2017).
- 6) Hirabayashi S., Uyeda A., Manabe I., Yonezu Y., Saito T., Saido TC., Misawa H., Ogasawara Y., Kinoshita K., Muramatsu R., *J. Pharmacol. Sci.*, accepted.