N 陳皮はノビレチン単体の薬効を凌駕！ ノビレチン高含有陳皮(N 陳皮)の 抗認知症作用と薬理学的優位性

山國 徹, 川畑伊知郎

要約：超高齢化社会を迎えた我が国の高齢者認知症の人口は今や約 462 万人に上るともいわれ、認知症の克服は喫緊の国家的課題となっている。著者らはアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) の克服のため、初期の AD の分子的病態に注目してその進行を阻止する活性をもつ天然薬物の探索研究および薬理研究を進めてきた。本稿では AD において臨床研究の取り組みがなされているノビレチン高含有陳皮 (N 陳皮) の抗認知症作用についてその薬理学的解析結果を解説し、ノビレチン単体に対する「N 陳皮の優位性」に関するエビデンスを紹介する。また、認知症の周辺症状の漢方治療薬抑肝散加陳皮半夏について、N 陳皮配合処方エキスの抗認知症作用の特徴を簡潔に解説する。本総説では生薬や漢方処方の抗認知症作用に関する薬理学データに基づいてこれらの薬剤のもつ「多成分系薬剤の優位性」を考察したい。

1. はじめに

認知症の最大の原因疾患であるアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) の増加は我が国にとどまらず、世界的な規模で加速する勢いである。2050 年までに世界の AD 患者人口は 1 億人に達するとの推計データもある (1)。このような状況から AD の進行を阻止する革新的な治療薬の上市が待望されている。しかし、2002 年以降 2012 年までに 244 種類の治療薬候補物質について、第 I 相試験から第 III 相試験を含む 413 件の臨床試験が実施され、その半数以上がアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) をターゲットとする低分子化合物の疾患修飾薬 (disease-modifying drug) や免疫療法の疾患修飾薬であったにもかかわらず、治療薬として承認されたのは症候改善薬 (symptomatic therapeutic

drug) のメマンチン (memantine) 唯一つであった (1)。このように現状では、単一物質薬、単一成分薬を基本とする AD の進行を阻止する疾患修飾薬の開発は苦戦を強いられている。その背景には、我々人類が、 $A\beta$ が AD の原因物質であることは知り得ても、AD の病態やその発症メカニズムについて未だ全容を知り尽くしていない現実がある。

それでは、現在知り得る科学的な知見を基盤にした画期的な疾患修飾薬の開発に繋がるアプローチとはなにか? 「病気は早期治療が重要」といわれる。AD においてもそれは例外であるまい。AD の初期に異常が認められるのは脳のどの部位か? AD 患者の脳の Braak 夫妻による病理学的研究がその答えを提示してくれる (2)。最初に嗅内野皮質に、ついで海馬に神経原線維変化が認められ、大脳皮質領域へ拡大していく。すなわち、まず側頭葉内側に病変が認められ、その後大脳新皮質へと拡大していく経過を辿る。しかし、海馬に老人斑が検出されるのは認知機能も極度に悪化した AD の病態の最後のステージである (2)。これは老人斑が神経原線維変化の出現に先行して現れるのとは逆の順番であり、一見奇妙に思われる。近年、AD の有力な病因論として $A\beta$ オリゴマー仮説が提唱された (3)。AD の原因は老人斑の形成ではなく、可溶性の $A\beta$ オリゴマー分子とするものである。これまでのところサイズや形状の異なる $A\beta$ オリゴマーの存在が報告されているが、その仮説を裏付けるように、 $A\beta$ オリゴマーの AD 患者脳での存在が明らかにされている (4)。しかも、AD 患者脳から調製した $A\beta$ オリゴマー (ダイマー) による海馬グルタミン酸神経回路での長期増強現象 (LTP) の抑制 (5)、海馬神経培養系における合成ヒト $A\beta$ から調製されたオリゴマー・ダイマーによるタウ

キーワード: N 陳皮, 多成分系薬剤, シネンセチン, 抗認知症作用, アルツハイマー病
東北大学大学院 薬学研究科 薬理学分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)
E-mail: yamakuni@m.tohoku.ac.jp 原稿受領日: 2015 年 2 月 7 日, 依頼原稿

Title: Pharmacological superiority of nobiletin-rich *Citrus reticulata* peel, a multicomponent drug, over nobiletin alone regarding anti-dementia action Author: Tohru Yamakuni, Ichiro Kawahata

