

神経突起形成促進作用を有する食品成分に関する研究

徳島大学大学院

先端技術科学教育部

物質生命システム工学専攻

博士論文

古賀 武尊

目次

序論.....	1
第1章 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進物質.....	7
第1節 はじめに.....	7
第2節 実験方法.....	9
第1項 実験試薬.....	9
第2項 Nuclear magnetic resonance (NMR)スペクトルおよび high performance liquid chromatography (HPLC)の分析.....	10
第3項 細胞培養.....	10
第4項 神経突起形成作用、神経突起形成促進作用.....	11
第5項 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製.....	12
第3節 結果および考察.....	14
第1項 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定.....	14
第2項 神経突起形成促進作用を示すアミノ酸のスクリーニング.....	27
第3項 アミノ酸混合物の神経突起形成促進作用.....	32
第4節 第1章の結論.....	41
第2章 シャクヤクの花由来の神経突起形成促進物質.....	42
第1節 はじめに.....	42
第2節 実験方法.....	44
第1項 実験試薬.....	44
第2項 Nuclear magnetic resonance (NMR)スペクトルの分析.....	44
第3項 細胞培養.....	45
第4項 神経突起形成作用、神経突起形成促進作用.....	45
第5項 <i>Paeonia lactiflora</i> の花由来の神経突起形成促進作用を示す化合物の精製.....	45
第6項 単離した活性化合物の化学構造解析.....	46
第7項 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉作用.....	47
第8項 アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用.....	47

第9項	Cell-ELISA法によるPC12細胞のニューロフィラメントの検出.....	48
第3節	結果および考察.....	49
第1項	<i>Paeonia lactiflora</i> の花由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定.....	49
第2項	Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalinおよびその類似体の構造活性相関研究.....	58
第3項	Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalinおよびその類似体の2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル捕捉作用.....	61
第4項	Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalinおよびその類似体のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用.....	63
第5項	Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalinのNGF誘導性の神経突起形成促進作用.....	65
第6項	Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalin処理によるPC12細胞のニューロフィラメント発現の促進.....	67
第4節	第2章の結論.....	70
第3章	ヒマワリの種子由来の神経突起形成促進物質.....	71
第1節	はじめに.....	71
第2節	実験方法.....	72
第1項	実験試薬.....	72
第2項	Nuclear magnetic resonance (NMR)スペクトルとgas chromatography (GC)の分析.....	72
第3項	細胞培養.....	73
第4項	神経突起形成作用、神経突起形成促進作用.....	73
第5項	<i>Helianthus annuus</i> の種子由来の神経突起形成促進作用を示す化合物の精製.....	73
第6項	ニューロフィラメントの免疫蛍光染色.....	74
第3節	結果および考察.....	75
第1項	<i>Helianthus annuus</i> の種子由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定.....	75
第2項	ステロール化合物の神経突起形成促進作用.....	79
第3項	NGF誘導下における β -sitosterolの神経突起形成促進作用.....	82

第4節 第3章の結論.....	85
総括.....	86
参考文献.....	89
論文目録.....	99
謝辞.....	101

序論

近年、日本は超高齢社会を迎え、認知症患者は増加傾向である¹ (Figure 1)。また、世界的にも、認知症患者は年々増加し続けている²。現在では、高齢者の4人に1人が認知症及びその予備軍と呼ばれており、今後も急激に増加の一途をたどると予測されている。認知症には様々な種類があるが、アルツハイマー病はその中の約70%を占めている。アルツハイマー病は、一般的に進行性の記憶力低下が起こり、同時に、視空間認知、言語力、問題解決能力に異常が起こる。これらの認知機能の異常は、日常生活に影響を及ぼし、症状が進行すると、摂食や意思疎通などが困難となり、寝たきりになる場合もある。現在は、一度アルツハイマー病を発症すると、完治するのは難しく、進行を遅延させる治療法が行われている。また、アルツハイマー病患者のほとんどは65歳以上といわれている一方で、若年性アルツハイマー病も存在している。そのため、アルツハイマー病は、治療にかかる労力とコストにおいて、非常に負担がかかる疾患であると考えられている。

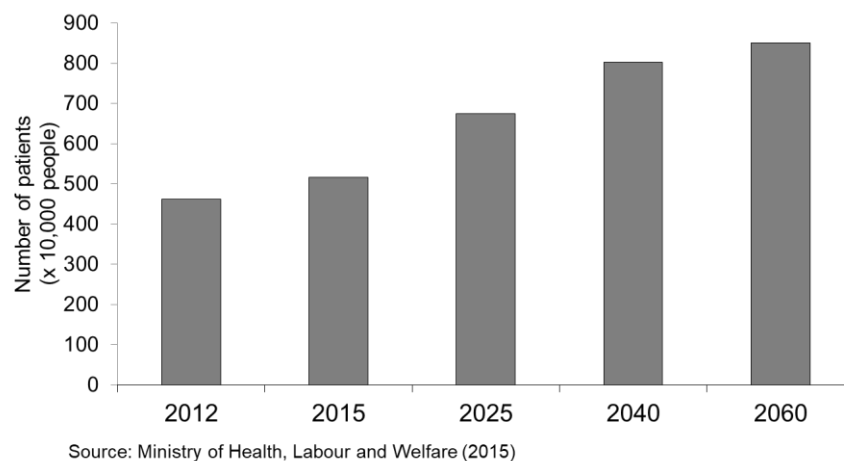


Figure 1. Trends in the number of dementia patients and predicted trends in the future in Japan

アルツハイマー病患者の特徴として①老人斑の出現、②神経原繊維変化、③神経伝達物質である acetylcholin の減少、④神経細胞（シナプス）の脱落が確認されている。①老人斑はアミロイドβ（Aβ）と呼ばれるタンパク質が凝集し、神経細胞外に沈着することで神経細胞に毒性を発揮している³。また、②神経原繊維変化は Aβの凝集物が微小管結合タンパク質の1つであるタウのリン酸化を促進し、リン酸化タウが神経細胞内で凝集することで神経変性が引き起こされると考えられている³。これらのことより、現在では、Aβがアルツハイマー病の主な原因であると考えられている。そのため、Aβを除去する抗体製剤の開発が行われたが、認知症の進行を停止させるだけの効果はなく、認知機能は持続的に低下していくことが報告されている⁴。現在、日本ではアルツハイマー病患者脳内の③ acetylcholin の減少に着目し、acetylcholin の分解酵素である acetylcholinesterase (AChE) を阻害する医薬品が使用されている (Figure 2)⁵。Acetylcholin は、記憶や学習に関連する神経伝達物質の1つである。シナプスの受容体に結合し、神経伝達を終えた acetylcholin は、AChE によって、cholin と酢酸に加水分解され、受容体から acetylcholin が除去される。これにより、神経細胞の情報伝達のオンとオフが制御されており、神経信号の伝達を正常に保っている。しかし、アルツハイマー病患者は、脳内の acetylcholin レベルは通常時よりも減少傾向であることが一般的に知られている。そこで、AChE 阻害剤を用いることで、一時的に脳内の acetylcholin の量を増加させることで、アルツハイマー病の進行を遅らせることができる。しかし、この医薬品は対症療法薬であり、アルツハイマー病の根本的な解決には至っていない。そこで、本研究では、④神経細胞（シナプス）の脱落に注目した。

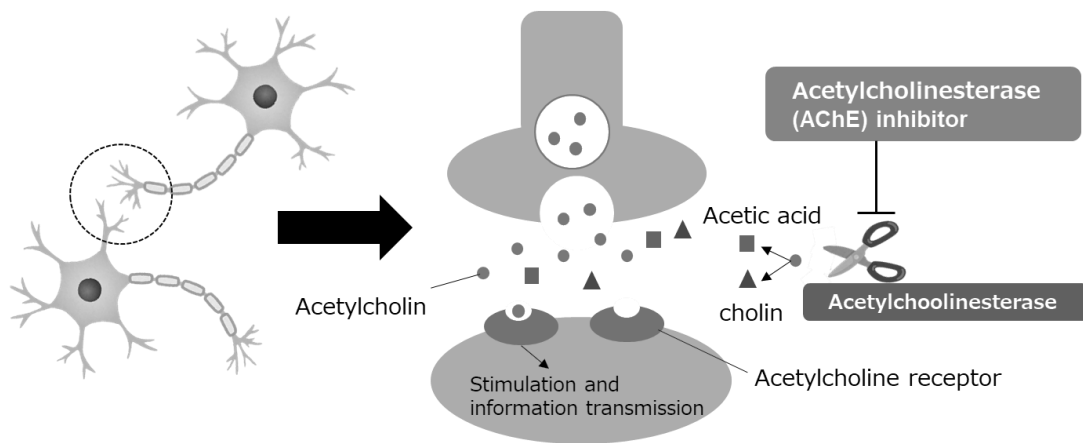


Figure 2. Mechanism of dementia prevention by acetylcholinesterase inhibition

神経細胞は神経成長因子である nerve growth factor (NGF) によって生存や突起形成を維持している。アルツハイマー病は、脳内の NGF 量が増加とともに減少し⁶、神経突起形成を維持できなくなり、神経突起の損傷、神経細胞死が引き起こされることが原因の1つと考えられている (**Figure 3**)⁷。そこで、脳内の NGF 量を増やすことでアルツハイマー病は改善されると考えられ、NGF 自体を治療薬として応用することが考えられた。しかし、NGF は容易に代謝されやすく、血液脳関門を通過できないというドラッグデリバリーの問題があるため、治療薬として応用することは困難である^{8,9}。学習能力の低い老齢ラットに NGF を1ヶ月投与すると学習能力が向上することが報告されていることから、NGF がアルツハイマー病改善の手がかりになると考えられる¹⁰。そのため、NGF と同様の作用を示す物質、NGF の作用を増強する物質、NGF 産生作用を示す物質を見いだす必要がある。本研究では、NGF 様作用、NGF 増強作用である、神経突起形成作用、神経突起形成促進作用に着目し、それらの活性を示す化合物の単離、同定を行った。

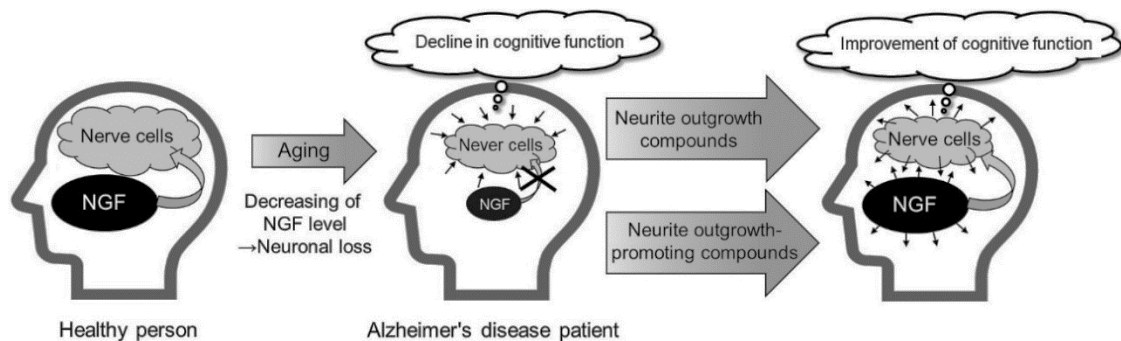


Figure 3. The hypothesized mechanism of Alzheimer's disease onset due to decreased NGF

神経突起形成作用や神経突起形成促進作用には、神経細胞分化モデルである PC12 細胞が汎用されている。PC12 細胞は、ラット副腎髄質由来の褐色細胞腫であり、NGF や dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP) の添加により、増殖を停止し、神経突起を伸長するようになる^{11,12}。NGF は tropomyosin receptor kinase (TrkA) に結合し、extracellular signal-regulated kinase (ERK) を介して神経突起を伸長させる¹³ (**Figure 4**)。別のシグナル伝達経路として、NGF は細胞内の cyclic AMP (cAMP) レベルを上昇させ、神経突起形成を誘導する¹⁴。膜透過性の cAMP 誘導體である Bt₂cAMP は、細胞内で cAMP へと代謝され、細胞内の cAMP のレベルの上昇により、神経突起形成作用を示す。また、PC12 細胞が分化する突起では、神経細胞に特異的に存在する中間径フィラメントであるニューロフィラメントを発現する¹⁵。これらのことより、PC12 細胞は、神経突起形成作用や神経突起形成促進作用を有する化合物を探索するために、有効な神経細胞モデルであると言われている。したがって、本研究における、神経突起形成化合物や神経突起形成促進化合物は、PC12 細胞の神経突起形成を指標に評価した。

