

陳皮の抗認知症成分ノビレチンによるアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の
神経毒性発現抑制と $A\beta$ 誘発性記憶障害改善

山國 徹,^{*,a} 中島 晶,^a 大泉 康^{b,c,d}

**Preventive Action of Nobiletin, a Constituent of AURANTII NOBILIS PERICARPIUM
with Anti-dementia Activity, against Amyloid- β Peptide-induced
Neurotoxicity Expression and Memory Impairment**

Tohru YAMAKUNI,^{*,a} Akira NAKAJIMA^a, and Yasushi OHIZUMI^{b,c,d}

^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan, ^bYokohama College of Pharmacy, 601 Matano-cho, Tozuka-ku, Yokohama 245-0066, Japan, ^cGraduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-07, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan, and ^dSchool of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(Received September 25, 2009)

Alzheimer's disease (AD) has become a major health burden to society. However, no fundamentally therapeutic drugs for AD have been developed. Increasing evidence suggests that the elevation of β -amyloid ($A\beta$) peptides in the brain is central to AD pathogenesis. Recently, in the course of our survey of substances having anti-dementia activity from natural resources, we have successfully found nobiletin, a polymethoxylated flavone contained in AURANTII NOBILIS PERICARPIUM which is a component of traditional Chinese medicines. In this review, we describe the beneficial effects of nobiletin on memory impairment and $A\beta$ pathology in a transgenic mouse model introduced human "Swedish" and "London" mutant amyloid precursor protein. We also note the possible molecular mechanism underlying the protective action against $A\beta$ -induced memory impairment provided by our studies using cultured hippocampal neurons. Namely, daily administration of nobiletin for four months rescued the memory impairment in fear conditioning, and decreased hippocampal $A\beta$ deposit in the transgenic mice as analyzed by immunohistochemistry. PKA-dependent signaling and membrane trafficking of AMPA receptor subunit, GluR1, which are known to be required for long-term potentiation (LTP), have been demonstrated to be inhibited by a sublethal concentration of $A\beta$ in cultured hippocampal neurons. Our *in vitro* studies evidently showed that a sublethal concentration of $A\beta$ actually inhibited glutamate-induced increases in both PKA substrates phosphorylation and GluR1 membrane trafficking in cultured hippocampal neurons, whereas nobiletin reversed the $A\beta$ -induced inhibition of such biochemical processes. The natural compound with these unique actions has thus potential to become a novel drug for fundamental treatment of AD.

Key words—Alzheimer's disease; amyloid β -peptide; nobiletin; anti-dementia activity; memory impairment; APP transgenic mouse

1. はじめに

アルツハイマー病 (AD) の最初の報告から既に一世紀が経過したが、いまだ AD の根本治療薬は

開発されておらず、その開発は焦眉の課題である。AD は、認知機能障害と記憶力の低下を伴う進行性中枢神経変性疾患であり、その原因としてアミロイド β ペプチド ($A\beta$) の重合・蓄積が考えられている。¹⁾ すなわち、AD の発症メカニズムの中心には $A\beta$ の重合・蓄積と神経毒性発現などがあると理解できる。そこで、私たちは AD の新しい予防薬及び原因療法薬の開発を目指して、AD の予防・治療効果を示す天然薬物を探索する研究を進めてきた。その結果、漢方生薬陳皮の成分ノビレチン [以下、nobiletin と記す; (Fig. 1)] が、1) 記憶障害改善

^a東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3), ^b横浜薬科大学 (〒245-0066 横浜市戸塚区俣野町 601), ^c東北大学大学院工学研究科 (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-07), ^d静岡県立大学大学院薬学研究科 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

*e-mail: yamakuni@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S22 で発表したものを中心に記述したものである。

