陳皮の抗認知症成分 nobiletin の薬理作用とその機能性食品開発への応用

山國 徹¹⁾, 中島 晶¹⁾, 大泉 康^{2),3),4)}

要約: 私たちはアルツハイマー病 (AD) の新しい予防法および原因療法の開発を目指して, 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, 新しい抗認知症作用を有する天然薬物として, 生薬陳皮 (AURANTII NOBILIS PERICARPIUM) に含まれる, 分子量 402.39 のポリメトキシフラボン, nobiletin を発見することに成功した。Nobiletin は, AD の原因物質の A β を脳室内に注入した急性 AD モデルラットにおいて記憶障害改善作用を示し, A β ₁₋₄₀ および A β ₁₋₄₂ を過剰発現する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) において脳内の A β の蓄積を抑制し, A β 誘発性記憶障害を改善させた。また, 本天然薬物は, 中枢コリン作動性神経の変性を伴う嗅球摘出誘発性記憶障害モデルマウスの神経変性を抑制し, 記憶障害を改善する作用を示した。さらに, N-methyl-D-aspartate 受容体遮断薬 (MK-801) 誘発性記憶・学習障害マウスにおいて, 海馬での ERK の活性化により, MK-801 誘発性記憶・学習障害を改善した。他方, 培養ラット海馬ニューロンを用いて nobiletin の記憶障害改善作用のメカニズムを解析した結果, nobiletin が, 培養海馬ニューロンにおいて, AMPA 受容体の細胞膜への移行や PKA/ERK/CREB シグナル伝達を促進し, また A β によるグルタミン酸誘発性 PKA/CREB シグナル伝達の阻害を抑制することが明らかとなった。このようなユニークな薬理作用を有する nobiletin は, 種々の食用柑橘類果実に含まれており, それを応用した機能性食品の開発が可能になれば, AD などの認知症の予防・改善に有効な代替療法が確立できると期待される。

1. はじめに

我が国は, 急速な高齢化社会を迎えて, 認知症などの中枢変性疾患の罹患率は増加の一途をたどり, 認知症高齢者人口は 2020 年には 300 万人を超える勢いである。このような状況から, アルツハイマー病 (AD) 等の認知症の克服が重要な国家的課題となり, これらの予防法および原因療法の開発が待望されている。しかしながら, AD の症例報告 (1) からすでに一世紀が経過した現在, 未だ AD の根本治療薬は開発されていない。2007 年のライフサイエンス財団の調査では, 我が国の医療の重要課題のトップに, 「人類の最大の課題アルツハイマー病の進行阻止法, 改善可能な治療法の開発」がランキングされている。

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, その発症メカニズムの解明研究により, その原因としてアミロイド β ペプチド (A β) の重合・蓄積による神経変性が考えられている (2)。つまり, AD の発症メカニズムの中心には A β の重合・蓄積と毒性発現があることが分かってきた。そ

図 1 Nobiletin の化学構造

キーワード: nobiletin, 陳皮, アミロイド β ペプチド, アルツハイマー病, 抗認知症作用

¹⁾ 東北大学 大学院薬学研究科 薬物療法学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉)

²⁾ 横浜薬科大学 漢方薬学科 (〒245-0066 横浜市戸塚区俣野町 60)

³⁾ 東北大学 大学院工学研究科 超臨界溶媒工学研究センター (〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6)

⁴⁾ 静岡県立大学 大学院薬学研究科 薬物動態学分野 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

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

原稿受領日: 2008 年 6 月 11 日, 依頼原稿

Title: Pharmacological action of nobiletin, a component of AURANTII NOBILIS PERICARPIUM with anti-dementia activity, and its application for development of functional foods. Author: Tohru Yamakuni, Akira Nakajima, Yasushi Ohizumi

こで、私たちはADの新しい予防法および原因療法の開発を目指して、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、生薬陳皮に含まれるポリメトキシフラボン、ノビレチン（以下、nobiletinと記す；図1）が、1）記憶障害改善作用、2）脳コリン作動性神経の変性抑制作用、3）脳内でのA β の蓄積抑制作用、4）A β 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。柑橘類の果皮である陳皮は、古来漢方薬としてまた食品にも活用されてきたので、この研究成果は、ADの予防薬・治療薬の開発だけではなく、漢方薬への応用や機能性食品の開発の道を拓くものと期待される。本稿では、様々な記憶障害モデル動物を用いて証明したnobiletinの抗認知症作用に関する私たちの最新の知見を紹介し、併せてADなどの認知症を予防するための柑橘類の果皮の機能性食品開発への応用について考察する。

