

2019 年度 課程博士学位論文

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

【薬学】生薬学分野
矢野 真実子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Mamiko Yano, Souichi Nakashima, Yoshimi Oda, Seikou Nakamura, Hisashi Matsuda. BBB-permeable aporphine-type alkaloids in *Nelumbo nucifera* flowers with accelerative effects on neurite outgrowth in PC-12 cells. *J. Nat. Med.* **2020**, 74, 212–218. [第 1 章]
- 2) Mamiko Yano, Souichi Nakashima, Shiori Kasa, Seikou Nakamura, Kaneyasu Nishimura, Yoshimi Oda, Kazuyuki Takata, Hisashi Matsuda. Accelerative effects of carbazole-type alkaloids from *Murraya koenigii* on neurite outgrowth and their derivative's *in vivo* study for spatial memory. *J. Nat. Med.* **2020**, 74, 448–455. [第 2 章]

目次

序論	1
本論	11
第一章　ハス (<i>Nelumbo nucifera</i>) 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.....	11
第一節　ハス花部メタノール抽出エキスの血液脳関門透過性成分の神経様突起伸展促進作用	11
第二節　ハス花部メタノール抽出エキス, 各種画分および含有アルカロイドの神経様突起伸展促 進作用	12
第三節　ハス花部含有神経様突起伸展促進作用アルカロイドの作用様式	15
第四節　ハス花部含有神経様突起伸展促進作用アルカロイドの血液脳関門透過性	22
考察.....	24
小括.....	26
第二章　オオバゲッキツ (<i>Murraya koenigii</i>) 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.....	27
第一節　オオバゲッキツ葉部メタノール抽出エキス, 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	27
第二節　カルバゾール誘導体の認知記憶力への作用	32
第一項　アルツハイマー病モデルマウス APPswe/PS1dE9 (APdE9)	32
第二項　新奇物体認識試験	33
第三項　モーリス水迷路試験	35
第四項　カルバゾール誘導体のマウス海馬歯状回への影響	38
第三節　カルバゾール誘導体のヒト iPS 細胞由来神経細胞に対する成熟促進作用	42
考察.....	44
小括.....	46

結論	47
謝辞	48
実験の部	49
第一章の実験	50
第二章の実験	56
引用文献	64
Supplemental data	73

略語表

ABC:	ATP-binding cassette
APP:	amyloid precursor protein
APdE9:	APP ^{swe} /PS1dE9
A β :	amyloid β
BBB:	blood brain barrier
<i>n</i> -BuOH:	<i>n</i> -butanol
CREB:	cAMP response element binding protein
CaM:	calmodulin
CaMKII:	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II
Cdc42:	cell division control protein 42
DCX:	doublecortin
DMSO:	dimethyl sulfoxide
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
ES:	embryonic stem
Et ₂ O:	diethyl ether
EtOAc:	ethyl acetate
FBS:	fetal bovine serum
FOXG1:	forkhead box protein G1
Grb2:	growth factor receptor-binding protein 2
HS:	horse serum
iPS:	induced pluripotent stem
IP ₃ :	inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK:	c-jun N-terminal kinase
LC-MS:	liquid chromatography-mass spectrometry
MAP:	microtubule-associated protein
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MeOH:	methanol
mDIA:	mammalian diaphanous
NFT:	neurofibrillary tangle
NF- κ B:	nuclear factor-kappa B
NGF:	nerve growth factor
NMR:	nuclear magnetic resonance
PBS (-):	Ca ²⁺ and Mg ²⁺ free phosphate buffered saline
PAK1:	p21-activated protein kinase 1,

PAX6:	paired box protein 6
PKD1:	phosphoinositide-dependent kinase 1
PI3K:	phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₃ :	phosphatidylinositol-3-phosphate
PLC:	phospholipase C
PSA:	polar surface area
p75 ^{NTR} :	p75 neurotrophin receptor
Rac:	ras-related C3 botulinus toxin substrate
RPMI-1640:	Roswell Park Memorial Institute media
SIM:	selected ion monitoring
SOS:	son of sevenless
SOX2:	sex determining region Y-box 2
Src:	steroid receptor coactivator
SLC:	solute carrier
TEER:	transepithelial electric resistance
TrkA:	tropomyosin receptor kinase A
TUBB3:	tubulin beta III
WAVE:	WASP family verprolin-homologous protein,
GEF:	guanine nucleotide exchange factor

序論

我が国の認知症患者数は2012年に約462万人、65歳以上の人口の15.0%と推計された¹。大規模な生活習慣病疫学調査である久山町研究では認知症有病率は年齢、性別および糖尿病の有病率に影響されることが報告²されており、糖尿病有病率が増加すると仮定した場合、2025年には730万人、65歳以上の人口の20.6%、2050年には1,016万人、65歳以上の人口の27.8%と予想されている¹(Fig. 1)。その後も高齢者数の増加に伴って認知症患者数は増加傾向が続くと見込まれている。

認知症患者数の推移

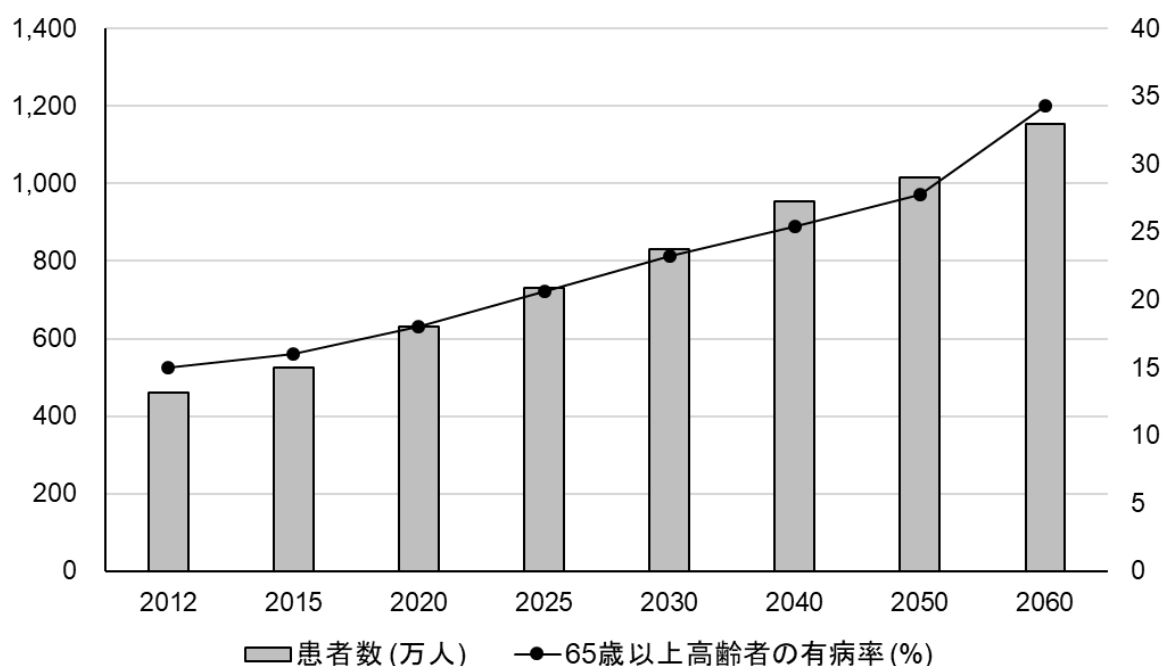


Fig. 1 我が国の認知症患者数の推移

[令和元年6月20日厚生労働省老健局

「認知症施策の総合的な推進について(参考資料)」を基に作成]

糖尿病有病率が2012年以降も増加すると仮定して算出された認知症患者数。高齢化に伴って認知症患者数は年々増加しており、今後も増加傾向が続くと予想されている。

認知症の種類にはアルツハイマー型認知症、脳血管性認知症およびレビー小体型認知症があり、全体の60-70%をアルツハイマー型認知症が占めると言われている³。認知症の症状には神経細胞の死滅によって直接起こる中核症状と、周囲の人との関わりのなかで起こる行動・心理症状がある。アルツハイマー型認知症の中核症状としては記憶障害、見当識障害および認知機能障害、また、行動・心理症状としては幻覚、徘徊、抑うつおよび不安が挙げられる。疾患が進行すると、これらの症状が次々と現れ日常生活を自立して送ることが困難となり介護が必要となるため、認知症患者の増加は社会問題となっており解決が急務である。

アルツハイマー型認知症の病理学的特徴として、老人斑、神経原線維変化 (neurofibrillary tangle, NFT) および脳萎縮がある。老人斑は神経細胞外でのアミロイド β (amyloid β , A β) タンパク質の沈着、NFT は神経細胞内で異常にリン酸化したタウタンパク質がフィラメント状になって沈着したものを指し、老人斑やNFTによって神経細胞死が起こった結果、脳萎縮が生じると言われている。A β は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) の部分断片で β セクレターゼおよび γ セクレターゼによって切り出されて産生されるペプチドであり、タウタンパク質は微小管結合タンパクのひとつで、中枢神経系および末梢神経系の神経細胞やグリア細胞に発現している⁴。

アルツハイマー型認知症の原因は完全には明らかになっていないが、発症機序の仮説としてアミロイド仮説やA β オリゴマー仮説⁵⁻⁷が提唱されている (Fig. 2)。アミロイド仮説とは、「A β の脳への沈着から始まり、沈着したA β がタウタンパク質の異常リン酸化によるNFT形成を惹起して最終的な神経細胞死が出現する」という病態仮説であり、長期間アルツハイマー型認知症の中心的な仮説とされてきた。しかし、A β の沈着は正常加齢によっても認められること、認知機能障害は神経原線維変化と相関することなどが指摘されていたことから、2010年頃にはA β オリゴマー仮説が提唱され一般的となった。A β オリゴマーはA β 単量体が二分子から数十分子結合した重合体のことで、A β オリゴマー仮説とは「A β オリゴマー産生に続いて神経原線維変化が出現し、A β オリゴマーの直接的およびNFTを介した神経細胞

死によって、脳構造の異常・記憶障害・臨床的な機能異常が順次出現する」という説⁶である。また、A β の沈着は認知機能障害が起こる約20年前から始まっており、認知症が発症する頃にはアミロイド蓄積はほぼ飽和し、認知症が出現する約10年前から病的なタウタンパク質が蓄積するNFTが脳に出現し、NFTが出現することによって神経細胞死とそれに続く臨床的な認知機能障害が出現するという説も提唱されている⁷。

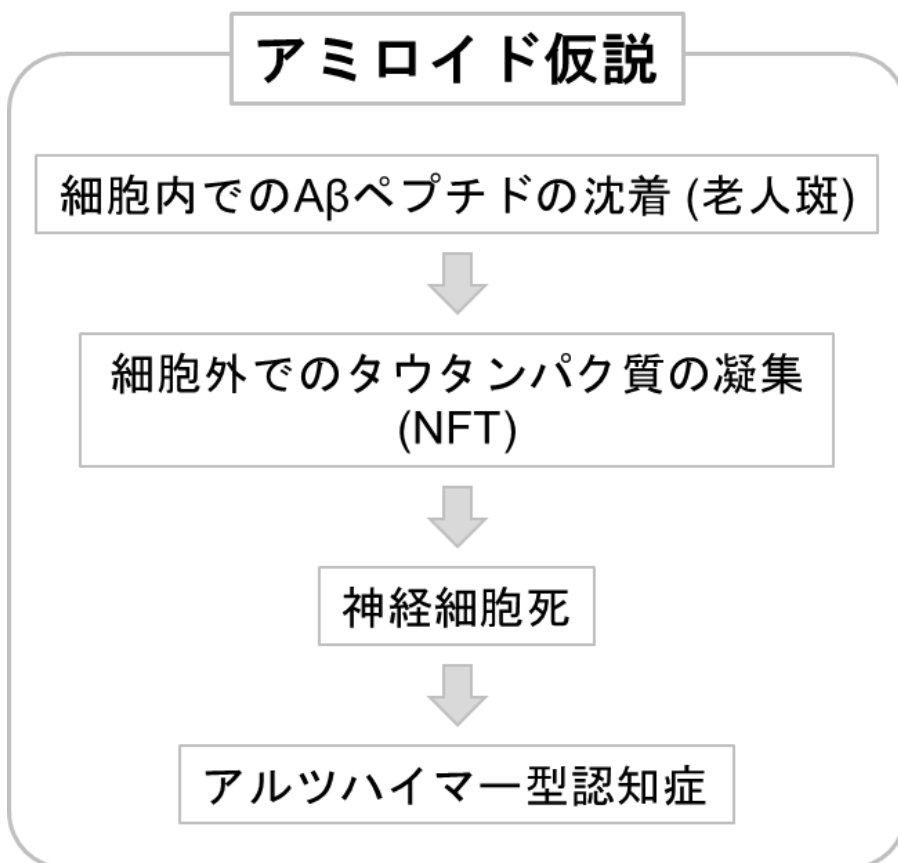


Fig. 2 アミロイド仮説の概略図

A β 沈着の毒性をきっかけとしてNFT形成が起こり、神経細胞が死滅しアルツハイマー型認知症が発症するという仮説。A β : amyloid β , NFT: neurofibrillary tangle

現在、アルツハイマー型認知症治療薬として、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジル、リバスチグミン、ガランタミンおよび *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (*N*-methyl-D-aspartate, NMDA) 受容体拮抗薬であるメマンチン (Fig. 3) が臨床で用いられている。ドネペジルが 1999 年に、リバスチグミン、ガランタミンおよびメマンチンは 2011 年に承認され、以降は新たなアルツハイマー型認知症治療薬は承認されていない。現在開発中の治療薬候補物質としては抗 A β 抗体、 β セクレターゼ阻害薬、抗タウ抗体があるが、いずれも開発は難航している。その理由のひとつとして、A β アミロイド線維の構造が患者の脳組織内に存在するものでは右巻き、人工的に作製したものでは左巻きと大きく異なっている⁸ ためと考えられる。また、これらの候補物質は A β やタウの沈着が起きる前から投与する必要がある⁹ と考えられ、投与開始タイミングの見極めが非常に困難である。

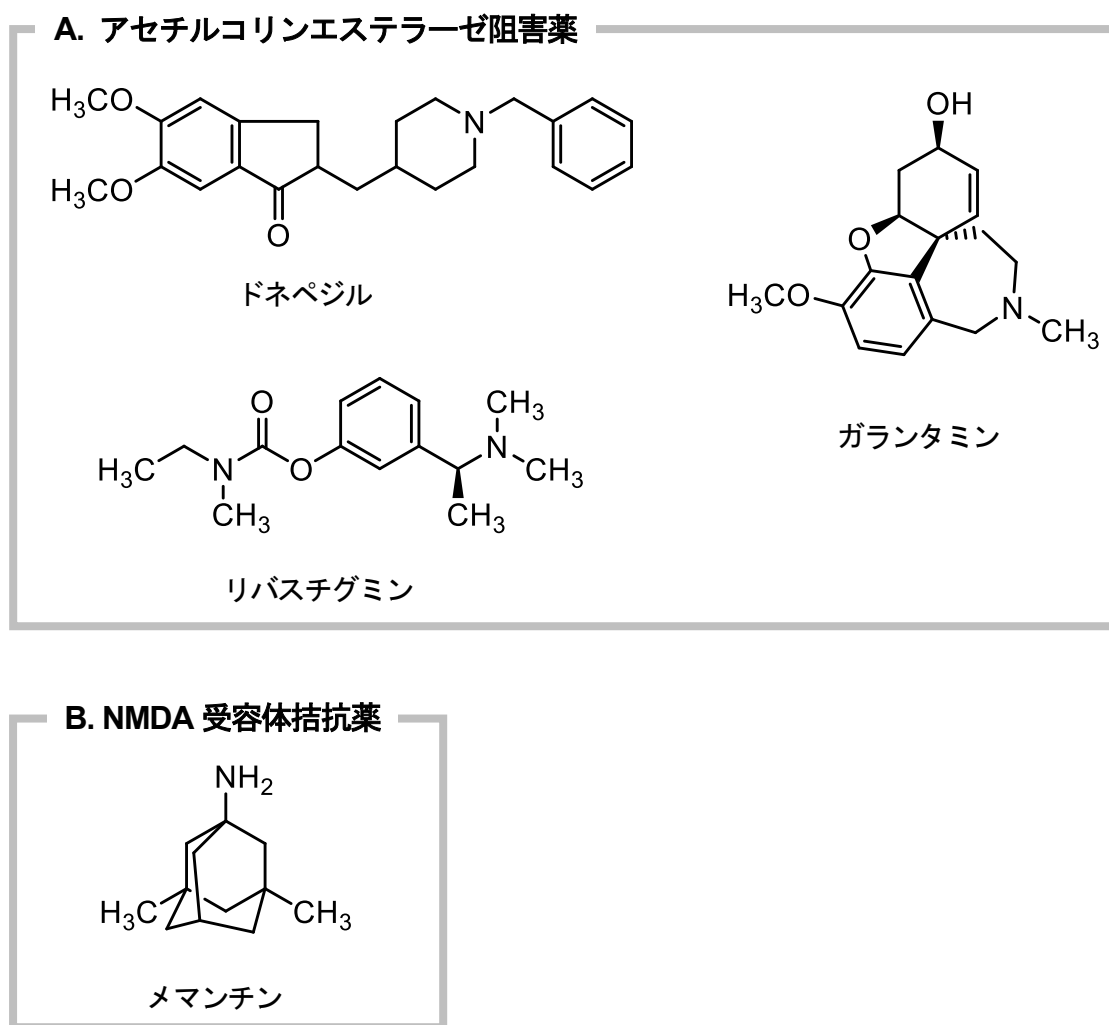


Fig. 3 臨床で用いられているアルツハイマー型認知症治療薬の化学構造
A: ドネペジル, ガランタミン, リバスチグミン, B: メマンチン
現在アルツハイマー型認知症治療薬として承認されている治療薬。

そこで、新たなアルツハイマー型認知症治療薬開発のアプローチとして、「成体神経新生」¹⁰に着目した。神経新生とは、神経幹細胞がニューロンへと分化することを言う。胎生期には脳全体で神経新生が起こることが分かっていたが、成体では側脳室周囲の脳室下帯や海馬の歯状回の限定された部位で起こっており、神経幹細胞が神経前駆細胞を経て未成熟神経細胞に分化し、海馬の顆粒細胞層などに移動して周囲の神経細胞とシナプス形成を行い、成熟神経細胞として機能していくことを成体神経新生という^{11,12}。成体神経新生は記憶の保持や学習、忘却などの高次脳機能と大きく関わっていることが報告されている¹³⁻¹⁵。

記憶形成過程において、ものごとを想起する際、一定期間内は海馬を必要とする（海馬依存的）が、時間経過に伴い海馬が必要でなくなり、大脳皮質を使って思い出すようになる（大脳皮質依存的）。このことから、記憶は時間経過に伴い海馬から大脳皮質に徐々に転送され、最終的に大脳皮質に貯蔵されるという「記憶固定化の標準モデル」¹⁶が提唱されている。海馬依存的な状態の期間はマウスやラットでは1ヶ月、ヒトでは数ヶ月から数年と言われているが、この期間は海馬の神経新生が活発になることで短縮されることが明らかになっている¹⁷。また、アルツハイマー型認知症患者の脳内では神経新生が低下していることが報告されている¹⁸。これらのことから、神経新生を促進することで疾患の進行に伴って生じた神経細胞死により失われた脳機能を、正常な状態に戻せる可能性があると考えられる。

神経新生を促進する化合物を探索する上で神経成長因子（nerve growth factor, NGF）に着目した（Fig. 4）。NGFは神経栄養因子のひとつで、神経細胞の生存、細胞死、増殖、分化などに作用することから、これまでの研究により、NGFを十分量補充することが出来れば神経変性の進行を止められる可能性が示されている¹⁹。NGFは前駆体であるproNGFの形で分泌され、トランスゴルジネットワークで転換酵素により切断されて成熟する²⁰。NGFはコリン作動性神経の生育と可塑化に必須であり、NGFと高親和性（ $K_d=10^{-11}$ ）に結合するトロポミオシン受容体キナーゼ（tropomyosin receptor kinase A, TrkA）と低親和性（ $K_d=10^{-9}$ ）に結合するp75ニューロトロフィン受容体（p75 neurotrophin receptor, p75^{NTR}）の2種類の受容体が発現している。TrkAに成熟NGFが結合するとホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ

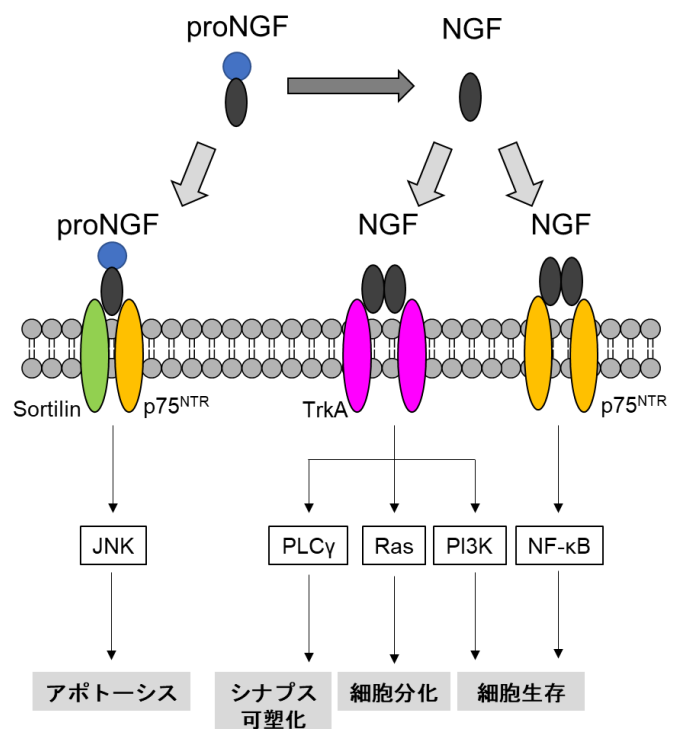


Fig. 4 proNGF および NGF と受容体との結合と反応
NGF 受容体である TrkA および p75^{NTR} に NGF や proNGF が結合すると、細胞生存、分化、シナプス可塑化やアポトーシスが起こる。NGF: nerve growth factor, TrkA: tropomyosin receptor kinase A, p75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor, JNK: c-jun N-terminal kinase, PLC: phospholipase C, NF-κB: nuclear factor-kappa B

(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) を介して神経細胞の生育, Ras を介して細胞分化, ホスホリパーゼ C γ (phospholipase C γ , PLC γ) を介してシナプス可塑化が促進される. シナプス可塑化とは, 1944 年心理学者の Hebb が「神経細胞 A が神経細胞 B を発火させるのに十分近くにあり, 繰り返しまたは絶え間なくその発火が起こるとき, いくつかの成長過程または代謝変化が A か B のどちらか, または A と B の両方の細胞に起こり, B を発火させる細胞のひとつとして A の効率が增加する」と唱えた仮説²¹ (ヘブ則) である. つまり, 「ある 2 つの神経細胞がシナプスを介して結合しており, 上流の神経が興奮すると下流の神経が興奮する. これが繰り返されるとその特定のシナプス結合が強化され, 伝達効率が増す」という仮説で記憶の基本的な原理とされている²². また, 低親和性の p75^{NTR} の二量体に NGF が結合すると, 核内因子 B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) を介してアポトーシス誘導が阻害され, p75^{NTR} と Sortilin の複合受容体に proNGF が結合すると c-jun N 末端キナーゼ (c-jun N-terminal kinase, JNK) を介してアポトーシスが誘導される²³ (Fig. 4).

健常者の脳内では, 前脳基底核のコリン作動性神経は, アセチルコリン神経支配を通じて皮質や海馬で認知機能において重要な役割を担っている. NGF はシナプス後の神経細胞から放出されて, シナプス前の神経投射によって TrkA/p75^{NTR} 受容体を介して取り込まれる²⁴. NGF が結合した受容体分子は内部移行し, 細胞生存や生育, アセチルコリン放出に関与する遺伝子発現とシグナルカスケードを開始するために前脳基底核のコリン作動性細胞へと逆行性運搬される²⁵.

一方, アルツハイマー型認知症患者の脳内では, 成熟 NGF の減少, TrkA/p75^{NTR} 受容体の割合の減少, 軸索輸送とシグナル伝達の効率低下, A β により引き起こされる NGF 受容体の異常, アセチルコリン放出の異常によるグリア細胞の炎症抑制作用の低下, A β 細胞毒性という過程を経てコリン作動性システムが影響を受ける²⁶. 初期のアルツハイマー型認知症では, 成熟 NGF の産生の減少とクリアランスの促進, NGF の逆行性輸送による基底核と皮質のニューロンでの TrkA 受容体レベルの減少による NGF 成熟化の効率低下によってコリン作動性神経支配の機能低下が生じる²⁷. proNGF レベルが上昇すると, アポトーシスシグナルを誘導するだけでなく, 成熟 NGF の受容体結合と軸索輸送にも影響を及ぼし, 前脳基底核のコリン作動性ニューロンの逆行性萎縮が起こる²⁷. また, proNGF によって誘導されるアポトーシスシグナルは TrkA と p75^{NTR} の相対発現量に依存しており, アルツハイマー型認知症では TrkA/p75^{NTR} の割合の減少, すなわち p75^{NTR} の相対的増加によりアポトーシス誘導が活発に起こる²⁸. NGF と A β の関連については, A β が NGF 成熟を妨害し, NGF は A β の産生を減らすというクロストークを行うことが報告されており²⁹, APP は NGF 受容体輸送および軸索輸送を調節することで NGF 下流シグナルに影響し, NGF は APP リン酸化レベルに影響を及ぼすことで A β 産生を減少させる³⁰. 重度のアルツハイマー型認知症では広汎なコリン作動性神経細胞の欠損が見られるが, 初期ではシナプス密度の軽度な減少に伴う細胞の機能的変化が観察された³¹. これらのコリン作動性神経細胞は NGF に対する感受性を保持しているため, 皮質および海馬への NGF の補充は, 同部位のコリン作動性シグナル伝達増強させる. このことを用いて様々な研究が行われてきた^{32,33}. しかし, NGF 自体を治療薬として用いるには, 高分子であるため BBB 透過性が低く脳室内投与を行う必要があり, 臨床応用が困難である³⁴ と考えられた. そこで, 本研究では, NGF 様作用もしくは NGF の作用を促進する化合物の探索を行った.

