

白の蓄積がこの ATP 枯渇を誘導するストレスと想定できる。今後、このモデルに基づき KUS で神経変性疾患のモデル動物での神経細胞死が抑制できるかどうかを検証し、細胞保護という新しい治療法の基盤構築を行いたいと考えている。

おわりに

神経変性疾患において異常蛋白質の蓄積が神経細胞死を誘導する共通の原因となっているという考えはかなり認められるようになってきた。しかし、蓄積部位という点では脳内の領域はいうに及ばず、神経細胞ひとつをとってみてもまちまちである。たとえば、ポリグルタミン病での凝集物はおもに核内、Parkinson 病の Lewy body や ALS で認められる凝集物は細胞質内、Alzheimer 病の老人斑やプリオン病で認められるクールー斑は神経細胞を取り囲んで細胞外に沈着する。もちろん、沈着する場所が異なるわけであるので、それに引き続いて引き起こされる生体反応もまちまちであるというのが、素直な考えではあるが、これらの蓄積がかなり似通った生体応答を引き起こすという考えも魅力ある考えである。たとえば、いずれの沈着物も細胞にはストレスなはずで、沈着物を除去しようとして ATP の消費が亢進することは十分ありえそうである。

神経変性疾患のもうひとつの特徴として、中年以降に発症する疾患がきわめて多いことがある。ATP 量の低下という視点から考えれば、これも

加齢に伴う ATP 合成系のへたり(衰え)を想定すると説明がつく。細胞のむだな ATP の消費を抑制できれば、加齢に伴う ATP 合成能の低下を補うことは可能なはずである。KUS 化合物はそのような作用をもっていると考えられ、細胞保護というまったく新しい疾患治療法の基盤構築に貢献できるものと考えている。

文献

- 1) The Huntington's Disease Collaborative Research Group : *Cell*, **72** : 971-983, 1993.
- 2) Kawaguchi, Y. et al. : *Nat. Genet.*, **8** : 221-228, 1994.
- 3) Kakizuka, A. : *Curr. Opin. Neurol.*, **10** : 285-290, 1997.
- 4) Kakizuka, A. : *Trends Genet.*, **14** : 396-402, 1998.
- 5) Selkoe, D. J. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, **4** : 708-716, 1994.
- 6) Ihara, Y. et al. : *J. Biochem.*, **99** : 1807-1810, 1986.
- 7) Glenner, G. G. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120** : 885-890, 1984.
- 8) Ikeda, H. et al. : *Nat. Genet.*, **13** : 196-202, 1996.
- 9) Polymeropoulos, M. H. et al. : *Science*, **276** : 2045-2047, 1997.
- 10) Zarranz, J. J. et al. : *Ann. Neurol.*, **55** : 164-173, 2004.
- 11) Spillantini, M. G. et al. : *Nature*, **388** : 839-840, 1997.
- 12) Rosen, D. R. et al. : *Nature*, **362** : 59-62, 1993.
- 13) Higashiyama, H. et al. : *Cell Death Differ.*, **9** : 264-273, 2002.
- 14) Watts, G. D. et al. : *Nat. Genet.*, **36** : 377-381, 2004.
- 15) Johnson, J. O. et al. : *Neuron*, **68** : 857-864, 2010.
- 16) Manno, A. et al. : *Genes Cells*, **15** : 911-922, 2010.
- 17) Hirabayashi, M. et al. : *Cell Death Differ.*, **8** : 977-984, 2001.
- 18) Chou, T. F. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** : 4834-4839, 2011.
- 19) Mori-Konya, C. et al. : *Genes Cells*, **14** : 483-497, 2009.