の異常リン酸化の誘導(6)が報告された。さらには、脳内に老人斑の形成が認められないヒト APP 遺伝子変異のケースで、A β オリゴマーが認められる Osaka 変異 (E693A 変異) (7) が発見された。この E693A 変異型 APP トランスジェニックマウス個体では海馬や大脳皮質の神経細胞内に A β オリゴマーが認められ、シナプスの消失、海馬 LTP の抑制、記憶障害の他、顕著なタウの異常リン酸化等が報告された(8)。さらに、この系統とヒト野生型タウトランスジェニックマウス (tau264) との交配により作出したダブルトランスジェニックマウスにおいては、E693A 変異型 APP トランスジェニックマウスの表現型に加えて記憶障害の亢進や神経原線維変化の出現も認められた(9)。これらの遺伝子改変動物から得られた知見は、先に述べた初期 AD の嗅内野皮質や海馬で観察される神経原線維変化の出現における A β オリゴマーの重要な役割を示唆するものであり、注目に値する。

A β オリゴマーは海馬においてシナプス後膜に局在する NMDA 受容体の機能低下を招くことが知られている(10, 11)。この NMDA 受容体の機能低下は下流の細胞内シグナル伝達の滞り、さらには核内で見られる、短期記憶から長期記憶への変換に必須な CRE 依存的転写活性の低下を招く(12-16)。つまり、A β オリゴマーが誘導する分子イベントは、記憶障害と直結する初期 AD で観察される特筆すべき分子的病態と理解できる。したがって、A β オリゴマーによる海馬神経回路の機能調節異常からの回復、A β オリゴマーの分解促進 (A β オリゴマーの蓄積抑制) は、AD の進行阻止と予防に直結する有望な手段になると考えられる。それ故に、著者らは、AD の初期の病態としての NMDA 受容体の機能低下やその下流の CREB のリン酸化、CRE 依存的転写活性の抑制に着目し、これらの細胞内の分子イベントの調節異常を改善する天然薬物の探索研究を進めてきた。

2. 生薬 N 陳皮の多成分系薬剤としての薬理的優位性—なぜ N 陳皮はノビレチン単体より抗認知症活性が強いのか—

著者らの探索研究で最初にヒットした天然薬物はポリメトキシフラボン類化合物ノビレチン (nobiletin) である。低分子化合物で分子量は 402.39 であり、高脂溶性の物性を示す。ノビレチンはカンキツ類の中のカンキツ (*Citrus*) 属に特徴的な天然薬物であり、キンカン (*Fortunella*) 属、カラタチ (*Poncirus*) 属には存在しない(17)。そのため、東京薬科大学薬学部の指田豊博士、三巻祥浩博士の両博士と共同でノビレチン高

含有カンキツ属のシイクワシャー (*C. depressa*) の果皮からノビレチンを精製し、薬理活性評価に用いた。その結果、種々の認知症モデル動物で抗認知症作用が認められた。スペースの制約上、詳細は拙著(18)に譲り、ここでは簡潔に説明したい。著者らは NMDA 受容体遮断薬 MK801 誘発性記憶障害モデルマウスや A β を脳室内に注入した急性 AD 病態モデルラットを用いてノビレチンの記憶障害抑制作用を、そして海馬神経細胞培養系で A β によるグルタミン酸誘発性の CREB のリン酸化と CRE 依存的転写の上昇の抑制に対するノビレチンの脱抑制作用を見出した(19, 20)。さら、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) で抗認知症作用の検証実験を進めた。9 ヶ月齢の動物に、4 ヶ月間ノビレチン (10 mg/kg) を腹腔内投与した結果、海馬依存的な学習・記憶機能を評価できる恐怖条件付け試験においてノビレチンの A β 誘発性記憶障害抑制作用が認められ、また抗 A β 抗体を用いた免疫組織化学的解析および ELISA 法により、海馬におけるノビレチンの抗アミロイドーシス作用を確認した(21)。