一方、血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) 透過は中枢神経用薬の開発において大きな課題である。BBB は、脳に必要な物質を血液中から選択して脳へ供給し、逆に脳内で産生された不要物質を血液中に排出する役割を担っている³⁵。脳毛細血管内皮細胞は密着結合を形成し、ペリサイトおよびアストロサイトに囲まれている (Fig. 5)。

脳毛細血管内皮細胞には、輸送に関わる ATP 結合カセット輸送体 (ATP-binding cassette transporters, ABC トランスポーター) や溶質キャリア (solute carrier, SLC) トランスポーターなどの様々なトランスポーターや受容体が発現している。受容体はトランスサイトosisによってリガンドを輸送し、トランスポーターと受容体が共同的に働くことによって血液から脳へ、脳から血液への物質のやりとりが制御されて

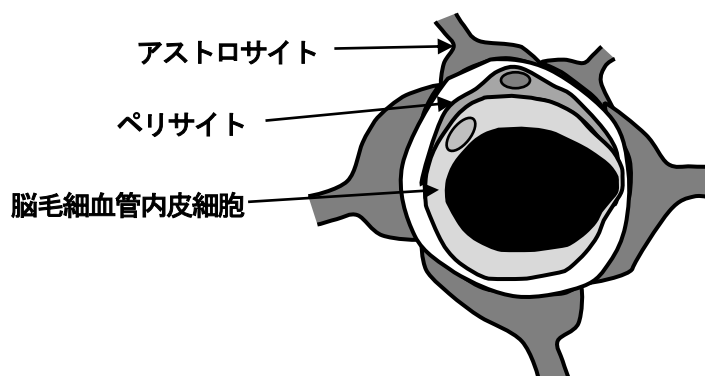


Fig. 5 BBB の概略構造

脳毛細血管内皮細胞周囲をペリサイトおよびアストロサイトが、密着結合を介して取り囲むことにより BBB を形成している。BBB: blood brain barrier

いる。アストロサイトは毛細血管と神経細胞間での物質のやりとりをサポートし、ペリサイトは脳血管内皮細胞上に発現する P 糖タンパク質などの ABC トランスポーターや密着結合構成タンパク質の発現量を増加させ、脳血管内皮細胞透過性を低下させることで BBB 機能を維持強化する³⁶。

BBB 透過性をもつ化合物の物理化学的性質として、分子量が 450 以下であること、脂溶性を示すオクタノール/水分配係数 ($\log P$) の値に分子をフラグメント化し電子的相互作用を考慮し再計算した ClogP 値が 1-3 であること、受動的な膜透過性と強く相関する酸素および窒素原子に占有された極性を帯びた分子の表面積を指す極性表面積 (polar surface area, PSA) が 90\AA 以下であること、水素結合供与体数が 3 以下、水素結合受容体数が 7 以下であることが挙げられる³⁷。現在臨床で用いられている 4 種のアルツハイマー型治療薬の性質を算出した (Table 1) ところ、ドネペジルとメマンチンは ClogP 値の条件を満たさないものの、これらの条件は一つの指標として有用であると考えられた。

Table 1 アルツハイマー型認知症治療薬の性質

	分子量	ClogP	PSA (\AA)	水素結合供与体数	水素結合受容体数
ドネペジル	379.50	4.598	38.77	0	3
ガランタミン	287.36	1.025	41.93	1	3
リバスチグミン	250.34	2.099	32.78	0	4
メマンチン	179.31	3.033	26.02	1	0

アルカロイドは窒素原子を含有する化合物の総称で、強い生物活性をもつものが多く、薬として用いられてきた。その例として、モルヒネ、トリアゾラムなどの麻薬や睡眠薬が挙げられる。世界の医薬品の約 70%をアルカロイドが占めると言われており、また日本の中樞神経用薬のうち 89.6%がアルカロイドである (2019 年 11 月時点)。このことから、血液脳関門透過性を前提とした化合物としてアルカロイドが有望であると考えた。

アポルフィン型アルカロイドのひとつである magnoflorine (Fig. 6) は、コウボクやボウイ、シンイ、オウレンに含有されている。強制水泳試験や尾懸垂試験において、抗うつ作用が確認されているが、単体では血液脳関門を通過しないためリン脂質による修飾が必要であった³⁸。うつ病の治療には現在、セロトニンやノルアドレナリンなどのモノアミンを増加させる選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI) やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, SNRI) などによる薬物治療が中心に行われているが、近年 SSRI が神経新生作用をもつことが報告された³⁹。このことから、うつ病の新たな治療アプローチとして神経新生が注目されているが、抗うつ作用が見られたものの、magnoflorine が神経新生に与える影響については検討されておらず、研究が不十分であると言える。なお、magnoflorine の性質については、分子量: 342.41, ClogP 値: -1.145, PSA: 58.92 Å, 水素結合供与体数: 2, 水素結合受容体: 3 であり、脂溶性が低いため単体では血液脳関門を透過しなかったと推測された。

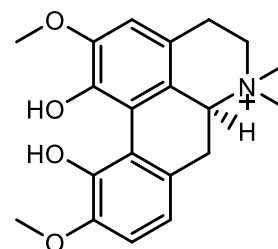


Fig. 6 Magnoflorine の化学構造
コウボクなどに含有されるアポルフィン型アルカロイドのひとつ。抗うつ作用や抗けいれん作用が報告されている。

カルバゾール型アルカロイドのひとつである P7C3 (Fig. 7) は *in vivo* 試験での神経新生作用やニューロン保護作用、BBB 透過性が報告されている⁴⁰。P7C3 は、Pieper らが神経新生作用をもつ化合物探索を目的に約 20 万の化合物ライブラリーから化学的性質によって選んだ 1,000 種類のうちの、マウス脳室内投与による神経新生作用を確認した化合物群のひとつで、腹腔内投与でも有効性が認められ、最も作用の強かった化合物である。しかしながら、P7C3 は *in vivo* 試験での作用や BBB 透過性は認められているものの、

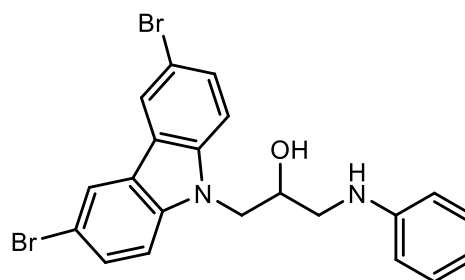


Fig. 7 P7C3 の化学構造
神経新生作用をもつカルバゾール型アルカロイド。

化合物自身が直接神経細胞に作用するかを明らかにした *in vitro* 試験は行われていない。なお、P7C3 の性質については、分子量: 472.20, ClogP 値: 6.356, PSA: 35.50 Å, 水素結合供与体数: 2, 水素結合受容体: 1 であり、分子量および ClogP 値は条件を満たしていない。

これまでの研究から、以下の理由によりアポルフィン型アルカロイドを特徴成分として含む植物としてハス、カルバゾール型アルカロイドを特徴成分として含む植物としてオオバゲッキツに着目した。

ハス (*Nelumbo nucifera*) はハス科の水生植物で、アジアやオセアニアなどに広く分布する。種子、葉部、根茎および花部などの様々な部位が世界中で薬用または食用として供されており、根茎は「レンコン」として日本で広く食されており、花部は東南アジアで茶として供されている。また薬用として、葉部は肥満や脂質異常症、喀血および血尿の治療に用いられており、花部は古くから皮膚疾患や吐血、創傷による出血および炎症などに、またインドの伝統医学であるアーユル・ヴェーダでは早期腹部痙攣の治療に用いられてきた⁴¹。ハス葉部にはアルカロイドとフラボノイド配糖体が豊富に含有されていることが報告⁴²⁻⁴⁴されている。花部からも *nuciferine* をはじめとしたアポルフィン型アルカロイドを著者の所属している研究室において単離、報告⁴¹している。

オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) はミカン科の常緑低木で、インドやスリランカなどに分布し、日本では沖縄や奄美諸島にて確認されている。葉部はインドなどで料理のスパイスとして利用され、その芳香からカレーリーフとも呼ばれるハーブである。また、清熱作用⁴⁵、抗菌作用⁴⁶などを目的として薬用にも供される。オオバゲッキツには、特徴成分としてカルバゾール型アルカロイドが含有されている⁴⁷。

このように、ハスおよびオオバゲッキツは長い間、食用として供されてきた実績のある植物で、薬としても用いられており、特徴的なアルカロイド成分を含有している。これらのアルカロイド成分を中枢神経系へ作用する医薬品のリード化合物探索素材として有望であると考え、第一章ではハス花部に特徴成分として含有されるアポルフィン型アルカロイドについて、第二章ではオオバゲッキツ葉部に含有されるカルバゾール型アルカロイドおよび誘導体について NGF 様作用または NGF の作用を促進させる化合物の探索研究を行った。

本研究では、主に PC-12 細胞⁴⁸ (Fig. 8) を用いた神経様突起伸展促進作用を検討した。PC-12 細胞はラット副腎髄質由来褐色細胞腫で、NGF の添加によって増殖を停止し突起を伸展すること、それに伴いコリンアセチルトランスフェラーゼやアセチルコリンエステラーゼなどの神経伝達物質の合成・分解に関与する酵素活性を上昇⁴⁹させ、神経細胞に特徴的な細胞表層タンパク質の増加やタウタンパク質、微小管結合タンパク質 (microtubule-associated protein, MAP) およびチューブリンタンパク質など細胞骨格タンパク質のリン酸化誘導を起こす⁵⁰ことが知られている。このような特徴をもつ PC-12 細胞は NGF 様作用もしくは NGF の作用を促進する化合物の探索を行う際に最適であると考えられた。

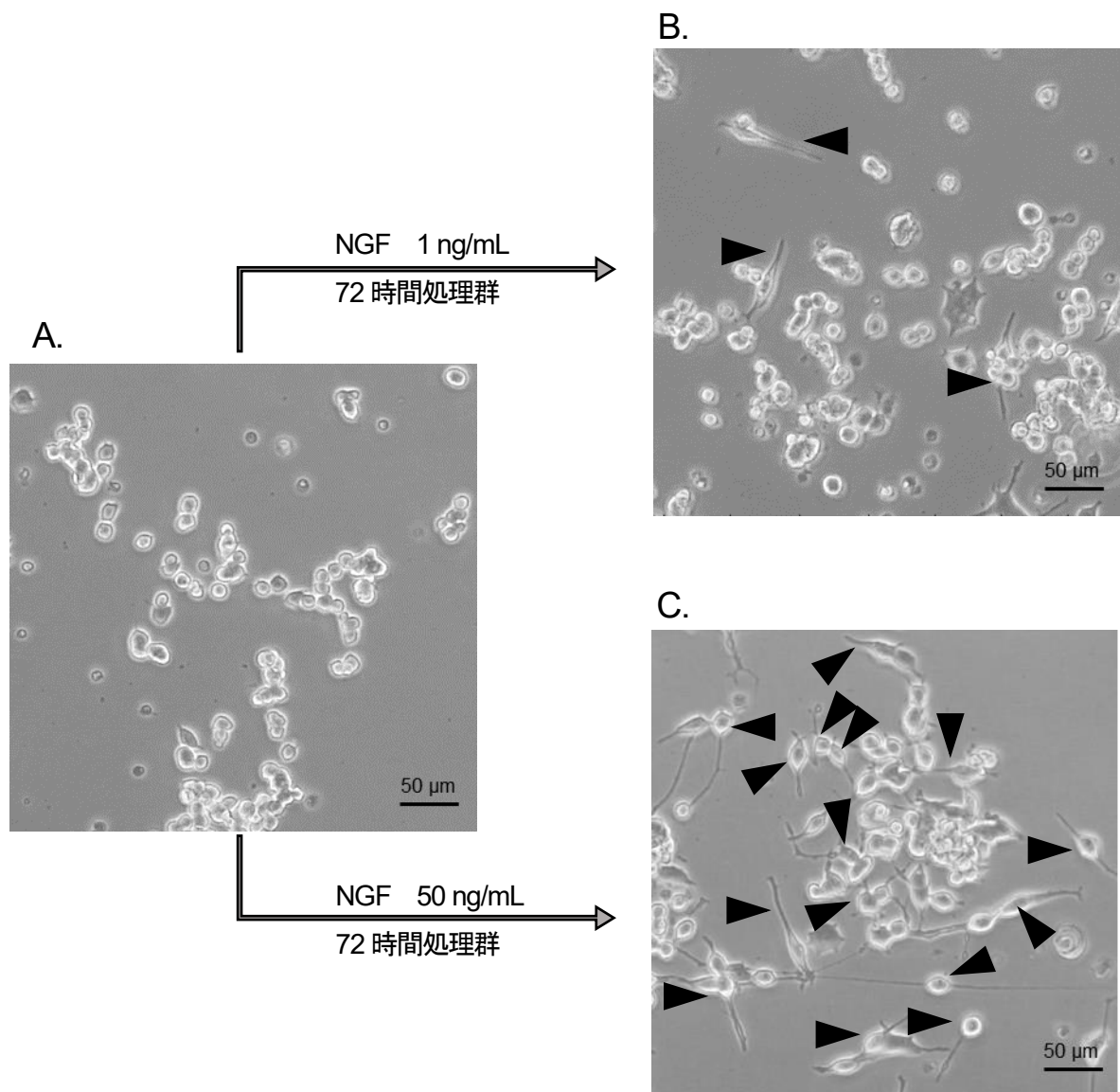


Fig. 8 PC-12 細胞の NGF 処理による形態変化
 矢印: 神経様突起伸展. A: NGF 非処理の PC-12 細胞, B: NGF 1 ng/mL, 72 時間処理の PC-12 細胞, C: NGF 50 ng/mL, 72 時間処理の PC-12 細胞. NGF: nerve growth factor

また、脳血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを共培養することで、タイトジャンクションを形成させ BBB を再現した *in vitro* モデルを用いた (Fig. 9). なお、タイトジャンクション形成の確認として経内皮電気抵抗 (transepithelial electric resistance, TEER) を測定した. TEER とはイオン移動の指標で、タイトジャンクション機能との相関が知られている⁵¹. TEER が $150\ \Omega$ 以上で低分子量物質の輸送の指標であるフルオレセインナトリウムの透過係数に変化がないことが報告⁵²されていることから、各ウェルで $150\ \Omega$ 以上であることを確認し、実験に供した.

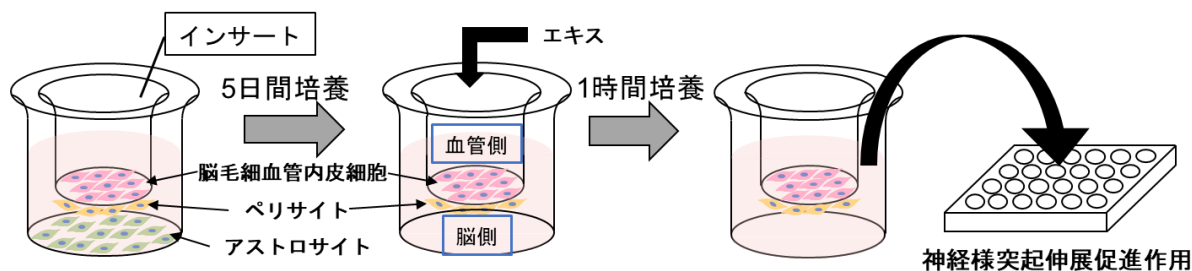


Fig. 9 *In vitro* BBB モデルを用いた実験方法の概略図

脳血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを 5 日間共培養し密着結合形成を確認後、インサート内にメタノール抽出エキスを添加し、1 時間後にインサート外へと透過した培養液について PC-12 細胞の神経様突起伸展促進作用を検討した.

本論

第一章 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

第一節 ハス花部メタノール抽出エキスの血液脳関門透過性成分の神経様突起伸展促進作用

BBB 透過性は、中枢神経系用薬開発において大きな課題である。本研究では、まず初めにアストロサイト、ペリサイトおよび脳毛細血管内皮細胞から構成された *in vitro* BBB モデルを用いて BBB 透過性成分の神経様突起伸展促進作用を検討した。

著者の所属する研究室で保有する植物エキ斯拉イブラリーの中からハス葉部メタノール (MeOH) 抽出エキス⁴¹を、血管側を模したインサート内へ添加し、脳側を模したインサート外へと透過した培養液を PC-12 細胞に付し、突起伸展促進作用を検討した。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 (%) として算出した。比較対照 (control) 群は NGF 1 ng/mL で 72 時間処理を行い、被験物質処理群は NGF 1 ng/mL と共に 72 時間処理した。control 群の陽性率 5.5% に対してインサート内に MeOH 抽出エキス 100 µg/mL 処理で陽性率 10.2% ($p=0.007$) と有意な突起伸展促進作用を確認した (Table 2)。BBB 透過性を有する突起伸展促進化合物がハス花部に含有されている可能性が考えられた。ハスにはアポルフィン型アルカロイド、フラボノイド配糖体などが含まれていることが明らかとなっており、これらが作用成分の候補と考えられた。

Table 2 ハス花部 MeOH 抽出エキス中 BBB 透過性成分の神経様突起伸展作用

インサート内の濃度 (µg/mL)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)			
	Control	1	10	100
MeOH 抽出エキス	5.5	6.5	7.3	10.2*
	(23/422)	(28/430)	(31/423)	(42/411)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%) [(突起伸展を示した細胞数/総細胞数)×100]」を示しており、同条件で行った4回の試験結果の合計である。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している。

[*J. Nat. Med.* (2020), Table 1 より一部改変して引用]

第二節 ハス花部メタノール抽出エキス, 各種画分および含有アルカロイドの神経様突起伸展促進作用

神経様突起伸展作用成分の探索のため, MeOH 抽出エキスおよび酢酸エチル (EtOAc) 可溶性画分および含有アルカロイドの神経様突起伸展促進作用について検討した. MeOH 抽出エキスでは control 群の陽性率 4.1%に対して 10 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 7.6% ($p=0.010$), EtOAc 可溶性画分では control 群の陽性率 3.5%に対して 1 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 7.0% ($p=0.006$), 10 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 7.8% ($p=0.001$) と, EtOAc 可溶性画分に MeOH 抽出エキスよりも強い作用を確認した. 更に, ジエチルエーテル (Et_2O) 可溶性アルカロイド集約画分は control 群の陽性率 4.5%に対して 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 8.2% ($p=0.010$), 1 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 8.2% ($p=0.007$), 10 $\mu\text{g/mL}$ 処理で 11.4% ($p<0.001$) と有意な神経様突起伸展促進作用を示した (Table 3). この結果より, ハスに含有されるアルカロイド成分が主な作用成分であることが示唆された.

Table 3 ハス花部 MeOH 抽出エキスおよび各種画分の神経様突起伸展促進作用

被験物質の濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)			
	Control	0.1	1	10
MeOH 抽出エキス	4.1 (23/561)	5.0 (24/482)	4.8 (24/503)	7.6** (38/498)
EtOAc 可溶性画分	3.5 (21/596)	5.0 (35/695)	7.0** (40/572)	7.8** (41/529)
Et_2O 可溶性 アルカロイド集約画分	4.5 (24/535)	8.2** (41/498)	8.2** (48/583)	11.4** (58/509)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%)」[(突起伸展を示した細胞数/総細胞数) $\times 100$]を示しており, 同条件で行った 4 回の試験結果の合計である.

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している.

[*J. Nat. Med.* (2020), Table 2 より一部改変して引用]

次に、有意な神経様突起伸展促進作用を確認した MeOH 抽出エキスを、EtOAc 可溶性画分および Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分の作用成分の解明を目的として、著者の所属する研究室で保有する化合物ライブラリーより、ハス花部 1.0 kg より単離された 10 種のアルカロイド **nuciferine (1, 298.3 mg)**, **lysicamine (2, 183.3 mg)**, **(-)-lirinidine (3, 7.2 mg)**, **N-methylasimilobine (4, 288.6 mg)**, **asimilobine (5, 149.0 mg)**, **pronuciferine (6, 64.3 mg)**, **nuciferine N-oxide (7, 62.8 mg)**, **D,L-armepavine (8, 27.4 mg)**, **dehydronuciferine (9, 3.9 mg)** および **N-nornuciferine (10, 13.5 mg)** (Fig. 10)⁴¹ の神経様突起伸展促進作用を検討した。陽性比較対照薬としてはこれまでに神経様突起伸展促進作用の報告のあるドネペジルを用いた⁵³ (陽性率: control 群 2.4%に対し 10 μ M 処理群 4.4%, $p=0.0040$)。10 種のアルカロイド成分のうち、**(-)-lirinidine (3, 陽性率: control 群 2.7%に対し 10 μ M 処理群 5.0%, $p=0.049$)**, **N-methylasimilobine (4, 陽性率: control 群 4.3%に対し 10 μ M 処理群 7.9%, $p=0.014$)**, **asimilobine (5, 陽性率: control 群 2.9%に対し 10 μ M 処理群 6.9%, $p=0.004$)** および **pronuciferine (6, 陽性率: control 群 2.9%に対し 10 μ M 処理群 5.8%, $p=0.021$)** がドネペジル⁵³ と同等以上の有意な神経様突起伸展促進作用を示した (Table 4)。化学構造と作用の比較から、1 位または 2 位の水酸基の存在が作用発現に重要であることが示唆された。

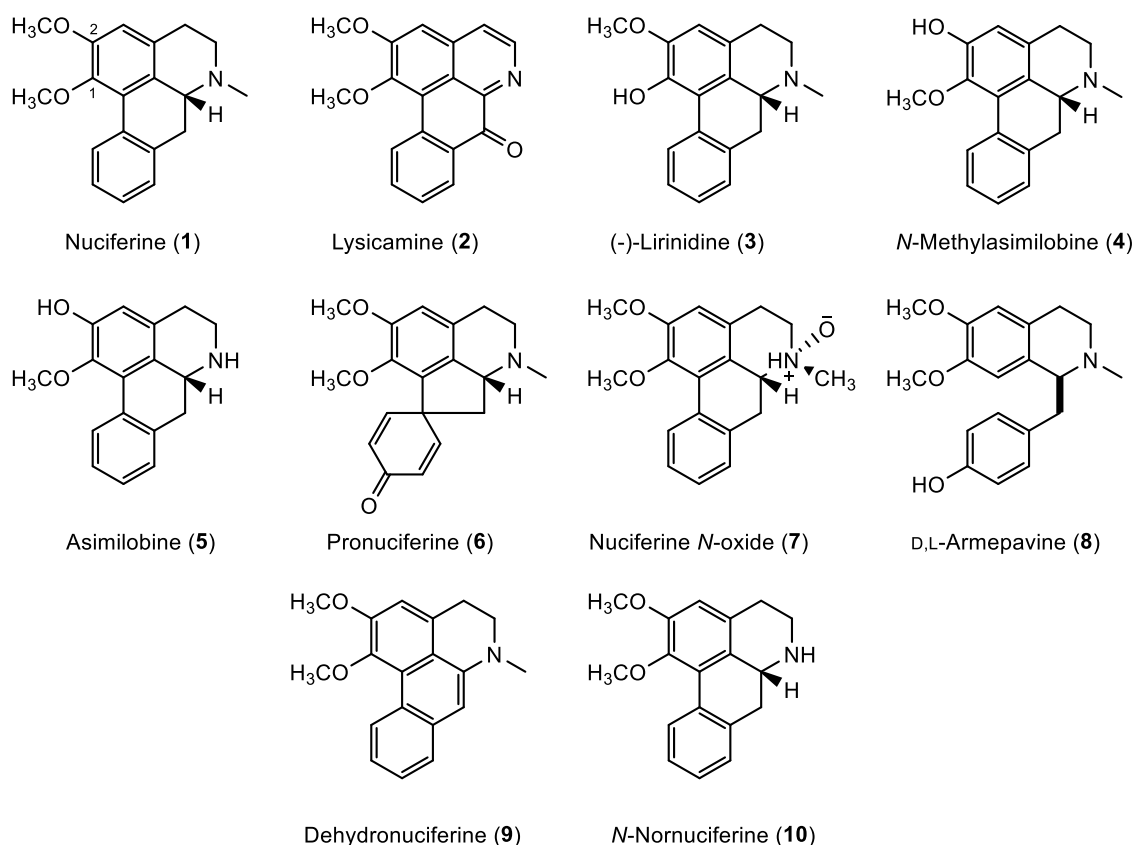


Fig. 10 ハス花部含有アルカロイドの化学構造

[*J. Nat. Med.* (2020), Fig. 1 より引用]

Table 4 ハス花部含有アルカロイドの神経様突起伸展促進作用

被験物質の濃度 (μM)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)			
	Control	0.1	1	10
Nuciferine (1)	7.9 (43/544)	7.2 (38/529)	8.9 (46/518)	10.1 (60/594)
Lysicamine (2)	5.6 (26/465)	5.3 (24/451)	6.5 (28/429)	6.2 (26/419)
(-)-Lirinidine (3)	2.7 (13/491)	3.5 (17/480)	4.7 (22/464)	5.0* (20/402)
N-Methylasimilobine (4)	4.3 (23/530)	4.9 (23/474)	7.9* (38/483)	7.2* (35/442)
Asimilobine (5)	2.9 (13/452)	3.0 (17/571)	4.9 (23/474)	6.9** (28/404)
Pronuciferine (6)	2.9 (13/448)	3.2 (16/494)	4.1 (23/561)	5.8* (29/499)
Nuciferine-N-oxide (7)	4.1 (21/517)	3.7 (18/493)	4.0 (19/477)	3.8 (18/477)
D,L-Armepevine (8)	2.6 (12/467)	2.6 (11/421)	3.3 (14/421)	4.0 (15/371)
Dehydronuciferine (9)	2.5 (14/570)	2.9 (17/583)	3.5 (18/518)	3.2 (16/506)
N-Nomuciferine (10)	2.6 (15/583)	2.8 (14/497)	2.9 (17/580)	3.0 (13/427)
ドネペジル (positive control)	2.4 (13/550)	2.8 (14/500)	4.2 (27/648)	4.4* (25/563)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%) [(突起伸展を示した細胞数/ 総細胞数)×100]」を示しており、同条件で行った4回の試験結果の合計である。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している。

[J. Nat. Med. (2020), Table 3 より一部改変して引用]

PC-12 細胞において, NGF は細胞膜上の TrkA に結合して成長因子結合タンパク質 (growth factor receptor-binding protein 2, Grb2) を介してグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) である son of sevenless (SOS) が Ras を活性化し, PI3K, Vav2/3, ras 関連 C3 ボツリヌストキシン物質 1 (ras-related C3 botulinus toxin substrate 1, Rac1) の活性化を通じてアクチン重合を促進し, 突起伸展を起こすことが報告^{54,55} されている (Fig. 11). また, PI3K の局所生成は細胞膜への Vav の輸送に必須であり, さらに PI3K は細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 活性化と NGF による神経様突起伸展を制御し⁵⁶, ステロイド受容体共活性化因子 (steroid receptor coactivator, Src) を介した Vav2 のチロシンリン酸化は細胞間接着分子のひとつであるネクチン誘導性 Rac1 活性化と葉状仮足の形成に必須であることが報告されている⁵⁷. その他にも, PI3K から Akt を介する経路や分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen activated protein kinase, MAPK) および ERK を介する経路が突起伸展促進に関与していることが報告されている⁵⁸. 神経突起伸展は発生段階でのニューロンネットワーク構築および損傷時の成体神経系の再生に不可欠である. 一方で, Rac の活性化によりカルシウム依存シグナル伝達が働くことからカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ 2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II, CaMKII) 活性化を介した学習への作用⁵⁹ や, Akt を介したサイクリック AMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element binding protein, CREB) の活性化による長期記憶への作用⁶⁰ が推察されている. TrkA は NGF の細胞膜上の受容体, Vav3 は GEF のひとつ, Rac1 は Rho ファミリーGTP アーゼである. Rho ファミリーGTP アーゼである RhoA, Rac1 および Cdc42 は, 細胞機能の多様性におけるアクチンダイナミクスを制御しており, ニューロンネットワークの発生期での神経の形態形成で中心的な役割を担っている. また, Rac1 と Cdc42 は神経突起伸展の正の調節因子である.

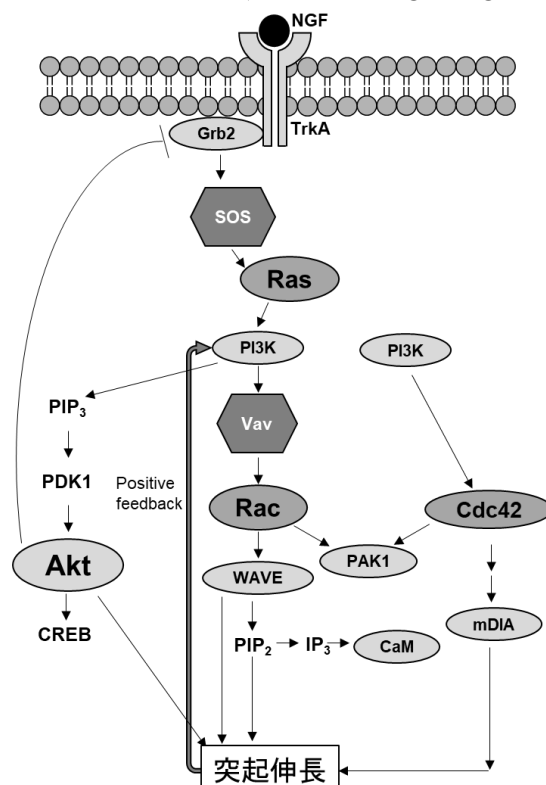


Fig. 11 NGF のシグナル伝達経路

NGF: nerve growth factor, TrkA: neurotrophin tropomyosin receptor kinase, Grb2: growth factor receptor-binding protein 2, SOS: son of sevenless, PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase, Rac: ras-related C3 botulinus toxin substrate, MAPK: mitogen activated protein kinase, ERK: extracellular signal-regulated kinase, CaMKII: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II, CREB: cAMP response element binding protein, Cdc42: cell division control protein 42, WAVE: WASP family verprolin-homologous protein, PAK1: p21-activated protein kinase 1, mDia: mammalian diaphanous, PIP₃: phosphatidylinositol-3-phosphate, PDK1: phosphoinositide-dependent kinase 1, IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate, CaM: calmodulin

そこで、神経様突起伸展作用の確認された (-)-lirinidine (**3**), *N*-methylassimilobine (**4**), assimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) の作用様式の検討のため、神経突起伸展に関与していることが確認されている *TrkA*, *Vav3*, *Rac1* メッセンジャーRNA (messenger RNA, mRNA) について発現量の変化を検討した。

作用の確認された **3** の作用様式の検討のため 4 時間処理し、PC-12 細胞における各タンパク質の mRNA 発現量の変化を検討したところ、*TrkA* および *Rac1* では 1 μ M 処理、*Vav3* では 0.1 および 1 μ M 処理で増加を確認した。しかし、10 μ M 処理では各 mRNA の変化は見られなかった (Table 5, Fig. 12)。

Table 5 (-)-Lirinidine (**3**) 4 時間処理後の mRNA 発現量変化

化合物 3 の濃度 (μ M)	<i>β-actin</i> mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 \pm 0.25	1.38 \pm 0.32	2.72 \pm 0.17**	0.83 \pm 0.16
<i>Vav3</i>	1.00 \pm 0.32	3.25 \pm 0.58*	5.00 \pm 1.06**	1.13 \pm 0.15
<i>Rac1</i>	1.00 \pm 0.21	2.36 \pm 0.62	2.99 \pm 0.19**	1.04 \pm 0.22

数値は、平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) を示している。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している。

[*J. Nat. Med.* (2020), Table 4 より一部改変して引用]

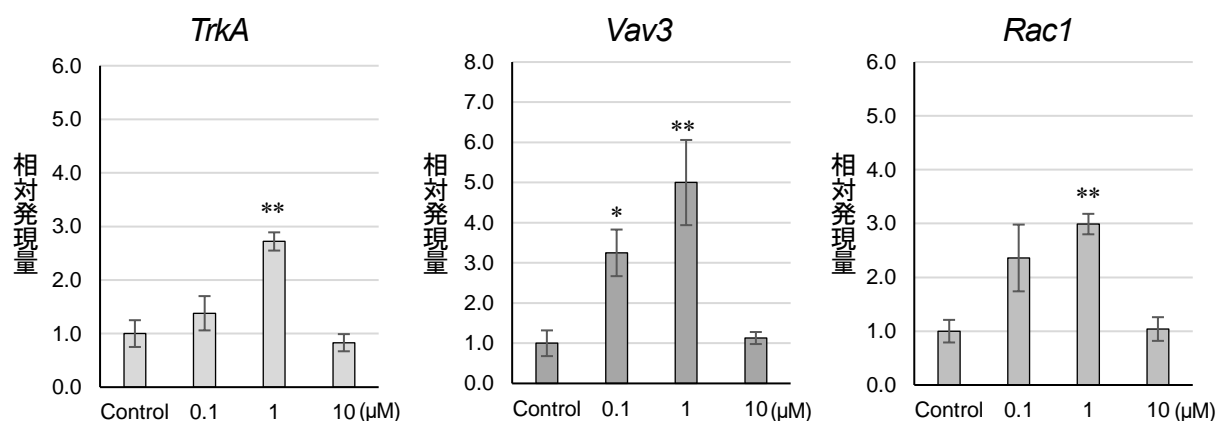


Fig. 12 (-)-Lirinidine (**3**) 4 時間処理後の mRNA 発現量変化
化合物 **3** を 4 時間処理した際の *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* mRNA 発現量