2. A β を脳室内に注入した急性アルツハイマー病態モデルラットにおけるnobiletinの記憶障害改善作用

ラット脳室内に可溶性A β_{1-40} を持続的に注入すると、記憶障害が誘発される(3)。この急性AD病態モデル動物を用いて、A β 誘発性記憶（空間認知機能）障害に対するnobiletinの効果を8方向放射状迷路課題により検討した。Nobiletin(10 mg/kg または 50 mg/kg, i.p.)をA β の2週間連続注入前後に各々7日間ずつ（計2週間）投与し、1日2試行の8方向放射状迷路課題を行った。その結果、A β の脳室内注入による参照記憶エラーおよび作業記憶エラーの上昇が観察されたが、対照的に、nobiletin(50 mg/kg)の投与は、このA β 誘発性参照記憶エラーおよび作業記憶エラーの上昇を顕著に抑制した。さらに、nobiletin(10 mg/kg)の投与によってA β 誘発性参照記憶エラーの上昇は有意に抑制されることが分かった。すなわち、nobiletinがA β 誘発性記憶障害を改善することが明らかとなった(4)。

3. 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におけるnobiletinの記憶障害改善作用およびA β 蓄積抑制作用

さらに、急性AD病態モデル動物で得られたnobiletinのA β 誘発性記憶障害改善効果について、慢性AD病態モデル動物、すなわちA β_{1-40} およびA β_{1-42} を過剰発現するAD病態モデルマウスである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）(5)を用いて検証した。本APP Tgマウスにおいて、A β の蓄積がわずかしき起こっていない9カ月齢より、nobiletin(10 or 50 mg/kg, i.p.)の投与を開始して、4カ月間、1日1回ずつ投与を続けた。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分かっている(5)。その結果は非常に興味深く、nobiletinの抗AD作用を裏付けるものであった。すなわち、ELISA法により測定したAPP Tgマウスの脳内不溶性A β_{1-40} 量は、nobiletin(10 mg/kg)の投与により約60%減少し、不溶性A β_{1-42} 量は約50%減少した（ $P < 0.05$ ； $n = 8-9$ ）。また、抗A β 抗体を用いた免疫組織化学的解析により、A β の沈着はnobiletinの処置により約50%程度減少していた（ $P < 0.05$ ； $n = 8-9$ ）。さらに、このようなnobiletinの長期投与は、APP Tgマウスにおいて用量依存的にA β 誘発性記憶障害を改善することが分かった(6)。これらの所見は、nobiletinが脳内A β の蓄積に対しては予防効果を示し、A β 誘発性記憶障害に対しては治療効果を有することを示唆するものである。

4. 中枢コリン作動性神経の変性を伴う嗅球摘出誘発性記憶障害モデルマウスにおけるnobiletinの記憶障害改善作用およびコリン作動性神経変性抑制作用

ADにおいては、中枢コリン作動性神経の顕著な変性・脱落が、病理学的特徴として観察される(7)ことから、次に中枢コリン作動性神経の変性を伴う嗅球摘出誘発性記憶障害モデルマウスで、nobiletinの薬効を検討した。記憶障害が認められる嗅球摘出後3日目から11日間nobiletin(50 mg/kg, i.p. or p.o.)を投与すると、受動回避試験およびY字型迷路においてnobiletinは反応潜時時間と自発交替率を増加させた(8)。すなわち、nobiletinが嗅球摘出誘発性記憶障害を改善することが分かった。さらに、アセチルコリンエステラーゼの活性染色によるコリン作動性神経の組織学的解析を行ったところ、海馬では、嗅球摘出によって誘発されるコリン作動性神経線維の明らかな減少、すなわちコリン作動性神経の変性が観察された。一方、嗅球摘出後3日目から11日間nobiletinを投与した動物では、このようなコリン作動性神経の変性は抑制されることが判明した(9)。これらの組織学的解析の結果から、nobiletinによる嗅球摘出誘発性記憶障害改善作用のメカニズムとして、海馬におけるコリン作動性神経の変性抑制、または神経線維の再生を伴うコリン作動性神経回路の機能的再構築が示唆された。

5. NMDA 受容体遮断薬 (MK-801) 誘発性記憶・学習障害モデル動物における nobiletin の記憶障害改善作用

A β は、学習・記憶に重要である NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 受容体の機能を低下させることから(10), MK-801 誘発性記憶・学習障害動物は、AD の病態の素過程のモデルとして考えられる。そこで、このマウスを実験系として用いて、MK-801 誘発性記憶・学習障害に対する nobiletin の効果の検討を行った。恐怖条件付け試験において nobiletin(10 mg/kg または 50 mg/kg, i.p.) を 1 週間連続投与することにより、MK-801 により誘発される記憶障害を 40-70% 程度改善した(11)。同様に、受動的回避試験において、nobiletin(50 mg/kg, i.p.) を 1 週間連続投与することにより、MK-801 により誘発される記憶障害を 90% 程度改善した(11)。また、受動的回避試験訓練直後のマウスの海馬において、ERK1/2 のリン酸化は 50% 程度上昇していた(11)。この訓練による ERK1/2 の活性化は記憶形成に重要であり(12, 13)、事実 MK-801 処置群