* * *

ホップ抽出物のアルツハイマー病発症抑制効果

Oral Administration of Hop Flower Extracts Mitigates Alzheimer Phenotypes in Mice

笹岡紀男^{*1} 垣塚 彰^{*2}

少子高齢化の問題を抱える現代社会において、認知症患者はこれから増々増加することが予想されており、その中でも認知症の半数以上を占めるアルツハイマー病に対する治療薬、および予防薬の早急な開発が求められている。本稿では、マウスの実験で、アルツハイマー病の発症抑制効果を示したホップエキスを中心に、筆者らの研究成果を紹介する。

1. はじめに

厚生労働省の調査によると国内の認知症患者は2012年の時点で約460万人にのぼることが判明しており、そのうちの半数以上がアルツハイマー病であると考えられている。しかしながら、現時点では根本的な治療法や予防法が確立されておらず、対症療法に依存している状況である。一方で、この状況は多くの先進国にも当てはまり、アルツハイマー病に対する有効な治療法の開発は、先進国に共通する重要課題であり、特に世界で最も顕著な高齢化社会を迎えつつある我が国にとって、この分野の研究の推進ほど、緊急かつ重要な科学的対策はないといえる。

アルツハイマー病の発症原因の最も上流に位置すると考えられているのが老人斑の主要構成成分である β Amyloid ($A\beta$)¹⁾の産生である。 $A\beta$ は、その前駆体タンパク質であるAmyloid Precursor Protein (APP)²⁾の膜貫通近傍部分から β -セクレターゼと γ -セクレターゼの2つのタンパク質プ

ロセシング酵素の働きで切り出される³⁾。遺伝性アルツハイマー病では、ほとんどの症例で $A\beta$ (特に $A\beta 42$)の産生亢進が観察され、アルツハイマー病の発症には γ -セクレターゼによるAPPからの $A\beta$ の切り出しが律速段階であると考えられる⁴⁾。また、これまで報告されている家族性アルツハイマー病のほとんどの症例でAPPおよび γ -セクレターゼの構成因子の一つであるPresenilinに変異が見られ⁵⁾、 $A\beta$ 産生の亢進が認められている⁶⁾。

健常者であっても、 $A\beta$ 沈着が40歳代から始まると考えられているが⁷⁾、それからの進行は緩やかで、約20年かけて明らかな沈着がみられるようになり、さらに20年、もしくはそれ以上かけて軽度認知障害が惹起される⁸⁾。アルツハイマー病患者においてはこの一連の $A\beta$ 沈着から最終的な認知症までの進行が非常に早く、40歳代前半で発症する場合も報告されている⁹⁾。

これらのことから、アルツハイマー病の薬物治療・予防においては、かなりの長期に渡って薬物

^{*1}Norio Sasaoka 京都大学大学院 生命科学研究科 高次生体統御学分野 助教

^{*2}Akira Kakizuka 京都大学大学院 生命科学研究科 高次生体統御学分野 教授

投与を行う必要があると想定される。したがって、いかに副作用が少なく安全な治療薬、および予防薬を提供できるかが極めて重要となる。この観点から筆者らは、合成化合物ではなく漢方薬に代表される植物エキスに着目した¹⁰⁾。漢方薬は古くからヒトに使用されており、副作用も比較的少なく安全性を確保しやすいため、より安全性の高い治療法を提供できる可能性を持っているといえる。また、現在臨床で使用されているアルツハイマー病治療薬は、障害を受けた神経細胞の機能を助けるものであり、神経細胞の障害や死を防ぐものではない。今もなお、A β の産生を阻害する薬剤やA β の排出を促進する薬剤の開発、および抗体を用いた治療法の開発に激しい競争が繰り広げられているが、本研究で目指した少ない副作用で長期投与が可能なアルツハイマー病のリスクを軽減するという治療薬は欧米で開発が進められている治療薬とは一線を画すものである。

また、近年、抑肝散とよばれるアルツハイマー病の周辺症状（鬱状態、行動異常）に効果を示す漢方薬が注目されているが¹¹⁾、中核症状（記憶障害）を予防・治療する漢方薬は未だ見つからない。