続いて、mRNA 発現への作用が継続しているのかを検討するため、**3** を 48 時間処理し、各タンパク質の mRNA 発現量の変化を検討したところ、0.1 および 1 μM 処理で増加し、10 μM 処理においては変化が確認されず (Table 6A, Fig. 13A)、4 時間処理時と同様の傾向が確認されたことから、作用が 48 時間後にも継続していることが分かった。化合物 **4** を 48 時間処理した場合も同様の変化傾向が見られた (Table 6B, Fig. 13B)。

Table 6 (–)Lirinidine (**3**) および *N*-methylasimilobine (**4**) 48 時間処理後の mRNA 発現量変化

A. (–)Lirinidine (**3**) 48 時間処理

化合物 3 の濃度 (μM)	<i>β-actin</i> mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 \pm 0.32	3.75 \pm 0.69**	5.42 \pm 0.38**	1.05 \pm 0.29
<i>Vav3</i>	1.00 \pm 0.25	3.42 \pm 0.90*	4.66 \pm 0.52**	1.19 \pm 0.21
<i>Rac1</i>	1.00 \pm 0.30	3.59 \pm 1.06**	5.07 \pm 0.47**	1.70 \pm 0.23

数値は、平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) で表している。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している。

B. *N*-Methylasimilobine (**4**) 48 時間処理

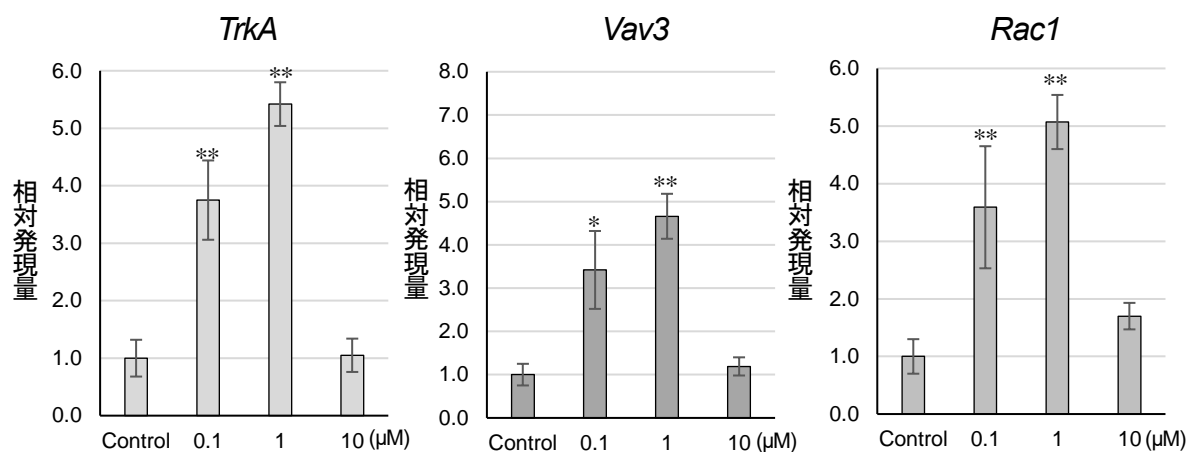
化合物 4 の濃度 (μM)	<i>β-actin</i> mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 \pm 0.24	2.10 \pm 0.54	3.38 \pm 0.40*	0.99 \pm 0.20
<i>Vav3</i>	1.00 \pm 0.10	3.47 \pm 0.66*	2.65 \pm 1.08	1.14 \pm 0.13
<i>Rac1</i>	1.00 \pm 0.24	1.91 \pm 0.51	2.45 \pm 0.45**	0.94 \pm 0.05

数値は、平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) を示している。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*, 0.01 未満の場合を**で示している。

[*J. Nat. Med.* (2020), Table 4 より一部改変して引用]

A. (-)-Lirinidine (3) 48 時間処理



B. *N*-Methylasimilobine (4) 48 時間処理

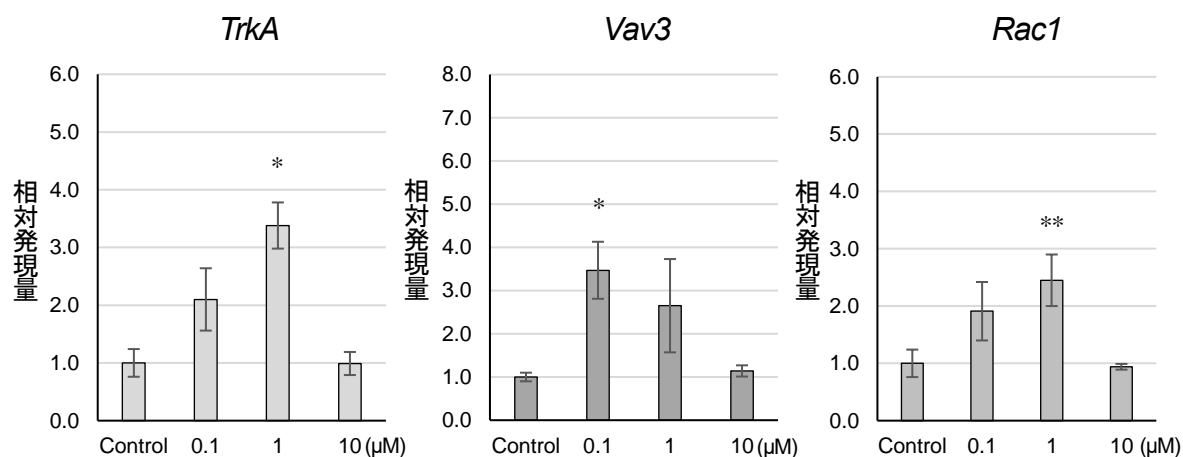


Fig. 13 (-)-Lirinidine (3) および *N*-methylasimilobine (4) 48 時間処理後の mRNA 発現量変化
A. 化合物 3 を 48 時間処理, B. 化合物 4 を 48 時間処理した際の *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* mRNA 発現量

また、**5** を 48 時間処理したとき、0.1, 1 および 10 μM 処理で変化は見られず (Table 7A, Fig. 15A), **6** 処理では, *TrkA* および *Rac1* では 1 μM および 10 μM 処理で, *Vav3* では 1 μM 処理で mRNA 発現量の増加傾向が確認された (Table 7B, Fig. 15B). 化合物 **3** および **4** と傾向が異なる原因として, **3** および **4** には 6 位にメチル基が結合しており, **5** には結合していないことから, 6 位のメチル基の有無が各 mRNA 発現量の変化に関与していると考えられた.

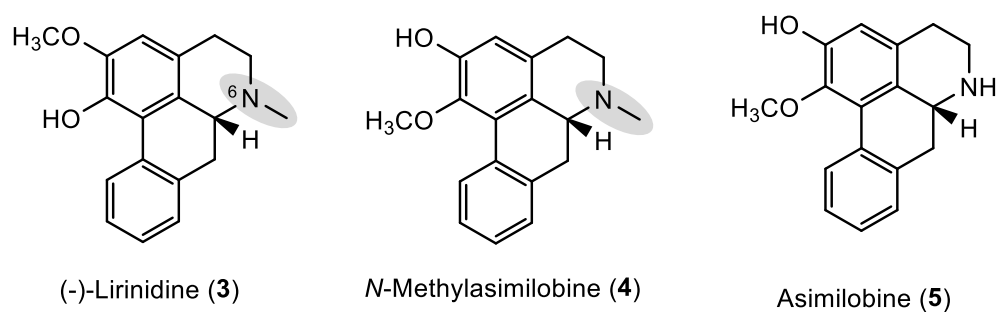


Fig. 14 化合物 **3**, **4** および **5** の化学構造の比較

Table 7 Asimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) 48 時間処理後の mRNA 発現量変化

A. Asimilobine (**5**) 48 時間処理

化合物 5 の濃度 (μM)	β -actin mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 \pm 0.09	1.15 \pm 0.13	1.40 \pm 0.28	1.46 \pm 0.24
<i>Vav3</i>	1.10 \pm 0.19	1.08 \pm 0.32	0.94 \pm 0.23	1.30 \pm 0.35
<i>Rac1</i>	1.00 \pm 0.09	1.06 \pm 0.17	1.34 \pm 0.31	1.29 \pm 0.16

数値は, 平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) を示している.

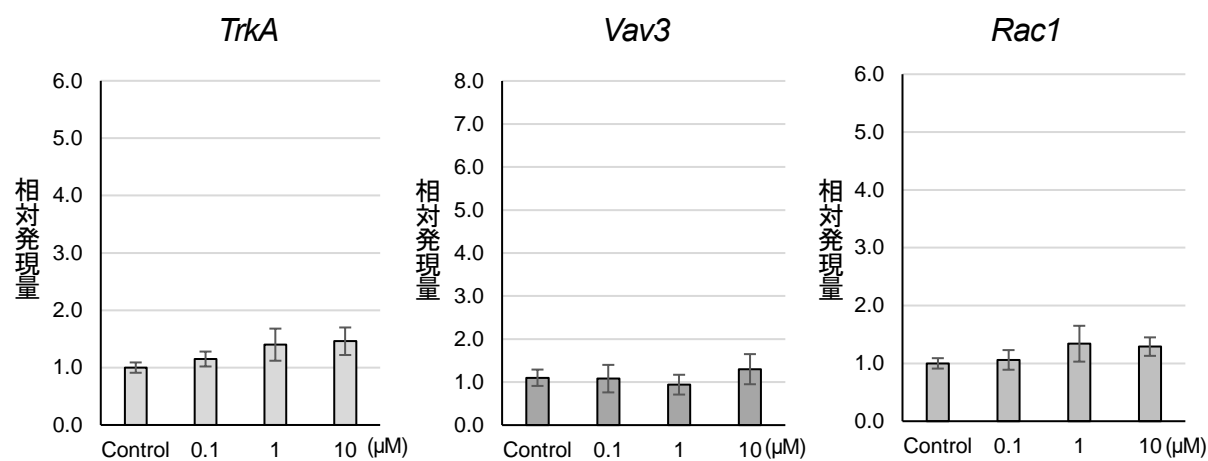
B. Pronuciferine (**6**) 48 時間処理

化合物 6 の濃度 (μM)	β -actin mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 \pm 0.05	0.91 \pm 0.12	1.39 \pm 0.45	1.36 \pm 0.20
<i>Vav3</i>	1.00 \pm 0.26	0.84 \pm 0.27	2.61 \pm 0.64	0.61 \pm 0.13
<i>Rac1</i>	1.00 \pm 0.08	1.20 \pm 0.32	1.75 \pm 0.41	1.71 \pm 0.27

数値は, 平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) を示している.

[J. Nat. Med. (2020), Table 4 より一部改変して引用]

A. 化合物 **5** (48 時間処理)



B. 化合物 **6** (48 時間処理)

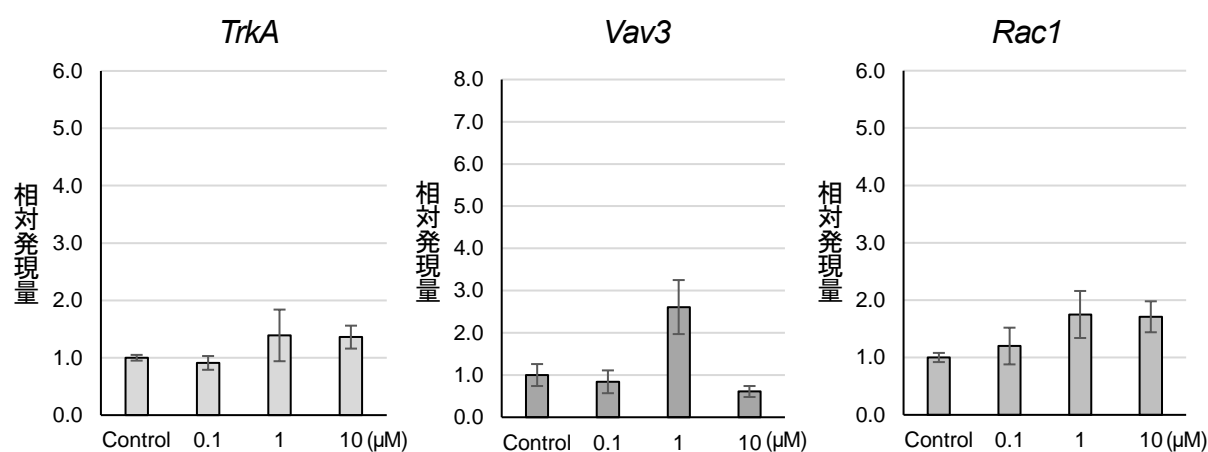


Fig. 15 Asimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) 48 時間処理後の mRNA 発現量変化

A. 化合物 **5** を 48 時間処理, B. 化合物 **6** を 48 時間処理した際の *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* mRNA 発現量

Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分についても同様の mRNA 発現量変化傾向が見られたため、これはアボルフィン型アルカロイドに共通する作用様式であると考えられた (Table 8, Fig. 16).

Table 8 Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分 48 時間処理後の mRNA 発現量変化

Et ₂ O 可溶性画分の濃度 (μg/mL)	<i>β-actin</i> mRNA に対する相対発現量			
	Control	0.1	1	10
<i>TrkA</i>	1.00 ± 0.20	2.13 ± 0.43*	2.62 ± 0.25**	1.06 ± 0.21
<i>Vav3</i>	1.00 ± 0.42	1.24 ± 0.39	2.44 ± 0.49	1.16 ± 0.28
<i>Rac1</i>	1.00 ± 0.21	1.94 ± 0.37	3.34 ± 0.43**	1.28 ± 0.26

数値は、平均値 ± 標準誤差 ($n=4$) を示している.

比較対照 (control) 群と比較したときの p 値が 0.01 以上 0.05 未満のときを*, 0.01 未満のときを**で示している.

[J. Nat. Med. (2020), Table 4 より一部改変して引用]

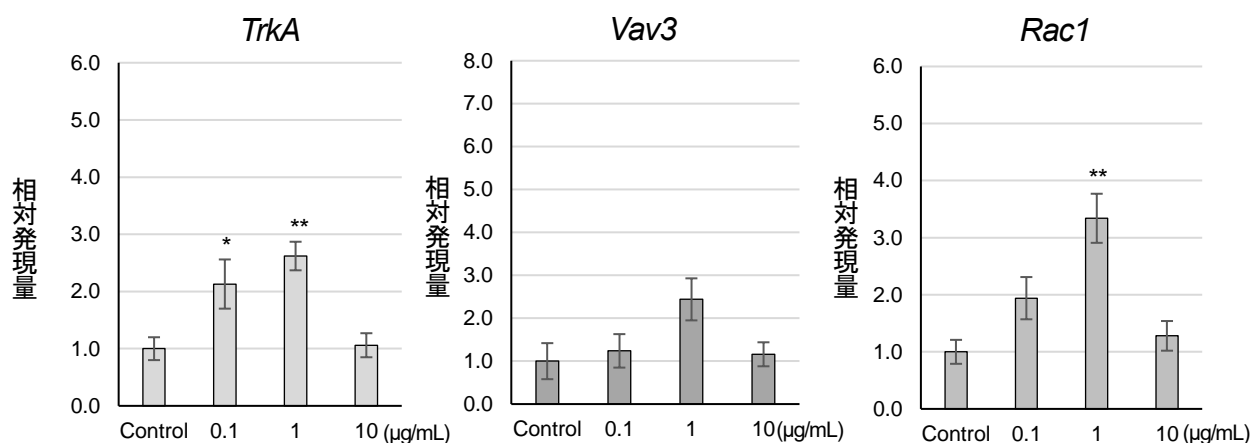


Fig. 16 Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分 48 時間処理後の mRNA 発現量変化

Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分を 48 時間処理した際の *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* mRNA 発現量

第四節 ハス花部含有神経様突起伸展促進作用アルカロイドの血液脳関門透過性

ハス花部含有アルカロイドが脳内で機能するのかを検討するため、神経様突起伸展促進作用を確認したアルカロイド成分のうち、特に作用が強く、収率の高かった *N*-methylassimilobine (**4**), assimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) の BBB 透過性試験を *in vitro* BBB モデルを用いて行い、液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) にて分析した。透過率はインサート内とインサート外の濃度を比較し、相対量を算出し、試行回数は各化合物 4 回ずつとした。

アルカロイドの LC-MS 測定条件は Morikawa らの報告⁶¹を参考に設定した。また、陽性比較対照薬として用いた caffeine の LC-MS 測定条件設定は以下のように行った。移動相について種々検討したところ、カラム担体への保持が認められ、シンメトリックなピークが得られたことから 20%MeOH に決定した。続いて、スキャン測定にて分子イオンピークを確認したところ、E+195 でピークが認められた。選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) 測定で 10 µg/mL および 1 µg/mL にて測定できることを確認し、測定条件とした (Fig. 17)。

結果として、**4** に 3.00%, **5** に 2.11% と十分な BBB 透過性を確認したが、**6** は 0.81% とほとんど BBB を透過しないことが分かった。なお、陽性比較対照薬として用いた caffeine は 5.35% の透過率であった (Table 9)。

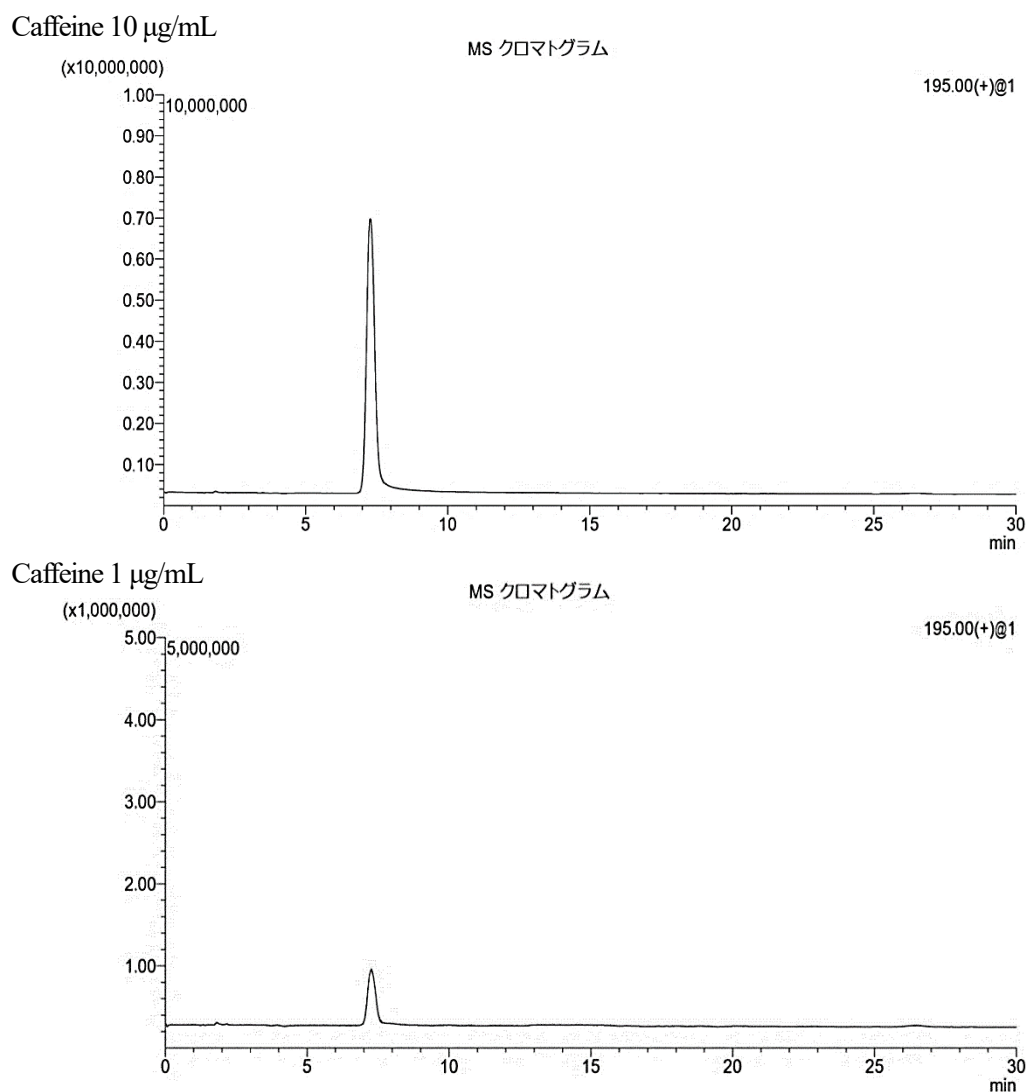


Fig. 17 Caffeine の SIM 測定の MS クロマトグラム
 カラム Cosmosil MS-II column (粒子径 5 µm, 2.0 mm id × 150 mm),
 移動相 20% methanol, 80% H₂O pH 3.0 adjusted by formic acid

Table 9 *In vitro* BBB モデルを用いたハス花部含有アルカロイドの BBB 透過性

被験物質	透過率 (%)
<i>N</i> -Methylasimilobine (4)	3.00 ± 0.42
Asimilobine (5)	2.11 ± 0.74
Pronuciferine (6)	0.81 ± 0.38
Caffeine (positive control)	5.35 ± 0.17

数値は、平均値 ± 標準誤差 (*n*=4) を示している。

考察

ハス花部含有アポルフィン型アルカロイドの (–)-lirinidine (**3**), *N*-methylassimilobine (**4**), asimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) に神経様突起伸展促進作用を明らかにし, 作用の確認された化合物の作用様式解明のために, PC-12 細胞の神経様突起伸展に関することが報告されている *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* の mRNA 発現量の変化を検討した. 化合物 **3** を 4 時間処理したとき, 0.1 および 1 μ M 処理では各 mRNA 発現量の増加が見られたものの, 10 μ M 処理では変化が見られなかった. 化合物 **3** および **4** を 48 時間作用させたときも同様の傾向であった. 神経様突起伸展促進作用は 10 μ M 処理において有意であったが, 本研究において検討した遺伝子発現量に変化はみられなかったことから, 本研究ではタンパク量の変化を確認していないが, 10 μ M 以上では同タンパク質が増加している可能性が考えられた. また, 推測の域を出ないが, 本研究で着目したシグナルとは別のシグナルが存在しており, アポルフィン型アルカロイドは低濃度で *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* のシグナルを介して突起伸展が観察されるが, 高濃度でこのシグナルにネガティブフィードバックがかかり, 別のシグナルが主として働いて突起伸展作用を発現する可能性があると考えられた.

これまでに, ウリクサ (*Lindernia crustacea*) に含有されるククルビタントリテルペン lindersin B⁶² は, *TrkA*/PI3K/ERK を介して, ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) に含有される cyathane ジテルペン erincine A⁶³ は *TrkA*/ERK を介して, *Sarcodon scabrosus* に含有される cyathane ジテルペンである sarcodonin G 誘導体⁶⁴ は *TrkA*/PKC および ERK/CREB を介して, PC-12 細胞の神経様突起伸展を促進することが報告されている. このように PC-12 細胞の突起伸展促進作用の作用機序についての報告のほとんどが *TrkA* の下流にある ERK や PKC, Akt の変化を検討しているものであるが, これらのタンパク質は様々な細胞内変化に関与しており, 神経に対する特異性が低いと考えたことから, 本研究では *TrkA* と ERK の間にあると考えられており, 形態変化に関与している, *Rac1* および *Vav3* の変化について検討を行った. なお, *Rac1* を介して PC-12 細胞の突起伸展を促進することが報告されている化合物の例として cyathane ジテルペンのひとつである cyrneine A⁶⁵ が挙げられ, AP-1 (activator protein-1) および NF- κ B の活性化を促進することが明らかにされている. このように突起伸展に関係する因子には AP-1 が正に作用する可能性が考えられる. 一方で, AP-1 は PC-12 細胞の神経様突起伸展において *TrkA* の転写を負に制御する⁶⁶ という報告もある.

また, BBB 透過性については, 神経突起伸展促進作用を有する化合物のうち, 特に作用の強かった 3 種のアポルフィン型アルカロイドについて, BBB 透過性の検討を行い, *N*-methylassimilobine (**4**), asimilobine (**5**) に十分な BBB 透過性を見出し, これらが脳内で作用する可能性が示唆された. それぞれのハス花部含有アルカロイドについて, 分子量, ClogP 値, PSA, 水素結合供与体数, 水素結合受容体数を算出し, 序論に記載した BBB 透過性化合物の物理化学的性質³⁷ との比較を行った. Table 10 に示すように, **4** の ClogP 値は少し範囲を超えていたもののほとんど上記の条件を満たしていた. このように, **4** および **5** は物理化学的観点からも BBB 透過性を有する可能性が高く, 本研究の結果を指示したものと考えられた. アポルフィンの構造をもたない **6** は他の化合物と比較して, ClogP 値が 1.837 と脂溶性が低くこれが BBB 透過性を示さなかったひとつの原因と考えられた.

Table 10. ハス花部含有アルカロイドの性質

	分子量	ClogP	PSA (Å)	水素結合供与体数	水素結合受容体数
Nuciferine (1)	295.38	3.623	21.70	0	3
Lysicamine (2)	291.31	3.688	47.89	0	4
(-)-Lirinidine (3)	281.35	3.156	32.70	1	2
<i>N</i> -Methylasimilobine (4)	281.35	3.156	32.70	1	2
Asimilobine (5)	267.33	2.490	41.49	2	1
Pronuciferine (6)	311.38	1.837	38.77	0	4
Nuciferine- <i>N</i> -oxide (7)	312.39	4.067	38.69	0	3
D,L-Armepavine (8)	313.40	3.189	41.93	1	3
Dehydronuciferine (9)	293.37	4.600	21.70	0	3
<i>N</i> -Nornuciferine (10)	281.35	2.966	30.49	1	2

小括

第一章では、アポルフィン型アルカロイドを特徴成分として含有するハスを素材として用い、MeOH 抽出エキス、EtOAc 可溶性画分、Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分、および 10 種の単離化合物について神経様突起伸展促進作用、作用成分の作用様式および BBB 透過性の検討を行った。

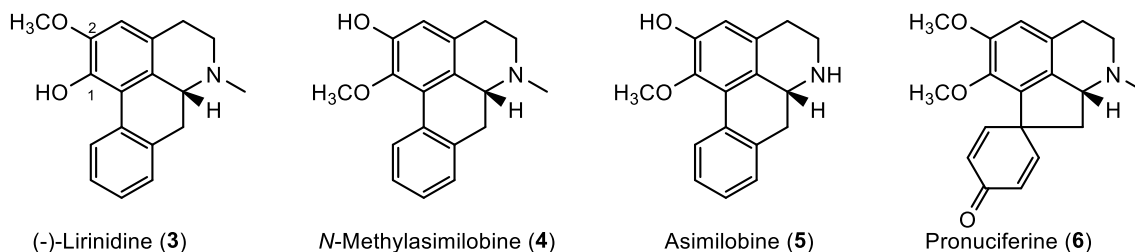
第一節において、予め MeOH 抽出エキスをを用いて神経様突起伸展促進作用を有する BBB 透過性成分の存在を明らかにし、その作用化合物の候補としてアポルフィン型アルカロイドまたはフラボノイド配糖体が考えられた。

第二節では、MeOH 抽出エキスおよび EtOAc 可溶性画分について神経様突起伸展促進作用を検討し、EtOAc 可溶性画分でより低濃度から作用が認められたため、主な作用成分はアポルフィン型アルカロイドであると仮説を立てた。アルカロイドを集約させる目的で Et₂O 可溶性アルカロイド集約画分を作製し作用の検討を行ったところ、より高い作用を見出し、アポルフィン型アルカロイド成分が主な作用成分である可能性が高いことを明らかにした。続いて、ハス花部に含有される 10 種のアポルフィン型アルカロイドについて検討したところ、(-)-lirinidine (**3**), *N*-methylassimilobine (**4**), asimilobine (**5**) および pronuciferine (**6**) に陽性比較対照薬ドネペジルと同等以上の有意な神経様突起伸展促進作用を見出した。構造と作用の比較から、1 位または 2 位の水酸基の存在が作用発現に重要であると考えられた。

神経様突起伸展促進作用を確認された化合物の作用様式を解明するため、第三節において、神経様突起伸展に関与していることが確認されている *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* について mRNA 発現量の変化を検討し、**3** を 4 時間処理し、PC-12 細胞における各タンパク質の mRNA 発現量の変化を検討したところ、*TrkA* および *Rac1* では 1 μM 処理、*Vav3* では 0.1 および 1 μM 処理で増加を確認した。しかし、10 μM 処理では各 mRNA の変化は見られなかった。

第四節では、作用アルカロイドが脳内での機能の有無を検討するため、BBB 透過性試験を行い、LC-MS にて分析したところ、**4** および **5** に十分な BBB 透過性を確認した。

これらのことから、**4** および **5** は、神経様突起伸展促進作用と BBB 透過性を兼ね備える化合物であることから、アルツハイマー型認知症の治療薬シード化合物として有望であると考えられた。



第二章 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

第一節 オオバゲッキツ葉部メタノール抽出エキス, 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

第一章第一節で用いた *in vitro* BBB モデルを用いて, 著者の所属している研究室で保有する植物エキスイブラリーのうち, オオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキス⁴⁷ 中の BBB 透過性成分の神経様突起伸展作用の有無を検討した. MeOH 抽出エキス 100 µg/mL をインサート内へ添加し, 透過した培養液について神経様突起伸展促進作用を検討し, control 群の陽性率 3.2%に対して被験物質処理群で 4.8% ($p=0.11$) と促進傾向を見出した. このことから, オオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキス中の BBB 透過性成分が突起伸展に対して促進傾向を示すことが示唆された.

オオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキス中に BBB 透過性の神経様突起伸展促進作用成分を見出したため, MeOH 抽出エキス単独での神経様突起伸展促進作用の確認を行ったところ, control 群の陽性率 2.8%に対して 1 µg/mL 処理群で 4.2% ($p=0.092$) と促進傾向があることが分かった (Table 11).