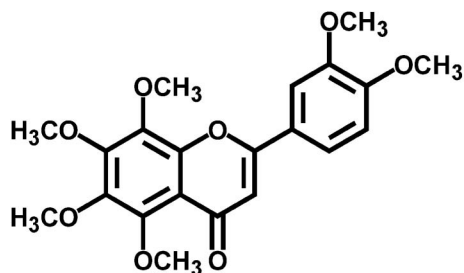


Fig. 1. Chemical Structure of Nobiletin

作用, 2) 脳コリン作動性神経の変性抑制作用, 3) 脳内での $A\beta$ の蓄積抑制作用, 4) $A\beta$ の神経毒性抑制作用を併せ持ち, かつ末梢投与が可能な天然薬物であることを世界で初めて発見することに成功した. 私たちは, これまでに種々の記憶障害モデル動物を用いて, 本天然薬物の抗認知症作用を証明した.²⁻⁷⁾ 本稿では, 家族性 AD の原因遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (APP-SL7-5)⁸⁾ における nobiletin の記憶障害改善作用, $A\beta$ の蓄積抑制作用, 及び培養海馬ニューロンを用いて明らかにした本天然薬物の $A\beta$ 神経毒性発現抑制作用, 特に $A\beta$ によるシグナル伝達障害に対する拮抗作用に関する最新の知見を紹介する.

2. ヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質トランスジェニックマウス (APP-SL7-5) における nobiletin の記憶障害改善作用

私たちはこれまでに, 脳室内に AD の原因物質である $A\beta_{1-40}$ を持続的に注入して作製した急性 AD 病態モデル動物を用いて, その $A\beta$ 誘発性記憶障害改善作用を初めて明らかにしてきた.³⁾ この知見に基づいてさらに nobiletin の抗 AD 作用を検証するため, 海馬における顕著な $A\beta$ の重合・蓄積及び空間認知機能障害などの病態を示すヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質トランスジェニックマウス (APP Tg マウス: APP-SL7-5) を用いて nobiletin の薬効を評価した. この APP-SL7-5 Tg マウスは, 辛らが家族性 AD の原因遺伝子として発見されたロンドン型及びスウエーデン型 APP 遺伝子変異の二つの変異を有するヒト変異型 APP 遺伝子を導入して作製した遺伝子改変マウスであり, $A\beta_{1-40}$ と $A\beta_{1-42}$ を過剰発現する.⁸⁾ 私たちはこの APP Tg マウスにおいて, $A\beta$ の蓄積がわずかしこ起こっていない 9 ヶ月齢より, nobiletin (10 mg/kg, i.p.) の投与を開始して, 4 ヶ月間, 1 日 1 回ずつ連続投与

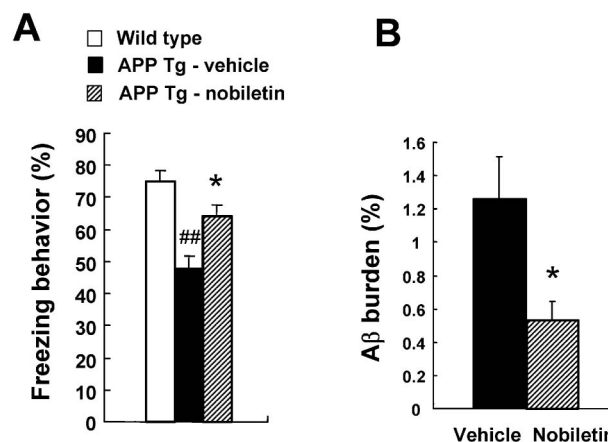


Fig. 2. Administration of Nobiletin from the Age of 9 Months Improves Memory Impairment (A) and Reduces Amyloid Plaque Pathology in the Hippocampus (B) in APP-SL 7-5 Tg Mice

(A) Notably, administration of nobiletin ameliorated the deficit in freezing responses in APP-SL 7-5 mice. ##, $p < 0.001$ vs. wild-type mice; * $p < 0.05$ vs. vehicle-treated APP-SL 7-5 Tg mice (wild-type mice, $n = 10$; APP Tg-vehicle, $n = 8$; APP Tg-nobiletin, $n = 8$). (B) The percentage of hippocampal areas covered with plaques (amyloid plaque) was significantly reduced by nobiletin (* $p < 0.05$ vs. vehicle-treated APP Tg mice; vehicle, $n = 8$; nobiletin, $n = 8$). Data are the means \pm S.E.M.