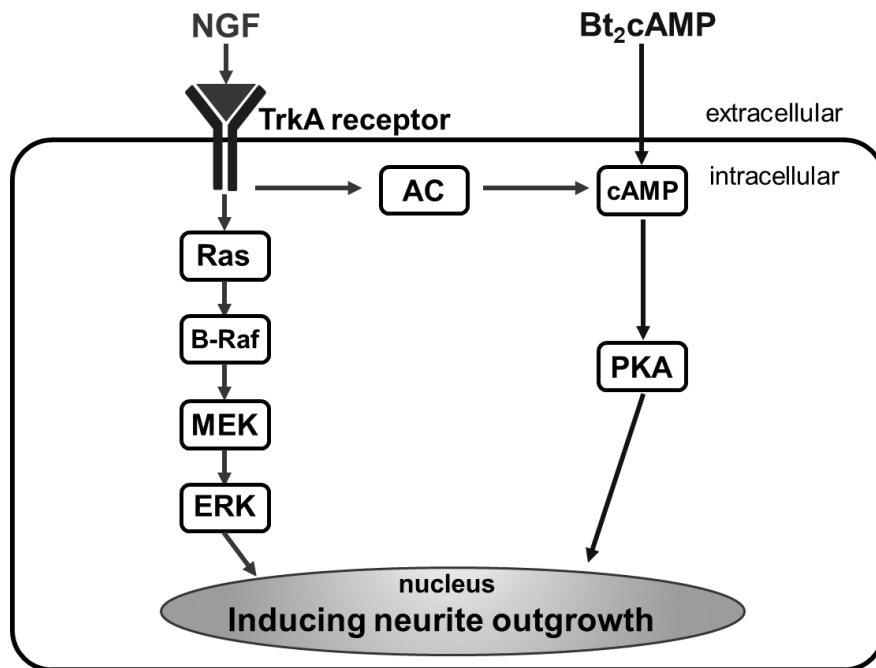


Figure 4. Schematic drawing of the neurite outgrowth process

アルツハイマー病は発症しても、本人では気付くことが難しく、診断される頃には既にかかなり進行した状態になっていることが多い。そのため、アルツハイマー病の解決策として、潜在的にアルツハイマー病が進行する前に予防、対策しておく必要がある。そこで、長期的に継続可能な手段でアルツハイマー病を予防する手段として食品に着目した。食品には、大きく分けて3つの機能があり、食品の3大機能と呼ばれている。一次機能は、生体に食品の栄養素を供給する最も基本的な機能であり、二次機能は、食品の見た目や美味しさなど、感覚的に働きかけるもの機能である。そして、三次機能は、食品中の成分を介して身体の様々なシステムを調整する機能であり、近年では、疾病を予防するという点で、この三次機能が特に注目されている。最近では、三次機能として、クロロゲン酸を含むコーヒー¹⁶やカテキン類を含む緑茶¹⁷、ポリフェノール類を含む赤ワイン¹⁸などがアルツハイマー病予防に効果的であると考えられている。しかし、コーヒーや緑茶はカフェインが豊富に含まれており、大量に飲み続けると身体に悪影響を引き起こしてしまう。また、赤ワインはアルコール飲料であり、アルコールの過剰摂取は生

活習慣病の原因となるため長期的に摂取し続けることは困難である。そのため、日常的に摂取するためには、ノンカフェイン、ノンアルコールの食品が望まれる。本研究では、動物由来食品として鶏冠、植物由来食品としてシャクヤクの花とヒマワリの種子に着目した。鶏冠は一般的に食用として用いられている他に、酵素処理され、鶏冠加水分解物としてサプリメントに応用されており、膝関節痛改善効果が認められている¹⁹。シャクヤクは、根は生薬として利用される一方で、花は食用であり、ハーブティーとしても利用されている。ヒマワリの種子は、栄養価が高いことが知られており、世界中で食されている。これらの食品は、日常的に摂取可能な食品であり、これまでに、神経突起形成作用や神経突起形成促進作用に関する報告はない。そこで、PC12 細胞を用いて、これらの食品の神経突起形成作用、神経突起形成促進作用を調査した結果、これらの食品に神経突起形成促進作用を見いだした。したがって、これらの食品中に含まれる神経突起形成促進作用を示す化合物を、活性を指標にして精製し、単離、同定を行うことを目的とした。

第1章 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進物質

第1節 はじめに

食品は、生体へ栄養素を供給する機能、味覚の嗜好性や感覚を供給する機能だけでなく、食品に含まれる成分によって生体の様々なシステムを調節する機能を有している²⁰。食品の生体調節機能は、健康の維持、増進や生活習慣病の予防、回復に役立つと考えられている。近年、平均寿命の長さに伴い健康意識が高まっており、健康食品として食品の機能性を重視した商品が広く受け入れられている。最近では、酵素的、化学的な加水分解により、吸収性や機能性を向上させた製品が開発されている。キトサンを加水分解して得られる、二糖から八糖を主体とするキトサンオリゴ糖の混合物が、ビフィズス菌や乳酸菌の増殖促進効果を示すことが報告されている²¹。この発見は、キトサンオリゴ糖が優れたプレバイオティクス効果を有していることを示している。また、キトサン由来の二糖から八糖までのキトサンオリゴ糖をウサギに投与すると、血清中のリゾチーム活性が2倍まで上昇し、生体防御機能が改善されたことが報告されている²²。化学的に加水分解したコンドロイチン硫酸オリゴ糖は、マウスの Th2 反応のダウンレギュレーションにより、IgE を介したアレルギー反応を抑制する²³。イワシ由来のタンパク質をプロテアーゼで分解することで得られるイワシペプチドは、アンジオテンシン変換酵素の働きを抑制し、血圧を正常に保持することができる^{24,25}。卵白の加水分解物の長期摂取は、血漿コレステロール値およびトリグリセリド値を低下させることが知られている²⁶。パパイヤの果実から抽出した植物性プロテアーゼであるパパインで加水分解した豚肉ペプチドの摂取は、血清コレステロールを低下させ、コレステロールと胆汁酸の糞便排泄を増加させる²⁷。

鶏冠は、ヒアルロン酸やコラーゲンタンパクを豊富に含む食品である。ヒアルロン酸は創傷治癒を促進し²⁸、ヒト結膜炎上皮細胞における活性酸素による DNA 損傷を緩和することが示されている²⁹。ヒアルロン酸を化学的または酵素的に加水分解して得られ

る 4 糖類は、in vivo で神経細胞の再生を促進することが報告されている³⁰。コラーゲンペプチドの摂取は、UV-B によって誘導される、皮膚の保湿低下、表皮の過形成、I 型コラーゲンの減少を抑制する³¹。近年、プロテアーゼで加水分解された鶏冠加水分解物が膝関節痛を改善することが報告されているが¹⁹、その作用機序は明らかにされていない。また、鶏冠加水分解物に関する研究はほとんど行われておらず、未報告の効果がある可能性がある。本研究において、鶏冠加水分解物が PC12 細胞の神経突起形成を促進することを見いだした。そこで、鶏冠加水分解物中の神経突起形成促進化合物を精製し、その活性を調査した。

第2節 実験方法

第1項 実験試薬

鶏冠加水分解物は、株式会社らいむより供与されたものを使用した。ギムザ染色液、D-PBS(-)、25%グルタルアルデヒド溶液、L-システイン塩酸塩 1 水和物、グリシン、L-ヒスチジン、L(-)-バリン、L-チロシン、L(-)-スレオニン、D(-)-バリン、D-メチオニン、*o*-フタルアルデヒド (OPA) は、富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。L-メチオニン、L-ロイシン、L(-)-フェニルアラニン、L(+)-リジン—塩酸塩、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L(+)-グルタミン、L-アルギニンは、純正化学工業株式会社から購入した。L-セリンおよびL-イソロイシンは、株式会社ペプチド研究所から購入した。ジペプチドである H-Val-Met-OH および H-Met-Val-OH は、国産化学株式会社から購入した。ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、L(-)-プロリン、L-アスパラギン—水和物、L-トリプトファン、L- α -アラニン、2-メルカプトエタノール、酸化重水素 (D₂O) はナカライテスク株式会社から購入した。RPMI-1640 培地、dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP)、Brij 35P はシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, Lot.42F9155K) およびウマ血清 (horse serum; HS, Lot.1517707) は、Gibco から購入した。セルマトリックスタイプ I-P (コラーゲン) は新田ゼラチン株式会社から購入した。Recombinant rat β -nerve growth factor (NGF, Cat.556-NG) は、R&D SYSTEMS から購入した。活性評価に使用した 96 ウェルプレートは、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社より入手したものを使用した。カラムクロマトグラフィーには、Diaion HP20 (三菱ケミカル株式会社)、Wakogel 50NH₂ (富士フイルム和光純薬株式会社)、TOYOPEARL HW-40F (東ソー株式会社)、Chromatorex ARG (富士シリシア化学株式会社) を使用した。他のすべての溶媒および緩衝液の調製に使用した試薬は、富士フイルム和光純薬株式会社もしくはナカライテスク株式会社から購入した。

第2項 Nuclear magnetic resonance (NMR)スペクトルおよび high performance liquid chromatography (HPLC)の分析

¹H-NMR スペクトルは、測定溶媒に D₂O を用い、JEOL NMR system (ECZ400, 400MHz) にて測定した。化学シフトは D₂O (δ_{H} 4.79 ppm) にて調整し、表示した。

HPLC は、液体クロマトグラフポンプ (株式会社島津製作所)、蛍光検出器 RF-10AXL (株式会社島津製作所)、カラムオープン CTO-10A (株式会社島津製作所)、デガッサ DGU-14A (株式会社島津製作所)、インテグレーターADL-2020 (エルシーサイエンス株式会社) により実施した。ホウ酸 1.55 g、水酸化ナトリウム 0.7 g、Brij 35P 0.05 g、2-メルカプトエタノール 0.1 mL、OPA 0.04 g を含む OPA 試薬とアミノ酸または鶏冠加水分解物を室温で 1 分間インキュベートした。次に、蛍光標識したアミノ酸を、Inertsil ODS-2 column (4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm , ジーエルサイエンス株式会社) を用いて、40 °C、0.7 mL/min の流速で、20 mM 酢酸ナトリウム水溶液/MeOH (45/55, v/v) で溶出した。溶出されたアミノ酸は Ex./Em. = 360 nm/460 nm. で検出した。

第3項 細胞培養

セルマトリックスタイプ I-P (コラーゲン) を 0.001N の塩酸で希釈し、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した。これをディッシュには 2 mL、96 ウェルプレートには 50 μL ずつ分注し、室温で 30 分静置した。その後、コラーゲンを回収後、ディッシュと 96 ウェルプレートを D-PBS(-)で 2 回洗浄し、無菌的に風乾し、4 °C で保管した。

PC12 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センターから購入した。細胞は、10% HS、5% FBS、100 U/mL ペニシリン G、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有する RPMI-1640 培地中で 5% CO₂ 空気気相下、37 °C で培養した。継代は 2、3 日ごとに、細胞密度が約 70% コンフルエント時に継代を行った。

第4項 神経突起形成作用、神経突起形成促進作用

PC12 細胞をコラーゲンコートした 96 ウェルプレートに、 4.0×10^3 cells/90 μ L/well (Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成の評価) または 2.0×10^3 cells/90 μ L/well (NGF 誘導性の神経突起形成の評価) で播種し、37 °C、5%CO₂ 空気相下で培養した。細胞を播種してから 24 時間後、10 mM の Bt₂cAMP (終濃度: 0.5 mM) または 200 ng/mL の NGF (終濃度: 10 ng/mL) を 5 μ L と、培地で希釈した評価サンプルまたは培地 (コントロール) を 5 μ L を各ウェルに添加した (Total volume: 100 μ L/well)。Bt₂cAMP と評価サンプルを添加した場合は 24 時間、NGF と評価サンプルを添加した場合は 48 時間さらに培養を行った。培養後、培地をアスピレートし、PC12 細胞を 1% グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH 7.2, 100 mM) で固定し、ギムザ染色液で染色した。その後、96 ウェルプレートを超純水で 2 回洗浄し、風乾させた。処理後、顕微鏡下にて細胞を観察し、細胞体の長径の 2 倍以上長い神経突起を有する細胞を陽性細胞と判定し、1 ウェルあたり 300-400 個の細胞について評価した。全細胞数に対する陽性細胞数の割合を百分率で算出し、神経突起形成率とした。