Table 11 オオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキスの神経様突起伸展促進作用

被験物質の濃度 (µg/mL)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)			
	Control	0.1	1	10
MeOH 抽出エキス	2.8	3.1	4.2	2.8
	(20/728)	(29/616)	(26/616)	(25/898)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%)」[(突起伸展を示した細胞数/総細胞数)×100]を示しており, 同条件で行った 4 回の試験結果の合計である.

[*J. Nat. Med.* (2020), Table 1 より一部改変して引用]

次に, 神経様突起伸展に対する促進傾向を確認したオオバゲッキツ葉部 MeOH 抽出エキスの作用成分の探索のため, 著者の所属している研究室で保有する化合物ライブラリーの中から過去に単離, 同定された 9 種のカルバゾール型アルカロイド mahanimbicine (**11**, 0.0263%), mahanimbine (**12**, 0.0812%), murrayamine-B (**13**, 0.0032%), *O*-methylnahanine (**14**, 0.0021%), pyrayafoline D (**15**, 0.0012%), eustifoline-C (**16**, 0.0012%), euchrestine-B (**17**, 0.0239%), murrayamine-E (**18**, 0.0016%), koenimbine (**19**, 0.0013%) (Fig. 18)⁴⁵ について神経様突起伸展促進作用を検討した (Table 12). 第一章と同様に陽性対照にはドネペジルを用いた (陽性率: control 群 4.8%に対して 10 µM 処理群 7.5%, $p=0.028$). オオバゲッキツ含有アルカロイドのうち, murrayamine-E (**18**) にドネペジルと同等程度の有意な突起伸展促進作用を確認した (陽性率: control 群 4.1%に対して 10 µM 処理群 7.2%, $p=0.021$) ことから, **18** にプレ

ニル基が結合しているように、窒素原子への官能基の結合が作用発現に重要であると示唆された。この結果から、カルバゾール型アルカロイドが神経様突起伸展促進作用成分として有望であると考えられた。

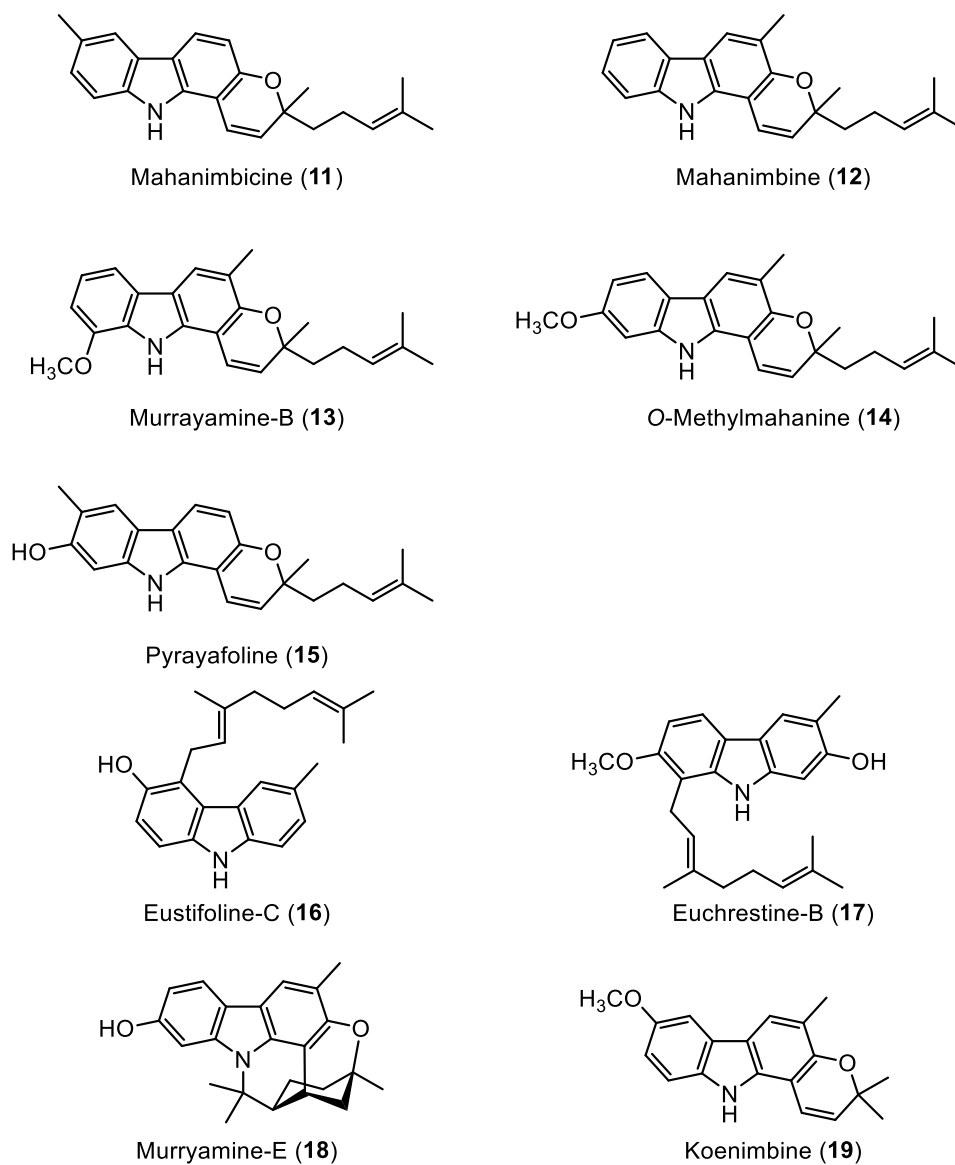


Fig. 18 オオバゲッキツ葉部含有カルバゾール型アルカロイドの化学構造
[*J. Nat. Med.* (2020), Fig. 1 より一部改変して引用]

Table 12 オオバゲッキツ葉部含有アルカロイドの神経様突起伸展促進作用

被験物質の濃度 (μM)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)			
	Control	0.1	1	10
Mahanimbicine (11)	3.9 (18/464)	2.2 (14/617)	3.8 (21/560)	4.9 (25/514)
Mahanimbine (12)	5.0 (20/410)	5.8 (25/428)	6.9 (28/407)	7.6 (32/422)
Murrayamine-B (13)	4.7 (28/601)	5.5 (38/695)	5.2 (26/496)	6.6 (38/576)
O-Methylmahanine (14)	4.1 (22/542)	4.4 (21/482)	4.1 (23/564)	4.8 (25/525)
Pyrayafoline D (15)	5.2 (24/466)	5.6 (37/666)	5.0 (25/495)	5.0 (27/536)
Eustifoline-C (16)	3.1 (17/556)	3.5 (19/537)	4.2 (22/530)	4.0 (26/650)
Euchrestine-B (17)	3.7 (18/485)	4.3 (21/494)	6.0 (32/534)	3.2 (19/593)
Murrayamine-E (18)	4.1 (22/538)	4.2 (24/573)	5.2 (27/519)	7.2* (35/487)
Koenimbine (19)	3.7 (23/615)	3.7 (20/546)	4.8 (26/546)	5.5 (31/565)
ドネペジル (Positive control)	4.8 (29/604)	6.6 (34/513)	7.1 (42/588)	7.5* (55/736)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%)」[(突起伸展を示した細胞数/ 総細胞数)×100]を示しており、同条件で行った4回の試験結果の合計である。

比較対照 (control) 群と比較し p 値が 0.01 以上 0.05 未満の場合を*で示している。

[J. Nat. Med. (2020), Table 2 より一部改変して引用]

続いて、Fig. 19 および 20 で示したスキームで合成したカルバゾール誘導体 (Fig. 21) について神経様突起伸展促進用を検討した (Table 13). しかし、基本骨格である carbazole (20) および 4 位に水酸基が結合した 4-hydroxycarbazole (21) は突起伸展促進作用を示さなかった. オオバゲッキツ葉部にはプレニル基を側鎖にもつ化合物が多く含有されていたことから、9 位の窒素原子にプレニル基を導入した 9-(3,3-dimethylallyl)-9*H*-carbazole (23) および 9-(3-dimethylallyl)-9*H*-carbazol-4-ol (25) を合成し作用を検討したが、促進作用は観察されなかった. そこで、9 位の窒素原子にベンジル基導入によって酸化ストレスによる細胞障害性が低下されるという報告⁶⁷を参考にして合成した 9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol (28) に神経様突起伸展に対する促進傾向 (陽性率: control 群 3.1% に対して被験物質 1 μ M 処理群 4.9%, $p=0.079$) を確認した. また、9-benzyl-9*H*-carbazole (26) に作用が見られなかったことから 4 位の水酸基が作用の発現に必要であることが推察された.

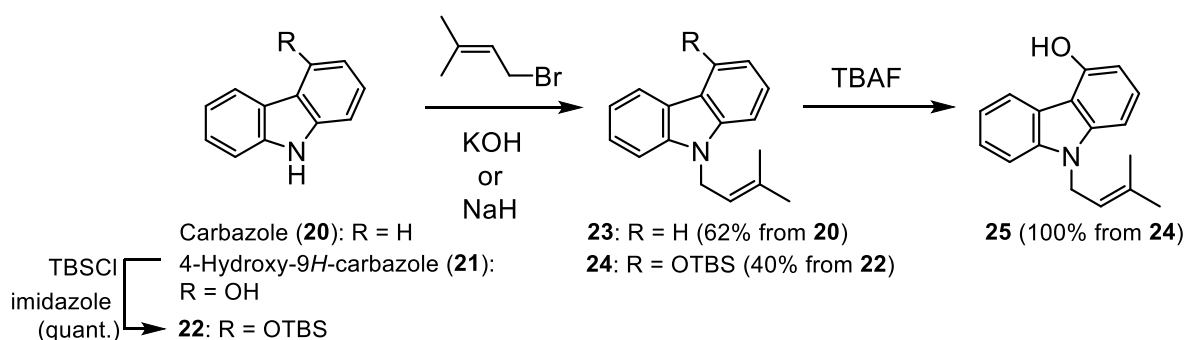


Fig. 19 化合物 23 および 25 の合成スキーム

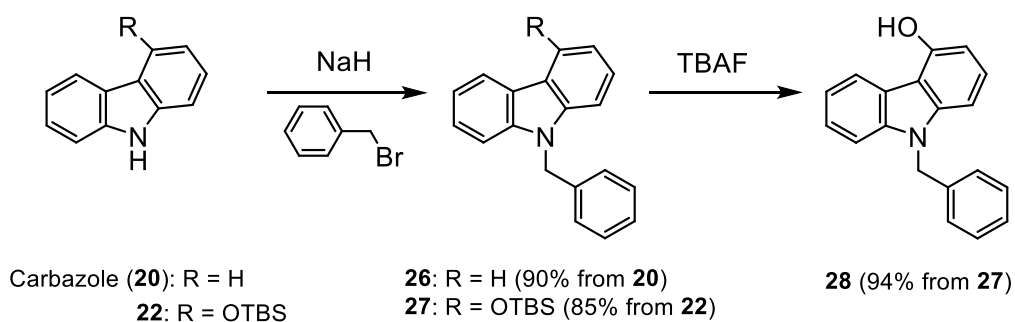


Fig. 20 化合物 26 および 28 の合成スキーム

[*J. Nat. Med.* (2020), Fig. 2 より一部改変して引用]

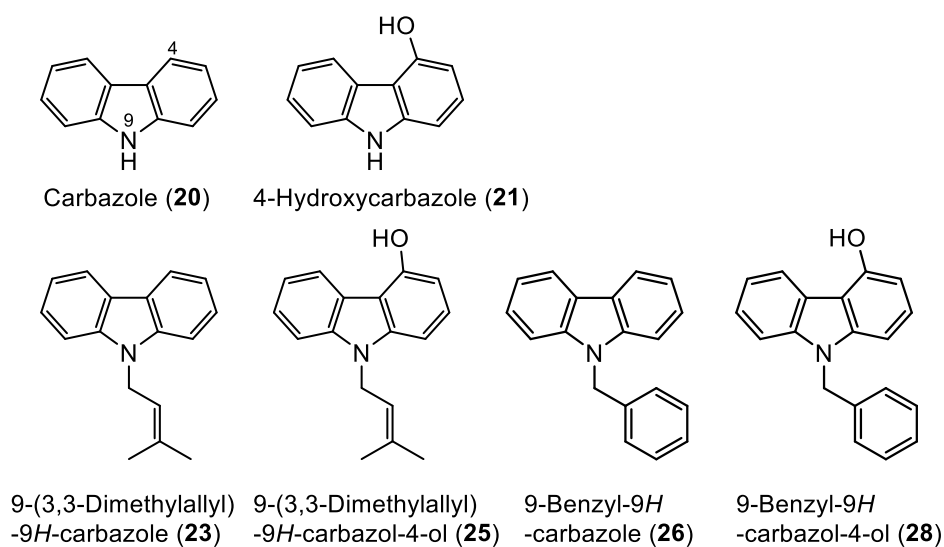


Fig. 21 作用を検討したカルバゾール誘導体の化学構造

Table 13 カルバゾール誘導体の神経様突起伸展促進作用

被験物質の濃度 (μM)	突起伸展を示した細胞の割合 (%)		
	Control	0.1	1
Carbazole (20)	2.6 (14/532)	1.5 (9/602)	2.5 (14/568)
4-Hydroxycarbazole (21)	3.3 (19/582)	3.1 (17/549)	2.4 (13/534)
9-(3,3-Dimethylallyl)-9H-carbazole (23)	3.0 (28/936)	1.9 (17/898)	2.7 (25/913)
9-(3-Dimethylallyl)-9H- carbazol-4-ol (25)	5.3 (31/580)	5.3 (33/627)	4.2 (29/691)
9-Benzyl-9H-carbazole (26)	3.9 (22/565)	3 (14/460)	3.2 (16/502)
9-Benzyl-9H-carbazol-4-ol (28)	3.1 (18/584)	3.5 (17/483)	4.9 (25/506)

数値は「神経様突起を示した細胞の割合 (%) [(突起伸展を示した細胞数/ 総細胞数)×100]」を示しており、同条件で行った 4 回の試験結果の合計である。

[J. Nat. Med. (2020), Table 3 より一部改変して引用]

第二節 カルバゾール誘導体の認知記憶力への作用

前節で神経様突起伸展促進作用が確認され、合成によって量的な確保が可能であった **28** について認知記憶力改善作用を評価するため、新奇物体認識試験およびモーリス水迷路試験を行った。試験には、アルツハイマー病モデルマウス的一种である APPswe/PS1dE9 (APdE9) マウス⁶⁸ を用いた。

第一項 アルツハイマー病モデルマウス APPswe/PS1dE9 (APdE9)

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として、21 番染色体の APP 遺伝子⁶⁹、14 番染色体のプレセニリン 1 遺伝子⁷⁰、1 番染色体のプレセニリン 2 遺伝子⁷¹、関連遺伝子としてアポリポ蛋白 E 遺伝子⁷² がある。

本研究で用いた APdE9 マウスは、原因遺伝子の APP の家族性変異のひとつである Swedish 変異およびエクソン 9 を欠損したプレセニン 1 の遺伝子が導入されたマウスである。APP 遺伝子における Swedish 変異は β セクレターゼ切断部位近傍で起こり、APP の β セクレターゼ 1 に対する親和性を高めることで、総 A β 産生量を上昇させると言われている。一方で、プレセニンは APP から A β を産生する酵素で、 γ -セクレターゼの活性本体ではないかと考えられているが、APP への直接的な影響は検証中である。このような遺伝子変異をもつ APdE9 マウスは、加齢に伴って海馬および大脳皮質でリン酸化タウタンパク質、A β およびその沈着が蓄積しやすい性質をもち、6 ヶ月齢頃から A β の沈着および認知機能障害が見られる⁷³ ことから、アルツハイマー型認知症モデルマウスとして用いられている。

本研究では、6-7 ヶ月齢雌性の野生型および APdE9 マウスに生理食塩水または化合物 **28** (10 mg/mL) を 30 日間腹腔内投与し、新奇物体認識試験、モーリス水迷路試験の順に実施した。

第二項 新奇物体認識試験

新奇物体認識試験⁷⁴は、新奇性を好むというげっ歯類の特性を利用した試験で、初めに観察箱に馴化させたマウスを一定時間後に2個の物体を観察箱内に設置し自由に探索させる。さらに一定時間後に片方の物体を新規の物体に変えて再度マウスを観察箱に入れて物体の探索時間を測定する (Fig. 22)。正常なマウスでは新奇性のある物体により長い時間探索行動を示し、物体の形状の記憶を反映していると考えられ、新奇物体認識試験は視覚的認知記憶力を評価することが出来る。本試験は、報酬や罰などの強化因子を用いないことから情動レベルの低い条件で形成される記憶を検出できると考えられる。

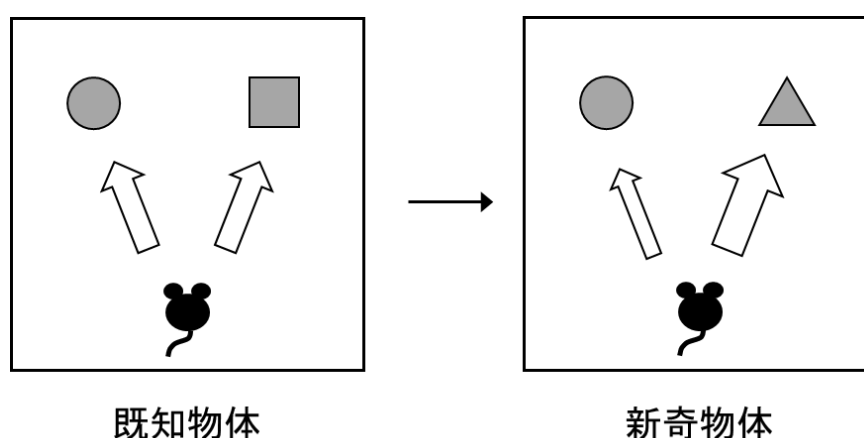


Fig. 22 新奇物体認識試験の実験概略図

1回目の試行で2つの物体を設置したフィールド上にマウスを10分間自由に探索させ、30分間の休憩後、2回目の試行では一方を新しい物体(新奇物体)に変えて10分間自由に探索させる。マウスが鼻先を物体へつけた回数の変化により興味の変化を検討でき、野生型マウスは1回目の試行では各物体へ等しく興味を示し、2回目の試行では新規物体に対してより高い興味を示すと考えられる。

本研究では、マウスの物体への興味の指標として、マウスの鼻部が物体への接触回数を割合として算出し評価した。生理食塩水処置野生型マウス ($n=5$) は1回目の試行では $49.8 \pm 1.5\%$ と二つの物体に対して同程度の興味を示し、2回目の一方の物体を変えた試行で新しい物体へ $65.1 \pm 7.2\%$ とより高い接触回数割合を示した。生理食塩水処置 APdE9 マウス ($n=5$) では、1回目 $51.7 \pm 2.3\%$ 、2回目 $39.2 \pm 5.9\%$ と新奇物体への接触回数割合は上昇しなかったが、**28** 処置 APdE9 マウス ($n=4$) では1回目 $45.5 \pm 3.5\%$ 、2回目 $49.8 \pm 2.7\%$ と新奇物体への接触回数割合の増加が観察された (Table 14, Fig. 23)。

生理食塩水処置 APdE9 マウス群と **28** 処置 APdE9 マウス群で新奇物体への接触回数割合を比較したところ、**28** 処置群で上昇傾向が見られた ($p=0.08$) ことから、化合物 **28** に視覚的認知記憶力を向上する傾向が確認された。

Table 14 化合物 **28** の視覚的認知記憶力への作用

	接触回数の割合 (%)	
	既知物体	新奇物体
生理食塩水 (野生型)	49.8 ± 1.5	65.1 ± 7.2
生理食塩水 (APdE9)	51.7 ± 2.3	39.2 ± 5.9
28 (APdE9)	45.5 ± 3.5	49.8 ± 2.7

数値は、平均値 ± 標準誤差 ($n=4-5$) で示している.

APdE9: APP^{swe}/PS1dE9

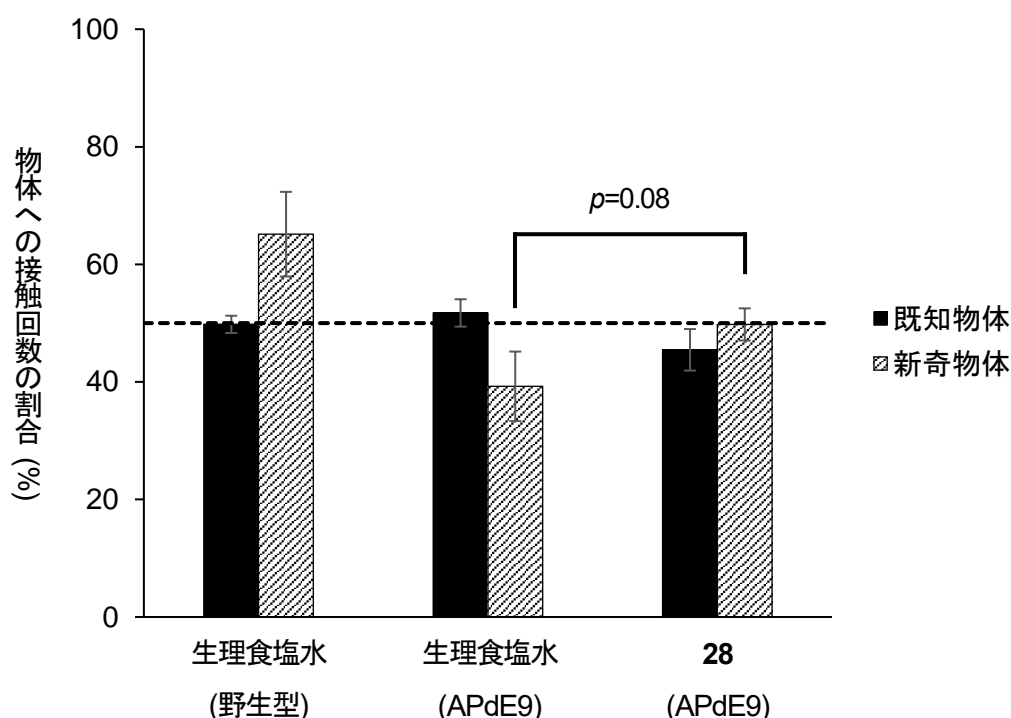


Fig. 23 化合物 **28** の視覚的認知記憶力への作用

平均値 ± 標準誤差 ($n=4-5$) で示している. 30 日間被験物質を投与し, 新奇物体認識試験を実施した. 各物体への接触回数を割合で表した [既知物体または新奇物体への接触回数/ 総接触回数 (%)] ($n=4-5$). 生理食塩水処置 APdE9 マウス群に比較して **28** 処置 APdE9 マウス群の新奇物体への接触回数割合は増加傾向がみられた ($p=0.08$). APdE9: APP^{swe}/PS1dE9.

[J. Nat. Med. (2020), Fig. 3 より一部改変して引用]

第三項 モーリス水迷路試験

モーリス水迷路試験⁷³は、白濁させたプールにプラットフォーム (逃避台) を設置し、マウスを泳がせてプールの壁面の図形を目印に逃避台の位置を記憶しているかを測定する試験で、空間認知記憶力を評価する試験として汎用されている^{76,77} (Fig. 24).

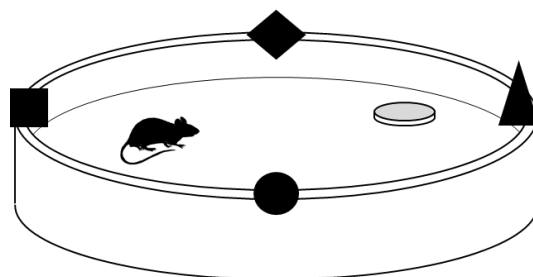


Fig. 24 モーリス水迷路の実験方法

トレーニングでは、逃避台であるプラットフォームおよびプールの壁面に目印を設置したプールにマウスを1分間泳がせる試行を1日に4回開始位置を変えて行い、たどり着くまでの時間を評価した。プローブテストでは、プラットフォームを撤去して1分間泳がせ、プラットフォームの設置していた場所を横切った回数を評価した。

はじめ5日間はトレーニングとして、最大60秒間泳がせ、設置したプラットフォームへとたどり着くまでの時間を評価したところ、生理食塩水処置した野生型マウス ($n=5$)、生理食塩水処置した APdE9 マウス ($n=5$) および **28** を処置した APdE9 マウス ($n=4$) の3群間で差は確認されなかった (Table 15A, Fig. 25A).

トレーニング後のプローブテストでは、プラットフォームを撤去した状態で60秒間泳がせ、プラットフォームのあった場所を横切った回数を評価したところ、生理食塩水処置した APdE9 マウスでは平均1.2回、**28** を処置した APdE9 マウスで2.3回と成績の上昇傾向を確認した ($p=0.08$) (Table 15B, Fig. 25B). このように、**28** に APdE9 マウスの空間認知記憶力を改善させる傾向を見出した。なお、これまでの報告では生理食塩水投与 APdE9 マウス群で平均約1回、ドネペジル (1 mg/kg) 投与 APdE9 マウス群で約2.7回逃避台のあった場所を横切った⁷⁸とあり、**28** 投与ではドネペジルより緩徐ではあるものの記憶力改善作用が期待できた。

新奇物体認識試験およびモーリス水迷路試験の結果から、**28** はマウス脳内で作用し、認知記憶力を向上させる可能性が考えられた。

Table 15 化合物 **28** の空間認知記憶力への作用

A. トレーニング

	プラットフォームにたどり着くまでの時間 (秒)				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
生理食塩水 (野生型)	48.8 ± 4.1	23.2 ± 4.3	34.4 ± 4.7	34.1 ± 5.3	29.6 ± 5.1
生理食塩水 (APdE9)	58.5 ± 1.4	45.0 ± 4.2	43.6 ± 4.8	33.7 ± 5.3	37.1 ± 4.5
28 (APdE9)	53.1 ± 3.3	48.6 ± 4.1	41.3 ± 4.7	48.3 ± 4.5	37.6 ± 5.2

数値は、平均値 ± 標準誤差 ($n=4-5$) で示している.

APdE9: APP^{swe}/PS1dE9

B. プローブテスト

	プラットフォームのあった場所を横切った回数 (回)
生理食塩水 (野生型)	2.2 ± 1.1
生理食塩水 (APdE9)	1.2 ± 1.5
28 (APdE9)	2.3 ± 0.5

数値は、平均値 ± 標準誤差 ($n=4-5$) で示している.

