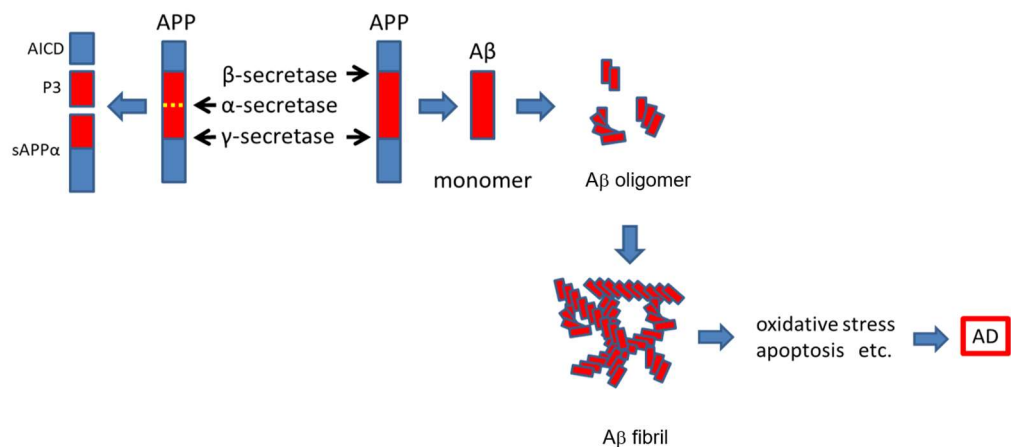


Search for anti-Alzheimer's Disease Drugs from Fruiting Bodies,
Polyozellus multiplex

令和3年度入学 中林 祥子 (Nakabayashi, Shoko)

我が国では認知症患者の急増が深刻な問題となっており、治療の必要性も高まっていくと考えられている。アルツハイマー病 (AD) は認知症の原因疾患のうち7割を占めるともいわれ、認知機能が徐々に低下していく進行性の神経変性疾患である。ADは、アミロイド前駆体タンパク質が β -secretase (BACE1) および γ -secretaseによって切断され生成するアミロイド β (A β)が凝集・蓄積することにより発症するという、アミロイドカスケード仮説が支持されている (Figure 1).¹⁾



sAPP α : secretory APP α , APP: Amyloid precursor protein, AICD: APP Intercellular domain, A β : Amyloid beta

Figure 1. Amyloid hypothesis.

昨年国内で承認を取得した抗 A β 抗体製剤である lecanemab は、アミロイドカスケード仮説が臨床的に有用であることを証明した根本的治療薬で

あり、国内において今後広くアルツハイマー病患者に普及することが期待されているが、対象患者が早期 AD 患者に限定されることや、検査および薬剤費の観点から課題は残る。そのため、安価で安全性および有効性が担保された、AD の発症機序に基づく根本的な治療法の開発は、以前として望まれている。

当研究室では AD 治療薬開発の一次スクリーニングとして A β 凝集抑制活性に注目して研究を行っている。また、キノコはシキミ酸経路、酢酸-マロン酸経路、イソプレノイド経路などの生合成経路が発達しており、他の生物種にはないユニークな二次代謝産物を数多く産生し、古くから生理活性についても注目されている点を考慮すると、新たな生理活性物質を見出せる可能性が高いと考えられる。そこで、A β 凝集抑制活性物質を見出すためにチオフラビン T (Th-T) 法を用いて当研究室保有のキノコ子実体抽出エキスのランダムスクリーニングを行い、活性の認められているカラストケ (*Polyozellus multiplex*) MeOH 抽出エキスからの探索を行った。

1. カラストケ MeOH 抽出エキスからの A β 凝集抑制活性化合物の探索

カラストケ MeOH 抽出エキスについて、Th-T 法を用いた A β 凝集抑制活性を指標に各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製を行い、7 種の化合物 (Comp. 1-7) を単離した。各種スペクトルデータを用いた構造解析の結果、Comp. 1-7 はそれぞれ polyozellin (1), kynapcin-12 (2), NSC₆₁₇₄₂₅ (3), cycloleucomelone (4), Bl-V (5), succinic acid (6) および protocatechuic acid (7) であると同定した。²⁻⁷⁾ Cycloleucomelone (4) はカラストケからの単離報告は初めてである (Figure 2)。