2. 植物エキスのスクリーニング

A β 産生の最初期段階を担う γ -セクレターゼは、少なくとも4つのタンパク質からなる複合体であり¹²⁾、*in vitro*での複合体の再構築は極めて難しい。細胞の内在性 γ -セクレターゼの活性は産生されるA β の量をELISA法で定量することで推定されている。しかしながら、ELISA法はコストが高く、薬剤のスクリーニングには適さない。このような状況の下、筆者らは γ -セクレターゼの活性を転写因子の活性に変換し、ルシフェラーゼレポーターとして安価に、そして簡便にモニターするシステムを構築した(図1)。既に β 切断されたIndiana変異をもつAPP(β CTF-V717F)のN末端部位にFLAGタグを付加し、C末端部分に酵母の転写因子Gal4のDNA結合領域とHerpes simplex virusの転写活性化領域を融合したGal4-VP16を付加したタンパク質(FLAG- β CTF-Gal4VP16)を発現させるベクターを構築した。このGal4VP16の活性はプロモーター領域にGal4認識配列(GalRE)を挿入したルシフェラーゼのレポーター(TK(GalRE)Luc)で測定することができる。このFLAG- β CTF-Gal4VP16とTK(GalRE)LucをHEK293A細胞にトランスフェク

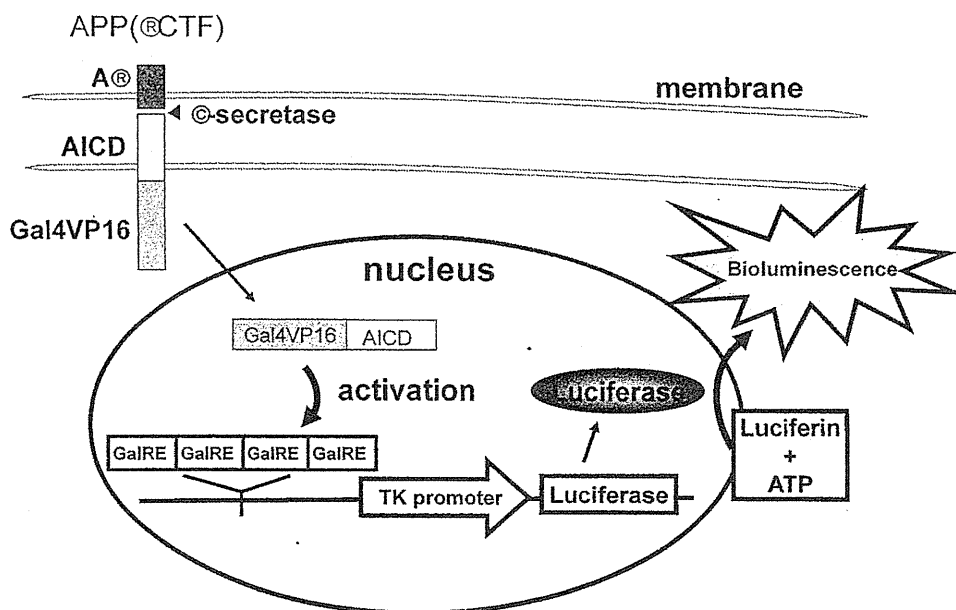


図1 γ -セクレターゼ活性を簡便に検出するアッセイ系

ションし、24時間後に植物エキスを添加、さらに24時間後に細胞を回収し、その抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。また、このアッセイ系では、非特異的な転写抑制作用が擬陽性になるため、サイトメガロウイルス (CMV) のプロモーターで β ガラクトシダーゼ (β -gal) を発現させるプラスミド (CMV- β -gal) を同時にトランスフェクションし、 β -gal 活性に変化を与えずルシフェラーゼ活性のみを低下させるものをポジティブと判定した。このアッセイ系において、ルシフェラーゼ活性は既存の γ -セクレターゼ阻害剤である *N*-[*N*-(3,5-ジフルオロフェンアセチル)-*L*-アラニル]-*S*-フェニルグリシン-*t*-ブチルエステル (DAPT) の添加で濃度依存的に低下したことから、 γ -セクレターゼによって細胞膜に存在する FLAG- β CTF (V717F)-Gal4VP16 が切断された結果、Gal4VP16 が核に移行してレポーターの転写を活性化していることを確認した。