を行った. この月齢では, 本 Tg マウスは既に空間認知機能障害を呈することがわかっている. その結果, 私たちは nobiletin の抗 AD 作用を示す実験的証左を得ることに成功した.⁵⁾ すなわち, APP Tg マウスにおいて, 海馬依存的な学習・記憶能力を評価する恐怖条件付け試験によって, nobiletin が $A\beta$ 誘発性記憶障害を改善することが明らかになった [Fig. 2(A)]. また, 抗 $A\beta$ 抗体を用いた免疫組織化学的解析から, nobiletin の投与により, 海馬における $A\beta$ の沈着が約 50% 減少することが判明した [Fig. 2(B)].⁵⁾ この免疫組織化学的解析の結果と一致して, エンザイムイムノアッセイ法で測定し



山國 徹

東北大学大学院薬学研究科薬物療法学分野, 准教授, 医学博士. 1985 年新潟大学大学院医学研究科博士課程修了, 医学博士, 同脳研究所神経薬理学部門研究生, '86 年三菱化成 (現三菱化学) 生命科学研究所研究員, '87 年同副主任研究員, '94 年同主任研究員, '98 年同グループリーダー, '01 年より現職. 研究テーマ: 抗認知症天然薬物の探索及びそのアルツハイマー病の根本治療薬開発への応用, 新規 Notch リガンド発現制御因子を利用した中枢神経変性疾患の新規治療法の開発, 漢方薬の薬効の科学的証明. 趣味: 読書, ウォーキング.

た APP Tg マウスの脳内不溶性 $A\beta_{1-40}$ 量は, nobiletin の処置により約 60% 減少し, 不溶性 $A\beta_{1-42}$ 量は約 50% 減少した ($p < 0.05$; $n = 8-9$).⁵⁾ これらの APP Tg マウスを用いた nobiletin の薬効評価試験の結果から, nobiletin は, APP Tg マウスにおいて抗 AD 作用を有すると結論した.

3. 海馬スライスを用いた nobiletin の作用メカニズムの解析

それでは, nobiletin はどのような分子メカニズムで記憶障害を改善するのであろうか. 海馬グルタミン酸シナプスにおける神経伝達の長期増強 (LTP) は, 学習及び記憶形成の細胞機構と考えられ, シナプス可塑性と関連した電気生理学的現象である. そこで, 海馬スライスを用いて海馬グルタミン酸シナプス伝達への nobiletin の作用を検討したところ, 本天然薬物が LTP 誘導活性を持つことがわかった.⁹⁾ また, nobiletin で海馬スライスを処置すると, LTP の初期過程で観察される PKA substrate 及び AMPA 受容体サブユニット GluR1 の Ser 845 のリン酸化の亢進が認められた (Fig. 3).⁹⁾ これらの所見は本天然薬物が LTP の発生に係わるシグナル伝達を促進する活性を有することを示す.

4. 培養海馬ニューロンを用いた nobiletin の作用メカニズムの解析

ついで, 初代培養ラット海馬神経細胞を用いて, LTP の発生に係わるシグナル伝達に対する nobile-

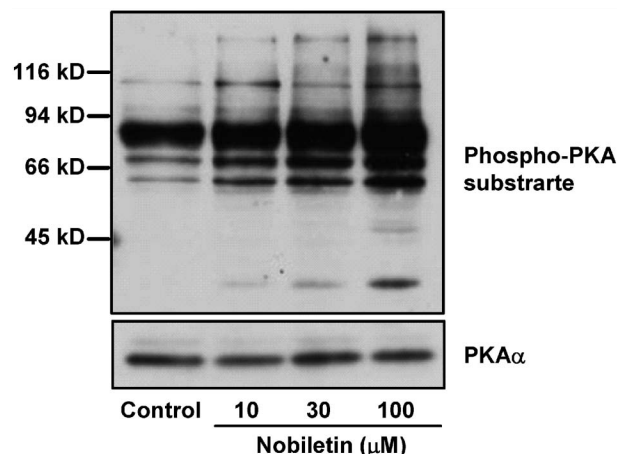


Fig. 3. Nobiletin Stimulates PKA Substrates Phosphorylation in the CA1 Region of Hippocampal Slices