神経突起形成評価、神経突起形成促進評価の概略図を **Figure 5** に示す。PC12 細胞に対して、鶏冠加水分解物を添加し、神経突起形成作用を評価した (**Figure 5-②**、NGF 様作用)。また、神経成長因子である nerve growth factor (NGF) や NGF と同様に神経突起形成を促す dibutyryl-cAMP (Bt₂cAMP) (神経細胞分化剤) を、鶏冠加水分解物と混合し、神経細胞分化剤のみで刺激した場合 (**Figure 5-①**) と混合物 (神経細胞分化剤+試験サンプル) で刺激した場合 (**Figure 5-③**、NGF 増強作用) を比較して、神経突起形成促進作用を評価した (**Figure 5**)。

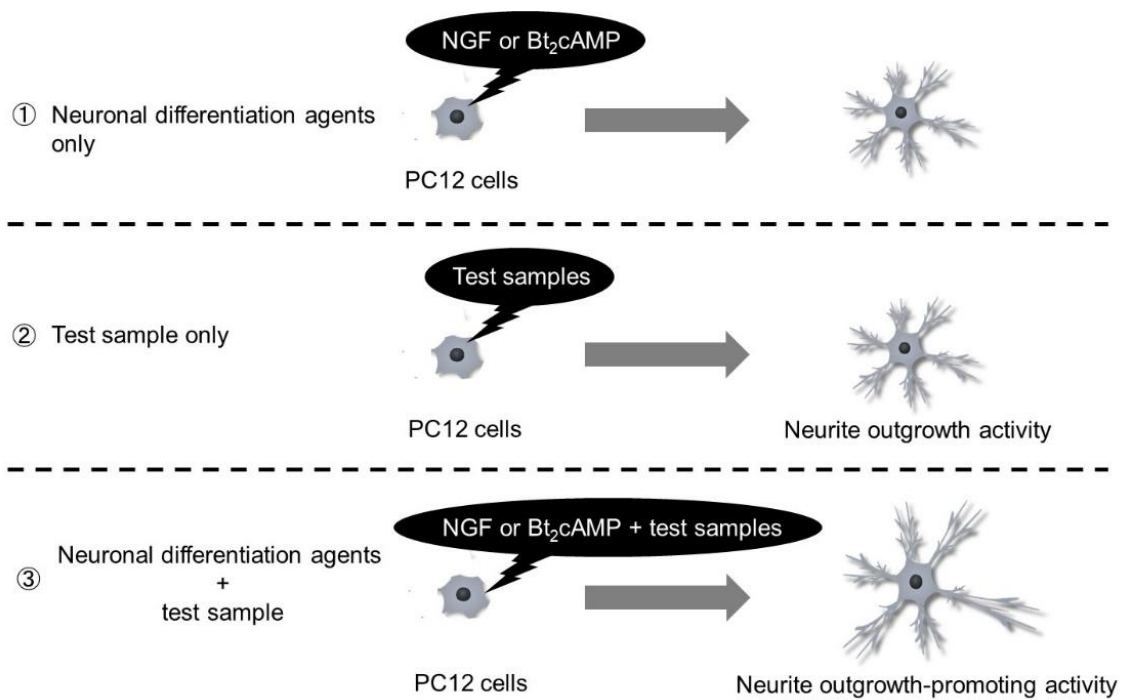


Figure 5. Neurite outgrowth activity and neurite outgrowth-promoting activity in PC12 cells

第 5 項 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製

鶏冠加水分解物 (97.3 g/1970 mL) に対して、7880 mL の EtOH を加え (EtOH の終濃度は 80%)、4 °C で 24 時間静置した。24 時間後、EtOH を含む鶏冠加水分解物を 3,773 x g、4 °C、10 分間遠心し、上清と沈殿物に分離した。神経突起形成促進作用を示す上清を、約 760 mL まで濃縮した。濃縮した上清を EtOAc で分液し (760 mL、3 回)、水層 (58.3 g, dry wt.) と EtOAc 層 (408.3 mg, dry wt.) を得た。神経突起形成促進作用を示した水層を Diaion HP20 カラム (12.5 cm i.d. × 35.0 cm) に供し、H₂O-MeOH (10/0, 8/2, 6/4, 4/6, 2/8, 各 4 L, v/v) で段階的に溶出し、100% H₂O で溶出した画分に有意な活性を見いだした。さらに、この活性画分を再度 Diaion HP20 カラム (5.0 cm i.d. × 40.5 cm) に供し、2.4 L の H₂O で溶出して、活性画分 A と B を得た。画分 A を Wakogel 50NH₂ に

供し、acetone/H₂O (80/20, 75/25, 70/30, 60/40, 各 345 mL, 40/60, 690 mL, v/v) で段階的に溶出して、80% acetone 溶液で溶出した活性画分 C と 75% acetone 溶液で溶出した活性画分 D を得た。画分 C を TOYOPEARL HW-40F (1.5 cm i.d. × 110.0 cm) に供し、380 mL の H₂O で溶出して、活性画分 E (24.2 mg) を得た。一方、画分 D は、TOYOPEARL HW-40F (1.5 cm i.d. × 110.0 cm) に供し、400 mL の H₂O で溶出して、活性画分 F (7.9 mg) と G (8.1 mg) を得た。画分 B は、TOYOPEARL HW-40C (2.5 cm i.d. × 81.0 cm) に供して、1.0 L の H₂O で溶出し、活性画分を得た。この活性画分を、TOYOPEARL HW-40F (1.5 cm i.d. × 112.0 cm) に供して、300 mL の H₂O で溶出し、得られた活性画分を Chromatorex ARG (1.5 cm i.d. × 5.7 cm) で段階的に acetonitrile/H₂O (100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, v/v) で精製し、70% acetonitrile 溶液で溶出した活性画分を得た。この活性画分を Chromatorex ARG (1.0 cm i.d. × 26.5 cm) で acetonitrile/H₂O (70/30, v/v) で 3 回精製し、活性画分 H (1.3 mg) を得た。以上の精製過程により、鶏冠加水分解物から、4 つの活性画分 E、F、G、H を得た。

第3節 結果および考察

第1項 鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定

鶏冠加水分解物は、NGF 誘導下において、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において有意な神経突起形成促進作用を示した (**Figure 6**)。そこで、鶏冠加水分解物由来の神経突起形成促進化合物を単離するために、活性を指標にして、**Figure 7** に示す工程で活性画分を精製した。Bt₂cAMP は、NGF と同様に神経突起形成を誘導する物質として知られている。NGF は tropomyosin receptor kinase (TrkA) に結合し、extracellular signal-regulated kinase (ERK) を介して神経突起を伸長させる¹³。また、NGF はシグナル伝達経路上において、cyclic AMP (cAMP) レベルを上昇させ、神経突起形成を誘導する¹⁴。Bt₂cAMP は、膜透過性の cAMP 誘導体であり、細胞内に取り込まれると cAMP レベルを上昇させ、神経突起形成を促す。すなわち、cAMP シグナルは、NGF のシグナル伝達経路の途中に存在するため、神経分化誘導剤としての Bt₂cAMP は、NGF よりも短時間で分化を誘導できる。したがって、精製過程では、神経突起形成促進作用を短時間で効率的に評価するために、Bt₂cAMP を神経分化誘導剤として使用した。

鶏冠加水分解物を 80% EtOH で沈殿させ、遠心分離後、神経突起形成促進作用を示した上清画分を濃縮し、EtOAc で分液した。水層と EtOAc 層の両方の画分が神経突起形成促進作用を示し (**Figure 8**)、水層の乾燥重量は、EtOAc 層の乾燥重量よりも圧倒的に大きかったので、水層をさらにカラムクロマトグラフィーにて精製した。まず、水層を Diaion HP20 カラムで2回精製し、活性画分 A と B を得た。画分 A を Wakogel 50 NH₂ で精製し、活性を示す画分 C と D を得た。画分 C を TOYOPEARL HW-40F で精製し、活性を示す画分 E (24.2 mg) を得た。一方で、画分 D は TOYOPEARL HW-40F で精製し、画分 F (7.9 mg) と画分 G (8.1 mg) を得た。画分 B は、TOYOPEARL HW-40C、TOYOPEARL HW-40F、Chromatorex ARG の順に供し、精製を行った。さらに、精製画分を Chromatorex ARG を用いて3回精製し、活性画分 H (1.3 mg) を得た。得られた画分 E、F、G、H の

神経突起形成促進作用を **Figure 9** に示している。鶏冠加水分解物より精製した活性画分の中には、精製が進むにつれて活性が低下、あるいは消失するものがあったため、活性化化合物の完全な精製を断念し、少量の不純物を含む活性画分について構造解析を試みた。¹H-NMR と HPLC による分析の結果 (**Figures 10-17**)、活性画分 E、F、G、H の主な化合物は、それぞれスレオニン、アラニン、バリン、メチオニンと同定した。これにより、鶏冠加水分解物から精製して得られた 4 つの神経突起形成促進作用を示す画分は、それぞれアミノ酸が主成分であることが明らかとなった。

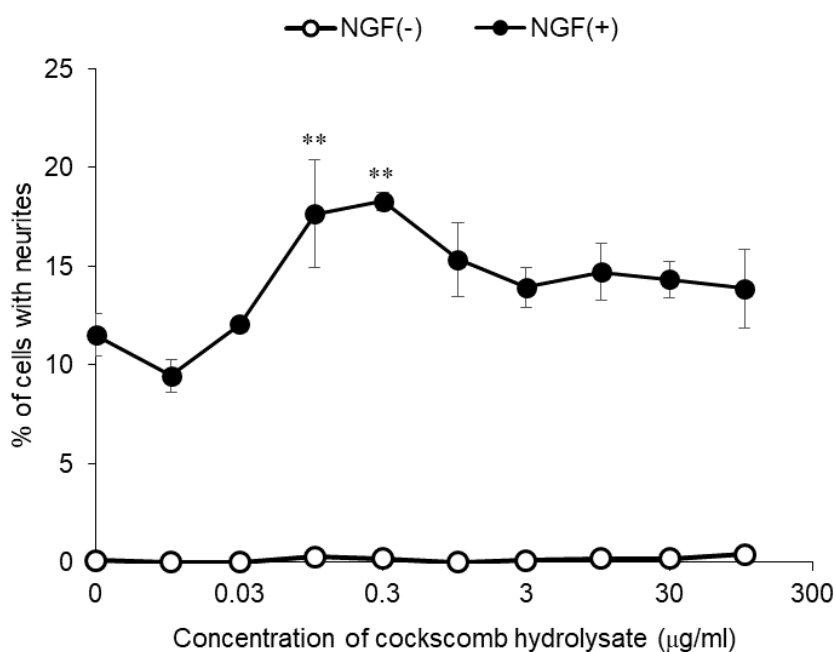


Figure 6. Neurite outgrowth activity of cockscomb hydrolysate in the presence or in the absence of NGF. PC12 cells were plated at 2.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at 0.01-100 µg/mL in the absence of NGF or in the presence of 10 ng/mL of NGF. The extent of neurite outgrowth was measured at 48 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from triplicated cultures. ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (10 ng/mL of NGF).