樹立したアッセイ系を用いて、約 1,600 種類の植物エキスをスクリーニングし、結果、数種類の植物エキスが濃度依存的にルシフェラーゼ活性を特異的に低下させた。その中でホップエキス (生薬名：啤酒花) が、最も顕著にルシフェラーゼ活性 (γ -セクレターゼの活性) を抑制した。ホップエキスに γ -セクレターゼの阻害活性があることの確認として、FLAG- β CTF (V717F)-Gal4VP16 を HEK293A にトランスフェクションし、その培養上清中の A β 分泌量を、A β に特異的な ELISA を用いて確認した結果、ルシフェラーゼアッセイの結果と同様に有意に A β 量を減少させた。

一方で、 β CTF と同じく γ -セクレターゼが作用することが知られている Notch1 の N 末端領域を除去した活性化型 Notch1 を HEK293A 細胞に強制発現させ、ホップエキスを添加したときのルシフェラーゼ活性を調べた結果、 β CTF と同様にホップエキス添加群ではコントロールと比較してルシフェラーゼ活性の減少がみられたが、活性化型 Notch1 ではその減少レベルは β CTF と比較して僅かであった。

3: ホップエキス中の有効成分の同定

樹立したスクリーニング系によって γ -セクレターゼの阻害活性を認めたホップエキスに対し、その主要成分の精製を行った (図 2)。

まず、ホップエキスを Bligh Dyer 法により水溶性 (Fraction 1)、脂溶性 (Fraction 2) の 2 層に分離した後、前述のレポーターアッセイによりエキス中の γ -セクレターゼ阻害活性が脂溶性分画 (Insoluble fraction) に移行していることを確認した。続いて、この脂溶性分画を Silica cartridges を使用した固相抽出により 2 分画に分離し 100% メタノール分画に移行していることを確認した。

次に、100% メタノール分画を 5CN-MS 順相カラムにより、ヘキサン：クロロホルム = 50 : 50 の溶媒から毎分 1% ずつメタノール濃度を上昇させるプロトコールで順相 HPLC を実施した。結果、