つぎに上記の動物実験の結果を踏まえて、著者らはこのノビレチンの薬効を活かすべく新たな探索研究に取り組んだ。注目したのはノビレチン高含有陳皮 (以下 N 陳皮と記す) である。何故なら、陳皮は基原植物をカンキツ属のウンシュウミカン (*C. unshiu*) または *C. reticulata* とする生薬であり、多数の市場流通品が入手可能であると考えたからである。小太郎漢方製薬(株)と共同で、実際に市場流通品の陳皮を調べてみると、実はそのほとんどがノビレチン低含有陳皮であった。しかも、ノビレチン低含有陳皮である通常の陳皮エキスには海馬神経細胞培養系では有意な CRE 依存的転写促進活性は見られなかった(22)。4, 5 年を要して、流通品 250 種余りの中からわずか (数種) ではあるが、N 陳皮を選別することに成功した(22)。海馬神経細胞培養系で N 陳皮エキス (熱水抽出エキス) の CRE 依存的転写促進活性を、ノビレチンをポジティブコントロールとして測定すると、不思議な現象が観察された。それは、300 μ g/mL の N 陳皮エキスで処置したとき、この処置濃度のエキスにはノビレチンは 5 μ M しか含まれないにもかかわらず、その CRE 依存的転写促進活性は 30 μ M のノビレチン単体の活性より 2 倍強いという事実である (図 1A)。しかも、その転写促進活性は、ノビレチンの活性と同様に PKA と ERK 依存的な性質を示した (図 1B, C) (22)。この現象は、N 陳皮エキスにおける CRE 依存的転写活性を促進するノビレチン以外の物質の存在を意味するものと判断して、そ

図1 培養海馬神経細胞におけるN陳皮エキスによるCRE依存的転写およびPKA/ERK依存的シグナリングの促進
(A) N陳皮エキスのPKAおよびERK依存的なCRE依存的転写促進活性。N陳皮: 300 μ g/ml N陳皮; H-89: 10 μ M H-89 (PKA阻害薬); U0126: 10 μ M U0126 (MEK阻害薬)。Means $\pm$ S.E.M. (n=4). *** P <0.001 vs. control, ### P <0.001 vs. vehicle. (B) N陳皮エキスによるPKA基質タンパク質およびERKのリン酸化レベルの上昇(左)。グラフはウエスタンブロット分析で検出されたリン酸化ERKレベルの定量解析データ(右)。One-way ANOVA, followed by the Student-Neumann-Keuls test. (文献22より改変)

の活性本体の探索・同定に着手した。図2Aに示す方法でN陳皮エキスを分画し、ポリメトキシフラボノイド画分(Fr.2)から調製した非ノビレチン画分(Fr.2-2)に、ノビレチン画分(Fr.2-1)と同様にCRE依存的転

図2 培養海馬神経細胞におけるN陳皮エキスおよび各画分のCRE依存的転写促進活性
(A) N陳皮エキスの分画方法。(B) N陳皮エキスの各画分のCRE依存的転写促進活性。Means $\pm$ S.E.M. (n=4). ** P <0.01, *** P <0.001 vs. control. One-way ANOVA, followed by the Student-Neumann-Keuls test. C: コントロール, NC1: N陳皮エキス, REC: 再構成サンプル. (文献22より改変)

写促進活性が検出された。さらに、非ノビレチン画分の活性本体を同定するため、この画分からポリメトキシフラボノイドを単離・精製し、活性を評価した結果、その活性本体としてタンゲレチン (tangeretin), 6-デメトキシノビレチン (6-demethoxynobiletin), シネンセチン (sinensetin), 6-デメトキシタンゲレチン (6-demethoxytangeretin) の4種類の化合物が同定された(22)。また、同定された4種類の化合物の中でシネンセチンは、ノビレチンのCRE依存的転写促進活性を凌駕する特筆すべき活性を示した。しかし、果たしてこれらの化合物はどの程度N陳皮エキスの活性に貢献しているのだろうか。この疑問に答えるため、著者らはN陳皮エキス中の含有量の、精製ノビレチンとこれら4種類のポリメトキシフラボノイド化合物の精製

標品を混合して調製した再構成サンプルの CRE 依存的転写促進活性を調べた。分析の結果、その活性は N 陳皮エキスの活性にほぼ匹敵するものであった (図 2B)。すなわち、N 陳皮エキスの 4 種類の化合物が N 陳皮の CRE 依存的転写促進活性に大きく貢献していることが証明された訳である。この再構成実験の結果は、N 陳皮エキ스가示す活性は、その構成成分であるノビレチンと他の複数の CRE 依存的転写促進活性物質との協働作用の結果であることを示している (22)。つまり、この知見は、これまで生薬学や漢方医学の研究領域の先達たちが提唱し続けた「多成分系薬剤が単一成分薬剤の活性を凌駕する」というコンセプトを薬理的に支持するものであった。