APdE9: APP^{swe}/PS1dE9

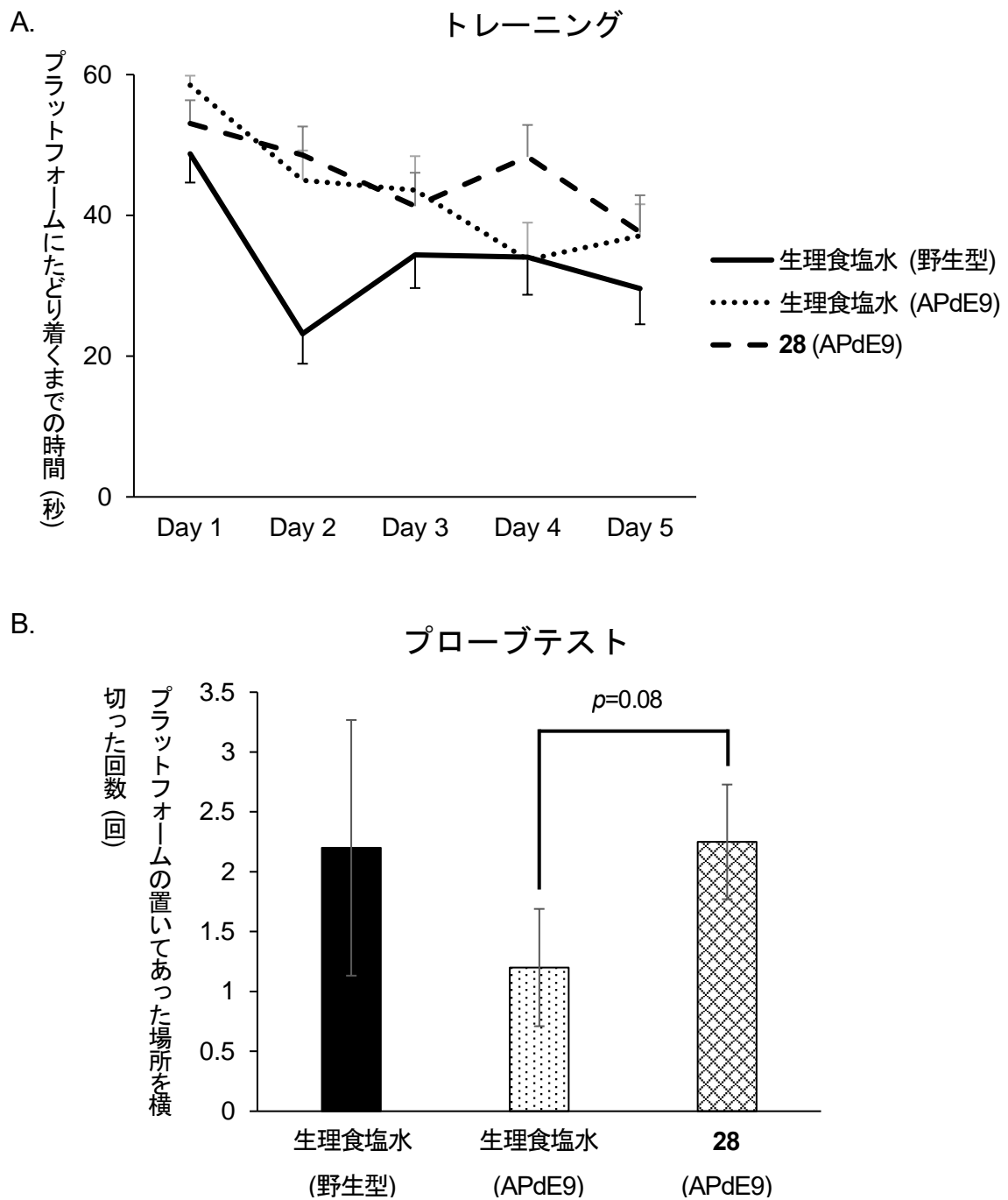


Fig. 25 化合物 **28** の空間認知記憶力への作用

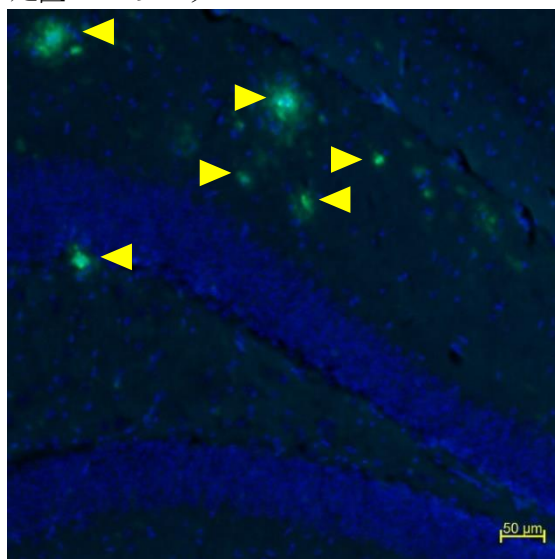
グラフは、平均値 \pm 標準誤差 ($n=4-5$) で示している。30 日間被験物質を投与し、新奇物体認識試験後にモーリス水迷路試験を実施した。A. 1-5 日目のトレーニングでは、マウスを逃避台であるプラットフォームへたどり着くまで最大 60 秒間泳がせ、スタート位置を変えながら 1 日 4 回試行を行い到達時間の平均値を算出した ($n=4-5$)。B. 6 日目のプローブテストでは、プラットフォームを撤去してマウスを 60 秒間泳がせ、プラットフォームの置いてあった場所を横切った回数の平均値を算出したところ生理食塩水処置 APdE9 マウス群と比べて **28** 処置野生型マウス群で成績の向上傾向が見られた ($p=0.08$)。APdE9: APP^{swe}/PS1^{dE9}。

[J. Nat. Med. (2020), Fig. 4 より一部改変して引用]

第四項 カルバゾール誘導体のマウス海馬歯状回への影響

本研究では、遺伝子的に A β 沈着しやすいとされるアルツハイマー病モデルマウス APdE9 マウスを用いたことから、APdE9 マウスの A β 沈着の確認と化合物 **28** が与えた影響について検討した。なお、細胞の核を青色 (Hoechst 33342) で、Alexa Fluor 488 にて緑色で A β を染色した。結果として、生理食塩水処置 APdE9 マウスでは、A β が海馬歯状回周辺へ沈着していることを確認し (Fig. 26A), 化合物 **28** 処置群でも同程度の沈着が見られた (Fig. 26B) ことから、化合物 **28** は APdE9 マウスの A β 沈着には影響を与えないことが示唆された。

A. 生理食塩水処置 APdE9 マウス



B. 化合物 **28** 処置 APdE9 マウス

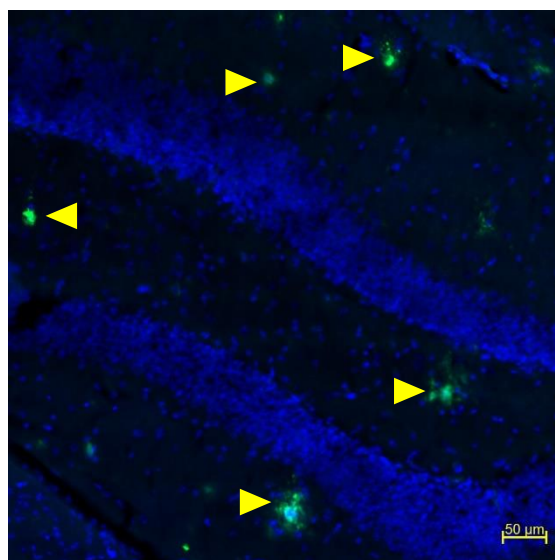


Fig. 26 APdE9 マウスの海馬歯状回の A β 沈着
30 日間被験物質を投与し、新奇物体認識試験およびモーリス水迷路試験実施 1 日後の A. 生理食塩水処置, B. **28** 処置した APdE9 マウス海馬歯状回の A β . 青: 細胞核 (Hoechst33342), 緑: A β (Alexa Fluor 488), APdE9: APP^{swe}/PS1^{dE9}.

続いて、化合物 **28** の神経新生作用を検討するため、前節で *in vivo* 試験を行ったマウスの海馬歯状回における神経新生マーカーであるダブルコルチン (doublecortin, DCX) の発現を確認した。

DCX は微小管結合タンパク質のひとつで、微小管の安定化、束状化および形成促進に関わっていることが報告⁷⁹ されており、未成熟神経マーカーとして用いられる⁸⁰。神経新生が活発に起こることが報告されている海馬歯状回では、顆粒層と歯状回門の境界領域である顆粒細胞層下帯で増殖したニューロン前駆体が新たなニューロンへと分化し、顆粒細胞層へと組み込まれる⁸¹。

海馬歯状回の神経新生において、ニューロンへの分化過程は形態学的特徴や発現分子の違いによって Type1, Type2 および Type3 に分類されており、Type1 は、アストロサイトマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 陽性の放射状の突起をもつ細胞で放射状グリア様細胞と呼ばれており、分裂能が低く幹細胞に近い細胞で、放射状グリアのマーカーである brain lipid-binding protein (BLBP)、幹細胞マーカーである nestin および sex determining region Y-box 2 (Sox2) を発現している。Type2 は高い分裂能を持つ神経細胞前駆細胞であり、GFAP は陰性で、BLBP および Sox2 を発現するが、DCX およびポリシアル酸化神経細胞接着分子 (polysialylated form of neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM) を発現し始める。Type2 は更に前期 (Type2a) と後期 (Type2b) に分けられ、2a 型は nestin を発現し、2b 型は、neurogenic differentiation1 (NeuroD) および prospero homeobox protein 1 (Prox1) を発現する。3 型細胞はゆるやかな増殖能を持ち、神経芽細胞として顆粒細胞層へと移動し、分裂活性を失った未成熟ニューロンに移行する細胞であり、幹細胞マーカーを発現せず、ニューロンマーカーである DCX, PSA-NCAM, NeuroD および Prox1 を発現する⁸² (Fig. 27)。

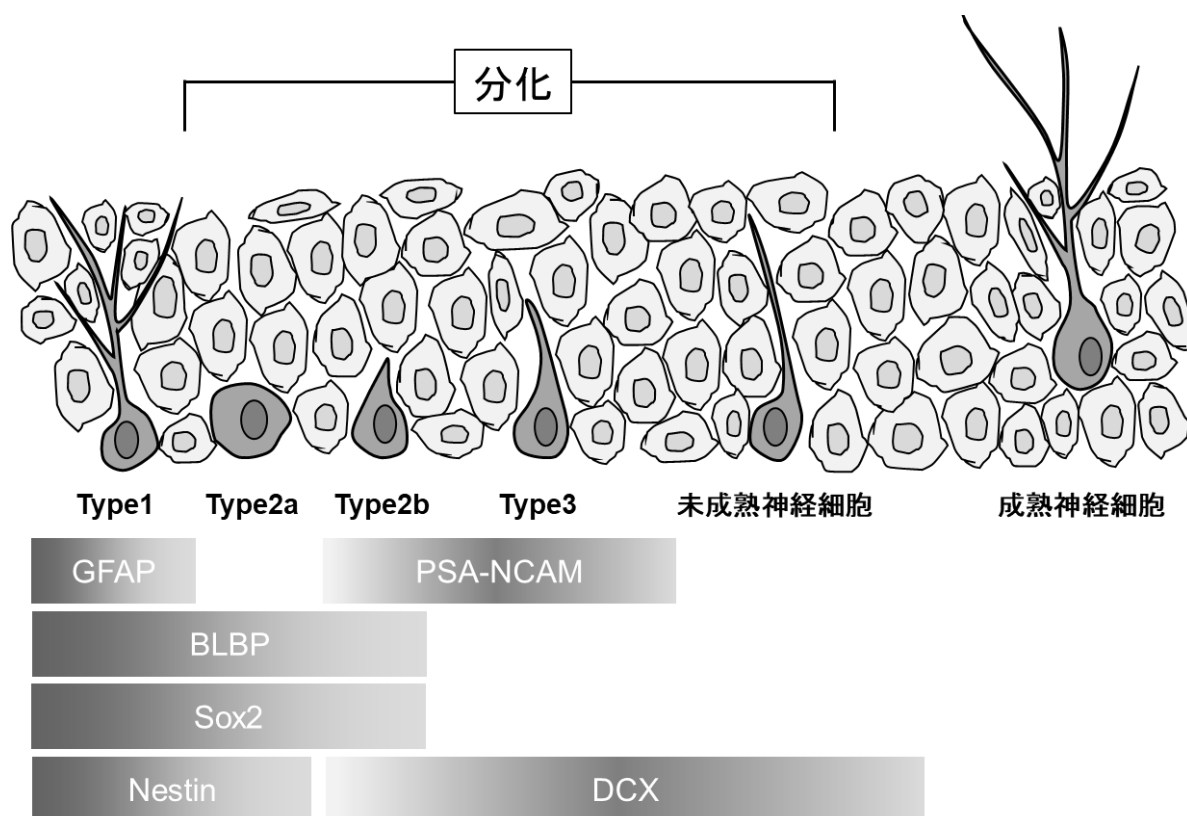


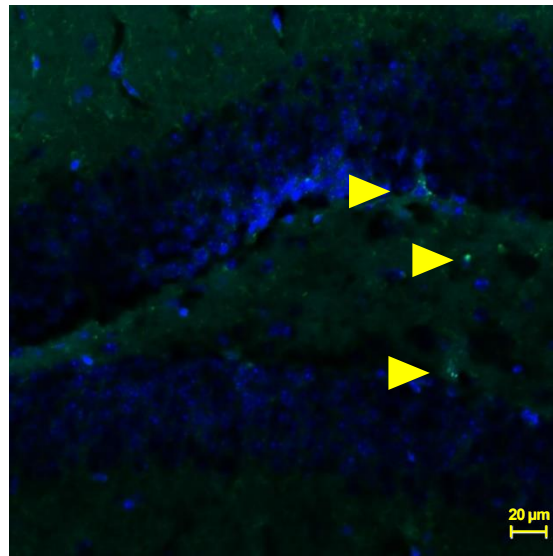
Fig. 27 ニューロンへの分化過程の概略図

GFAP: glial fibrillary acidic protein, BLBP: brain lipid-binding protein, Sox2: sry-related HMG box transcription factor 2, PSA-NCAM: polysialylated form of neural cell adhesion molecule, Prox1: prospero homeobox protein 1, DCX: doublecortin

本研究では、分化段階である Type2 から未成熟ニューロンに至るまでの期間で陽性となることから、新生のマーカーとして汎用されている DCX の発現を検討した。なお、細胞の核を Hoechst 33342 (青色) で、DCX を Alexa Fluor 488 で標識した抗体 (緑色) で染色した。

生理食塩水処置群 APdE9 マウス (Fig. 28A) に比較して化合物 **28** 処置群では、より多くの DCX 陽性細胞が観察された (Fig. 28B)。このことから、化合物 **28** は海馬歯状回において神経幹細胞からニューロンへの分化および成熟を促進した可能性がある。

A. 生理食塩水処置 APdE9 マウス



B. 化合物 **28** 処置 APdE9 マウス

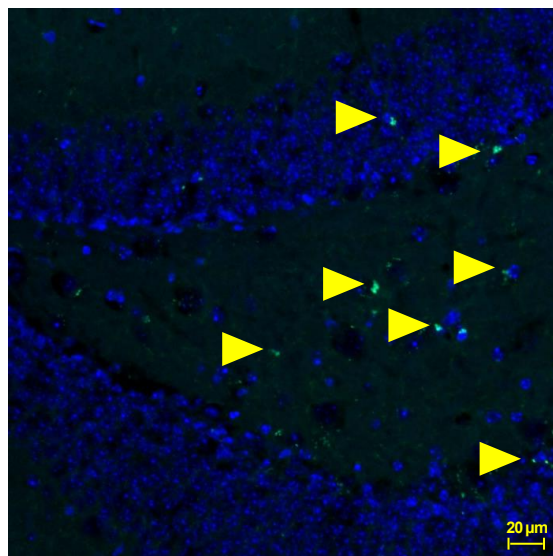


Fig. 28 APdE9 マウスの海馬歯状回の DCX 陽性細胞

30 日間被験物質を投与し，新奇物体認識試験およびモーリス水迷路試験実施
1 日後 A. 生理食塩水処置， B. **28** 処置した APdE9 マウス海馬歯状回の DCX.

青: 細胞核 (Hoechst33342)， 緑: DCX (Alexa Fluor 488)

APdE9: APP^{swe}/PS1^{dE9}.

第三節 カルバゾール誘導体のヒト iPS 細胞由来神経細胞に対する成熟促進作用

ヒト人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞は、2007 年に作製された様々な組織や臓器の細胞に分化する能力と無限に増殖する能力をもつ細胞である⁸³。iPS 細胞は再生医療および新薬開発などに活用できると考えられており、また、iPS 細胞は体細胞から作製できることから、胚盤胞から作製される胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞と比べて、倫理的問題を解決できるという点で利用しやすく、世界中で盛んに研究が行われている。

本研究では、過去の報告を参考にしてヒト iPS 細胞を大脳皮質神経細胞へと分化⁸⁴させ、その過程で **28** を作用させ、神経成熟に及ぼす影響を検討した。

分化能を有する iPS 細胞から神経細胞へと分化させる過程において、神経細胞になる運命が決定した神経幹細胞では SOX2 陽性になる⁸⁵。未成熟神経細胞では DCX およびチューブリン β III (tubulin β III, TUBB3)⁸⁶ が陽性となり、成熟すると DCX は陰性となり、MAP2⁸⁷ が陽性となる (Fig. 29)。

iPS 細胞を大脳皮質の神経細胞へと分化させる過程では、paired box protein 6 (PAX6) や forkhead box protein G1 (FOXG1) が陽性となることが報告されている (Fig. 29)。発生過程において外胚葉から神経板が形成され、内側に陥入し左右が癒着することで神経管が形成される。神経管の前方で三カ所が膨らみ、前脳胞、中脳胞、菱脳胞とそれに続く神経管が構成された後、前脳胞は終脳と間脳胞へ、菱脳胞は後脳胞と髄脳胞へ分かれ、神経管は脊髄になる⁸⁸。胚形成の際、最終的に大脳を形成する終脳で PAX6 陽性となり、FOXG1 は終脳前駆細胞で高頻度陽性となる⁸⁴。

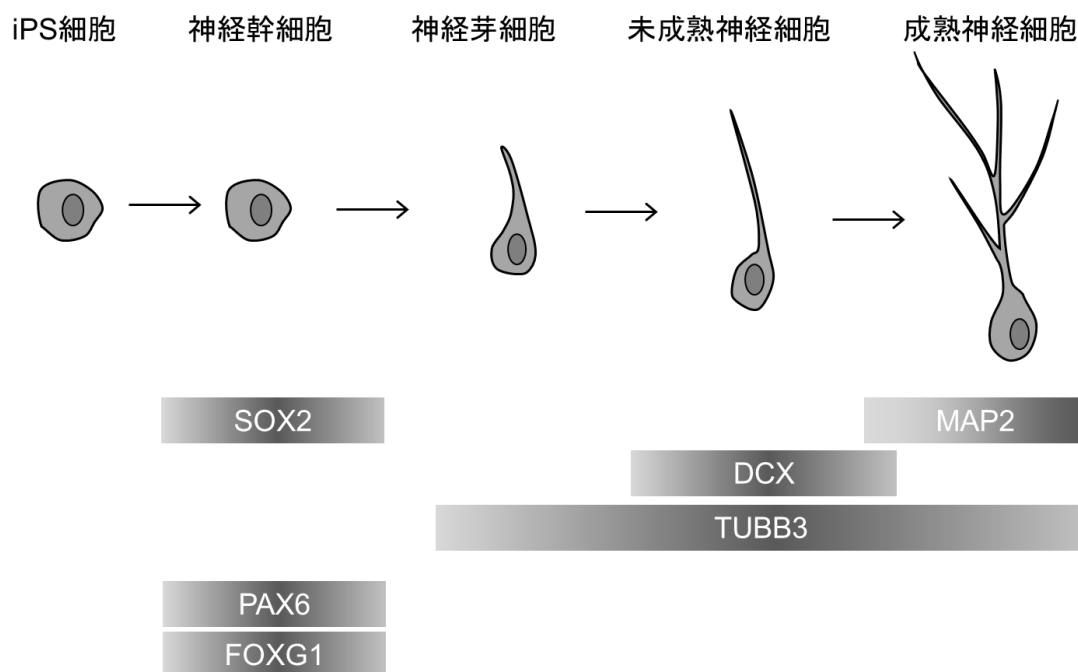


Fig. 29 iPS 細胞から大脳皮質神経への分化・成熟における発現マーカー

iPS 細胞: induced pluripotent stem cell, SOX2: sex determining region Y-box 2, DCX: doublecortin, TUBB3: tubulin β III, MAP2: microtubule associated protein 2, PAX6: paired box protein 6, FOXG1: forkhead box protein G1

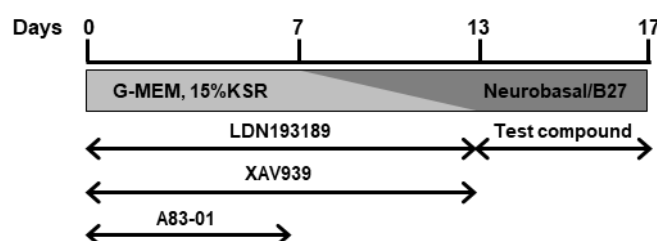
陽性比較対照 (positive control, P/C) は 10 μ M *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine-*t*-butylester (DAPT), 5 μ M SU5402 および 1 μ M PD035901 とともに培養し, 陰性比較対照 (negative control, N/C) は培養液のみで培養した. 未成熟神経細胞で発現する *TUBB* と *DCX* の mRNA 発現量の変化を検討したところ, **28** は各 mRNA 発現量を増加させる傾向が観察された (Table 16, Fig. 30B). この結果は, 試行回数が 1 回であるが, **28** は神経成熟促進作用をもつ可能性が考えられた.

Table 16 化合物 **28** のヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞に対する各 mRNA 発現量への影響

	<i>GAPDH</i> mRNA に対する相対発現量				
	N/C	P/C	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
<i>TUBB3</i>	1.00	1.68	0.89	1.07	1.43
<i>DCX</i>	1.02	1.52	0.72	1.24	1.68

n=1

A.



B.

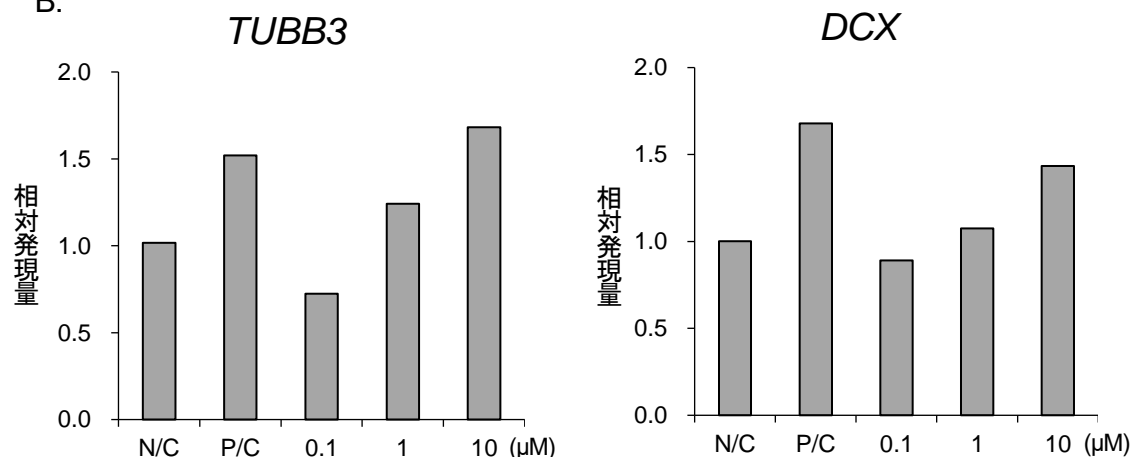


Fig. 30 化合物 **28** のヒト iPS 細胞由来大脳皮質神経細胞に対する各 mRNA 発現量への影響

P/C (positive control) は 10 μ M *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine-*t*-butylester (DAPT), 5 μ M SU5402 および 1 μ M PD035901 とともに培養, N/C (negative control) は培養液のみで培養. *TUBB3*: tubulin beta III, *DCX*: doublecortin

[*J. Nat. Med.* (2020), Fig. S1 より一部改変して引用]

考察

まず初めに *in vitro* BBB モデルを用いて MeOH 抽出エキスを BBB 透過性を有する神経様突起伸展促進作用をもつ成分が含有されることを確認した。各単離化合物について検討を行ったところ、murrayamine-E (**18**) に有意な神経様突起伸展促進作用を見出し、複素環の窒素原子へ官能基が結合していることが作用発現と関係している可能性が考えられた。次に、4 種のカルバゾール誘導体を合成し神経様突起伸展促進作用の検討を行ったところ、9-benzyl-9H-carbazole (**26**) に作用が見られず、9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (**28**) に促進傾向を確認したことから、4 位の水酸基が作用発現に重要であることが示唆された。

加えて、野生型および APdE9 マウスを用いて新奇物体探索試験およびモーリス水迷路試験を行い、**28** の認知記憶力改善作用を検討した。げっ歯類が新奇性の高い物体を好む性質を利用し、視覚的認知記憶力を評価する新奇物体探索試験では、**28** 処置群は生理食塩水処置群に比べて新奇物体への興味の増加傾向が観察された。空間認知記憶力を評価できるモーリス水迷路試験では、5 日間のトレーニングではプール内に設置したプラットフォームへ到達するまでの時間を 1 日に 1 匹あたり 4 回ずつ測定し、各群での平均値を算出し、空間学習能力を評価した。トレーニングにおいてプラットフォームへの到達時間は日を迫る毎に短縮したが、Day 2 において生理食塩水処置野生型群で短縮が見られたものの、Day 5 では各群間で統計学的有意な差は見られなかった。6 日目のプローブテストでは、プラットフォームを撤去しマウスを泳がせ 60 秒間のうちにプラットフォームの置かれていた場所を横切った回数の平均値を各群で算出し、空間記憶能力を評価した。プローブテストでは、**28** 処置群で生理食塩水処置群と比較して回数の増加が見られたことから、**28** が空間記憶能力の向上させる傾向をもつことが示唆された⁸⁹。

マウス脳海馬歯状回の新生神経マーカー DCX について組織免疫染色法を用いて検討したところ、DCX 陽性細胞が **28** 処置群で増加している個体では確認された。

物事を記憶する際、はじめは海馬に蓄えられ、神経新生の働きにより大脳皮質へと送られることで次々と新しいことを覚えることができると報告されている⁹⁰。このように、神経新生の促進は記憶力の改善へ繋がる可能性がある。したがって、**28** の投与により視覚的認知記憶力および空間認知記憶力の改善傾向および海馬歯状回での DCX 陽性細胞の増加を見出したことから、神経新生を促進することによる認知記憶力改善作用をもつ可能性が示唆された。

よりヒトの生体に近い条件での検討を行うため、ヒト iPS 細胞を用いて大脳皮質神経へと分化誘導を行い、神経様突起伸展促進作用を見出した化合物が神経成熟に与える影響を検討した。化合物 **28** は、神経細胞への成熟過程のうち神経前駆細胞から未成熟神経となる際に陽性となる *TUBB3* および *DCX* mRNA 発現量の増加傾向をもつことを確認した。

カルバゾールの一部構造であるインドリン誘導体 (Fig. 31) は、ニューロスフェアの形成作用および BBB 透過性をもつことが報告されている⁹¹。これは本研究の結果と一部一致しており、BBB 透過にはインドリン構造が必要であると考えられた。

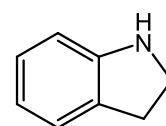


Fig. 31 インドリンの化学構造

本研究では、海馬歯状回における神経新生促進作用および大脳皮質由来神経細胞における神経成熟促進作用を検討したが、海馬歯状回では脱成熟が起こることが報告⁹²されている。脱成熟とは成熟顆粒細胞の表現型が未成熟状態に変化することで、すなわちシナプスの幼若化であり、抗うつ薬投与などによって起こる。抗うつ薬の慢性投与によって成体神経新生が促進されることが報告⁹³されており、抗うつ作用の細胞基盤に関する有力な仮説とされていたが、ヒト歯状回の神経新生を起こす細胞は全体の約0.1%で、抗うつ薬投与により約0.2%と2倍になる程度⁹⁴で、これがヒトの機能へと影響を及ぼす可能性は不明であった。そこで、SSRIのひとつであるフルオキセチン投与によって脱成熟が起こることが報告されたことから、抗うつ薬の作用機序に関する新仮説として海馬歯状回における脱成熟が提唱された。また、脱成熟と神経新生は歯状回で同時に起こっており、両者に相関があることが報告⁹⁵されている。

エピソード記憶の想起の際にも同様の現象が観察されており、初期には想起に海馬が必要だが、次第に大脳皮質の前頭前皮質へと移っていく。この時、海馬の記憶を担うエンGRAM細胞は時間の経過に従って脱成熟し、前頭前皮質のエンGRAM細胞は成熟する。

このようにものごとを覚える際には、海馬における神経新生と大脳皮質における神経成熟を促進する必要がある。本研究で見出した神経様突起促進作用をもち、神経新生促進作用および神経成熟促進作用を有し、認知機能を改善する **28** は、アルツハイマー型認知症治療薬のシード化合物として有望であると考えられる。

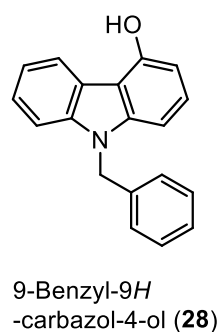
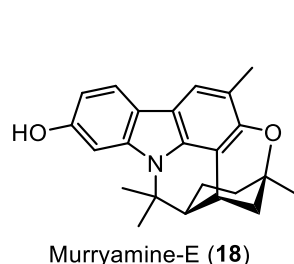
小括

第二章では、カルバゾール型アルカロイドを特徴成分として含有するオオバゲッキツ葉部およびカルバゾール誘導体について、神経様突起伸展促進作用の検討を行った。

第一節では、MeOH 抽出エキスには BBB 透過性を有し神経様突起伸展に対する促進傾向を示す成分が含有されることを確認した後、含有カルバゾール型アルカロイドと本研究室にて合成したカルバゾール誘導体について神経様突起伸展促進作用を検討した。オオバゲッキツに含有される murrayamine-E (**18**) に有意な神経様突起伸展促進作用、カルバゾール誘導体である 9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (**28**) に促進傾向を見出した。

第二節では、前節で神経様突起伸展促進作用の確認された化合物の認知記憶力改善作用を評価するため、合成によって量的な確保が可能であった **28** について野生型およびアルツハイマー型認知症モデル APdE9 マウスを用いて、新奇物体認識試験およびモーリス水迷路試験を行った。化合物 **28** 処置 APdE9 マウス群は生理食塩水処置 APdE9 マウス群と比較して認知記憶力の改善傾向を示した。マウス脳薄切切片を作製し、組織免疫染色法を用いて脳内での **28** の作用を検討したところ、**28** 処置は APdE9 マウス脳内の A β 沈着には影響を及ぼさなかったが、DCX 陽性細胞数を増加させる可能性があると考えられた。

第三節において、**28** がヒト iPS 細胞由来神経細胞の成熟促進に与える作用について検討した。ヒト iPS 細胞を大脳皮質神経へと分化誘導し、その過程に **28** が与える作用について検討したところ、未成熟神経マーカーである DCX および TUBB3 の mRNA 発現量が増加傾向にあったことから **28** には神経成熟を促進する可能性が示唆された。



結論

本研究は、高齢化に伴い患者数の増加しているアルツハイマー型認知症に対して、神経新生促進という新たな作用機序をもつ新たな治療薬のシード化合物探索を目的として研究を行った。中枢神経系用薬として有望であると考えられるアルカロイドに着目し、特にアポルフィン型アルカロイドおよびカルバゾール型アルカロイドについて、ハス花部、オオバゲッキツ葉部含有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を検討した。

第一章では、ハス花部より単離されたアポルフィン型アルカロイドである *N*-methylassimilobine (4) および *asimilobine* (5) に神経様突起伸展促進作用および血液脳関門透過性を見出した。

第二章では、合成したカルバゾール誘導体 9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol (28) に神経様突起伸展促進作用および認知記憶力の改善傾向を見出し、これらの化合物をアルツハイマー型認知症治療薬シード化合物として提案することができた。

本研究では、中枢神経系用薬の大きな課題である血液脳関門透過性について予め検討した後に神経様突起伸展促進作用を明らかにし、詳細な研究を行うことで、従来の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。

謝辞

本研究に際し、ご懇意なるご指導とご高配を賜りました京都薬科大学生薬学分野 松田久司教授に心から感謝の意を表します。また、本研究を遂行するに際し、ご助言・ご討論くださいました中村誠宏准教授、そして多くのご指導と激励を賜りました中嶋聡一助教に深甚なる敬意を表します。

さらに本研究の遂行にあたり、実験の一部に数多くのご助言、ご協力を賜りました京都薬科大学統合薬科学系 高田和幸教授、西村周泰助教に深謝いたします。

本論文の作成にあたり、副査としてご助言いただくとともに、本論文の細部にわたりご指導を頂きました病態生理学分野 芦原英司教授、ならびに公衆衛生学分野 渡辺徹志教授に心より御礼申し上げます。

そして、本研究の遂行にあたり、実験にご協力頂きました尾田好美博士、笠香織学士、谷美有紀学士、辻畑潤一郎学士、中矢友里香学士、笠詩織学士、増本優介学士、堀田有美氏、平尾みなみ氏、青木真琴氏、細田依里氏、西村侑桂氏、吉治萌氏、玉野優果氏、山崎睦氏、吉川佳那氏らをはじめとする京都薬科大学生薬学分野 職員、博士、学士ならびに学生諸氏の皆様および京都薬科大学統合薬科学系 学士ならびに学生諸氏の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、常に温かく見守り、支え励まして下さった家族に心から感謝いたします。

実験の部

LC-MS について、高速液体クロマトグラフは Nexera UHPC システムを、トリプル四重極型質量分析計は Shimadzu LCMS-8040 を用いて測定した。Nexera UHPC システムについて、システムコントローラーは Shimadzu CBM-20A を、ポンプは Shimadzu LC-20A を、紫外可視分光光度計検出器 (UV) は Shimadzu SPD-20A を、オートサンプラーは Shimadzu SIL-20AC を、カラムヒーターは Shimadzu CTO-20AC を、デガッサーは Shimadzu SGU-20A3R を用いた。

トリプル四重極型質量分析計 Shimadzu LCMS-8040, Nexera UHPC システムのシステムコントローラー Shimadzu CBM-20A, ポンプ Shimadzu LC-20A, 紫外可視分光光度計検出器 (UV) Shimadzu SPD-20A, オートサンプラー Shimadzu SIL-20AC, カラムヒーター Shimadzu CTO-20AC およびデガッサー Shimadzu SGU-20A3R は株式会社 島津製作所 (京都) より購入した。

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H Nuclear Magnetic Resonance, ^1H NMR), 炭素核磁気共鳴スペクトル (^{13}C Nuclear Magnetic Resonance, ^{13}C NMR) は, JEOL JNM-ECS400 (400 MHz) (日本電子株式会社, 東京) を用いて測定した。

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は、順相系はシリカゲル Silica Gel BW-200 (Fuji Silysia Chemical, 150-350 mesh) を用いた。

薄層クロマトグラフィーには, silica gel 60F₂₅₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 順相) を使用し, スポットの検出は UV (254, 365 nm), ニンヒドリンスプレーおよび 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ /10% H_2SO_4 水溶液, *N,N*-dimethyl-1,4-phenylenediammonium dichloride を噴射し, 加熱時の呈色により行った。

細胞培養は, MCO-18AIC (パナソニック株式会社, 大阪) CO_2 インキュベーターを使用し, 37°C , 5% CO_2 存在下で行った。

ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), ウマ血清 (horse serum, HS), Pure Link™ RNA Mini Kit, Essential 8 medium, Neurobasal medium, Glasgow minimum essential medium, B27 minus vitamin A, GlutaMAX, 15% knockout serum replacement, Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体, 6-well multiplate, 12-well multiplate, 48-well multiplate は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。

Y27632, LDN193189, XAV939, *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine-*t*-butylester (DAPT), SU5402, PD035901 は, Selleck Chemicals (Houston, TX, USA) より購入した。

Rever Tra Ace® qPCR RT Kit および THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix は東洋紡 (大阪) より購入した。

Collagen type-I-coated 6 および 24 well multiplate は AGC 株式会社 (静岡) より購入した。

0.45 μm コスモナイスフィルター, Cosmosil π NAP column, Cosmosil MS-II column およびパラホルムアルデヒドは, ナカライテスク株式会社 (京都) より購入した。

その他の試薬は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) より購入した。

第一章の実験

第一節および第二節の実験

植物抽出エキス, 各種画分および単離化合物

本研究に使用した抽出エキスおよび各種画分は, 著者の所属している研究室で保有している植物エキ斯拉イブラリーの中から, 単離化合物は化合物ライブラリー⁴¹の中から用いた.