では ERK1/2 のリン酸化の上昇の抑制が観察された。一方、nobiletin を 1 週間連続投与した群においては、この MK-801 による ERK1/2 のリン酸化の上昇の抑制は改善されていた。これらの結果から、nobiletin は、海馬での ERK の活性化を介して、MK-801 誘発性記憶・学習障害を改善することが示された(11)(図 2)。

6. 培養海馬ニューロンにおける nobiletin の A β 誘発性シグナル伝達障害に対する抑制効果

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、学習および記憶形成の細胞機構の一つと考えられ、シナプス可塑性の代表的な例である。近年、脳内における A β の蓄積に起因する神経の変性・脱落に加えて、可溶性 A β による神経細胞死を伴わないシナプス可塑性障害は、AD における記憶障害の原因の一つと考えられている(14)。その分子レベルでのメカニズム解析により、A β は PKA/CREB シグナル伝達を阻害して、この LTP の発生を抑制することが報告された(15)。私たちは、最近、培養ラット海馬ニューロンにおいて、nobiletin が LTP の分子基盤とされる AMPA 受容体の細胞膜への移行や PKA 基質タンパク質と CREB のリン酸化を濃度依存的に促進すること、さらに海馬スライスで LTP の発生を誘導することを見出した(4, 16, 17)。また、この天然薬物が、神経細胞死を惹起しない濃度(5 μ M) の可溶性 A β_{1-40} あるいは A β_{1-42} によるグルタミン酸誘発性 PKA/CREB シグナル伝達の阻害を濃度依存的に抑制することを明らかにした(4)(図 3)。したがって、本稿で紹介した nobiletin による A β 誘発性のシグナル伝達障害の抑制は、少なくとも一部は、AD 病態モデル動物における本天然薬物の記憶障害改善作用の分子メカニズムとなっていると考えられる。

7. 認知症を予防するための柑橘類の果皮の機能性食品開発への応用

近年、国民の健康志向の高まりから健康食品のニーズが増加し、その結果健康食品関連企業の発展もめざましく、年間 1 兆円を超える巨大産業に成長しつつある。

温州みかん等の柑橘類果皮中の nobiletin の含有量は、品種により、また収穫時期により大きく変動することが報告されている(18)。我が国において、温州みかんは柑橘類の中で最も大量に生産されていることから、現在、私たちは、超臨界溶媒工学の先端技術を利用して、未利用バイオマスの温州みかんの果皮から nobiletin を抽出するための安全で効率的な大量抽出技術の開発研究を進めている。みかんの加工工場から

図 2 MK-801 誘発性記憶・学習障害に対する nobiletin の改善効果

A: Nobiletin の受動的回避試験における MK-801 誘発性記憶・学習障害に対する改善作用; B: 受動的回避試験訓練直後の ERK リン酸化に対する nobiletin の改善作用。Nobiletin (50 mg/kg, 6 or 7 days, i.p.) 処置後、受動的回避試験により記憶・学習障害改善効果を検討した。また、訓練直後の海馬における ERK リン酸化をウェスタンブロット法により検出した。** $P < 0.01$ vs Control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs MK-801 ($n = 8-12$); ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. (文献 11 より改変)

図3 培養海馬ニューロンにおけるAβによるグルタミン酸誘導性のPKA基質タンパク質(A)およびCREB(B)のリン酸化促進阻害に対するnobiletinの濃度依存的な拮抗作用
A: 代表的なウェスタンブロット分析結果; B: リン酸化CREBの定量的解析。培養7日目の海馬ニューロンをnobiletinで1時間処置後、5 μM Aβ₁₋₄₂で3時間処置し、ついで50 μM グルタミン酸で15分間処置した。その後、細胞抽出液を調製し、抗リン酸化CREB抗体を用いてウェスタンブロット法により検出した。また、インターナルコントロールとして14-3-3βを用いた。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 4$); Student's t -test. (文献4より改変)

出る加工残渣やみかんの生産の現場から出る摘果みかんなどは、実用化のため有望な大規模未利用バイオマスと考えられる。これらの未利用バイオマスに含まれるnobiletinを活用し、安価で安全な機能性食品の開発に成功すれば、ADなどの認知症を予防・改善することが可能となると期待される。

