

氏名 (生年月日) や の ま み こ
矢野 真実子 (1991年3月23日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬第193号

学位授与の日付 2020年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 アポルフィン型アルカロイド *N*-methylasimilobine, asimilobine およびカルバゾール型アルカロイド 9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol の神経様突起伸展促進作用

論文審査委員 (主査) 教授 松田 久司

(副査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 渡辺 徹志

論文内容の要旨

序論

アルツハイマー型認知症患者数は、高齢化に伴い増加しており、2012年に462万人を超え、2025年には730万人に達すると見込まれている。臨床で処方される治療薬は対症療法的作用に留まっており、根本的治療薬が切望されている。そこで根本的な治療薬開発のアプローチとして、神経幹細胞を神経細胞へと分化させる「神経新生」に着目した。死滅した神経細胞を「神経新生」により補完することでアルツハイマー型認知症などの神経変性疾患の治療が可能になると考え、まずラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC-12 細胞を用いた神経様突起伸展促進作用を検討した。過去約5年間の天然物由来化合物の神経様突起伸展促進作用に関する報告のうち、72.4%で血液脳関門 (BBB) 透過性が確認されておらず、これらの化合物を基にした医薬品開発が進められていない原因の一つと考えられる。一方で、アルカロイドは日本の中枢神経用薬では89.6%を占める (2019年時点) ことから、BBB 透過を前提とした中枢神経用薬のシード化合物として有望であると考えられた。

アポルフィン型アルカロイドである magnoflorine は、*in vivo* で強制水泳試験および尾懸垂試験での抗うつ作用が報告され、神経新生への作用が期待できるが、単独では BBB を透過しないため、リン脂質との複合体を作成して行われた研究であった。また、神経新生作用に関する *in vitro* 試験での詳細な報告がないという点でも、研究が不十分であると言える。一方、カルバゾール型アルカロイドである P7C3 は、*in vivo* 試験で海馬歯状回での神経新生促進作用およびニューロン保護作用を示し、BBB を透過することも報告されている。しかしながら、直接神経細胞に作用し、神経新生を促すかどうかを検討した *in vitro* 試験での報告はない。このように、単独で神経新生と BBB 透過性の両方を満たす報告はないものの、これら2種の化合物の誘導体は有望な候補と考えられたことから、本研究では関連化合物を多種含有するハスおよびオオバゲッキツを研究素材とした。

第1章 ハス (*Nelumbo nucifera*) 花部含有アポルフィン型アルカロイドの神経様突起伸展促進作用と血液脳関門透過性

中枢神経系へ作用する化合物の探索では BBB 透過性が大きな課題であることから、まず *in vivo* 試験と相関性の高い *in vitro* BBB モデルを用いてエキス全体での BBB 透過性成分の作用の有無について検討した。ハス花部メタノール抽出エキスのうち *in vitro* BBB モデルを透過した培養液を神経細胞様

PC-12 細胞に付した。細胞の直径以上の突起伸展を示した細胞を陽性とし、その割合を陽性率 (%) としたところ、透過前の濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の培養液で有意な突起伸展促進作用を示した (陽

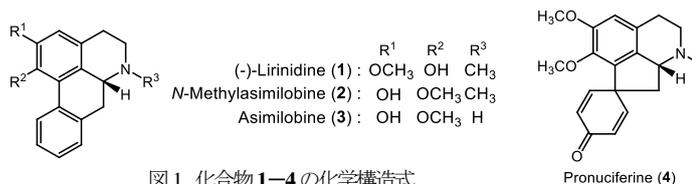
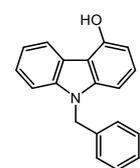