すなわち, ハス (*Nelumbo nucifera*) の乾燥花 (1.0 kg) を MeOH で熱時 (80°C) 抽出後, 溶媒を減圧留去し, MeOH 抽出エキス (155.0 g, 収率 15.5%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキスのうち 145.0 g を, EtOAc と H₂O で分配抽出後, H₂O 可溶性画分を *n*-ブタノール (*n*-butanol, *n*-BuOH) で分配抽出し, EtOAc 可溶性画分 (31.2 g, 3.1%), *n*-BuOH 可溶性画分 (41.0 g, 4.1%), および H₂O 可溶性画分 (72.8 g, 7.3%) を得た. 得られた EtOAc 可溶性画分 (31.2 g) および *n*-BuOH 可溶性画分 (40.0 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー, 逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) を用いて繰り返し分離精製することにより, 既知アポルフィン型アルカロイドを単離し, 同定した⁴¹.

細胞培養

ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC-12 (JCRB0733) は JCRB 細胞バンクより分譲された. 10% FBS, 5% HS, 4 mM L-グルタミン, 100 units/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン含有 Roswell Park Memorial Institute media (RPMI-1640) 培地 (Merck KGaA) で培養 (5% CO₂, 37°C) した.

PC-12 細胞の神経様突起伸展促進作用

PC-12 細胞 1.0×10⁵ cells/400 µL/well を Collagen Type I coated Microplate 24 well に播種し, 24 時間培養後, 被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) (R&D SYSTEMS, Inc., Minneapolis, MN, USA) を添加した. 48 時間培養後, 写真撮影を行い (オリンパス株式会社, 東京), 全細胞数および細胞の直径以上の突起伸展を認めた細胞を陽性と判断し, その数をカウントし, 割合を陽性率として算出した. なお, 同様の操作を 4 回行い, その合計を算出した. 比較対照 (control) 群は毎回試験を行った.

$$\text{陽性率 (\%)} = (\text{突起伸展を示した細胞数} / \text{全細胞数}) \times 100$$

被験物質はジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO, 東京化成工業株式会社, 東京) に溶解し, 培養液に添加した (DMSO 終濃度 0.1%). 陽性比較対照物質としてドネペジル (東京化成工業株式会社) を用いた.

In vitro BBB モデルを用いた BBB 透過性成分の神経様突起伸展促進作用

BBB kit™ (RBT-24H, ファーマコセル株式会社, 長崎) を *in vitro* BBB モデルとして用い, 手順書通りに実験を行った. すなわち, 加温した専用培養液を解凍したキットに入れ, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養し, 1 時間後および 1 日後に同じように培養液を交換した. 4 日間培養後, PC-12 細胞の培養液を入れた 24 well プレート内へインサートを移動し, 被験物質を添加した. 1 時間培養後, プレートのウェル内へと透過した培養液を採取し, 24 時間 PC-12 細胞を培養したプレートに NGF (終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) とともに付して神経様突起伸展促進作用を検討した. 被験物質は DMSO に溶解し, 培養液に添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

第三節の実験

mRNA 発現量

PC-12 細胞 5.0×10^5 cells/2 mL/well を Collagen Type I coated Microplate 6 well に播種し、24 時間培養後、被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) 添加した。48 時間培養後、Pure Link™ RNA Mini Kit を用いて全 RNA を抽出した。その後、50 ng の全 RNA から Rever Tea Ace® を用いて cDNA を合成した。各プライマーおよび THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix を添加し、LightCycler® Nano (ロシュ・ダイアグノティクス株式会社, 東京) を用いて PCR 反応を行った。変性 (95°C, 2 分) の後、変性 (95°C, 30 秒), アニーリング (58°C, 30 秒), 伸長を 40 サイクル行った。

各遺伝子産物量は β -actin mRNA を基準とし、比較 Ct 法によって相対量で評価を行った。すなわち、 β -actin mRNA の Ct とターゲット遺伝子 *TrkA*, *Vav3* および *Rac1* までの Ct との差を求め、この値を Δ Ct とし、比較対照 (control) 群とサンプル処理群の Δ Ct 値の差 $\Delta\Delta$ Ct 値から相対発現量を $2^{\Delta\Delta Ct}$ として算出した。

各プライマーの配列

<i>TrkA</i>	Forward	5'-GTCTGGTGGGTCAGGGACTA-3'
	Reverse	5'-GGGTTGCTTTCCATAGGTGA-3'
<i>Vav3</i>	Forward	5'-CAACCTGAGACCCCAGATGT-3'
	Reverse	5'-TCGGGATAGGCGAGATAATG-3'
<i>Rac1</i>	Forward	5'-TCATCCTAGTGCGGACGAAG-3'
	Reverse	5'-CAGCAGGCATTTTCTCTTCC-3'
β -actin	Forward	5'-GGGAAATCGTGCGTGACAT-3'
	Reverse	5'-CAGGAGGAGCAATGATCTC-3'

第四節の実験

BBB 透過性試験

In vitro BBB モデルである BBB kit™ (RBT-24H) を用いて、手順書に従って行った。すなわち、加温した専用培養液を解凍したキットに入れ、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し、1 時間後および 1 日後に同じように培養液を交換した。4 日間培養後、培養液を入れた 24 well プレート内へインサートを移動し、被験物質を添加した。1 時間培養後、プレートのウェル内へと透過した培養液を採取し、LC-MS にて分析を行った。培養液には 1% HEPES、0.45% D-グルコース含有リンゲル液を用いた。

サンプル調整

被験物質

透過前の 50 μ L および透過液 1 mL をエバポレーターにて減圧留去し、アセトニトリル 2 mL に溶解した後、0.45 μ m コスモナイスフィルターを用いて濾過して調整した。

陽性比較対照 (カフェイン)

透過前の溶液 50 μ L をエバポレーターにて減圧留去し、MeOH 1 mL に溶解した。透過液 0.8 mL をエバポレーターにて減圧留去し、MeOH 0.2 mL に溶解した。その後、0.45 μ m コスモナイスフィルターを用いて濾過して調整した。

分析条件

被験物質

LC は Nexera UHPLC を用いた.

カラム	Cosmosil π NAP column (粒子径 5 μ m, 2.0 mm id \times 150 mm)
カラム温度	40°C
移動相	Acetonitrile (A), 0.2% acetic acid 含有 H ₂ O (B)
	0 min 5% A, 95% B
	20 min 18% A, 82% B
	50 min 50% A, 50% B
流速	0.2 mL/min
波長	260 nm
注入量	2.0 μ L

MS は LCMS-8040 にて選択イオンモニタリングを行った.

<i>m/z</i>	282, 268, 312 [M+H] ⁺
ネブライザー流速	3 L/min
乾燥ガス流速	15 L/min
脱溶媒和ライン温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C

陽性比較対照薬 (カフェイン)

LC は Nexera UHPLC を用いた.

カラム	Cosmosil MS-II column (粒子径 5 μ m, 2.0 mm id \times 150 mm)
カラム温度	40°C
移動相	20% methanol, 80% H ₂ O pH 3.0 adjusted by formic acid
流速	0.2 mL/min
波長	278 nm
注入量	2.0 μ L

MS は LCMS-8040 にて選択イオン検出を行った.

<i>m/z</i>	195 [M+H] ⁺
ネブライザー流速	3 L/min
乾燥ガス流速	15 L/min
脱溶媒和ライン温度	250°C
ヒートブロック温度	400°C

第一節から第四節の統計処理

PC-12 細胞の神経様突起伸展促進作用の統計学的解析は Kruskal-Wallis 検定を用い、検定には Fisher の正確確率検定を用いて比較対照 (control) 群と被験物質処理群での比較を行った。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意であると判定した。

mRNA 発現量の統計学的解析は一元配置分散分析法を用い、検定には Dunnett 検定を用いて比較対照 (control) 群と被験物質処置群での比較を行った。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意であると判定した($n=4$)。

第二章の実験

第一節の実験

植物抽出エキスを、各種画分および単離化合物

本研究に使用した抽出エキスおよび各種画分は、著者の所属している研究室で保有している植物エキ斯拉イブラリーの中から、単離化合物は化合物ライブラリー⁴⁷の中から用いた。

すなわち、オオバゲッキツ (*Murraya koenigii*) の乾燥葉 (3.0 kg) を MeOH で熱時抽出後、溶媒を減圧留去し、MeOH 抽出エキス (290.6 g, 収率 9.7%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスのうち 269.3 g を、EtOAc と H₂O で分配抽出後、H₂O 可溶性画分を *n*-BuOH で分配抽出し、EtOAc 可溶性画分 (174.0 g, 6.3%), *n*-BuOH 可溶性画分 (20.1 g, 0.7%), H₂O 可溶性画分 (79.6 g, 2.7%) を得た。得られた EtOAc 可溶性画分 (153.6 g) を順相シリカゲル、逆相 ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて繰り返し分離精製し、既知カルバゾール型アルカロイドを単離、同定した。既知カルバゾール型アルカロイドについては、MS および NMR などのスペクトルデータおよび旋光度を標品のデータと直接または文献値と比較することにより同定した。但し、これらの単離成分の収率はオオバゲッキツ葉部 (乾燥品) からの単離収率である⁴⁷。

PC-12 細胞の神経様突起伸展促進作用

PC-12 細胞 1.0×10^5 cells/400 μ L/well を Collagen Type I coated Microplate 24 well に播種し、24 時間培養後、被験物質および NGF (Rat beta-NGF Mab, 終濃度 2 ng/mL, 50 ng/mL) を添加した。48 時間培養後、写真撮影を行い、全細胞数および細胞の直径以上の突起伸展を認めた細胞を陽性と判断し、その数をカウントし、割合を陽性率として算出した。なお、同様の操作を 4 回を行い、その合計を算出した。比較対照 (control) 群は毎回試験を行った。

$$\text{陽性率 (\%)} = (\text{突起伸展を示した細胞数} / \text{全細胞数}) \times 100$$

被験物質は DMSO に溶解し、培養液に添加した (DMSO 終濃度 0.1%)。比較対照物質としてドネペジルを用いた。

In vitro BBB モデルを用いた BBB 透過性成分の神経様突起伸展促進作用

BBB kit™ (RBT-24H) を *in vitro* BBB モデルとして用い、手順書通りに実験を行った。すなわち、加温した専用培養液を解凍したキットに入れ、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し、1 時間後および 1 日後に同じように培養液を交換した。4 日間培養後、PC-12 細胞の培養液を入れた 24well プレート内へインサートを移動し、被験物質を添加した。1 時間培養後、プレートのウェル内へと透過した培養液を採取し、24 時間 PC-12 細胞を培養したプレートに NGF (終濃度 1 ng/mL, 50 ng/mL) とともに付して神経様突起伸展促進作用を検討した。被験物質は DMSO に溶解し、培養液に添加した (DMSO 終濃度 0.1%)。

化合物 **23** および **25** の合成

既報⁹⁴に従い合成した。すなわち、carbazole (**20**, 167 mg, 1 mmol) の DMSO 溶液に、水酸化カリウム (KOH, 112 mg, 2 mmol) を加え、室温で 20 分間撹拌した。次に、1-bromo-3-methylbut-2-ene (0.23 mL, 2 mmol) を本溶液に加え、超音波で 30 分間反応させた。その後、反応物に水 (25 mL) を加えた後、酢酸エチルを用いて抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) で乾燥し減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1-hexane : EtOAc = 20 : 1) にて精製し、目的化合物 9-(3,3-dimethylallyl)carbazole⁹⁷ (**23**, 145 mg, 62%) へと導いた。

化合物 **22** (100 mg, 0.34 mmol) の THF (テトラヒドロフラン) 溶液 (3 mL) に、水素化ナトリウム (NaH 60% oil, 20 mg, 0.51 mmol) を加え、窒素気流下、0 °C にて 30 分間撹拌した。次に、1-bromo-3-methylbut-2-ene (0.10 mL, 0.51 mmol) を本溶液に加え、室温で 1 時間反応させた。その後、反応物に飽和塩化ナトリウム水溶液を加えた後、酢酸エチルを用いて抽出した。得られた酢酸エチル層を、さらに水を用いて洗浄した。次に、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) で乾燥し減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1-hexane : EtOAc = 30 : 1) にて精製し、化合物 **24** (49 mg, 40%) を得た。得られた **24** (49 mg, 0.13 mmol) の THF 溶液 (3 mL) に、テトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF in 1mol/L in THF, 0.5 mL, 0.5 mmol) を加え、窒素気流下、室温にて 30 分間撹拌した。その後、反応物に水 (20 mL) を加えた後、酢酸エチルを用いて抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) で乾燥し減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-hexane : EtOAc = 10 : 1) にて精製し、目的化合物 9-(3-methyl-2-buten-1-yl)-9H-carbazol-4-ol⁹⁸ (**25**, 33 mg, 100%) へと導いた。

化合物 **26** および **28** の合成

4-hydroxycarbazole (**21**, 200 mg, 1.09 mmol) の DMF (*N,N*-dimethylformamide, 5.0 mL) 溶液に imidazole (187 mg, 2.75 mmol) および TBSCl (*tert*-butyldimethylchlorosilane, 414 mg, 2.75 mmol) を加え, 12 時間室温にて窒素気流下で撹拌した. 反応混合物に水を加え, 酢酸エチルで 3 回分液操作を行った. 得られた酢酸エチル層を硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) を用いて乾燥させた. 次にその溶液を濾過し, 溶媒を減圧下留去した. 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [*n*-hexane-EtOAc (5:1, v/v)] を用いて精製し, 4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)-oxy]-9*H*-carbazole (**22**, 325 mg, quant.) を得た. 次に, **22** (100 mg, 0.34 mmol) を THF (4.0 mL) に溶解させ, 水素化ナトリウム (60% oil, 20 mg, 0.51 mmol) を加え, 0°Cにて窒素気流下 30 分間撹拌した. その後, benzyl bromide (0.06 mL, 0.51 mmol) を反応溶液に加え, さらに 2 時間室温にて撹拌した. 氷冷下, 反応混合物に水を加え, 4 回酢酸エチルにて分液操作を行った. Na₂SO₄を用いて酢酸エチル層を乾燥させた. 次にその溶液を濾過し, 溶媒を減圧下留去した. 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [*n*-hexane-EtOAc (30:1, v/v)] を用いて精製し, 9-benzyl-4-[(*tert*-butyldimethylsilyl)-oxy]-9*H*-carbazole (**27**, 111 mg, 85%) を得た. 次に **27** (30 mg, 0.077 mmol) を THF (1.0 mL) に溶解させ, Tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF, *ca.* 1 mol/L in THF, 0.31 mL, 0.31 mmol) を加え, 0°Cで窒素気流下 30 分間撹拌した. 反応混合物を水に加え, 酢酸エチルで 3 回分液操作を行った. 酢酸エチル層を Na₂SO₄を用いて乾燥させた. 次にその溶液を濾過し, 溶媒を減圧下留去した. 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [*n*-hexane-EtOAc (10:1, v/v)] を用いて精製し, 9-benzyl-9*H*-carbazol-4-ol (**28**, 20 mg, 94%) を得た. 9-benzyl-9*H*-carbazole (**26**, 277 mg, 90%) は carbazole (**20**, 200 mg, 1.20 mmol) より **28** の合成と同様の手法で合成した. 化合物 **26** および **28** は, 文献値^{99, 100} との物性データ (¹H-NMR, ¹³C-NMR および MS) の比較により同定した.

第二節の実験

動物実験

実験に用いたマウスは全て京都薬科大学バイオサイエンスリサーチセンターから供給された。なお、本動物実験計画は京都薬科大学動物実験委員会により承認された (計画書番号: PCOG-18-036)。

6-7 ヶ月齢の雌性アルツハイマー型認知症モデル (APdE9) マウスに、生理食塩水に溶かした 25 mg/mL カルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁した 9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (**28**, 10 mg/10mL/kg, $n=4$) または生理食塩水 (10 mL/kg, $n=5$) を 30 日間一日一回腹腔内投与した。マウスは 12 時間毎の明暗周期、気温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件で飼料と水は自由に摂れる環境下にて飼育された。投与期間中、マウスの体重に 10% 以上の減少は見られなかった。比較対照群として、同月齢の遺伝子組換えでない同腹仔 (野生型) に生理食塩水 (10 mL/kg, $n=5$) を 30 日間一日一回の腹腔内投与を行った。

新奇物体認識試験

30 日の投与後に新奇物体認識試験を実施した。1 匹のマウスを照度 20 ルクスの条件下でオープンフィールド (長さ 40×幅 40×高さ 40 cm) に 10 分間入れ、環境に馴化させた。30 分後、2 つの物体 (A と B) をアリーナに設置し、10 分間マウスの行動を観察した。その 30 分後、一方の物体 (B) を新しいもの (C) に変え、10 分間マウスの行動を観察した。マウスの行動は、ビデオ行動解析システム Etho Vision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) によって解析した。視覚的記憶力の評価 (Object preference index) として、各 10 分間の間に A および B (既知物体) または C (新奇物体) へとマウスが鼻部を触れた回数をカウントし、その割合を算出した。

$$\text{Object preference index (\%)} = \text{B/A+B} \times 100 \text{ または } \text{C/A+C} \times 100$$

モーリス水迷路

新奇物体認識試験の後にモーリス水迷路を実施した。円形プールは直径 100 cm、高さ 30 cm で白く塗装されているものを用い、透明の直径 10 cm のプラットフォームが水面下 1 cm になるように $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の水を張った。なお、水は無毒性の顔料で白濁させた。目印として異なる 4 種類の図形の絵をプール側面に設置した。ビデオカメラはプールの中央上部に設置し、EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology) にてプラットフォームにたどり着くまでに泳いだ距離および時間を記録した。はじめの 5 日間は、1 日 4 回のトレーニングを行った。マウスにプール壁面側を向けさせ、ランダムに選んだスタート地点から開始させた。各試行はプラットフォームにたどり着くまで最大 60 秒間続け、マウスがプラットフォームへ 60 秒以内にたどり着けなかった場合、プラットフォームまで連れて行き 15 秒間プラットフォーム上で過ごさせた。4 回の試行終了後、マウスを乾燥して元のケージへ戻した。6 日目にはプローブテストとして、プラットフォームを撤去した状態でマウスを 60 秒間泳がせた。マウスをプール壁面へ向けさせ、プラットフォームの置いてあった場所の反対側のスタート地点から開始させ、プラットフォームの置いてあった場所を横切った回数を解析し、空間認知記憶力の評価を行った。

マウスの脳摘出および薄切切片の作製

モーリス水迷路試験終了後、マウスに三種混合麻酔 [塩酸メデトミジン 0.3 mg/kg (ZENOAQ, 福島), 酒石酸ブトルファール 5 mg/kg (ZENOAQ, 福島), ミダゾラム 4 mg/kg] を腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心室に翼状針を挿入し、PBS (phosphate buffer solution) (-) にて灌流した。灌流後すみやかに脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS (-) 固定液中にて浸潤固定を行った。30%スクロース含有 PBS (-) にて脱水し、脳が PBS (-) 中に沈むまでクライオプロテクションを行った。脱水後、凍結組織切片作製用包埋剤 (サクラファインテックジャパン株式会社, 東京) にて組織を凍結包埋し、 -20°C で凍結させた後、クライオスタットミクロトーム (大和光機工業株式会社, 埼玉) を用いて $20 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。切片は 0.1% Triton X および 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS (-) 中で 4°C にて保存した。

免疫組織染色

脳の組織切片を 5% ロバ血清 (Abcam, Cambridge, UK) および 0.1% Triton X 含有 PBS (-) に室温にて 10 分間作用させてブロッキングを行った。その後、一次抗体として anti-human amyloid- β (1: 1000; 株式会社免疫生物研究所, 群馬) および Doublecortin 抗体 (E-6) (1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を室温にて 4°C で一晩反応させた。次いで, Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1: 500) を室温, 遮光にて 1 時間作用させた。核染色には Hoechst 33342 (1: 500, 株式会社 同仁化学研究所, 熊本) を用い, 室温, 遮光にて 10 分間作用させた。それぞれの工程の間で脳切片を 0.1% Triton X 含有 PBS (-) にて 3 回洗浄した。その後, スライドガラス (松浪硝子工業株式会社, 大阪) に封入し, 共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて蛍光染色の組織画像を取得した。

第三節の実験

ヒト iPS 細胞

ヒト iPS 細胞は 1231A3 (XX, 継代数 19)¹⁰¹ を 0.48% iMatrix-511 silk (Nippi, 東京) でコートしたウェル上で Essential 8 medium にて培養し, 継代時は 6-well multiplate に 1.5×10^4 cells で再播種した. 再播種後初めの 24 時間は培養液に Y27632 を 10 μ M で添加した. なお, ヒト iPS 細胞の使用にあたっては本学倫理委員会の承認を得ている (承認番号: 19-18-26).

大脳皮質神経前駆細胞の誘導

大脳皮質神経前駆体への誘導はこれまでの報告⁸⁴と同様に行った. 未分化の iPS 細胞を 0.48% iMatrix-511 silk でコートした 12-well multiplate に 2×10^6 cells で再播種した. Day 0 から, 15% knockout serum replacement, 0.1 mM 非必須アミノ酸, 1 mM ピルビン酸ナトリウム, 0.1 mM 2-メルカプトエタノール, 200 nM LDN193189, 500 nM A83-01 および 2 μ M XAV939 を含有した Glasgow minimum essential medium にて培養し, Day 7 からは A83-01 を取り除いた. 培養液は 7 日目から徐々に B27 minus vitamin A および 2 mM GlutaMAX 含有 Neurobasal medium へと変更した.

mRNA 発現量への影響

ヒト iPS 細胞 5×10^5 cells/500 μ L/well を 0.48% iMatrix-511 silk でコートした 48-well multiplate に播種し, 被験物質を 4 日間付して培養した. 陽性比較対照として, 10 μ M *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-*S*-phenylglycine-*t*-butylester (DAPT), 5 μ M SU5402 および 1 μ M PD035901 を用いた. Pure LinkTM RNA Mini Kit を用いて全 RNA を抽出した. その後, 50 ng の全 RNA から Rever Tea Ace[®]を用いて cDNA を合成した. 各プライマーおよび THUNDERBIRDTM SYBR[®] qPCR Mix を添加し, LightCycler[®] Nano を用いて PCR 反応を行った. 変性 (95°C, 2 分) の後, 変性 (95°C, 30 秒), アニーリング (58°C, 30 秒), 伸長を 40 サイクル行った. 各遺伝子産物量は第一章第三節と同様に *GAPDH* mRNA を基準として, 比較 Ct 法によって相対量で評価を行った.

各プライマーの配列

<i>TUBB3</i>	Forward	5'- CATTCTGGTGGACCTGGAAC -3'
	Reverse	5'- ATACTCCTCACGCACCTTGC -3'
<i>DCX</i>	Forward	5'- GCTTAGCCTCGTCGATGAAC -3'
	Reverse	5'- GGCAGGTACAGGTCCTTGTGCT -3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'- TTGAGGTCAATGAAGGGGTC -3'
	Reverse	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA -3'

第一節から第三節の統計処理

PC-12 細胞の神経様突起伸展促進作用の統計学的解析は Kruskal-Wallis 検定を用い、検定には Fisher の正確確率検定を用いて control 群と被験物質処理群での比較を行った。P 値が 0.05 以下を統計学的に有意であると判定した。

新奇物体認識試験モーリス水迷路試験の統計学的解析は一元配置分散分析法を用い、片側 t 検定を用いて control 群と被験物質処置群での比較を行った。

引用文献

- 1) <https://www.mhlw.go.jp/content/12300000/000519620.pdf> (2020 年 2 月 5 日)
- 2) Ninomiya, T. Japanese Legacy Cohort Studies: The Hisayama Study. *J. Epidemiol.* **2018**, 28, 444–451.
- 3) WHO ホームページ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (2020 年 2 月 5 日)
- 4) Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, 2, a006247.
- 5) Karran, E.; De Strooper, B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J. Neurochem.* **2016**, 139, 237–252.
- 6) Ono, K.; Yamada, M. Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2011**, 117, 19–28.
- 7) Tokuda, T. Hypothesis of Pathogenic Mechanisms for the Development of Alzheimer's Disease: its Paradigm Shift. *京府医大誌*, **2016**, 125, 797–804.
- 8) Kollmer, M.; Close, W.; Funk, L.; Rasmussen, J.; Bsoul, A.; Schierhorn, A.; Schmidt, M.; Sigurdson, C. J.; Jucker, M.; Fändrich, M. Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat. Med.* **2019**, 10, 4760.
- 9) Fujita, K.; Motoki, K.; Tagawa, K.; Chen, X.; Hama, H.; Nakajima, K.; Homma, H.; Tamura, T.; Watanabe, H.; Katsuno, M.; Matsumi, C.; Kajikawa, M.; Saito, T.; Saido, T.; Sobue, G.; Miyawaki, A.; Okazawa, H. HMGB1, a Pathogenic Molecule That Induces Neurite Degeneration via TLR4-MARCKS, Is a Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease *Sci. Rep.* **2016**, 6, 31895.
- 10) Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **1998**, 4, 1313–1317.
- 11) Morinobu, S. Physiopathological mechanism of depression in relation to neurotrophic and growth factors and synaptic plasticity. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* **2009**, 111, 687–691.
- 12) Nakagawa, S. Involvement of Neurogenesis in the Action of Psychotropic Drugs. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* **2010**, 112, 992–997.
- 13) Sahay, A.; Scobie, K. N.; Hill, A. S.; O'Carroll, C. M.; Kheirbek M. A.; Burghardt, N. S.; Fenton, A. A.; Dranovsky, A.; Hen, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis Is Sufficient to Improve Pattern Separation *Nature* **2011**, 472, 466–470.
- 14) Stone, S. S. D.; Teixeira, C. M.; DeVito, L. M.; Zaslavsky, K.; Josselyn, S. A.; Lozano, A. M.; Frankland P. W. Stimulation of Entorhinal Cortex Promotes Adult Neurogenesis and Facilitates Spatial Memory *J. Neurosci.* **2011**, 31, 13469–13484.
- 15) Akers, K. G.; Martinez-Canabal, A.; Restivo, L.; Yiu, A. P.; De Cristofaro, A.; Hsiang, H.; Wheeler, A. L.; Guskjolen, A.; Niihori, Y.; Shoji, H.; Ohira, K.; Richards, B. A.; Miyakawa, T.; Josselyn, S. A.; Frankland, P. W. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, **2014**, 344, 598–602.