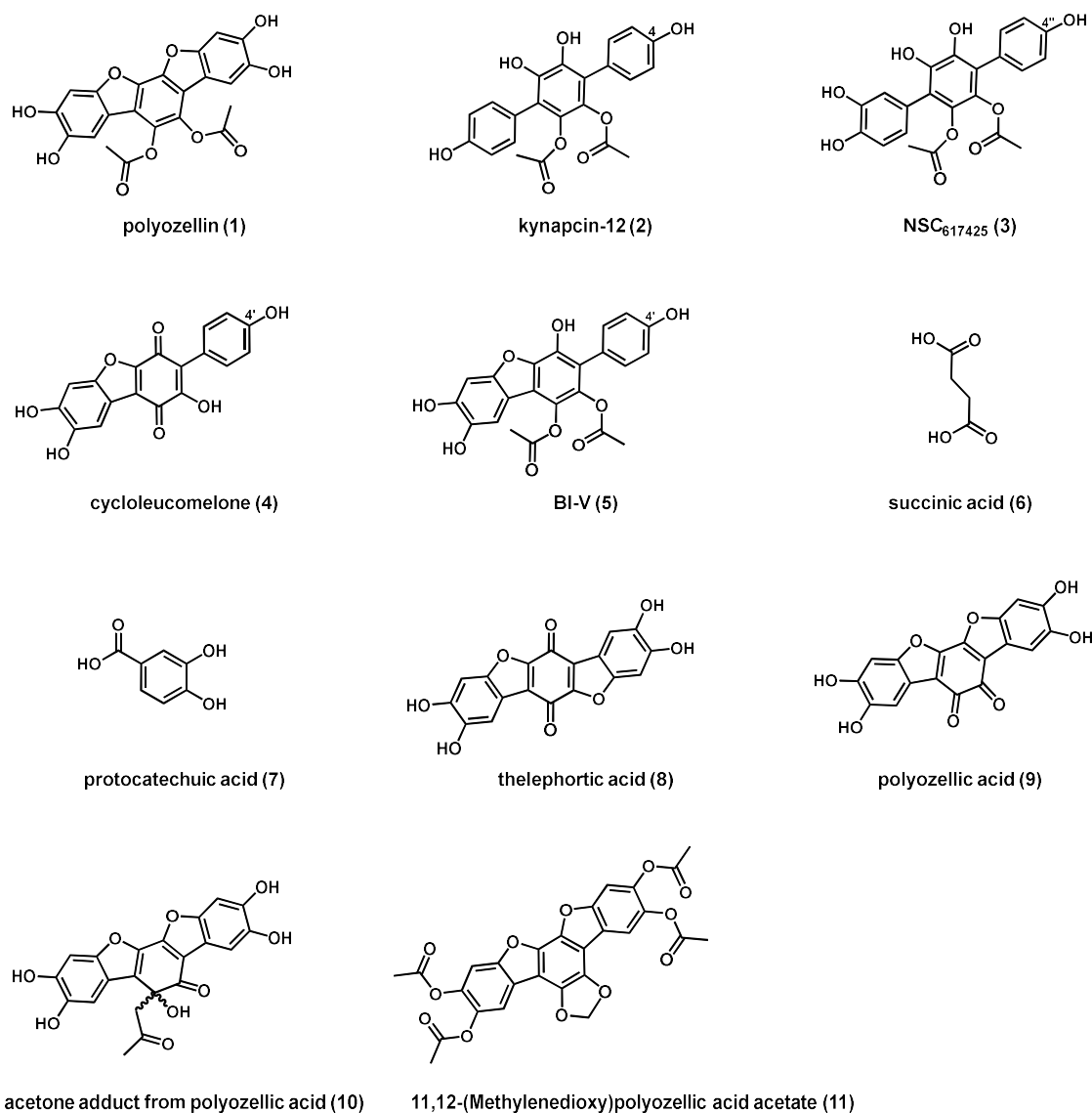


Figure 2. Structures of Comp. 1–11.

2. カラストケ由来化合物の抗 AD 活性と構造活性相関

単離した Comp. 1–7 の A β 凝集抑制活性を評価したところ、Comp. 1–5 において濃度依存的な活性が認められた (Table 1). さらに、A β 凝集抑制活性の発現において重要とされる構造的な特徴を明確にするために、研究室で保管をしていた *p*-terphenyl 化合物 (Comp. 8–11), すなわち thelephoric acid (8), polyozellic acid (9), acetone adduct from polyozellic acid (10), 11,12-(methylenedioxy)polyozellic acid acetate (11) についても A β 凝集抑制活性を評価した (Figure 2). その結果、Comp. 8–11 においても濃度依存的な A β 凝集抑制活性が認められた (Table 1).