著者らは、さらに N 陳皮エキスの抗認知症作用について MK801 誘発性記憶障害モデルマウスで恐怖条件付け試験により精査した。MK801 は NMDA 受容体遮断薬であり、NMDA 受容体依存的な学習・記憶の過程をブロックして学習・記憶障害を誘導する。マウスに、7 日間ノビレチン 25 mg/kg/day に相当する用量の N 陳皮エキスを経口投与し、7 日目の投与終了 1 時間後 MK801 (0.08 mg/kg) を腹腔内投与し、その 30 分後に恐怖条件付け (訓練試行) を行い、すくみ行動を観察して恐怖記憶の獲得過程における薬物の影響を分析した。さらに、24 時間後に恐怖条件付け装置に再度マウスを入れて 5 分間のすくみ行動の観察 (テスト試行) を行った。この行動観察では恐怖記憶の保持・想起の過程における薬物の影響を把握した。その結果、N 陳皮エキスの経口投与は MK801 誘発性の記憶の保持・想起障害のみならず、記憶の獲得障害も抑制した (22) (図 3)。しかも、N 陳皮エキスの記憶の獲得障害に対する抑制作用は腹腔内投与時のノビレチン単体にも認められない活性である (19)。一方、マウスに 7 日間ノビレチン 50 mg/kg/day を経口投与しても恐怖記憶の獲得障害のみならず記憶の保持・想起障害も抑制することはなかった (投稿論文準備中)。良好な脳内移行性は中枢神経疾患治療薬の必要条件である。精製ノビレチンのバイオアベイラビリティ (bioavailability) を検討したところ、経口投与で脳内移行性は認められるものの、腹腔内投与の場合の約 7 分の 1 まで低下することが判明した (23)。対照的に、N 陳皮エキスでは、経口投与条件下でノビレチンの良好な脳内移行性が認められ、その高いバイオアベイラビリティが示唆された (投稿論文準備中)。このように、N 陳皮エキスはノビレチン単体を薬理的に凌駕する抗認知症活性をもつことが明らかにされた。また、本稿で抗認知症活性について解説したエキスと同一バッチの N 陳皮に

図 3 MK801 誘発性記憶障害モデルマウスにおける N 陳皮エキスの抗認知症作用

(A) 恐怖条件付け試験における訓練試行の結果。Two-way repeated measures ANOVA. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. control; ### $P < 0.001$ vs. MK-801. (B) 恐怖条件付け 24 時間後のテスト試行の結果。One-way ANOVA, followed by the Student-Neumann-Keuls test. Means $\pm$ S.E.M. *** $P < 0.001$ vs. control, ## $P < 0.001$ vs. MK-801. ◆: コントロール群 ($n=10$), ■: MK801 投与群 ($n=11$), ▲: N 陳皮エキス + MK801 投与群 ($n=8$)。 (文献 22 より改変)

おいては、本特集号の関隆志博士の総説にも記載の通り、pilot study において 1 年間の N 陳皮煎液の服用によるアルツハイマー病患者の中核症状の悪化抑制の可能性を示す知見が得られ、その高い安全性も示唆されている (24)。

3. N 陳皮の漢方処方への応用

抑肝散と釣藤散は代表的な認知症の漢方処方である。抑肝散は認知症の周辺症状改善作用が、釣藤散については認知機能障害の改善作用が報告されている (25, 26)。これらの漢方処方の薬理メカニズムについての解説は最新の総説 (27) に譲りたい。さて、抑肝散加陳皮半夏は我が国で開発された抑肝散の加味方であり、抑肝散と同様に認知症の治療に用いられる。この処方構成生薬として陳皮を含んでおり、著者らは N 陳皮配合処方エキスを調製し、その抗認知症作用を通常陳皮配合

処方エキスの作用と比較して精査した。その結果、培養海馬神経細胞で N 陳皮配合処方エキスを濃度依存的な CRE 依存的転写促進活性が検出されたが、通常陳皮配合処方エキスではそのような活性は見られなかった。さらに、両漢方処方エキスをそれぞれ 7 日間経口投与して MK801 誘発性記憶障害に対する作用を恐怖条件付け試験により精査したところ、N 陳皮配合処方エキスでは、0.5 g/kg/day の用量で MK801 誘発性の恐怖記憶の獲得障害およびその固定・想起障害に対して強い抑制作用を示し、さらに低用量でも記憶障害抑制作用が認められ、用量依存性を示した。しかし、通常陳皮配合処方エキスでは、ヒト 1 日量の 25 倍量に相当する 2.5 g/kg/day の高用量において改善作用が見られるものの、0.5 g/kg/day の用量では記憶障害抑制作用は見られなかった(28、投稿論文準備中)。したがって、N 陳皮配合の抑肝散加陳皮半夏処方 AD などの認知症の中核症状を改善する薬剤として期待される。