- 16) Wiltgen, B. J.; Tanaka K. Z. Systems Consolidation and the Content of Memory *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2013**, *106*, 365–371.
- 17) Kitamura, T.; Saitoh, Y.; Takashima, N.; Murayama, A.; Niibori, Y.; Ageta, H.; Sekiguchi, M.; Sugiyama, H.; Inokuchi, K. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell* **2009**, *139*, 814–827.
- 18) Moreno-Jiménez, E. P.; Flor-García, M.; Terreros-Roncal, J.; Rábano, A.; Cafini, F.; Pallas-Bazarra, N.; Ávila, J.; Llorens-Martín, M. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Abundant in Neurologically Healthy Subjects and Drops Sharply in Patients With Alzheimer's Disease *Nat. Med.* **2019**, *25*, 554–560.
- 19) Heese, K.; Low, J.W.; Inoue, N. Nerve growth factor, neuronal stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals* **2006-2007**, *15*, 1–12.
- 20) Seidah, N. G.; Benjannet, S.; Pareek, S.; Savaria, D.; Hamelin, J.; Goulet, B.; Laliberte, J.; Lazure, C.; Chrétien, M.; Murphy, R. A. Cellular Processing of the Nerve Growth Factor Precursor by the Mammalian Pro-Protein Convertases *Biochem. J.*, **1996**, *314*, 951–960.
- 21) Hebb, D. O. The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory New York, Wiley & Sons, **1949**
- 22) Martin, S. J.; Grimwood, P. D.; Morris, R. G. M. SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY: An Evaluation of the Hypothesis *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 649–711.
- 23) Bibel, M. Neurotrophins: Key Regulators of Cell Fate and Cell Shape in the Vertebrate Nervous System, *Genes. Dev.* **2000**, *14*, 2919–2937.
- 24) Segal, R. A. Selectivity in Neurotrophin Signaling: Theme and Variations *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, *26*, 299–330.
- 25) Campenot, R. B.; MacInnis, B. L. Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J. Neurobiol.*, **2004**, *58*, 217–229.
- 26) Niewiadomska, G.; Mietelska-Porowska, A.; Mazurkiewicz, M. The Cholinergic System, Nerve Growth Factor and the Cytoskeleton *Behav. Brain. Res.*, **2011**, *221*, 515–26.
- 27) Allard, S.; Jacobs, M. L.; Carmo, S. D.; Cuello, A. C. Compromise of Cortical proNGF Maturation Causes Selective Retrograde Atrophy in Cholinergic Nucleus Basalis Neurons *Neurobiol. Aging* **2018**, *67*, 10–20.
- 28) Masoudi, R.; Ioannou, M. S.; Coughlin, M. D.; Pagadala, P.; Neet, K. E.; Clewes, O.; Allen, S. J.; Dawbarn, D.; Fahnestock, M. Biological Activity of Nerve Growth Factor Precursor Is Dependent Upon Relative Levels of Its Receptors *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18424–33.
- 29) Yang, C.; Liu, Y.; Ni, X.; Li, N.; Zhang, B.; Fang, X. Enhancement of the Nonamyloidogenic Pathway by Exogenous NGF in an Alzheimer Transgenic Mouse Model *Neuropeptides* **2014**, *48*, 233–238.
- 30) Zhang, Y.; Chen, Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Liao, F.; Xu, H.; APP Regulates NGF Receptor Trafficking and NGF-mediated Neuronal Differentiation and Survival *PLoS One*, **2013**, *8*, e80571.
- 31) Mesulam, M. The Cholinergic Lesion of Alzheimer's Disease: Pivotal Factor or Side Show? *Learn. Mem.*, **2004**, *11*, 43–49.

- 32) Gu, H.; Long, D.; Song, C.; Li, X. Recombinant human NGF-loaded microspheres promote survival of basal forebrain cholinergic neurons and improve memory impairments of spatial learning in the rat model of Alzheimer's disease with fimbria-fornix lesion *Neurosci. Lett.*, **2009**, *453*, 204–209.
- 33) Wang, S.; Liao, X.; Liu, D.; Hu, J.; Yin, Y.; Wang, J.; Zhu, L. NGF Promotes Long-Term Memory Formation by Activating poly(ADP-ribose)polymerase-1 *Neuropharmacol.*, **2012**, *63*, 1085–92.
- 34) Eriksdotter Jönhagen, M.; Nordberg, A.; Amberla, K.; Bäckman, L.; Ebendal, T.; Meyerson, B.; Olson, L.; Seiger, A.; Shigeta, M.; Theodorsson, E.; Viitanen, M.; Winblad, B.; Wahlund, L. O. Intracerebroventricular Infusion of Nerve Growth Factor in Three Patients With Alzheimer's Disease *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **1998**, *9*, 246–257.
- 35) Ohtsuki, S.; Terasaki, T. Contribution of Carrier-Mediated Transport Systems to the Blood-Brain Barrier as a Supporting and Protecting Interface for the Brain; Importance for CNS Drug Discovery and Development, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1745–1758.
- 36) Dohgu, S.; Takata, F.; Kataoka, Y. Brain pericytes regulate the blood-brain barrier function *日薬理誌*, **2015**, *146*, 63–65.
- 37) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs *Neuro. Rx*, **2005**, *2*, 541–553.
- 38) Li, B.; Han, L.; Cao, B.; Yang, X.; Zhu, X.; Yang, B.; Zhao, H.; Qiao, W. Use of magnoflorine-phospholipid complex to permeate blood-brain barrier and treat depression in the CUMS animal model. *Drug Deliv.* **2019**, *26*, 566–574.
- 39) Malberg, J. E.; Eisch, A. J.; Nestler, E. J.; Duman, R. S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus *J. Neurosci.*, **2000**, *20*, 9104–9110.
- 40) Pieper, A. A.; Xie, S.; Capota, E.; Estill, S. J.; Zhong, J.; Long, J. M.; Becker, G. L.; Huntington, P.; Goldman, S. E.; Shen, C. H.; Capota, M.; Britt, J. K.; Kotti, T.; Ure, K.; Brat, D. J.; Williams, N. S.; MacMillan, K. S.; Naidoo, J.; Melito, L.; Hsieh, J.; De Brabander, J.; Ready, J. M.; McKnight, S. L. Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical. *Cell* **2010**, *142*, 39–51.
- 41) Nakamura, S.; Nakashima, S.; Tanabe, G.; Oda, Y.; Yokota, N.; Fujimoto, K.; Matsumoto, T.; Sakuma, R.; Ohta, T.; Ogawa, K.; Nishida, S.; Miki, H.; Matsuda, H.; Muraoka, O.; Yoshikawa, M. Alkaloid constituents from flower buds and leaves of sacred lotus (*Nelumbo nucifera*, Nymphaeaceae) with melanogenesis inhibitory activity in B16 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 779–787.
- 42) Agnihotri, V. K.; ElSohly, H. N.; Khan, S. I.; Jacob, M. R.; Joshi, V. C.; Smillie, T.; Khan, I. A.; Walker, L. A. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochem. Lett.* **2008**, *1*, 89–93.
- 43) Ma, C.; Wang, J.; Chu, H.; Zhang, X.; Wang, Z.; Wang, H.; Li, G. Purification and characterization of aporphine alkaloids from leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn and their effects on glucose consumption in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3481–3494.

- 44) Liu, C. M.; Kao, C. L.; Wu, H. M.; Li, W. J.; Huang, C. T.; Li, H. T.; Chen, C. Y. Antioxidant and anticancer aporphine alkaloids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. Rosa-plena. *Molecules* **2014**, *19*, 17829–38.
- 45) Rao, L. J. M.; Ramalakshmi, K.; Borse, B. B.; Raghavan, B. Antioxidant and radicalscavenging carbazole alkaloids from the oleoresin of curry leaf (*Murraya koenigii* Spreng.). *Food Chem.* **2007**, *100*, 742–747.
- 46) Rahman, M. M.; Gray, A. I. A benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1601–1606.
- 47) Nakamura, S.; Nakashima, S.; Oda, Y.; Yokota, N.; Fujimoto, K.; Matsumoto, T.; Ohta, T.; Ogawa, K.; Maeda, S.; Nishida, S.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Alkaloids from Sri Lankan curry-leaf (*Murraya koenigii*) display melanogenesis inhibitory activity: structures of karapinchamines A and B. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1043–1049.
- 48) Greene, L. A.; Tischler, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1976**, *73*, 2424–2428.
- 49) Greene, L. A.; Rukenstein, A. Regulation of Acetylcholinesterase Activity by Nerve Growth Factor. Role of Transcription and Dissociation From Effects on Proliferation and Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6363–6367.
- 50) Drubin, D. G.; Feinstein, S. C.; Shooter, E. M.; Kirschner, M. W. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1799–1807.
- 51) Gaillard, P. J.; de Boer, A. G. Relationship Between Permeability Status of the Blood-Brain Barrier and in Vitro Permeability Coefficient of a Drug *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *12*, 95–102.
- 52) Nakagawa, S.; Deli, M. A.; Nakao, S.; Honda, M.; Hayashi, K.; Nakaoke, R.; Kataoka, Y.; Niwa, M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2007**, *27*, 687–694.
- 53) Oda, T.; Kume, T.; Katsuki, H.; Niidome, T.; Sugimoto, H.; Akaike, A. Donepezil potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *104*, 349–354.
- 54) Aoki, K.; Nakamura, T.; Matsuda, M. Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 713–719.
- 55) Aoki, K.; Nakamura, T.; Fujikawa, K.; Matsuda, M. Local Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate Accumulation Recruits Vav2 and Vav3 to Activate Rac1/Cdc42 and Initiate Neurite Outgrowth in Nerve Growth Factor-Stimulated PC12 Cells *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 2207–2217.
- 56) York, R. D.; Molliver, D. C.; Grewal, S. S.; Stenberg, P. E.; McCleskey, E. W.; Stork, P. J. Role of phosphoinositide 3-kinase and endocytosis in nerve growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase activation via Ras and Rap1 *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8069–8083.

- 57) Fukuyama, T.; Ogita, H.; Kawakatsu, T.; Fukuhara, T.; Yamada, T.; Sato, T.; Shimizu, K.; Nakamura, T.; Matsuda, M.; Takai, Y. Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 815–825.
- 58) Terada, K.; Matsushima, Y.; Matsunaga, K.; Takata, J.; Karube, Y.; Ishige, A.; Chiba, K. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* **2018**, *18*, 224–233.
- 59) Elgersma, Y.; Sweatt, J. D.; Giese, K. P. Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 8410–8415.
- 60) Nonaka, M.; Kim, R.; Fukushima, H.; Sasaki, K.; Suzuki, K.; Okamura, M.; Ishii, Y.; Kawashima, T.; Kamiyo, S.; Takemoto-Kimura, S.; Okuno, H.; Kida, S.; Bito, H. Region-specific Activation of CRTCL-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory *Neuron* **2014**, *84*, 92–106.
- 61) Morikawa, T.; Kitagawa, N.; Tanabe, G.; Ninomiya, K.; Okugawa, S.; Motai, C.; Kamei, I.; Yoshikawa, M.; Lee, I. J.; Muraoka, O. Quantitative Determination of Alkaloids in Lotus Flower (Flower Buds of *Nelumbo Nucifera*) and Their Melanogenesis Inhibitory Activity *Molecules* **2016**, *21*, 930.
- 62) Cheng, L.; Ye, Y.; Xiang, L.; Osada, H.; Qi, J. Lindersin B from *Lindernia crustacea* induces neuritogenesis by activation of tyrosine kinase A/phosphatidylinositol 3 kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway *Phytomedicine* **2017**, *24*, 31–38.
- 63) Zhang, C.; Cao, C.; Kubo, M.; Harada, K.; Yan, X.; Fukuyama, Y.; Gao, J. Chemical Constituents from *Hericium erinaceus* Promote Neuronal Survival and Potentiate Neurite Outgrowth via the TrkA/Erk1/2 Pathway *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi: 10.3390/ijms18081659.
- 64) Cao, C.; Zhang, C.; Shi, X.; Li, D.; Cao, W.; Yin, X.; Gao, J. Sarcodonin G Derivatives Exhibit Distinctive Effects on Neurite Outgrowth by Modulating NGF Signaling in PC12 Cells *ACS. Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 1607–1615.
- 65) 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 Sciences*, **2007**, *80*, 1669–1677.
- 66) Fujimoto, M.; Kitazawa, R.; Maeda, S.; Kitazawa, S. Methylation Adjacent to Negatively Regulating AP-1 Site Reactivates TrkA Gene Expression During Cancer Progression *Oncogene* **2005**, *24*, 5108–5118.
- 67) Miura, H.; Takano, K.; Kitao, Y.; Hibino, S.; Choshi, T.; Murakami, R.; Suzuki, H.; Yamada, M.; Ogawa, S.; Hori, O. A Carbazole Derivative Protects Cells Against Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Glutathione Depletion *J. Pharmacol. Sci.* **2008**, *108*, 164–171.
- 68) Jankowsky, J. L.; Slunt, H. H.; Ratovitski, T.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Borchelt, D. R. Co-expression of Multiple Transgenes in Mouse CNS: A Comparison of Strategies *Biomol. Eng.* **2001**, *17*, 157–165.
- 69) Hardy, J.; Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356.

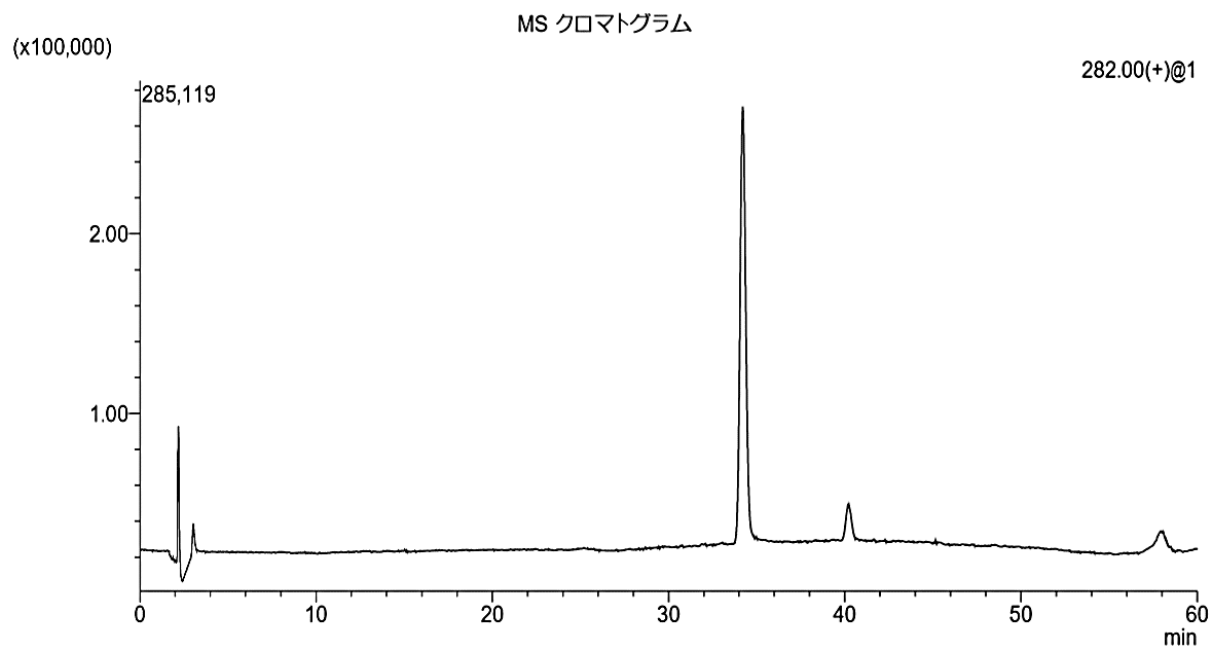
- 70) Rogaev, E. I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y.; Chi, H.; Lin, C.; Holman, K.; Tsuda, T. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **1995**, *376*, 775–778.
- 71) Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Chi, H.; Lin, C.; Li, G.; Holman, K.; Tsuda, T.; Mar, L.; Foncin, J. F.; Bruni, A. C.; Montesi, M. P.; Sorbi, S.; Rainero, I.; Pinessi, L.; Nee, L.; Chumakov, I.; Pollen, D.; Brookes, A.; Sanseau, P.; Polinsky, R. J.; Wasco, W.; Da Silva, H. A.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A.; Tanzi, R. E.; Roses, A. D.; Fraser, P. E.; Rommens, J. M.; St George-Hyslop, P. H. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **1995**, *375*, 754–760.
- 72) Strittmatter, W. J.; Saunders, A. M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghild, J.; Salvesen, G. S.; Roses, A. D. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1993**, *90*, 1977–1981.
- 73) Takata, K.; Kawanishi, S.; Touji, Y.; Takada, T.; Kitamura, Y.; Ashihara, E. Development of Cell Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Using Animal Models *Animal Models in Cancer Research and Human Disease: Applications, Outcomes and Controversies* Murray, S. A. Nova Science Publishers: New York, **2013**, 87–103.
- 74) Ennaceur, A.; Delacour, J. A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data *Behav. Brain Res.* **1988**, *31*, 47–59.
- 75) Morris, R. G.; Garrud, P.; Rawlins, J. N.; O'Keefe, J. Place Navigation Impaired in Rats With Hippocampal Lesions *Nature* **1982**, *297*, 681–683.
- 76) Myskiw, J. C.; Rossato, J. I.; Bevilaqua, L. R. M.; Medina, J. H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *89*, 338–351.
- 77) Nagakura, A.; Shitaka, Y.; Yarimizu, J.; Matsuoka, N. Characterization of cognitive deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease and effects of donepezil and memantine. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *703*, 53–61.
- 78) Gong, Y.; Chen, J.; Jin, Y.; Wang, C.; Zheng, M.; He, L. GW9508 Ameliorates Cognitive Impairment via the cAMP-CREB and JNK Pathways in APPswe/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease *Neuropharmacology* **2020**, *164*, 107899.
- 79) Moores, C. A.; Perderiset, M.; Kappeler, C.; Kain, S.; Drummond, D.; Perkins, S. J.; Chelly, J.; Cross, R.; Houdusse, A.; Francis, F. Distinct Roles of Doublecortin Modulating the Microtubule Cytoskeleton *EMBO J.* **2006**, *25*, 4448–4457.
- 80) Martí-Mengual, U.; Varea, E.; Crespo, C.; Blasco-Ibáñez, J. M.; Nacher, J. Cells Expressing Markers of Immature Neurons in the Amygdala of Adult Humans *Eur. J. Neurosci.* **2013**, *37*, 10–22.
- 81) Imayoshi, I.; Sakamoto, M.; Kageyama, R. Genetic methods to identify and manipulate newly born neurons in the adult brain *Front. Neurosci.* **2011**, *5*, 64.

- 82) Yoneyama, M.; Ogita, K. Activation of Neuronal Regeneration Signal Following Neuronal Degeneration-Involvement of Microglia *Nihon Yakurigaku Zasshi* **2013**, *142*, 17–21.
- 83) Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells From Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors *Cell*, **2006**, *126*, 663–676.
- 84) Eiraku, M.; Watanabe, K.; Matsuo-Takasaki, M.; Kawada, M.; Yonemura, S.; Matsumura, M.; Wataya, T.; Nishiyama, A.; Muguruma, K.; Sasai, Y. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 519–532.
- 85) Episkopou, V. SOX2 Functions in Adult Neural Stem Cells *Trends. Neurosci.* **2005**, *28*, 219–221.
- 86) Katsetos, C. D.; Karkavelas, G.; Herman, M. M.; Viores, S. A.; Provencio, J.; Spano, A. J.; Frankfurter, A. Class III Beta-Tubulin Isotype (Beta III) in the Adrenal Medulla: I. Localization in the Developing Human Adrenal Medulla *Anat. Rec.* **1998**, *250*, 335–343.
- 87) Soltani, M. H.; Pichardo, R.; Song, Z.; Sangha, N.; Camacho, F.; Satyamoorthy, K.; Sanguenza, O. P.; Setaluri, V. Microtubule-associated Protein 2, a Marker of Neuronal Differentiation, Induces Mitotic Defects, Inhibits Growth of Melanoma Cells, and Predicts Metastatic Potential of Cutaneous Melanoma *Am. J. Pathol.* **2005**, *166*, 1841–1850.
- 88) 脳科学辞典 <https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E7%B5%82%E8%84%B3> (2020 年 2 月 24 日)
- 89) Takuma, K.; Nagai, T.; Yamada K. Behavioral analyses for learning and memory in mice and rats. *日薬理誌* **2007**, *130*, 112–116.
- 90) Alam, M. J.; Kitamura, T.; Saitoh, Y.; Ohkawa, N.; Kondo, T.; Inokuchi, K. Adult Neurogenesis Conserves Hippocampal Memory Capacity *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 6854–6863.
- 91) Salado, I. G.; Zaldivar-Diez, J.; Sebastián-Pérez, V.; Li, L.; Geiger, L.; González, S.; Campillo, N. E.; Gil, C.; Morales, A. V.; Perez, D. I.; Martinez, A. Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) inhibitors based on indolinone scaffold: Potential pro-neurogenic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 328–342.
- 92) Kobayashi, K.; Ikeda, Y.; Sakai, A.; Yamasaki, N.; Haneda, E.; Miyakawa, T.; Suzuki, H. Reversal of Hippocampal Neuronal Maturation by Serotonergic Antidepressants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, *107*, 8434–8439.
- 93) Malberg, J. E.; Eisch, A. J.; Nestler, E. J.; Duman, R. S. Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 9104–9110.
- 94) Spalding, K. L.; Bergmann, O.; Alkass, K.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Huttner, H. B.; Boström, E.; Westerlund, I.; Vial, C.; Buchholz, B. A.; Possnert, G.; Mash, D. C.; Druid, H.; Frisén, J. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans *Cell* **2013**, *153*, 1219–1227.
- 95) Imoto, Y.; Kira, T.; Sukeno, M.; Nishitani, N.; Nagayasu, K.; Nakagawa, T.; Kaneko, S.; Kobayashi, K.; Segi-Nishida, E. Role of the 5-HT₄ Receptor in Chronic Fluoxetine Treatment-Induced Neurogenic Activity and Granule Cell Dematuration in the Dentate Gyrus *Mol. Brain* **2015**, *8*, 29.

- 96) Zhao, S.; Kang, J.; Du, Y.; Kang, J.; Zhao, X.; Xu, Y.; Chen, R.; Wang, Q.; Shi, X. An efficient ultrasound-assisted synthesis of *N*-alkyl derivatives of carbazole, indole, and phenothiazine, *J. Heterocycl. Chem.* **2014**, *51*, 683–689.
- 97) Schouteeten, A.; Julia, M. NMR study of 1-(1-carbazolyl)allyl anions, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 607–608.
- 98) Issa, S.; Walchshofer, N.; Kassab, I.; Termoss, H.; Chamat, S.; Geahchan, A.; Bouaziz, Z. Synthesis and antiproliferative activity of oxazinocarbazole and *N,N*-bis(carbazolylmethyl)amine derivatives *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2567–2577.
- 99) Kitawaki, T.; Hayashi, Y.; Ueno, A.; Chida, N. One-step construction of carbazoles by way of the palladium-catalyzed double *N*-arylation reaction and its application to the total synthesis of murrastifoline-A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6792–6801.
- 100) Sissouma, D.; Maingot, L.; Collet, S.; Guingant, A. Concise and efficient synthesis of calothrixin B. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8384–8389.
- 101) Nakagawa, M.; Taniguchi, Y.; Senda, S.; Takizawa, N.; Ichisaka, T.; Asano, K.; Morizane, A.; Doi, D.; Takahashi, J.; Nishizawa, M.; Yoshida, Y.; Toyoda, T.; Osafune, K.; Sekiguchi, K.; Yamanaka, S. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3594.

Supplemental data

インサート内 (透過前)



インサート外 (透過後)

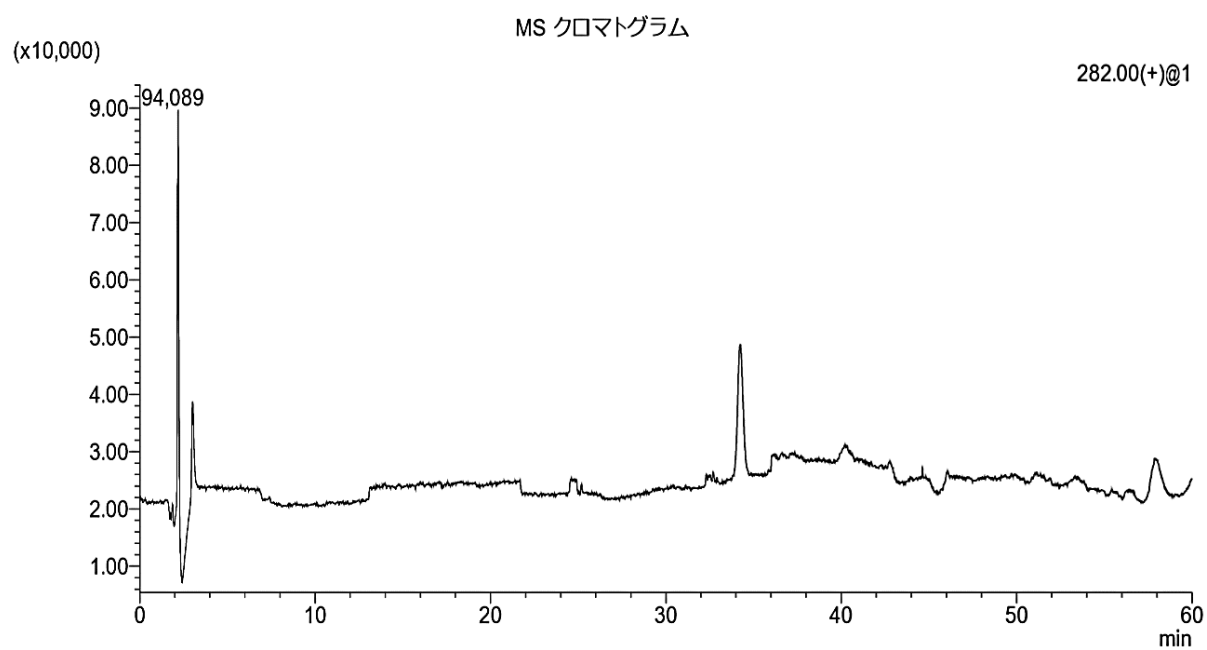
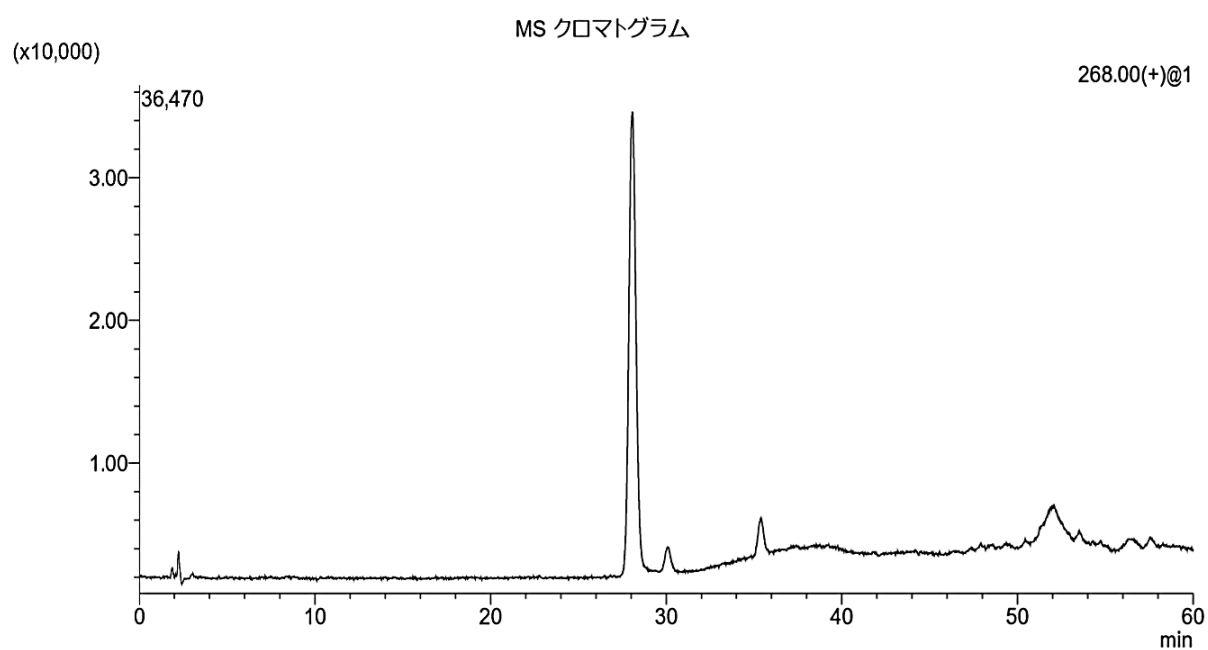


Fig. S1 *N*-Methylasimilobine (**4**) の透過前後の MS クロマトグラムの比較

インサート内 (透過前)



インサート外 (透過後)