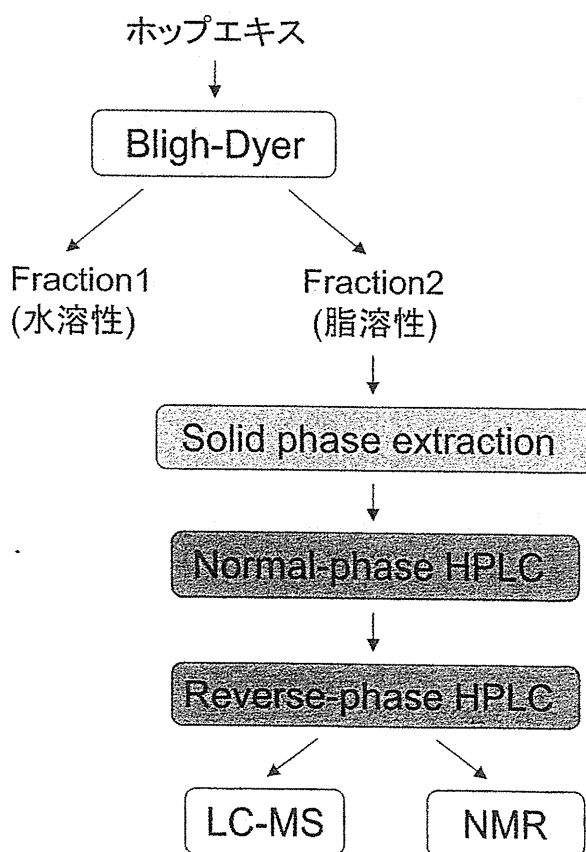


図 2 ホップエキスの抽出・精製

分離開始後3分~7分の分画に活性成分が溶出していることを確認した。また、この順相HPLCで得た活性分画を回収し、5C18-AR-IIカラムにより、アセトニトリル：水=80：20の溶媒から毎分1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコルで逆相HPLCを行った。その結果、分離開始後8分~12分の分画に活性成分が溶出していることを確認した。さらに、この活性分画を回収し、2度目の逆相HPLCとして、Symmetry shield C18カラムで前述と同様に毎分1%ずつアセトニトリル濃度を上昇させるプロトコルで分離を行った結果、分離開始後14分~16分に活性成分が溶出していることを確認した。最後に、活性成分をより純粋なシングルピークに精製するために、 π -NAPカラムを用いてアセトニトリル：水=65：35の溶媒で逆相HPLCを行った。その結果、よりシャープなシングルピークが分離開始後15分にみられ、その化合物の最大吸収波長は247nmと332nmを示した。

上記の一連の方法を用いて、ホップエキスの脂溶性分画330mgから開始し、最終的に2mgの精製化合物を得た。さらに、質量分析および核磁気共鳴(NMR)により精製化合物は分子量416のGarcigliptone HC ($C_{25}H_{36}O_5$)という既知化合物¹³⁾であることが明らかとなった。

精製化合物のルシフェラーゼアッセイによる γ -セクレターゼ阻害活性の IC_{50} 値は $5.4 \mu g/mL$ であり、DAPTは29nMであった。これまでに報告のあるDAPTの IC_{50} 値は20nMであり¹⁴⁾、このアッセイ系が概ね妥当であることを示している。

4. 病態モデルマウスにおける薬理学的効果の検証

同定したホップエキスが実際にアルツハイマー病の症状発症を予防できるかを検証するために筆者らはアルツハイマー病モデルマウスを作出した。脳の神経細胞に特異的に発現させるために、神経特異的エノラーゼ(Neuron-specific enolase : NSE)遺伝子のプロモーター支配下に家族性アル

ツハイマー病で同定されたIndiana変異(V717F)をもつAPPを発現させるトランスジーンをマウスの受精卵にインジェクションし、APPトランスジェニックマウス(V717Fマウス)を得た。このV717Fマウスを水投与群およびホップエキス投与群(エキスを水に溶解し2g/Lとしたものを投与)にグループ分けし、生後6週間から各々を自由摂取させた。

病態モデルマウスに対するホップエキスの効果を評価するための記憶・学習能力測定実験としてMorrisの水迷路を用い、1日目から5日目までの5日間を訓練セッションとして観察した。2ヵ月齢のマウスでは野生型マウスとV717Fマウスとの間にプラットホームに辿り着くまでの時間に有意差は認められなかったが、6ヵ月齢頃から野生型マウスとV717Fマウスの間に徐々に差が見られ始め、9ヵ月齢、12ヵ月齢では有意な差が認められた。また、V717Fマウスのホップエキス投与群は非投与群と比較して、プラットホームにたどり着くまでの時間が有意に短縮された(図3)。しかしながら、15ヵ月齢、18ヵ月齢のV717Fマウスではホップエキス投与マウスと非投与マウスとの間で、訓練セッションでの経時的な到着時間の短縮はみられず、6日目のプローブテストにおいても、滞在時間に有意な差はみられなかった。この結果から、本研究で同定したホップエキスは惹起されるアルツハイマー病の症状を完全に抑制するのではなく、発症を遅延させる効果を持つことが示唆された。

さらに、筆者らは同じNSE遺伝子のプロモーターの支配下に家族性アルツハイマー病で同定された変異を持つPresenilin 1(PS1(P267S))を発現させるトランスジェニックマウスを作出し、前述のV717Fマウスと掛け合わせることで、V717F/P267Sトランスジェニックマウス(V717F/P267Sマウス)を作出した。作出したV717F/P267Sマウスに対し、Morrisの水迷路試験に加え、別の記憶・学習能力の検証実験としてY字迷路を実施した。その結果、9ヵ月齢マウスのV717F/P267Sマウスは、両試験において、記憶・学習能力に低