8. おわりに

本稿では、陳皮の有効成分nobiletinの抗認知症作用とそのメカニズムについて紹介した。また、nobiletinを利用した機能性食品の有用性について述べた。このmulti-functionalな薬効を示すnobiletinのターゲット分子を探索・同定することは、そのユニークな薬理作用メカニズムの解明に不可欠である。現在、私たちは、その探索・同定のための研究を推進して、薬理作用メカニズムの全貌解明を目指している。さらに、動物実験により、陳皮エキスの経口投与は、認知症モ

デル動物の記憶障害を改善することが明らかとなった(論文投稿準備中)。これらの結果を踏まえて、私たちは、小太郎漢方製薬株式会社と共同で、近畿大学東洋医学研究所、東北大学病院およ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開始した。この陳皮による治療は、ADなどの認知症の新しい原因療法として有望であると考えられる。

他方、昨今の健康食品ブームの陰に、それによる健康被害もマスコミをしばしば賑わしており、多くの国民に不安感・不信感を与えている。したがって、健康食品に関する健康維持・回復の効果とその安全性についての科学研究が極めて重要であると考えられる。食品の成分を科学的に明らかにしていくマテリアルサイエンスを重視することは勿論のこと、薬理学的視点に立って、食品に関する基礎と臨床を統合した研究を推進し、新しい学問分野を構築することが今後の最重要課題である。Nobiletinを応用した機能性食品の開発には、食品としての安全性の確保とその薬効評価、体内動態研究が必須である。

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、大前直樹氏、4年生の小野塚寛氏によって行われたものである。また、紫藤治島根大学教授および橋本道男島根大学准教授、只野武東北薬科大学教授、八尾寛東北大学教授、福永浩司東北大学教授、宋時榮徳島文理大学教授、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。

文 献

- 1) Alzheimer A. *Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* 1907;64:145-148.
- 2) Hardy J, et al. *Science.* 2002;297:353-356.
- 3) Nitta A, et al. *Neurosci Lett.* 1994;17:63-66.
- 4) Matsuzaki K, et al. *Neurosci Lett.* 2006;400:230-234.
- 5) Shin R-W, et al. *Acta Neuropath.* 2007;113:627-636.
- 6) Onozuka H, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* in press.
- 7) Kasa P, et al. *Prog Neurobiol.* 1997;52:511-535.
- 8) Nagase H, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337:1330-1336.
- 9) Nakajima A, et al. *J Pharmacol Sci.* 2007;105:122-126.
- 10) Mishizen-Eberz AJ, et al. *Neurobiol Dis.* 2004;15:80-92.
- 11) Nakajima A, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:784-790.
- 12) Alonso M, et al. *Neurobiol Learn Mem.* 2002;77:119-124.
- 13) Cammarota M, et al. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76:36-46.
- 14) Haass C, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:101-112.
- 15) Vitolo OV, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:13217-13221.
- 16) Matsuzaki K, et al. *Eur J Pharmacol.* 2008;578:194-200.
- 17) Nagase H, et al. *Biochemistry.* 2005;44:13683-13691.
- 18) Nogata Y, et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:178-192.

著者プロフィール

山國 徹（やまくに とおる）

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）生命科学研究科研究員，'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およびその創薬への応用，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。

中島 晶（なかじま あきら）

東北大学 大学院薬学研究科 薬物療法学分野，助教，博士（医学）。

◇1997年名古屋大学工学部卒業，'99年名古屋大学大学院工学研究科修士課程修了，'03年名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了，'03年米国シカゴ大学神経精神科学分野リサーチアソシエイト，'05年東北大学大学院薬学研究科助手，'07年同助教。

◇研究テーマ：認知症病態モデル動物における天然化合物の薬効解析。◇趣味：パドミントン，音楽鑑賞，読書。

大泉 康（おおいずみ やすし）

横浜薬科大学教授，東北大学名誉教授，同大学院工学研究科客員教授，静岡県立大学大学院薬学研究科客員教授，薬学博士。

◇1972年東北大学大学院薬学研究科博士課程修了，薬学博士，'73年東北大学薬学部助手，'77年米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学部ポストドクトラルフェロー，'78年東北大学薬学部講師，三菱化成（現三菱化学）生命科学研究科副主任研究員，'80年同主任研究員，'88年同筋細胞生理学研究室室長，'90年東北大学薬学部教授，'99年同大学院薬学研究科教授（配置換え），'06年より現職。

◇研究テーマ：アルツハイマー病などの難治性神経疾患の予防・根本治療法の開発。◇趣味：クラシック音楽，茶道。