Following incubation of the hippocampal slices with vehicle and nobiletin, the CA1 region was cut out and collected to prepare the extracts and subject to Western blot analysis with anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibody. Similar results were obtained from at least three independent experiments.

tin の作用を検討した. Nobiletin は海馬スライスと同様に培養海馬ニューロンにおいても, PKA substrate, CREB 及び GluR1 の Ser 845 のリン酸化を亢進させた.^{9,10)}

近年, 可溶性 $A\beta$ による神経細胞死を伴わないシナプス可塑性障害が, AD における記憶障害の原因の一つとなる可能性が報告された.¹¹⁾ そこで, 私たちは, 初代培養ラット海馬神経細胞における PKA substrate 及び GluR1 の Ser 845 のリン酸化に及ぼす $A\beta$ の影響を検討した. その結果, 神経細胞死を惹起しない濃度, すなわち $5 \mu\text{M}$ の $A\beta_{1-42}$ は, グルタミン酸誘発性の PKA substrate 及び CREB のリン酸化の亢進を抑制した.³⁾ 同様に, $5 \mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$ による処置はグルタミン酸による GluR1 の Ser 845 のリン酸化の上昇及び GluR1 の細胞膜への移行を減弱させた (未発表データ). 一方, nobiletin で培養ラット海馬神経細胞を前処置すると, 同一濃度の $A\beta_{1-42}$ によるグルタミン酸誘発性の PKA substrate 及び CREB のリン酸化の亢進阻害 (Fig. 4),³⁾ さらに GluR1 Ser 845 のリン酸化及びその細胞膜への移行阻害 (未発表データ) を濃度依存的に抑制した.

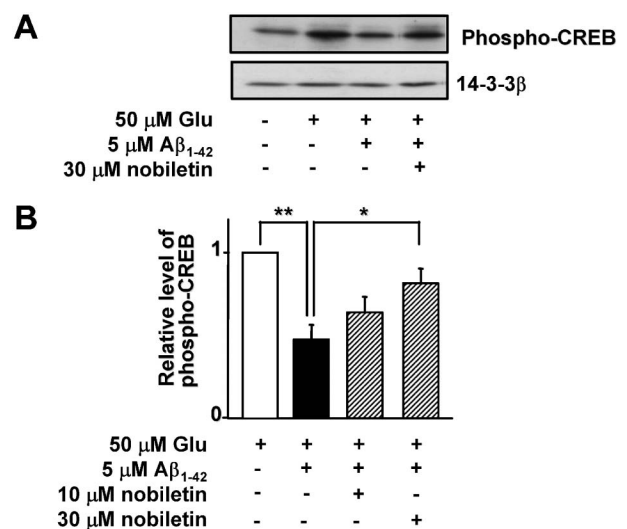


Fig. 4. Nobiletin Reverses $A\beta$ -inhibition of Glutamate-induced Increase in CREB Phosphorylation by a Sublethal Concentration

(A) The levels of phosphorylated CREB (phospho-CREB) in hippocampal neurons were examined by Western blot analysis with anti-phospho-CREB antibody. Blots were then stripped and reprobed with anti-14-3-3 β antibody to verify that equal amount of protein was present in each lane. (B) Quantitative analysis of the levels of phospho-CREB in cultured neurons treated with glutamate or glutamate plus $A\beta$ in the absence and presence of nobiletin. * $p < 0.05$ vs. treatment with glutamate in the presence of $A\beta$; ** $p < 0.01$ vs. treatment with glutamate alone. Data are the means \pm S.E.M. ($n = 3-4$).