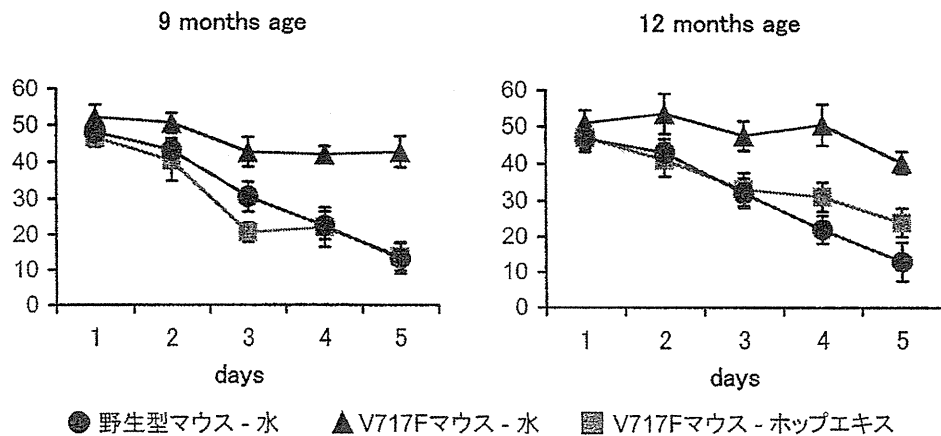


図3 Water Maze テスト (訓練セッション) におけるホップエキスのV717F マウス に対する効果

F=11.4, $p < 0.001$ in 9-month-old mice, F=20.94, $p < 0.01$ in 12-month-old mice, by two-way repeated measures ANOVA followed by a Holm-Sidak test.

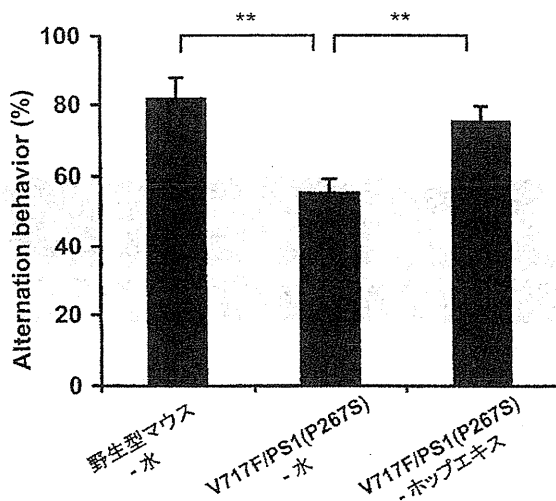


図4 9ヵ月齢のV717F/P267S マウスにおける Y字迷路

** $p < 0.01$ by Student's t test.

下がみられたが、ホップエキス投与マウスは野生型マウスとほぼ同じレベルで記憶・学習能力が保持されたままであった(図4)。

これら2種類のアルツハイマー病モデルマウスを用いた行動実験の結果から、ホップエキスはアルツハイマー病でみられる記憶・学習能力の低下を有意に遅延させる効果があると考えられた。

本研究の結果からホップエキスは、Notch1に作用する γ -セクレターゼより β CTFに作用する

γ -セクレターゼを阻害する可能性を持っており、実際、ホップエキスを長期投与したマウスは、脳内A β 沈着の抑制効果に加え、記憶・学習能力の低下の抑制が認められた。一方、Notchの抑制によることが想定される成長障害、皮膚病、皮膚がんは観察されなかった。これらのことから、ホップエキスは、高い安全性をもってアルツハイマー病の予防に貢献できるものと考えられた。

5. おわりに

漢方薬は経験をもとに発展してきたという歴史的背景がある。それゆえ、数千年の歴史があるにもかかわらず、漢方薬の科学的根拠はほとんどわかっていないものが多い。科学的根拠に基づく西洋医学が主流となった今、漢方薬の科学的性質を明らかにすることが求められている。すなわち、漢方薬に含まれる成分およびその薬理学的作用を詳細に調べ、明らかにしていくことは極めて重要な意味と大きな可能性があるといえる。これまでにアルツハイマー病の中核症状に対する漢方薬の存在は知られていないが、本研究により、 γ -セクレターゼの阻害活性を指標に同定したホップエキス(生薬名: 啤酒花)に顕著なアルツハイマー病に対する発症抑制効果があることが、マウスの病態モデルで観察された。本研究が、今後、現在