図1. 化合物1-4の化学構造式

性率: control 群 5.5% に対し透過培養液処理群 10.2%, $p=0.007$). このことから BBB 透過性をもつ突起伸展促進化合物がハス花部に含有される可能性が考えられた. 次に含有アルカロイド (図1) について突起伸展促進作用の検討を行い, (-)-lirinidine (1, 陽性率: control 群 2.7% に対し 10 μM 処理群 5.0%, $p=0.049$), N-methylasimilobine (2, 陽性率: control 群 4.3% に対し 10 μM 処理群 7.9%, $p=0.014$), asimilobine (3, 陽性率: control 群 2.9% に対し 10 μM 処理群 6.9%, $p=0.004$) および pronuciferine (4, 陽性率: control 群 2.9% に対し 10 μM 処理群 5.8%, $p=0.021$) に有意な作用を見出した. 構造と作用の比較検討から 1 位または 2 位の水酸基が作用発現に関与すると考えられた. 作用成分の作用様式の解明を目的とし, tropomyosin receptor kinase A (TrkA), guanine nucleotide exchange factor のひとつである Vav3 および ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) の mRNA 発現量の変化について検討した. 化合物 1 および 2 は, 0.1 μM および 1 μM で各 mRNA 発現量を増加させ, ジエチルエーテル可溶性アルカロイド集約画分も同様の作用を示したことから, 本作用様式はアポルフィン型アルカロイドに共通することが示唆された. また, 2, 3 および 4 の BBB 透過性を LC-MS にて分析したところ, 2 および 3 に良好な透過性を確認した (順に $3.00 \pm 0.42\%$ および $2.11 \pm 0.74\%$). なお, BBB 透過性の比較対照薬には caffeine を用いた ($5.35 \pm 0.17\%$).

第2章 オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部含有カルバゾール型アルカロイドおよびカルバゾール誘導体の神経様突起伸展促進作用と認知記憶力への作用

オオバゲッキツ葉部メタノール抽出エキスのうち *in vitro* BBB モデルを透過した画分が突起伸展促進傾向を示した (陽性率: control 群 3.1% に対し 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群 4.8%, $p=0.111$) ことから, BBB 透過性と突起伸展促進作用の両方を有する成分の存在が示唆された. 次に 9 種の含有カルバゾール型アルカロイドのうち, murrayamine-E (陽性率: control 群 4.1% に対し 10 μM 処理群 7.2%, $p=0.021$) に同作用を見出した. また, 構造と作用について比較した上で合成した 9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (5, 陽性率: control 群 3.1% に対し 1 μM 処理群 4.9%, $p=0.079$) に突起伸展促進傾向が認められた. 家族性アルツハイマー病の変異遺伝子を過剰発現させた遺伝子導入アルツハイマー型認知症モデルマウスである APP^{swe}/PS1^{dE9} マウス (雌, 6-7 ヶ月齢) に 5 (10 mg/kg) を 30 日間腹腔内投与したところ, モーリス水迷路試験で成績の上昇傾向 (逃避台のあった場所を横切った回数: control 群 1.20 回に対し 5 投与群 2.25 回, $p=0.08$) がみられ, 5 に空間認知力の改善傾向が認められた.



9-Benzyl-9H-carbazol-4-ol (5)

図2. 化合物5の化学構造式

総括

本研究では, ハス花部由来 N-methylasimilobine (2) および asimilobine (3) が神経様突起伸展促進作用および BBB 透過性を, またオオバゲッキツ葉部由来 murrayamine-E が神経様突起伸展促進作用を有することを見出した. さらに, カルバゾール誘導体 9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (5) が神経様突起伸展促進作用や *in vivo* での空間認知記憶力改善傾向を示すことを明らかにし, 2, 3 および 5 を認知症治療リード化合物として提案できた. 予め BBB 透過性成分の神経様突起伸展促進作用を明らかにした上で詳細な研究を行うことで, 従来の天然物からの化合物探索研究の課題であった脳への移行性と作用の観点から有望な物質を見出した点は, 今後の中枢神経系医薬品のリード化合物探索研究の効率化の一