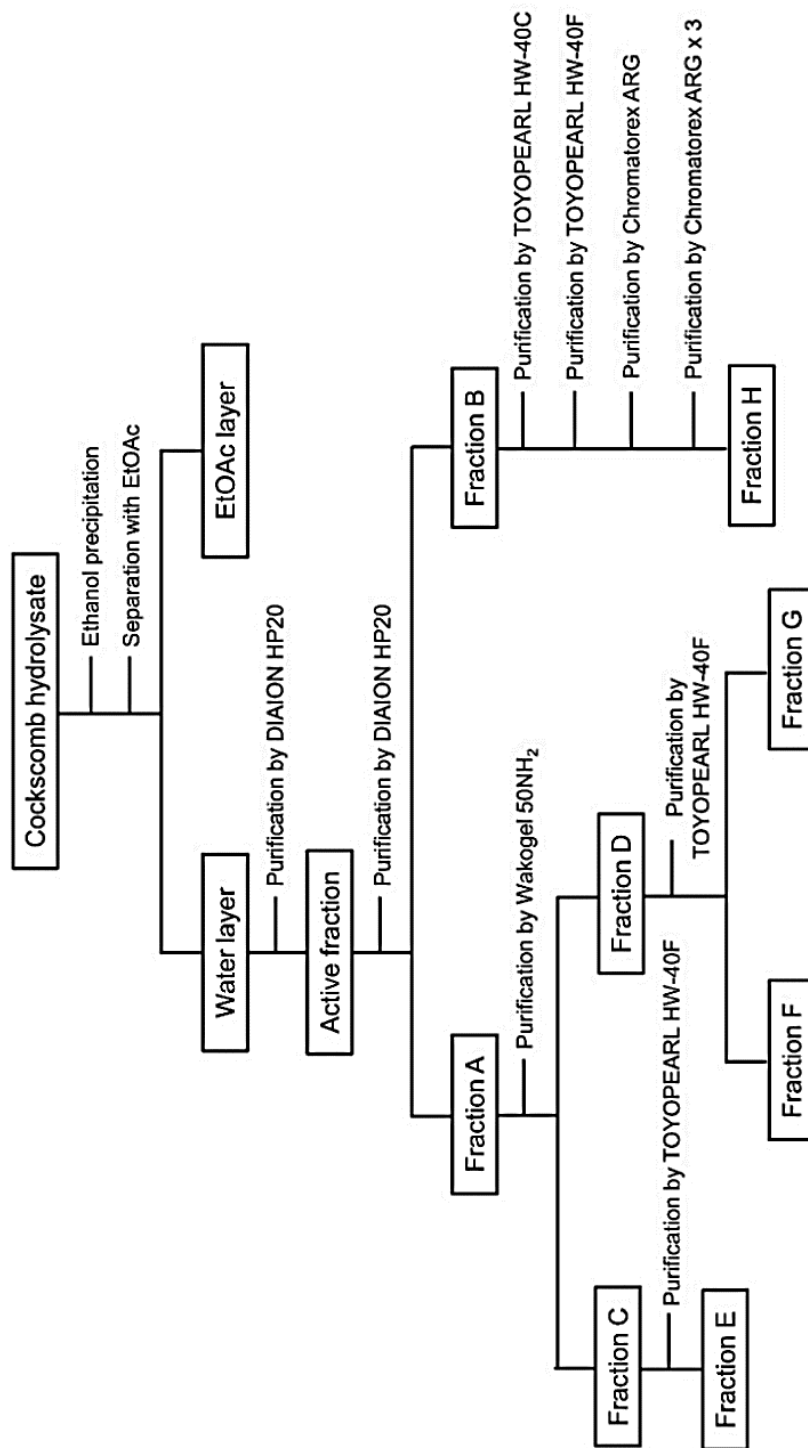


Figure 7. Purification scheme for neurite outgrowth-promoting compounds contained in cockscomb hydrolysate

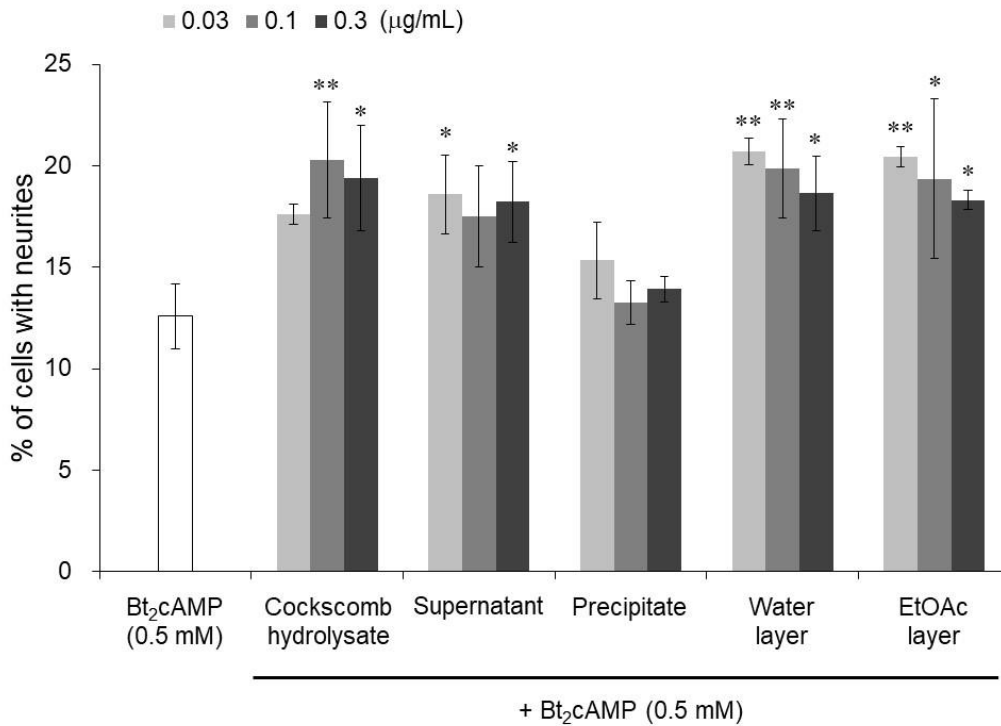


Figure 8. Neurite outgrowth-promoting activities of cockscomb hydrolysate, supernatant, and precipitate by ethanol precipitation, water layer, and EtOAc layer obtained by liquid separation of the supernatant in the presence of Bt₂cAMP. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at 0.03, 0.1 and 0.3 µg/mL in the presence of 0.5 mM Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from triplicate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM of Bt₂cAMP).

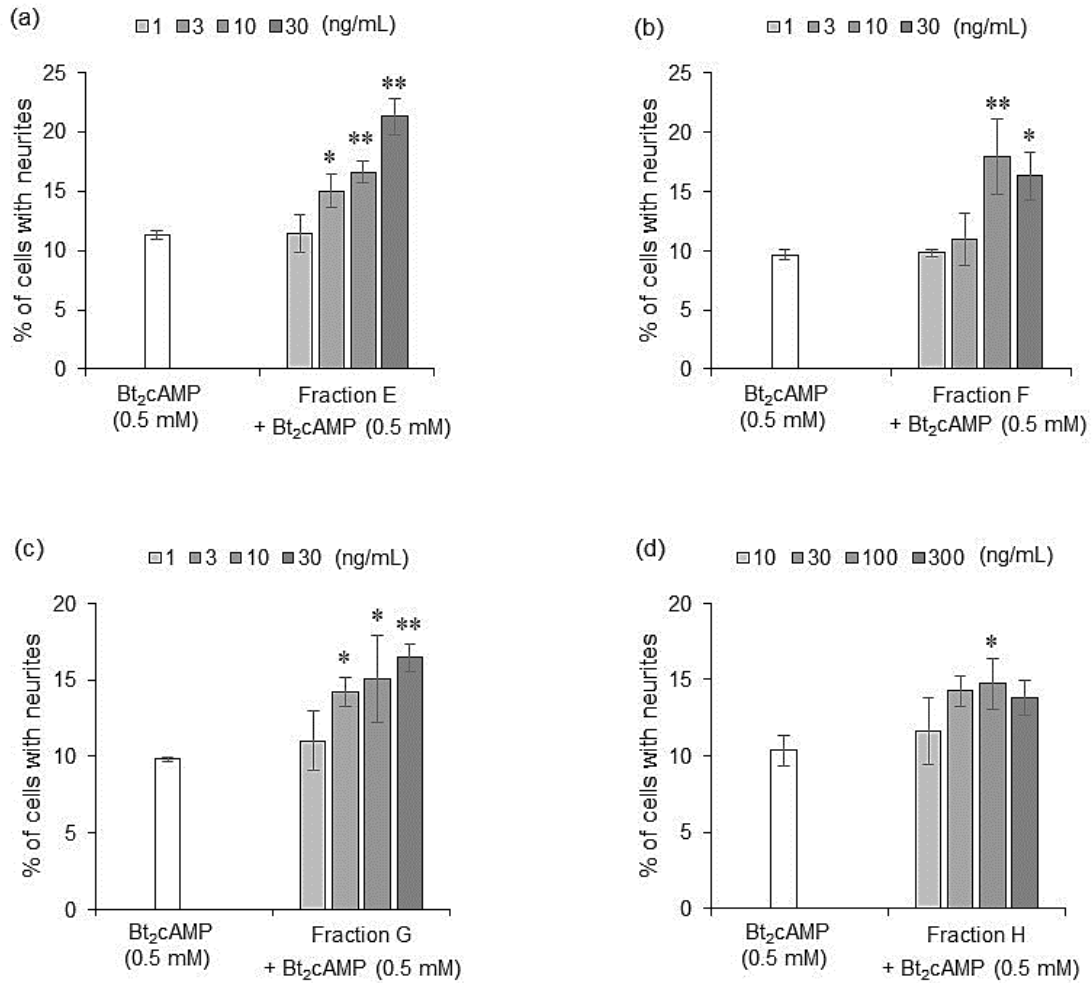


Figure 9. Neurite outgrowth-promoting activities of fractions E-H in the presence of Bt₂cAMP. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the fraction E (a), fraction F (b), fraction G (c), or fraction H (d) in the presence of 0.5 mM Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from triplicate cultures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM of Bt₂cAMP).