4. おわりに

本稿では、多成分系薬剤として N 陳皮エキスを、単一成分系薬剤としてノビレチンを選び、両薬剤の抗認知症作用を薬理学的に比較解析し、N 陳皮エキスのノビレチン単体に対する薬理学的優位性について解説した。現在、医薬品として使用されている多くの単一成分系薬剤の開発の歴史はモルヒネ (morphine) のアヘンからの単離に始まるといわれる。その成功の歴史は、薬用植物は単一成分医薬品の開発のための単なる材料とする価値観を生み出した。しかし、著者等の天然薬物の抗認知症作用の研究結果は N 陳皮の複数の有効成分の協働作用がむしろ抗認知症作用の強化に働くことを意味している。つまり、薬用植物 (植物生薬) エキスそのものを医薬品として利用の方が有効性も安全性も高くなると期待できる。薬物送達の観点からも N 陳皮エキスはノビレチン単体より優れており、さらにノビレチンには認められない記憶の獲得障害を抑制する特徴的な活性を示す。著者らはこの N 陳皮のユニーク

な作用を示す活性本体も特定している。また、本稿で述べた漢方処方への応用研究から、N 陳皮の抑肝散加陳皮半夏処方への配合による記憶障害抑制活性の増強が確認されている。近年、著者等が発見した N 陳皮の活性本体の 1 つであるシネンセチンについて、 α -セクレターゼ依存的な APP プロセッシング促進活性が報告された(29)。この物質が AD の治療上 N 陳皮エキスの薬効にどの位貢献するのか興味深い。さらなる研究により N 陳皮の多成分系薬剤としての真価が実証されれば、認知症の克服のための新たな治療戦略を提唱する日も近いと期待される。

著者の利益相反：山國 徹 (小太郎漢方製薬株式会社)。

文 献

- 1) Cumming JL, et al. *Alzheimers Res Ther.* 2014;6:37.
- 2) Braak H, et al. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239-259.
- 3) Hardy J, et al. *Science.* 2002;298:789-791.
- 4) Selkoe DJ. *Behav Brain Res.* 2008;192:106-113.
- 5) Shanker GM, et al. *Nat Med.* 2008;14:837-842.
- 6) Ji M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:5819-5824.
- 7) Tomiyama T, et al. *Ann Neurol.* 2008;63:377-387.
- 8) Tomiyama T, et al. *J Neurosci.* 2010;30:4845-4856.
- 9) Umeda T, et al. *Acta Neuropathol.* 2014;127:685-698.
- 10) Snyder EM, et al. *Nat Neurosci.* 2005;8:1051-1058.
- 11) Cissé M, et al. *Nature.* 2011;469:47-52.
- 12) Impey S, et al. *Nat Neurosci.* 1998;1:595-601.
- 13) Impey S, et al. *Neuron.* 1998;21:869-883.
- 14) Vitolo OV, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13217-13221.
- 15) Athos J, et al. *Nat Neurosci.* 2002;5:1119-1120.
- 16) Mucke L, et al. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a006338.
- 17) 「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」カンキツによるがん予防に関する基礎的研究—がん予防研究への貢献・がん予防食品としての評価向上を目指して—(平成 8 年度～平成 12 年度)報告書(総括研究代表 矢野昌充)。
- 18) 山國徹, 他. *日薬理誌.* 2008;152:155-159.
- 19) Nakajima A, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:784-790.
- 20) Matsuzaki K, et al. *Neurosci Lett.* 2006;400:230-234.
- 21) Onozuka H, et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326:739-744.
- 22) Kawahata I, et al. *J Neural Transm.* 2013;120:1397-1409.
- 23) Saigusa D, et al. *Anal Bioanal Chem.* 2011;400:3635-3641.
- 24) Seki T, et al. *Geriatr Gerontol Int.* 2013;13:236-238.
- 25) Iwasaki K, et al. *J Clin Psychiatry.* 2005;66:248-252.
- 26) Terasawa K, et al. *Phytomedicine.* 1997;4:15-22.
- 27) Matsumoto K, et al. *J Pharmacol Sci.* 2013;122:257-269.
- 28) 山國徹, 他. *J Trad Med.* 2014;Suppl 58.
- 29) Cox CJ, et al. *Neurobiol Aging.* 2014;36:178-187.