以上の実験結果は、APP Tg マウスにおいて nobiletin が、 $A\beta$ による LTP の発生に重要なシグナル伝達阻害に対して拮抗的に作用し、記憶障害を改善する可能性が示唆する。

5. おわりに

温州みかんの乾燥果皮である陳皮は古来漢方薬として活用され、nobiletin を含有する。本稿で述べた nobiletin の抗 AD 作用を主たる薬効基盤とする陳皮による AD の漢方治療法は、副作用の少ない、安心・安全な AD の新しい原因療法として有望である。これまでに私たちは、nobiletin を含有する陳皮エキスの経口投与が認知症モデル動物の記憶障害を改善することを明らかにしている（論文投稿準備中）。これらの知見に基づいて、現在私たちは小太郎漢方製薬㈱と共同で、近畿大学東洋医学研究所、東北大学病院及びその関連病院において、陳皮による AD の漢方治療の臨床研究を推進しており、その研究成果が期待される。

本総説に記載の動物実験は NIH の「実験動物の管理と使用に関する指針」遵守の下、東北大学の動物実験委員会の承認を受けて行われた。

謝辞 本稿で述べた nobiletin に関する研究は、東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野（現在、薬物療法学分野）において、主として大学院生の松崎健太郎氏、4年生の小野塚寛氏によって行われたものである。また、東北大学辛 龍雲博士、八尾 寛東北大学教授、福永浩司東北大学教授、紫藤 治島根大学教授、橋本道男島根大学准教授、只野 武東北薬科大学教授、指田 豊東京薬科大学名誉教授、三巻祥浩東京薬科大学教授との共同研究によって推進された。ここに甚大なる謝意を表します。なお、本研究の結果は、一部厚生労働省長寿医療委託費（17公-1）による研究成果である。また財団法人武田科学財団より研究助成を頂いた。

REFERENCES

1) Hardy J., Selkoe D. J., *Science*, **297**, 353–356 (2002).

- 2) Nagase H., Omae N., Omori A., Nakagawasai O., Tadano T., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**, 1330–1336 (2005).
- 3) Matsuzaki K., Yamakuni T., Hashimoto M., Haque A. M., Shido O., Mimaki Y., Sashida Y., Ohizumi Y., *Neurosci. Lett.*, **400**, 230–234 (2006).
- 4) Nakajima A., Yamakuni T., Matsuzaki K., Nakata N., Onozuka H., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Ohizumi Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **321**, 784–790 (2007).
- 5) Onozuka H., Nakajima A., Matsuzaki K., Shin R.-W., Ogino K., Saigusa D., Tetsu N., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **326**, 739–744 (2008).
- 6) Nakajima A., Yamakuni T., Haraguchi M., Omae N., Song S.-Y., Kato C., Tadano T., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Ohizumi Y., *J. Pharmacol. Sci.*, **105**, 122–126 (2007).
- 7) Yamamoto Y., Shioda N., Han F., Moriguchi S., Nakajima A., Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., Fukunaga K., *Brain Res.*, **1295**, 218–229 (2009).
- 8) Shin R.-W., Ogino K., Shimabuku A., Taki T., Nakashima H., Ishihara T., Kitamoto T., *Acta Neuropathol.*, **113**, 627–636 (2007).
- 9) Matsuzaki K., Miyazaki K., Sakai S., Yawo H., Nakata N., Moriguchi S., Fukunaga K., Yokosuka A., Sashida Y., Mimaki Y., Yamakuni T., Ohizumi Y., *Eur. J. Pharmacol.*, **578**, 194–200 (2008).
- 10) Nagase H., Yamakuni T., Matsuzaki K., Maruyama Y., Kasahara J., Fukunaga K., Hinohara Y., Kondo S., Mimaki Y., Sashida Y., Tank A. W., Ohizumi Y., *Biochemistry*, **44**, 13683–13691 (2005).
- 11) Vitolo O. V., Sant'Angelo A., Costanzo V., Battaglia F., Arancio O., Shelanski M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 13217–13221 (2002).