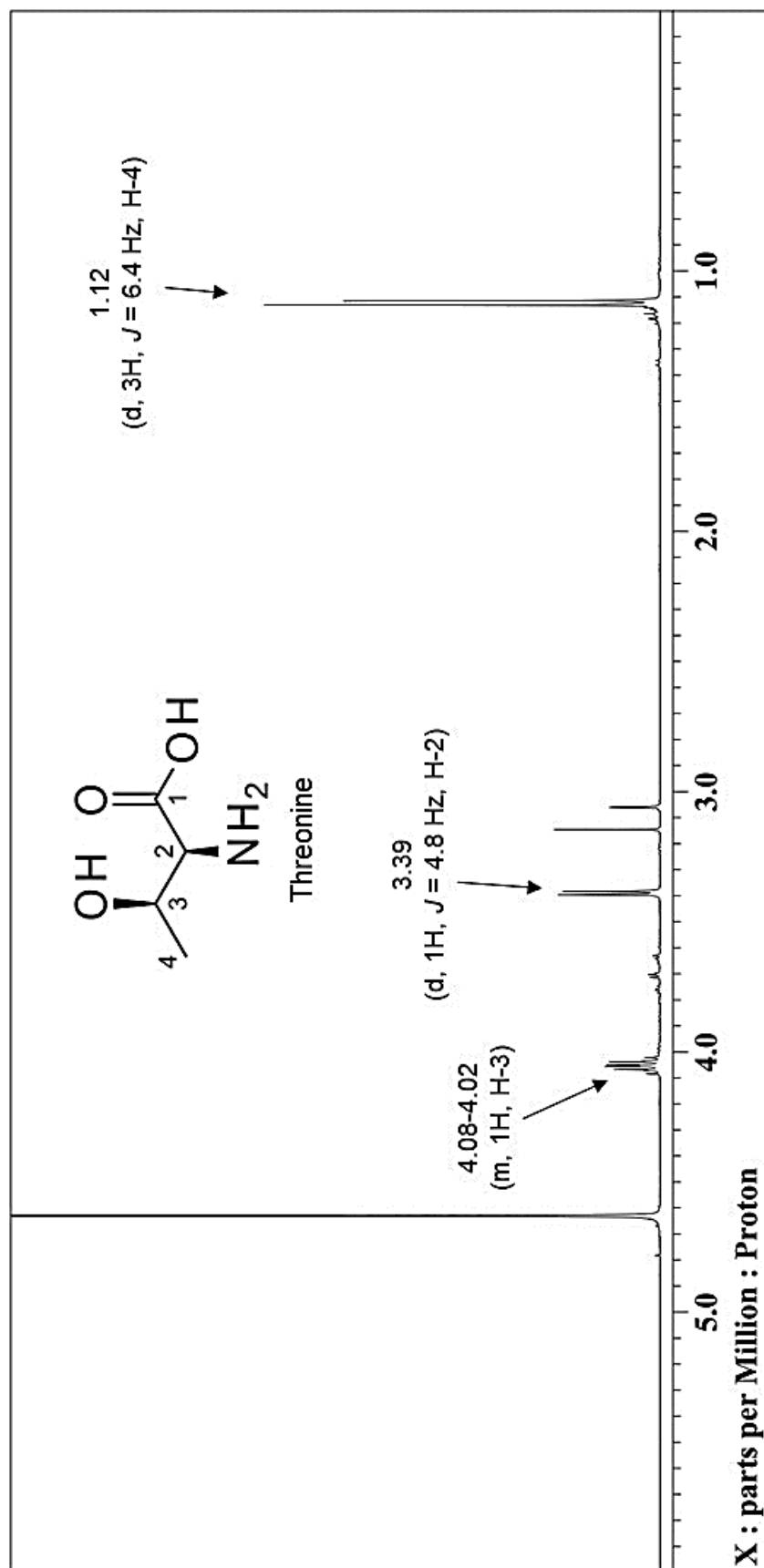


Figure 10. ¹H-NMR spectrum of fraction E

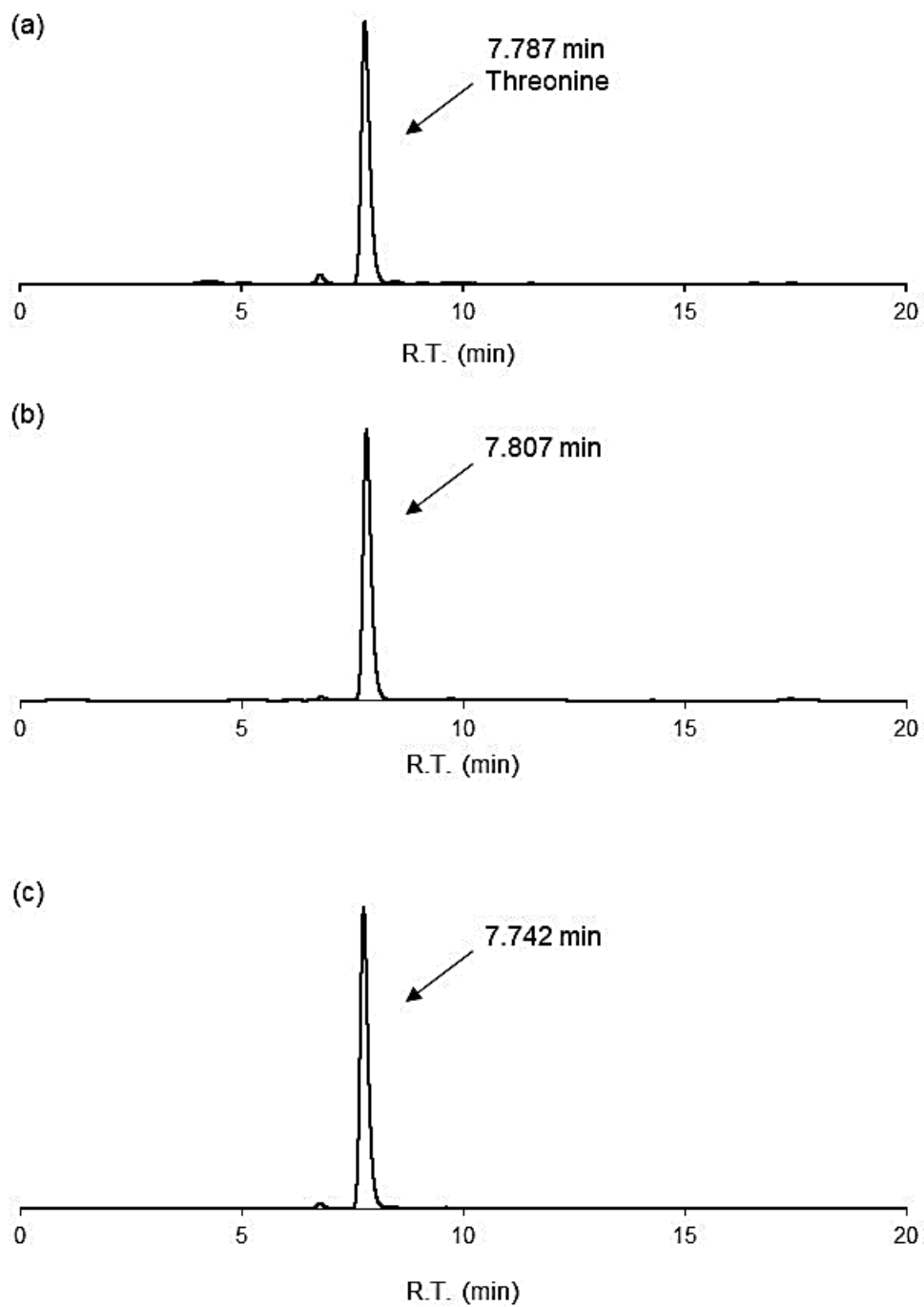


Figure 11. HPLC analyses of fraction E. (a) HPLC analysis of fraction E. (b) HPLC analysis of standard of threonine. (c) HPLC co-chromatography analysis of fraction E and threonine of standard.

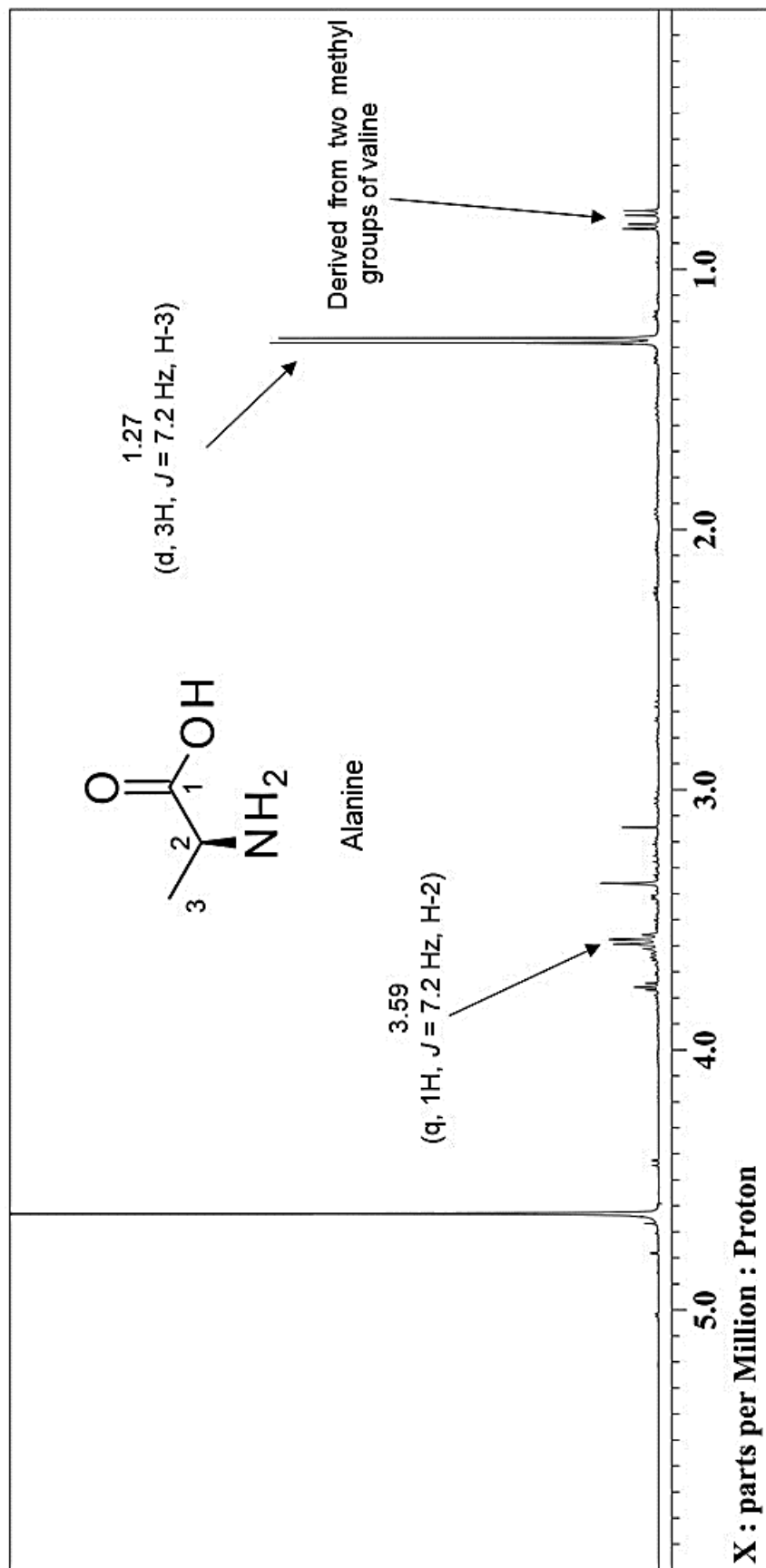


Figure 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of fraction F

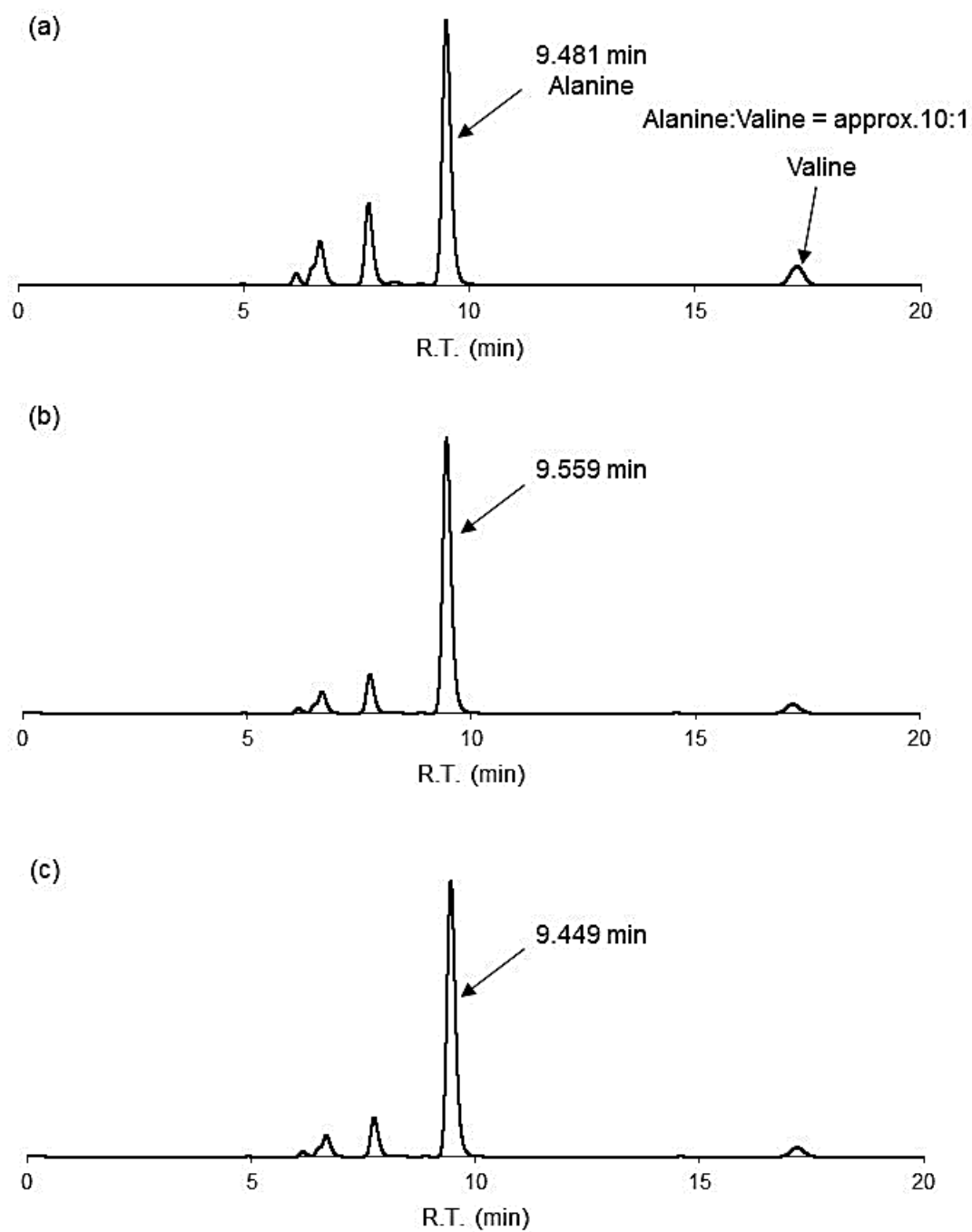


Figure 13. HPLC analyses of fraction F. (a) HPLC analysis of fraction F. (b) HPLC analysis of alanine of standard. (c) HPLC co-chromatography analysis of fraction F and alanine of standard.