助になると考えられる。

審査の結果の要旨

アルツハイマー型認知症患者数は近年増加するものの、治療薬は対症療法的作用を示すもののみであり、根本的治療薬はない。一方で認知症の発症原因・過程に関しては諸説あるものの完全には解明されていない。そこで申請者は根本的な治療アプローチとして、神経幹細胞を神経細胞へと分化させる「神経新生」の促進に着目した。神経細胞死や機能障害などにより不足した、成熟した神経細胞を「神経新生」により補うことで、発症仮説に関わらず、アルツハイマー型認知症を含む神経変性疾患の治療が可能になると考えた。一方で、中枢神経薬開発では血液脳関門 (BBB) 透過性が度々問題点となるが、日本の中枢神経用薬では含窒素化合物が 2019 年の時点で 89.6% を占めている。この点から着想を得て、本研究では含窒素化合物の中でもとりわけ植物由来のアルカロイド成分に着目し、BBB 透過を前提とした中枢神経用薬のシード化合物候補として研究が行われた。申請者はまた、神経新生に必要と考えられる神経成長因子 (NGF) と同様の作用もしくは NGF の作用を促進する成分を見出すため、形態変化に NGF が重要な役割を担う PC-12 細胞を用いて、神経様突起伸展促進作用を検討した。

1) ハス (*Nelumbo nucifera*) 花部含有血液脳関門透過性アポルフィン型アルカロイドの神経様突起伸展促進作用

ハス花部メタノール抽出エキスのうち *in vitro* BBB モデルを透過した培養液を PC-12 細胞に付したところ、細胞の直径以上の突起伸展を示したものを陽性とした場合、エキスの一部の成分が透過したと考えられる培養液で有意な突起伸展促進作用が観察された。含有成分の中では (-)-lirinidine、*N*-methylassimilobine、*asimilobine* および *pronuciferine* などのアポルフィン型アルカロイドに有意な作用を見出した。(-)-Lirinidine、*N*-methylassimilobine およびアルカロイド成分の集約したジエチルエーテル可溶性画分は、0.1 および 1 μM (画分の場合 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で tropomyosin receptor kinase A (TrkA)、guanine nucleotide exchange factor (Vav3) および ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) の mRNA 発現量を増加させていたが、一方で 10 μM (画分の場合 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では増加していなかったことなどと併せて考察し、アポルフィン型アルカロイドに共通かつ特有の作用様式と考えられた。また、モデルキットを用いた実験では、*N*-methylassimilobine および *asimilobine* に良好な BBB 透過性が確認された。

2) オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) 葉部含有カルバゾール型アルカロイドおよびその誘導体の神経様突起伸展促進作用および空間認知記憶への作用

オオバゲッキツ葉部メタノール抽出エキスのうち *in vitro* BBB モデルを透過した画分が PC-12 細胞における突起伸展促進傾向を示した。続いて 9 種の含有カルバゾール型アルカロイドのうち、*murrayamine-E* に同作用を見出した。また、構造と作用について比較した上で合成した 9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol に突起伸展促進傾向が認められた。新奇物体認識試験やモーリス水迷路試験などといった視覚的認知記憶力や空間認知記憶力に関する *in vivo* 試験では、家族性アルツハイマー病の変異遺伝子を過剰発現した遺伝子導入アルツハイマー型認知症モデルマウスである APP^{swe}/PS1^{dE9} マウス (雌、6-7 ヶ月齢) でそれぞれ成績の上昇傾向が見られ、9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol が視覚的認知記憶や空間認知記憶を改善する傾向が認められた。

以上、申請者はハス花部由来 *N*-methylassimilobine および *assimilobine* が神経様突起伸展促進作用および BBB 透過性を、またオオバゲッキツ葉部由来 *murrayamine-E* が神経様突起伸展促進作用を有することを見出した。またカルバゾール誘導体 *9-benzyl-9H-carbazol-4-ol* が神経様突起伸展促進作用や *in vivo* での空間認知記憶改善傾向を示すことを明らかにした。BBB 透過性を確認した上で詳細な研究を行うことで、従来の天然物からの中枢作用化合物の探索研究の課題であった、脳への移行性と作用の両方の観点から、有望な物質を見出したと言え、今後の中枢神経系医薬品の天然物からのリード化合物探索研究の効率化の一助になると考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。