本研究で得られた知見から構造活性相関を検討すると、カテコール構造が活性発現に重要であることが考えられた。カテコール構造または C4, C4' または C4'' 位にフェノール性水酸基が存在する Comp. 1-5 および Comp. 8-10 は、フェノール性水酸基をすべてアセチル化した polyozellin 誘導体 11 に比べ活性が高い傾向がみられたため、その構造が重要であることが示唆された。また、カテコール構造を含むが *p*-terphenyl 構造を持たない Comp. 7 は活性を示さなかったことより、活性発現には *p*-terphenyl 構造を有することも重要であることが示唆された。

また、各化合物について BACE1 阻害活性についても検討した結果、Comp. 4 と Comp. 10 で濃度依存的な活性を確認した (Table 1)。

Table 1. A β aggregation and BACE1 inhibitory activities of Comp. 1- 11.

	A β aggregation IC ₅₀ (μ M, n=3)	BACE1 IC ₅₀ (μ M, n=3)
1	0.615	3.08 ⁹⁾
2	6.76	15.79 ⁹⁾
3	6.45	>100
4	2.17	66.62
5	3.61	>100
6	>100	>100
7	>100	>100
8	12.62	3.50 ⁹⁾
9	1.29	4.78 ⁹⁾
10	1.96	34.49
11	21.61	>100
myricetin ^a	9.9 ⁸⁾	2.8 ¹⁰⁾
inhibitor IV ^b	>100 ⁸⁾	0.015 ⁸⁾

^aMyricetin was used as a positive control for the inhibitory activity of A β aggregation. ^bInhibitor IV was used as a positive control for BACE1 inhibitory activity.

3. ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いた A β による毒性の軽減効果

A β 凝集抑制活性試験において、カラスタケより得られた *p*-terphenyl 類に A β 凝集抑制活性が認められたので、次にヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて A β の毒性を軽減する効果の検討を行った。活性を評価する

Comp. 1-7 については、はじめに SH-SY5Y 細胞への毒性を検討し、各化合物について SH-SY5Y 細胞が 80% 以上の細胞生存率を示す濃度で A β による神経細胞毒性を軽減する効果の検討を行うこととした (Figure 3).

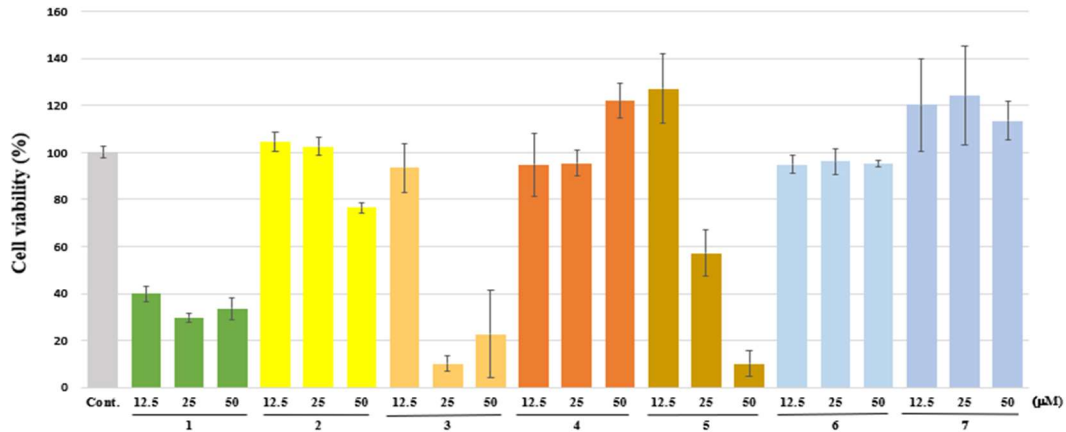


Figure 3. Cytotoxicity of Comp. 1-7 on SH-SY5Y cells.

その結果、Comp. 2-5 において、細胞生存率が有意に改善し濃度依存的であった (Figure 4).