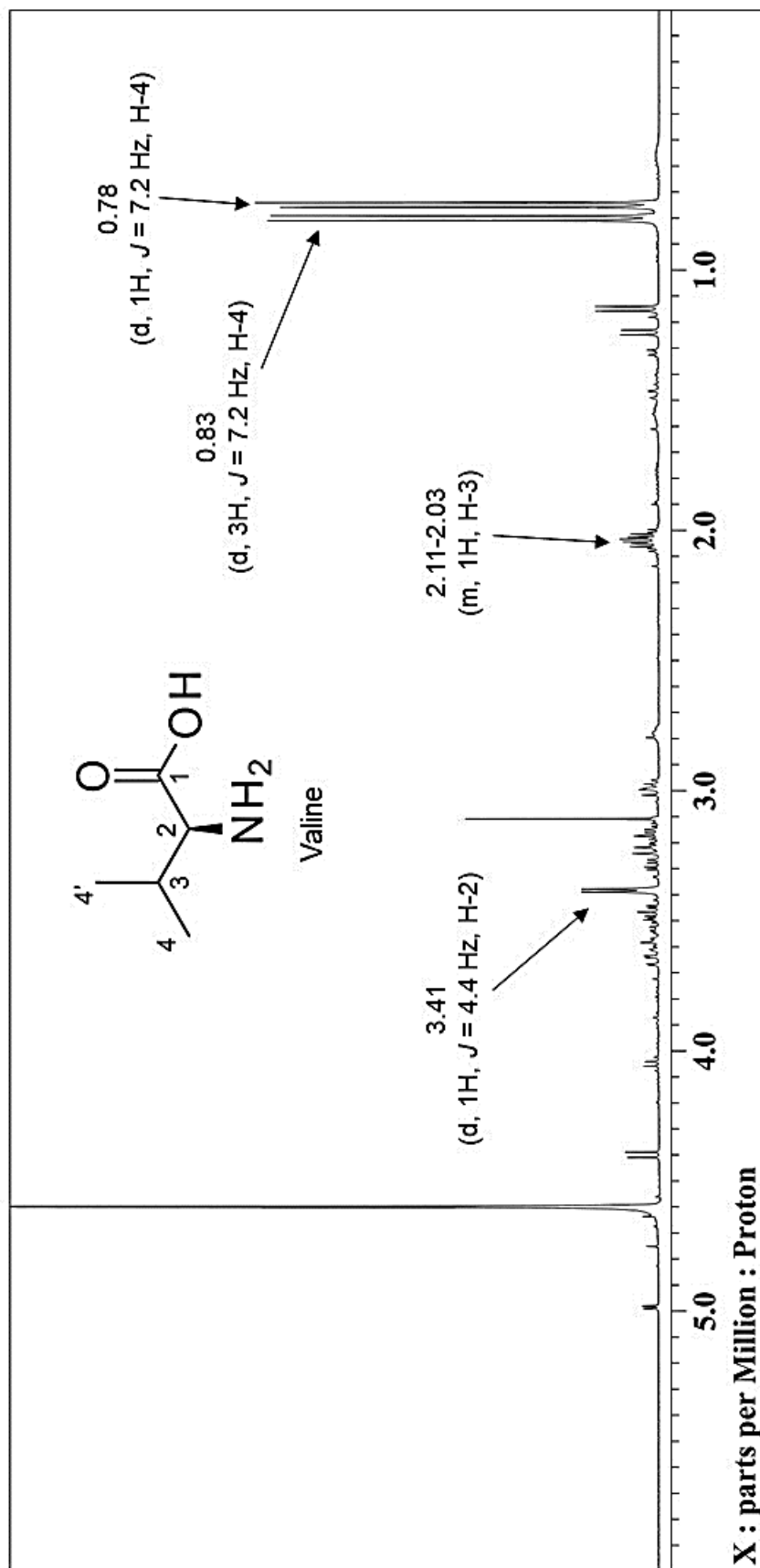


Figure 14. ¹H-NMR spectrum of fraction G

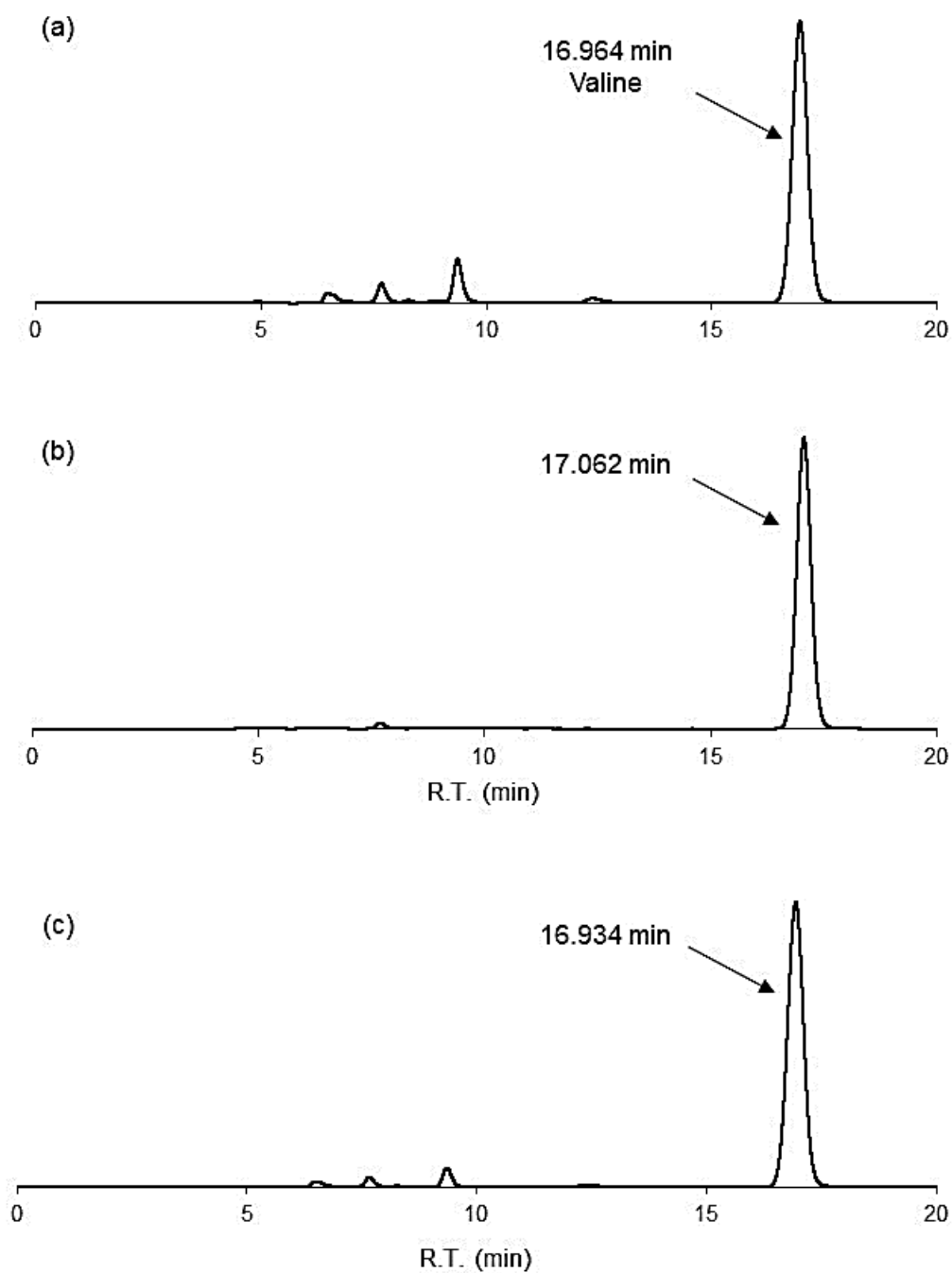


Figure 15. HPLC analyses of fraction G. (a) HPLC analysis of fraction G. (b) HPLC analysis of valine of standard. (c) HPLC co-chromatography analysis of fraction G and valine of standard.