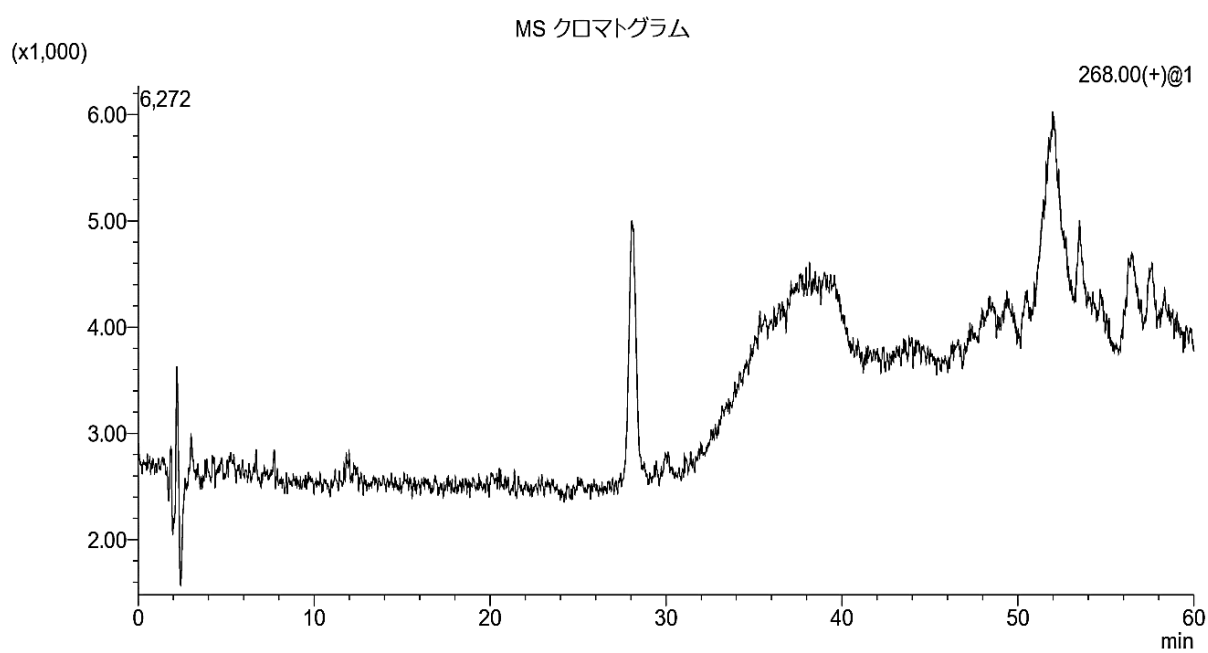
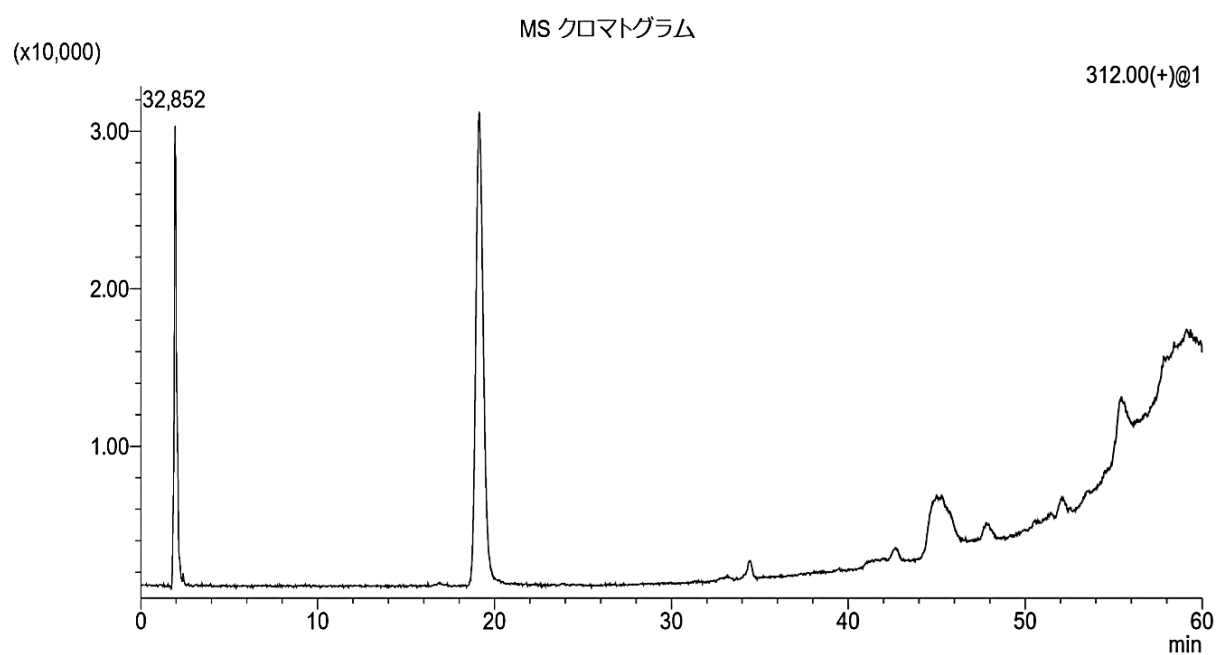


Fig. S2 Asimilobine (5) の透過前後の MS クロマトグラムの比較

インサート内 (透過前)



インサート外 (透過後)

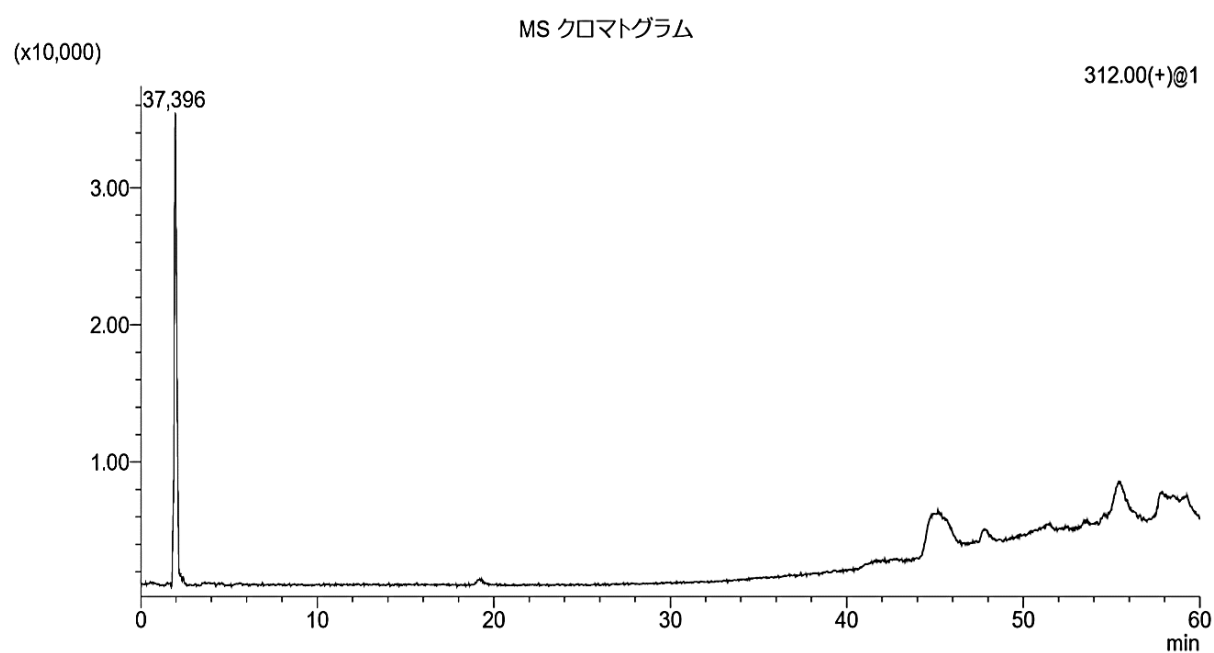
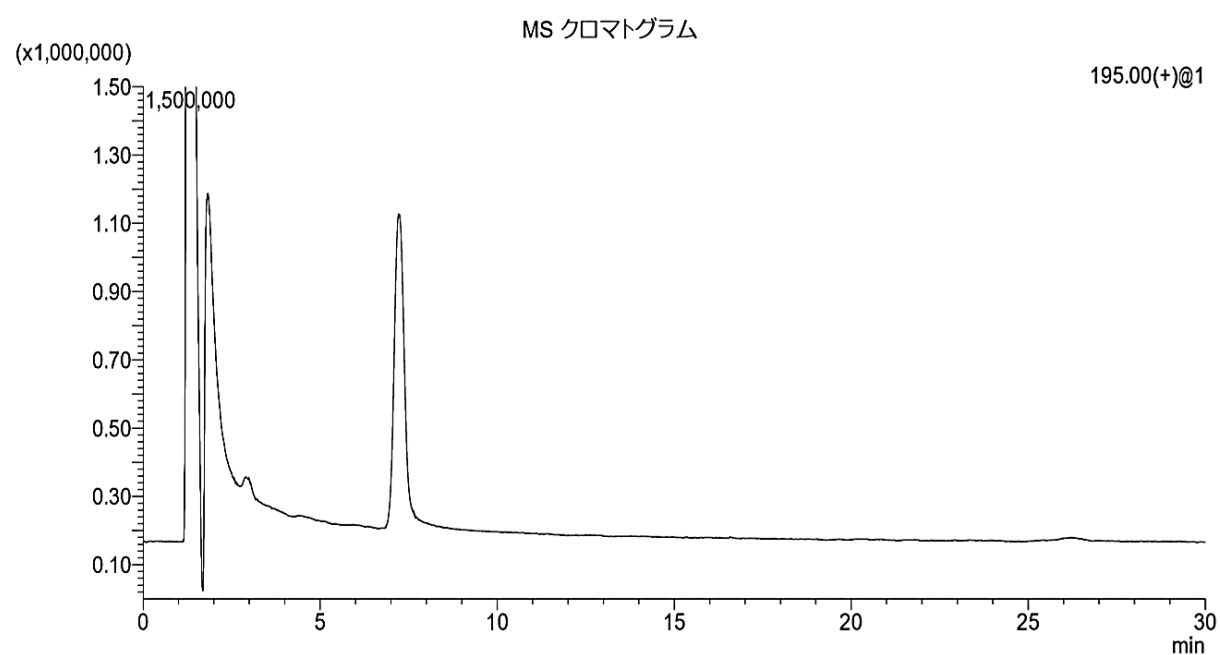


Fig. S3 Pronuciferine (6) の透過前後の MS クロマトグラムの比較

インサート内 (透過前)



インサート外 (透過後)

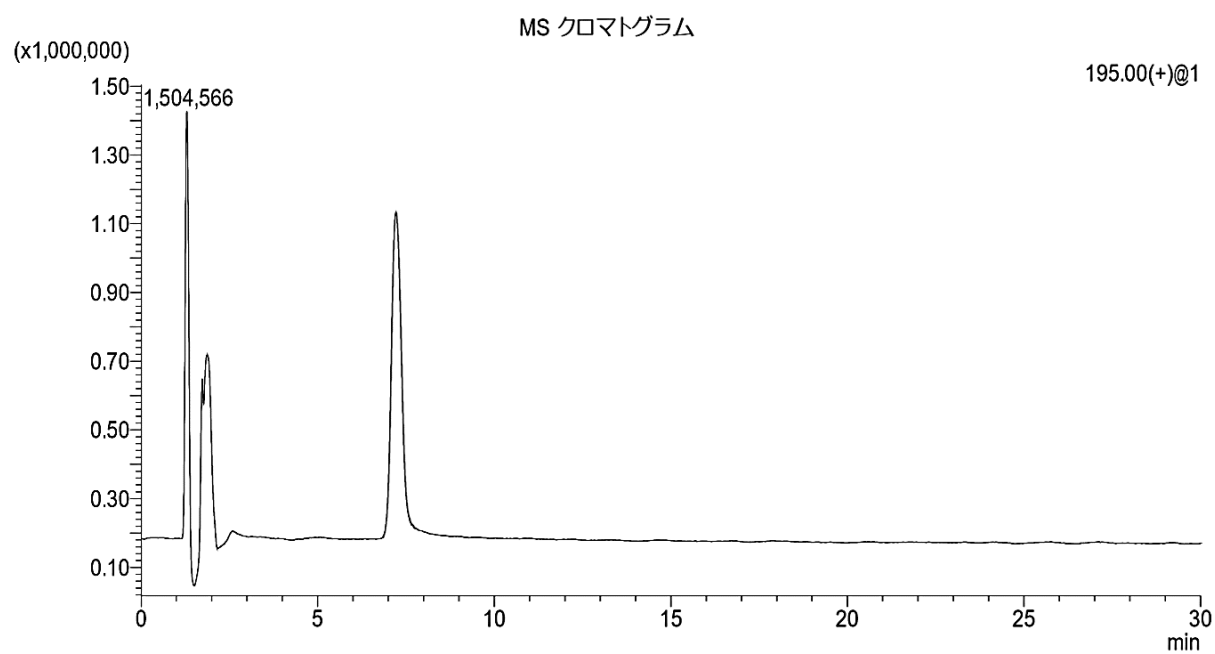


Fig. S4 caffeine の透過前後の MS クロマトグラムの比較

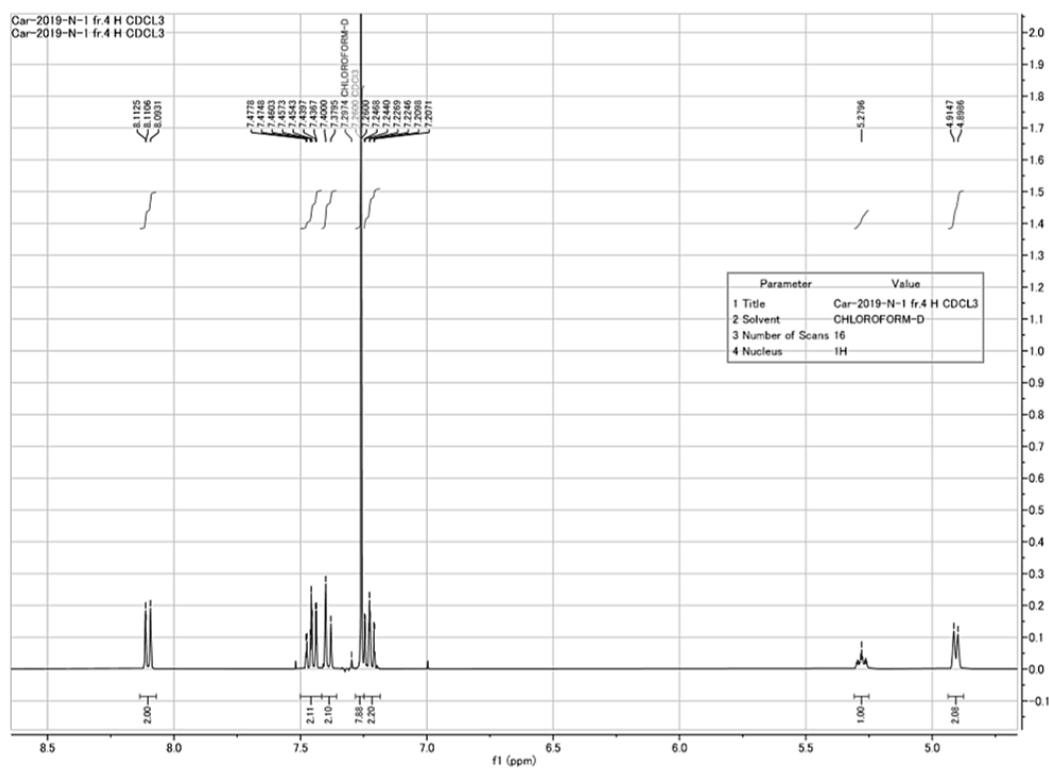
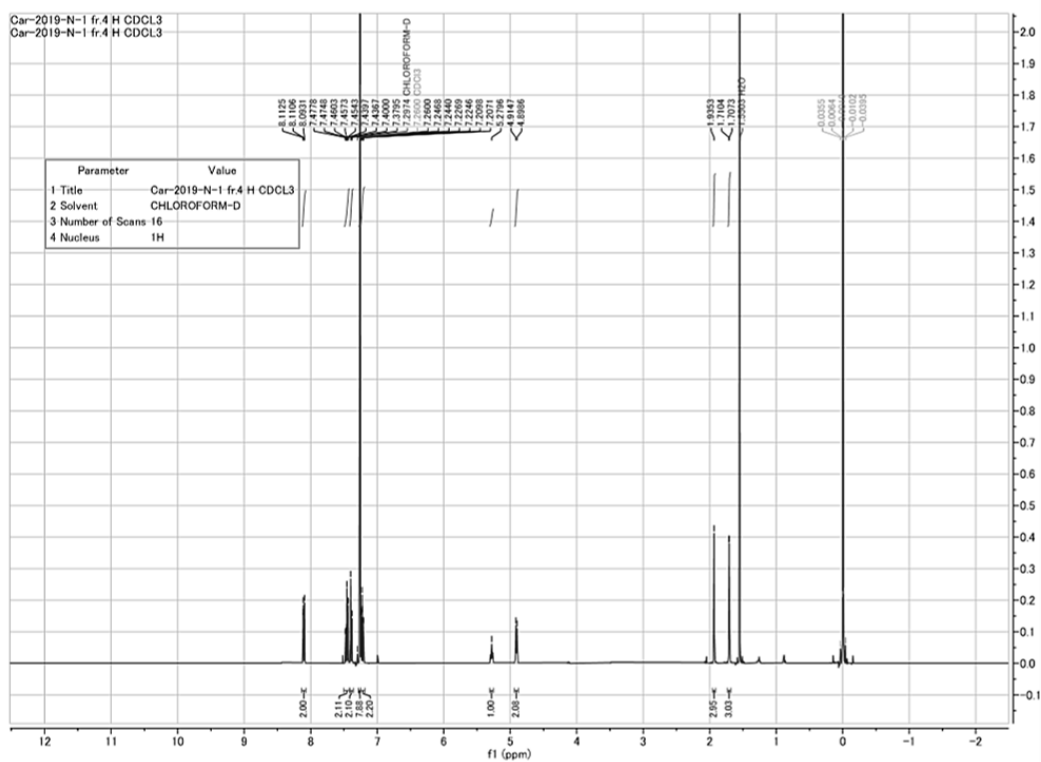


Fig. S5 9-(3,3-dimethylallyl)-9H-carbazole (**23**) の ¹H-NMR スペクトル (Measured in CDCl₃)

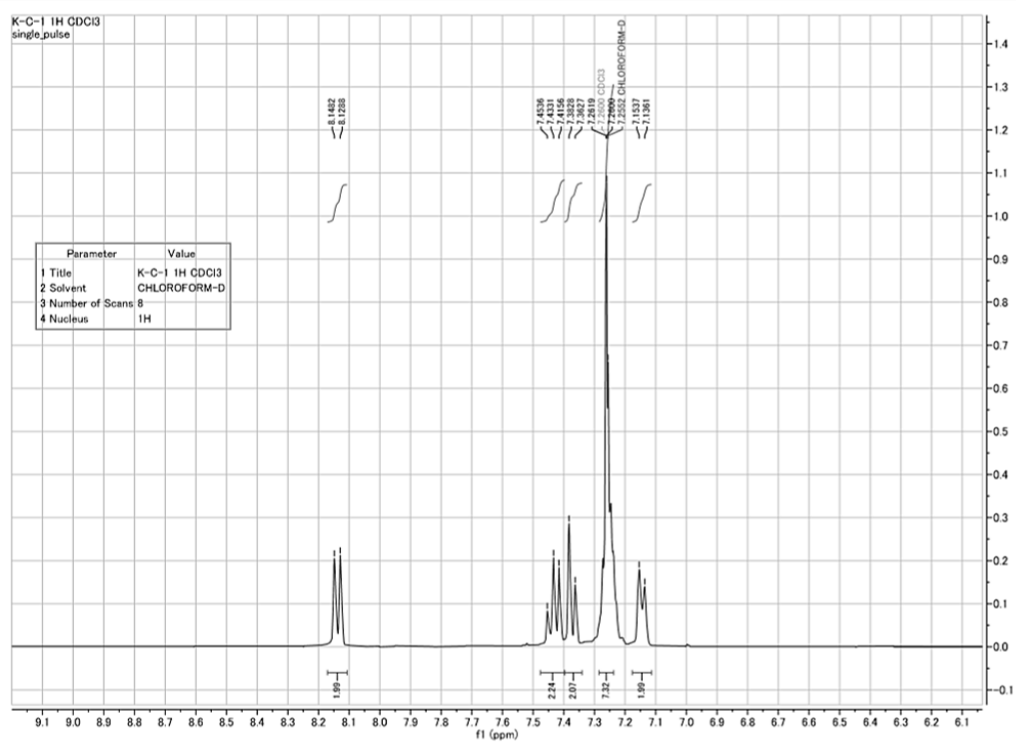
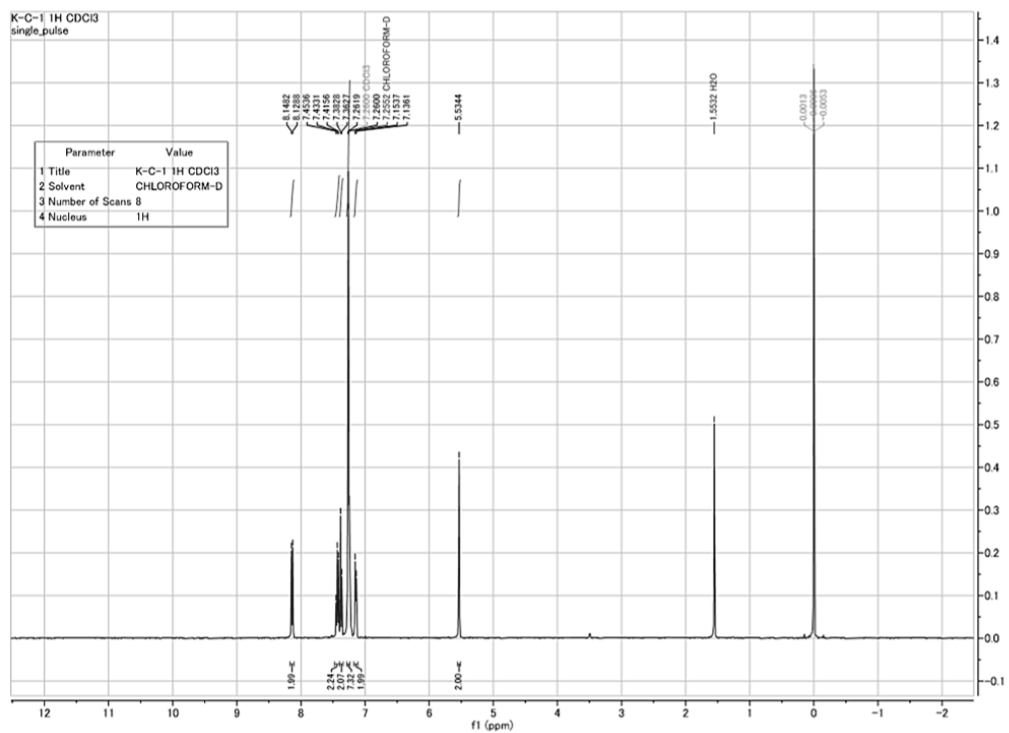
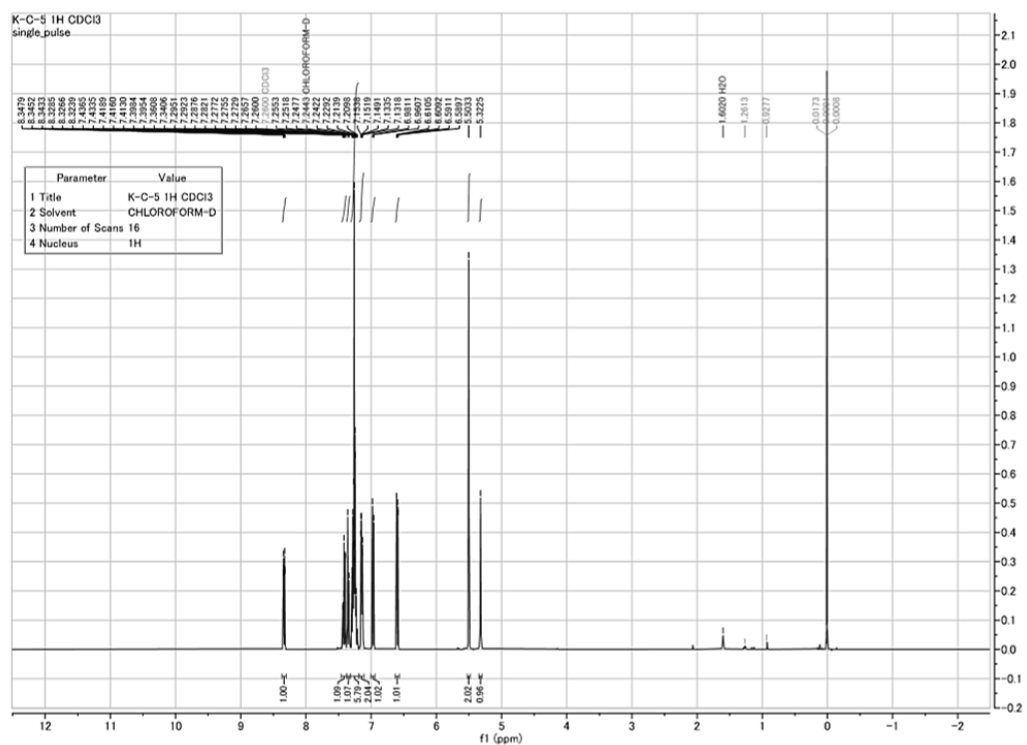


Fig. S6 9-benzyl-9H-carbazole (**26**) の ^1H -NMR スペクトル (Measured in CDCl_3)



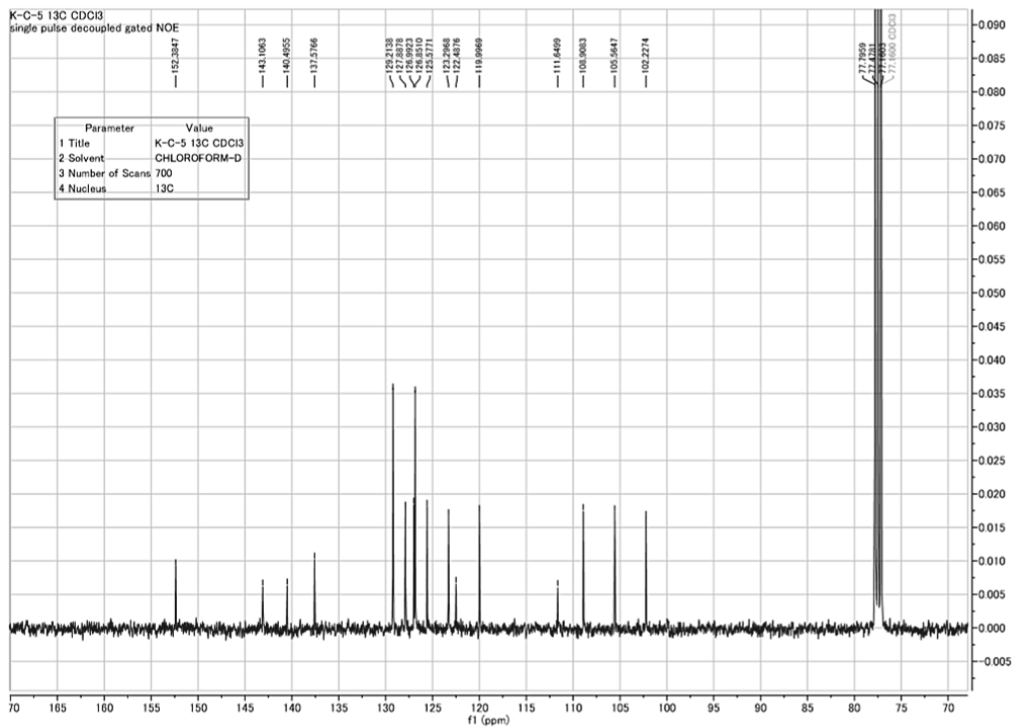
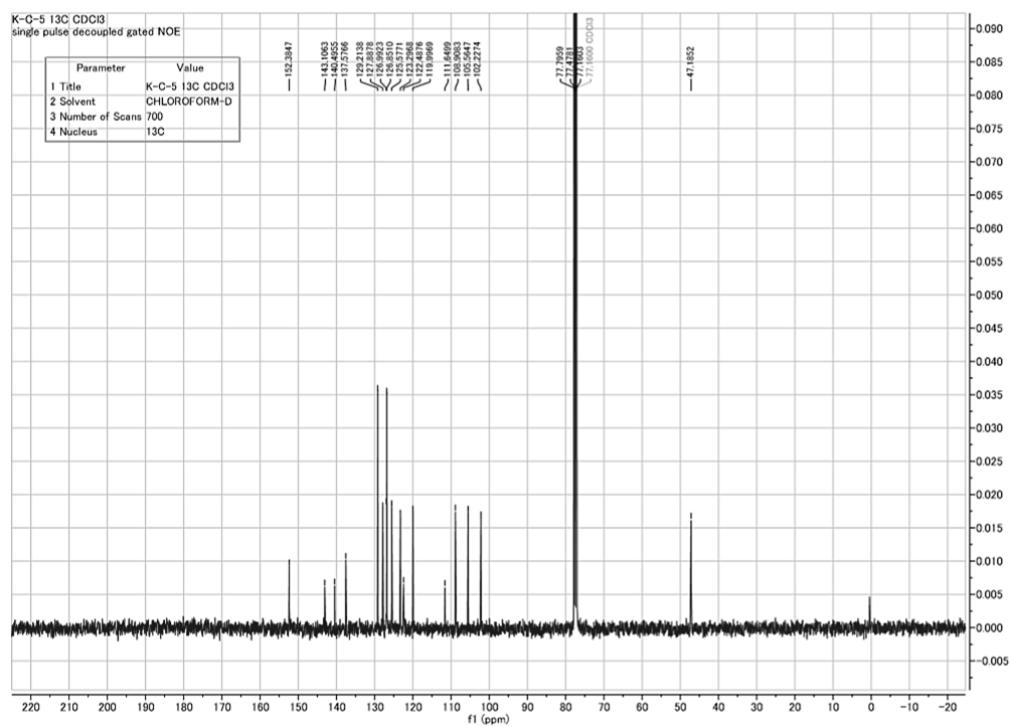


Fig. S8 9-benzyl-9H-carbazol-4-ol (**28**) の ^{13}C -NMR スペクトル (Measured in CDCl_3)