西洋医療では治療法のない疾患に対して、漢方薬の可能性を探る方法のプロトタイプになることを期待したい。

文 献

1) J. Hardy *et al.*, *Science*, 297, 353-356 (2002)
 2) D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.*, 271, 18295-18298 (1996)
 3) C. Haass *et al.*, *Nature*, 359, 322-325 (1992)
 4) D. J. Selkoe, *Science*, 337, 1488-1492 (2012)
 5) A. Capell, *J. Biol. Chem.*, 273, 3205-3211 (1998)
 6) D. J. Selkoe, *Neuron*, 32, 177-180 (2001)
 7) H. Braak *et al.*, *Neurobiol. Aging*, 18, 351-357 (1997)
 8) H. Funato *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 152, 1633-1640 (1998)
 9) A. K. Godbolt *et al.*, *Arch. Neurol.*, 61, 1743-1748 (2004)
 10) N. Sasaoka *et al.*, *PLoS One*, 9, e87185 (2014)
 11) H. Fujiwara *et al.*, *Neuroscience*, 180, 305-313 (2011)
 12) N. Takasugi *et al.*, *Nature*, 422, 438-441 (2003)
 13) Y. H. Lu *et al.*, *Phytochemistry*, 69, 225-233 (2008)
 14) H. F. Dovey *et al.*, *J. Neurochem.*, 76, 173-181 (2001)



機能性食品素材のためのヒト評価

監修：山本哲郎 (株)TTC

- ★機能性食品素材のヒト試験・評価に関する研究手法を徹底解説!
- ★ストレス、骨・関節、眼、脳、口腔、免疫、胃腸、アレルギー、更年期、アルコール代謝、泌尿器、生活習慣病に関する実際の評価事例を一挙掲載!
- ★今後ますますエビデンスの確立が求められる機能性食品市場において必読の一冊!

第1章 ストレス、疲労、睡眠	6 グァバ葉ポリフェノール-血糖コントロール作用と安全性-
1 オルニチン	7 アロニア果実の機能性
2 GABA	第7章 免疫
第2章 骨、関節の健康	1 シスチン・テアニン
1 プロテオグリカン	2 アガリクス
2 ヒアルロン酸	第8章 胃腸の健康
3 グルコサミン	1 乳酸発酵野菜入り野菜・果実混合飲料の整腸作用
第3章 眼	2 フコイタン抗ピロリ菌作用、胃症状改善作用
1 アスタキサンチン	3 大麦若葉粉末
2 眼機能に関するルテインのヒト評価	第9章 アレルギー
3 ヒルベリーエキスに含まれるアントシアニンと眼の機能への影響	1 青大豆によるスギ花粉症抑制効果
第4章 脳機能	第10章 アルコール代謝
1 PQQ(ピロロキノリンキノン)	1 CoQ10
2 ホスファチジルセリン	第11章 更年期
第5章 口腔	1 中高年期とくに更年期周辺女性における「伝統にんにく卵黄」の有用性
1 カルシウムとイソフラボン	第12章 泌尿器、前立腺
2 歯周病と食品素材に関する総説	1 ノコギリヤシ
第6章 生活習慣病	第13章 抗酸化
1 ハッサク果実由来オーラペンと糖・脂質代謝関連ヒト試験	1 マガキ(Crassostrea gigas)軟体部エキスの抗酸化作用と新規抗酸化物質に関する研究
2 ニーム	2 天然の抗酸化エキスピクノジェノール®の効果
3 アブラナ科野菜	
4 小麦アルブミンを利用した機能性粉体食品素材	
5 中鎖脂肪酸	

■体裁/B5判・300頁 ■発行/2013年4月 ■定価/57,000円+税

申込 FAX: 03(3293)2069 <http://www.cmcbooks.co.jp/>

シーエムシー出版