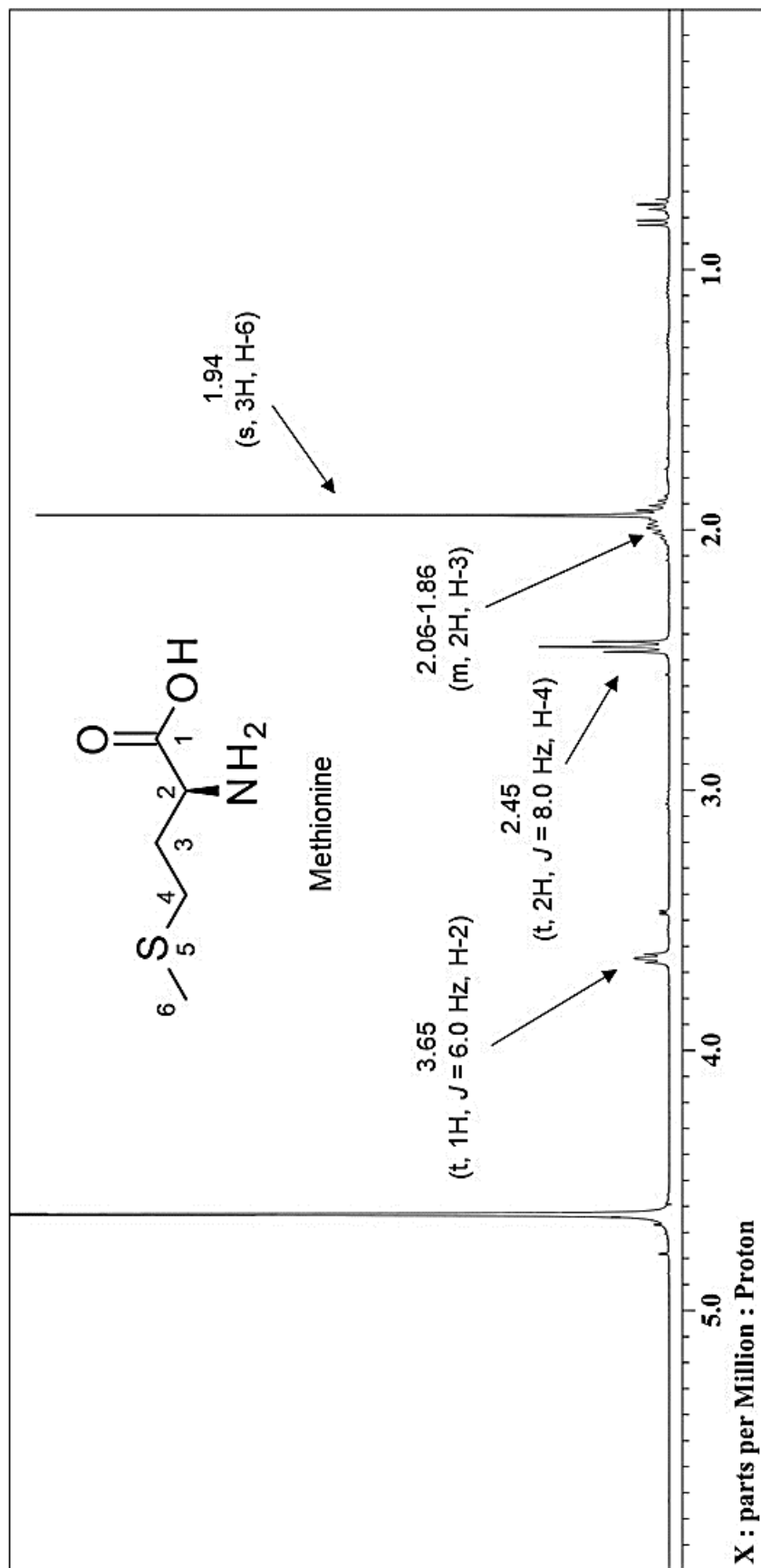


Figure 16. ¹H-NMR spectrum of fraction H

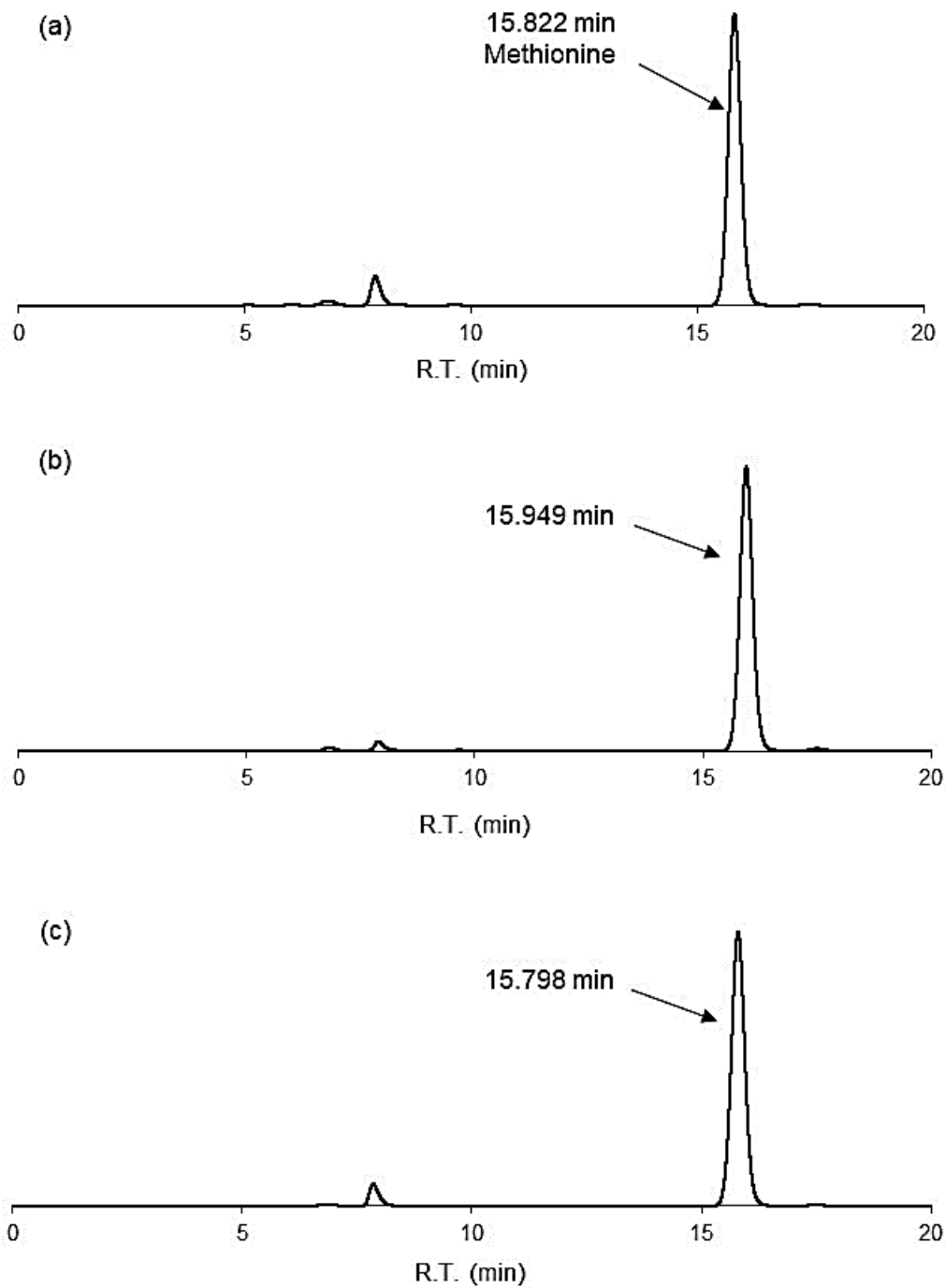


Figure 17. HPLC analyses of fraction H. (a) HPLC analysis of fraction H. (b) HPLC analysis of methionine of standard. (c) HPLC co-chromatography analysis of fraction H and methionine of standard.

第 2 項 神経突起形成促進作用を示すアミノ酸のスクリーニング

Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を指標にして鶏冠加水分解物を精製し、それぞれスレオニン、アラニン、バリン、メチオニンを主成分とする 4 つ画分を得た。そこで、20 種類の L-アミノ酸をスクリーニングし、Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を有するアミノ酸を調査した。その結果、バリンとメチオニンが有意な神経突起形成促進作用を示した (Figure 18 d, e)。バリンとメチオニンは、それぞれ、活性画分 G と H の主成分と一致していた。バリンとメチオニンの神経突起形成促進作用は、これまでに報告されていない新規の作用として見いだした。20 種類のアミノ酸の中で、最も強い活性を示したバリンで処理した PC12 細胞の形態を Figure 19 に示している。また、バリンとメチオニンの L 体と D 体は、それぞれ類似した活性の傾向を示した (Figure 20)。この結果より、バリンとメチオニンにおいて、光学異性体間で活性の影響はないことが明らかとなった。評価した 20 種類の L-アミノ酸の内、バリンとメチオニン以外のアミノ酸は活性を示さなかった (Figure 18)。活性画分 E と F の主成分であったスレオニンとアラニンは活性を示さなかった (Figure 18 b, f) ことから、これらの画分が示す神経突起形成促進作用は、各画分に微量に含まれる他の成分によるものであると示唆された。

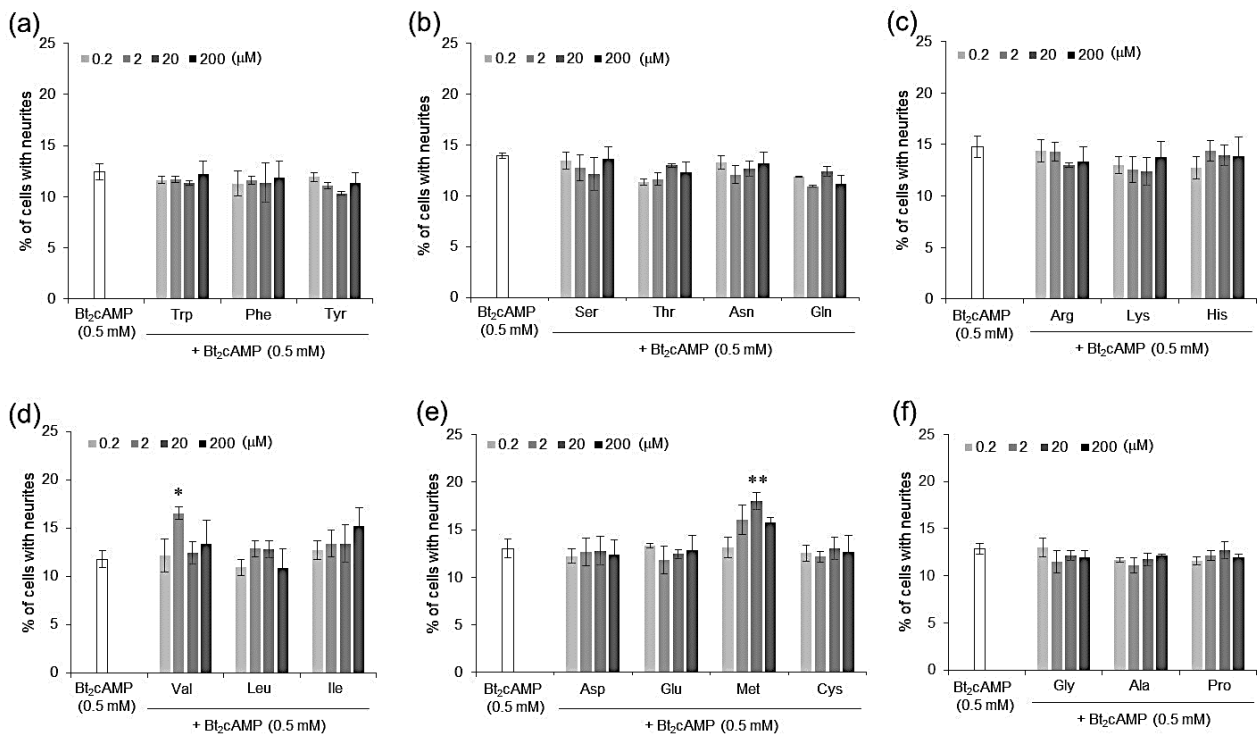


Figure 18. Neurite outgrowth-promoting activities of 20 kinds of amino acids in the presence of Bt₂cAMP in PC12 cells. Promoting activities of Trp, Phe, and Tyr (a), Ser, Asn, Gln, and Thr (b), Arg, Lys, and His (c), Leu, Ile, and Val (d), Asp, Glu, Cys, and Met (e), and Gly, Ala, and Pro (f) for neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the amino acids at 0.2-200 μM in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (Dunnett's test), as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

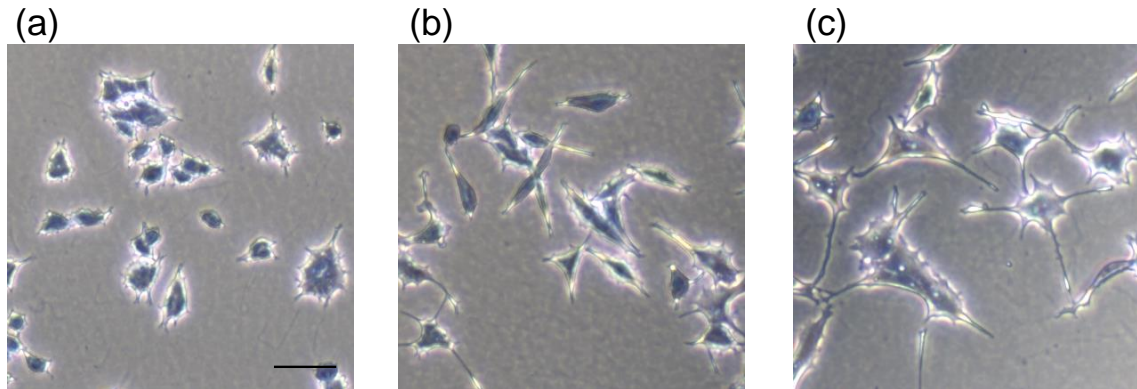


Figure 19. Photomicrographs of PC12 cells treated with medium only (a), 0.5 mM Bt₂cAMP (b), and mixture of 2 μM valine and 0.5 mM Bt₂cAMP (c). PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with medium only, Bt₂cAMP at 0.5 mM, or mixture of valine at 2 μM and Bt₂cAMP at 0.5 mM. After 24 h, treated cells were fixed with 1% glutaraldehyde and stained with Giemsa stain solution. Scale bar = 50 μm.

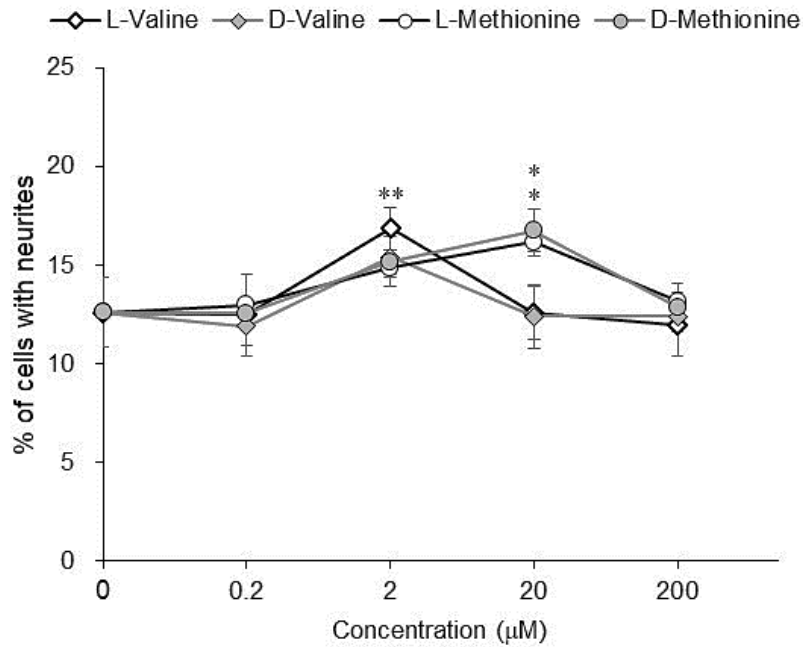


Figure 20. Neurite outgrowth-promoting activities of L-valine, D-valine, L-methionine, and D-methionine in the presence of Bt₂cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the amino acids at 0.2-200 μM in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