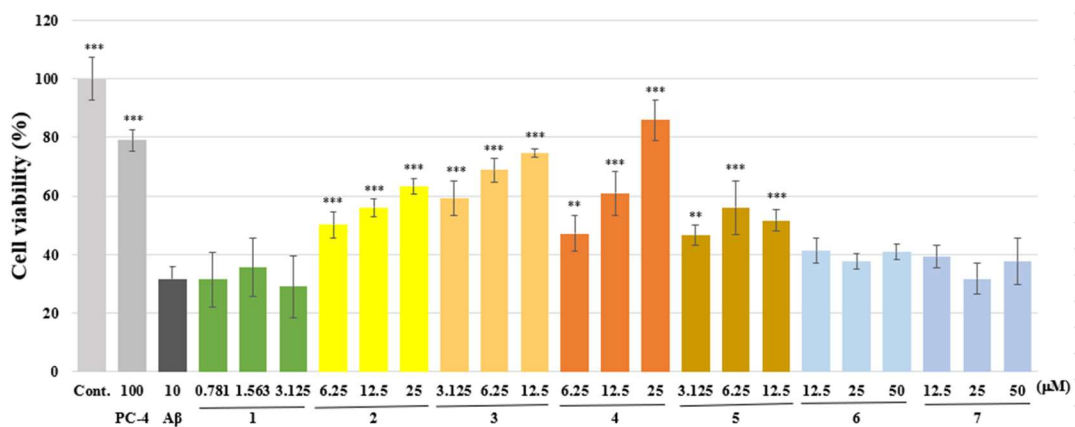


Figure 4. Protective effects of Comp. 1-7 on SH-SY5Y cells against A β toxicity.

Comp. 2-5 は *p*-terphenyl 構造と C4, C4' または C4'' にフェノール性水酸基を有しており、この構造は A β 凝集抑制活性だけでなく、神経保護効果の発現にも重要であることが示唆された。*p*-Terphenyl 構造の重要性については、カテコール構造を含むが *p*-terphenyl 構造を持たない Comp. 7 は活性を示さなかったことから支持された。また、A β 凝集抑制活性が見られた Comp. 1 は A β の毒性に対する神経保護効果は示さなかった。これは

Comp. 1 の SH-SY5Y 細胞への毒性が強かったため、神経保護効果を示せる濃度を投与出来なかった可能性がある。

5.結語

以上、カラスタケ MeOH 抽出エキスからの AD 治療薬の探索を目指し、A β 凝集抑制活性を指標に 7 種の化合物 (Comp. 1-7) を単離し、構造を明らかにした。Comp. 1-7 の A β 凝集抑制活性を評価したところ Comp. 1-5 において活性が認められた。また、Comp. 2-5 の神経保護効果も明らかにした。さらに研究室で保有していた 4 種の *p*-terphenyl 化合物と合わせて構造活性相関についても検討したところ、*p*-terphenyl 構造とカテコール構造または C4, C4' または C4'' 位にフェノール性水酸基を有していることが活性発現に重要な条件であることが示唆された。今後の課題として、より詳細な構造活性相関や神経保護作用の見られた化合物がどのようにその作用を発揮しているのかは検討していく必要がある。

6.参考文献

- 1) Hardy J. A.; Higgins G. A., *Science*, **256**, 184-185 (1992).
- 2) Nakabayashi S., Ishikura A., Fujihara K., Hirabayashi S., Koike S., Sasaki H., Ogasawara Y., Koyama K., Kinoshita K., *Heterocycles*, **104**, 2025-2036 (2022).
- 3) Takahashi S., Kawano T., Nakajima N., Suda Y., Usukhbayar N., Kimura K., Koshino H., *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **28**, 930-933 (2018).
- 4) Takahashi S., Yoshida A., Uesugi S., Hongo Y., Kimura K., Matsuoka K., Koshino H., *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **24**, 3373-3376 (2014).
- 5) Tringali C., Piattelli M., Geraci C., Nicolosi G., Rocco C., *Can. J. Chem.*, **65**, 2369-2372(1987).
- 6) Jagers E., Hillen-Maske E., Steglich W., *Z. Naturforsch*, **42b**, 1349-1353 (1987).
- 7) Takahashi A., Kudo R., Kusano G., Nozoe S., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3194-3196 (1992).
- 8) 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).
- 9) Chon S.H., Yang E.J., Lee T., Song K.S., *Food Funct.*, **7**, 3834-3842 (2016).
- 10) Shimmyo Y., Kihara T., Akaike A., Niidome T., Sugimoto H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 819-825 (2008).