バリンは、必須アミノ酸であり、分岐鎖アミノ酸の一種である。分岐鎖アミノ酸は、運動による筋肉の消耗を抑制する効果³²、食欲不振や栄養状態の改善効果³³、肝性脳症患者の症状改善効果³⁴が確認されている。また、アルツハイマー病患者の血清中のバリン濃度が、健常者と比べて低下していることが報告されているが³⁵、バリンとアルツハイマー病の関係については明らかにされていない。メチオニン必須アミノ酸であり、含硫アミノ酸の一種である。メチオニンは、肝保護作用³⁶や HIV 感染者における免疫力低下抑制作用³⁷が知られている。また、S-アデノシルメチオニンは、脳由来の神経栄養因子の発現を増加させることにより、神経保護的な役割を果たすことが分かっている³⁸。このように、バリンやメチオニンには様々な機能があり、アルツハイマー病に有効な機能も報告されている。しかし、バリンやメチオニンの神経突起形成に関連する報告されていない。本研究では、バリンとメチオニンの神経突起形成促進作用を新規の作用として見いだした。

第3項 アミノ酸混合物の神経突起形成促進作用

活性画分 G と H のそれぞれの主成分であるバリンとメチオニンは有意な神経突起形成促進作用を示したが、活性画分 E と F の主成分であるスレオニンとアラニンはアミノ酸のスクリーニングにおいて活性を示さなかった。そのため、画分 E と F は、それぞれ微量に含まれている化合物の効果によって神経突起形成促進作用を發揮していると考えられた。¹H-NMR 分析および HPLC 分析では、画分 E に微量に含まれている少量の混合化合物は、同定することができなかった。一方で、画分 F はアラニンとバリンが約 10:1 の割合で混合していることが明らかとなった (Figures 12, 13)。そこで、画分 F に含まれるアラニンとバリンの混合物の Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を調査するために、アラニンとバリンの混合物 (アラニン:バリン = 10:1) の活性を評価し、アラニンとバリンの活性と比較した (Figure 21)。アラニンとバリンの混合物は、低濃度 (0.2 μM のアラニンと 0.02 μM のバリンの混合物) から高濃度 (20 μM のアラニンと 2 μM のバリンの混合物) の広い濃度幅において有意な活性を示した。アラニンは、単独では活性を示さず、バリンは、単独では 2 μM から 20 μM の濃度で有意な活性を示した。バリンは、単独で活性を發揮するために、2 μM の濃度が必要であったが、アラニンとバリンの混合物は、バリンの最小濃度が 0.02 μM で、有意に神経突起形成促進作用を發揮した。また、アラニンとバリンの混合物によって誘導される神経突起形成率は、バリン単独で誘導されるものと同程度もしくはそれ以上であった。この結果より、アラニンは、バリンと共存する条件で、バリンの活性を増強することが示唆された。アミノ酸は、それらが混合することによって、さらに強い神経突起形成促進作用を發揮する可能性があることが考えられた。

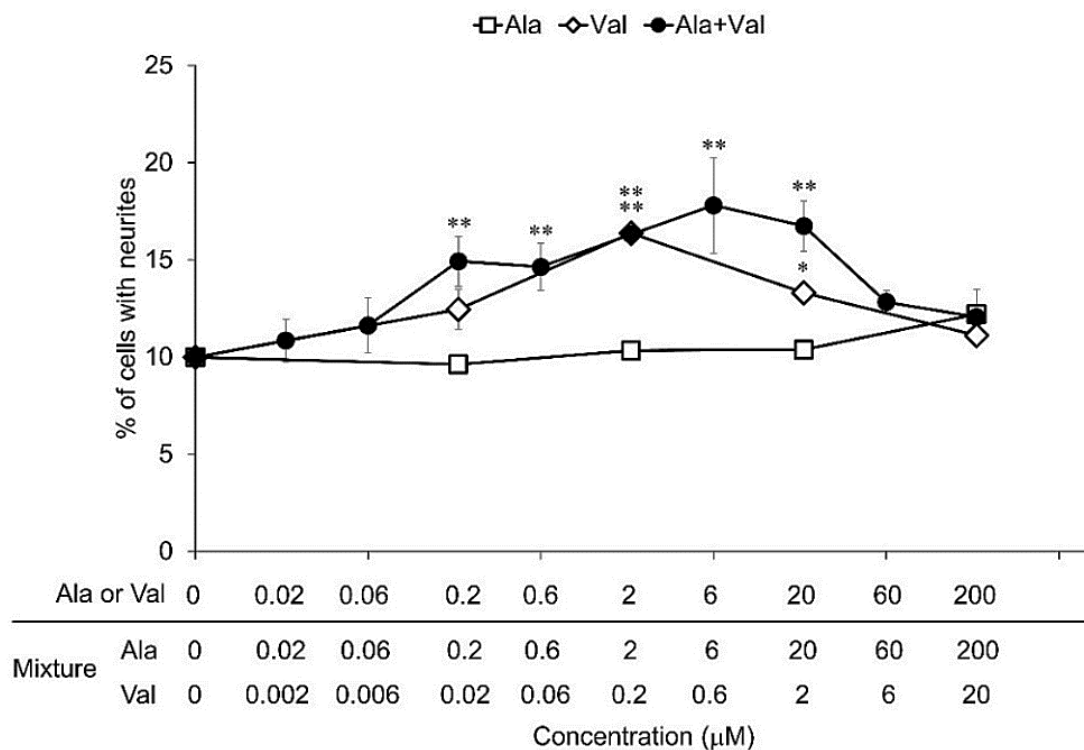


Figure 21. Neurite outgrowth-promoting activities of alanine, valine, and their mixture in the presence of Bt₂cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the samples (final concentrations: from 0.02 μ M of alanine and 0.002 μ M of valine to 200 μ M of alanine and 20 μ M of valine) in the presence of Bt₂cAMP (0.5 mM). The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300–400 cells. The data represent means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett’s test), as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

アラニンとバリンの混合物は、有意な神経突起形成促進作用を示すことが明らかとなった。そこで、単独で活性を発揮するアミノ酸であるバリンとメチオニンを混合することでさらに活性が向上する可能性があると考えられたため、バリンとメチオニンを等量ずつ混合した条件で Bt_2cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を評価した。また、バリンとメチオニンからなるジペプチド ($H\text{-Val-Met-OH}$, $H\text{-Met-Val-OH}$) の活性を評価した。その結果、バリンとメチオニンの混合物は $0.2 \mu\text{M}$ から $200 \mu\text{M}$ の広い濃度範囲で有意な神経突起形成促進作用を示し、バリンは単独で $2 \mu\text{M}$ 、メチオニンは単独で $20 \mu\text{M}$ の濃度で最も高い活性を示した (**Figure 22 a**)。一方で、バリンとメチオニンからなるジペプチドは、バリンとメチオニンの混合物よりも弱い神経突起形成促進作用を示した (**Figure 22 b**)。バリンとメチオニンの混合物は、バリンとメチオニンがそれぞれ単独で活性を示す濃度よりも低い濃度で、強い活性を示した。また、バリンとメチオニンの混合物の神経突起形成率は、バリンとメチオニンをそれぞれ単独で処理した場合よりも高かった。さらに、バリンとメチオニンの混合物は、 NGF 誘導性の神経突起形成を濃度依存的に促進し、混合物が示した神経突起形成率は、バリンとメチオニンをそれぞれ単独で処理した場合よりも高い数値を示した (**Figure 23 a**)。そして、バリンとメチオニンのジペプチドは、 NGF 存在下では神経突起形成促進作用を示さなかった (**Figure 23 b**)。これらの結果から、バリンとメチオニンの混合物は、神経突起形成において相乗的な促進作用を発揮することが示唆された。

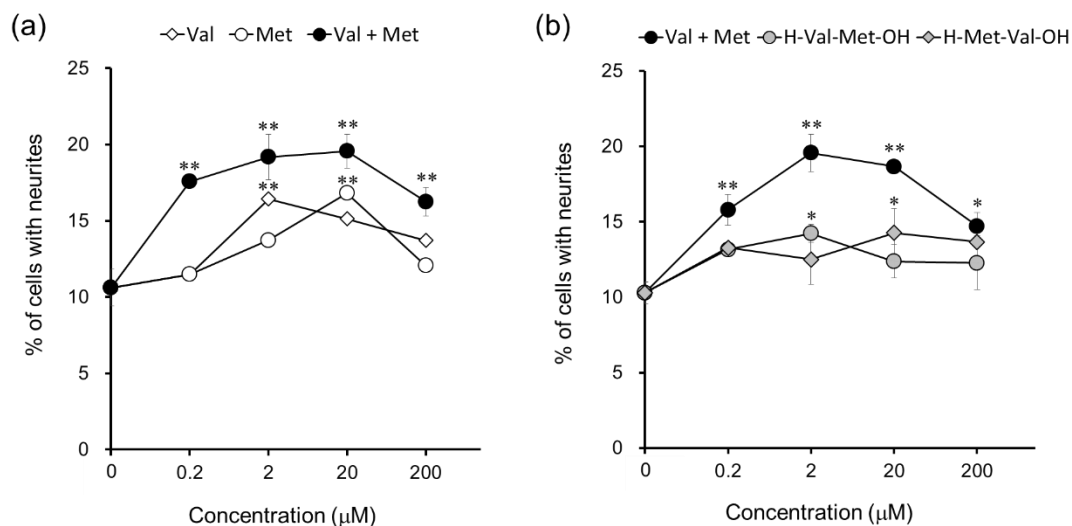


Figure 22. Neurite outgrowth-promoting activities of valine, methionine, their mixture, and their dipeptide in the presence of Bt₂cAMP in PC12 cells. **(a)** Promoting activities of valine and methionine and a mixture of equal amounts of valine and methionine for neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. **(b)** Promoting activities of a mixture of equal amounts of valine and methionine and their dipeptides (H-Val-Met-OH, H-Met-Val-OH) for neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at concentrations of 0.2-200 μM in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test), as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

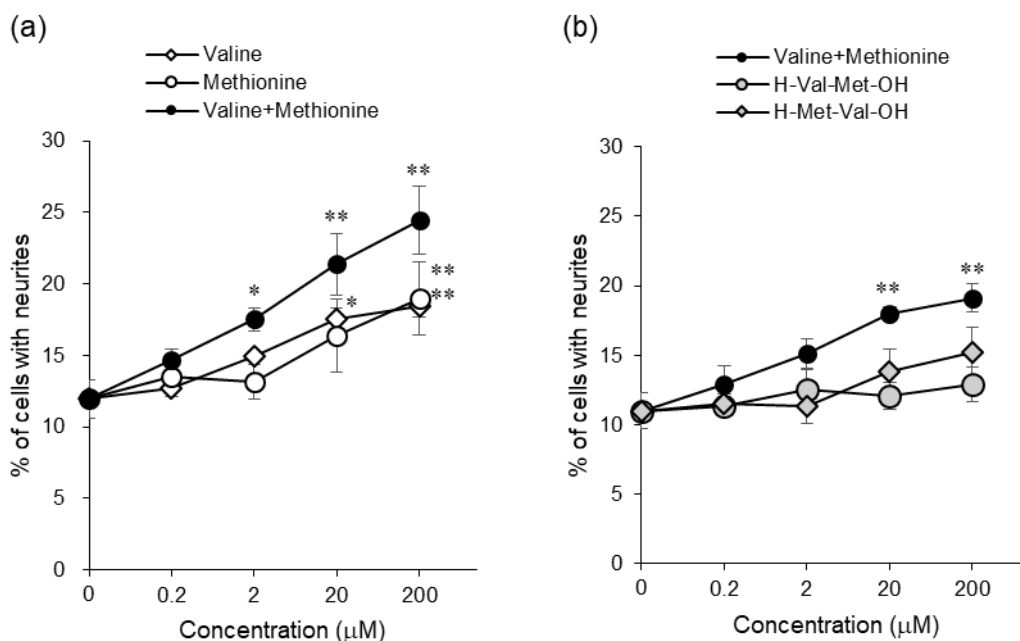


Figure 23. Neurite outgrowth-promoting activities of valine, methionine, their mixture, and their dipeptides in the presence of NGF in PC12 cells. (a) Promoting activities of valine and methionine and a mixture of equal amounts of valine and methionine for neurite formation induced by NGF in PC12 cells. (b) Promoting activities of a mixture of equal amounts of valine and methionine and their dipeptides (H-Val-Met-OH, H-Met-Val-OH) for neurite formation induced by NGF in PC12 cells. PC12 cells were plated at 2.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at concentration of 0.2-200 μM in the presence of 10 ng/mL of NGF. The extent of neurite outgrowth was measured at 48 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (10 ng/mL of NGF only).

最後に、鶏冠加水分解物から精製して得られた4つの活性画分の主成分であるスレオニン、アラニン、バリン、メチオニンの混合物の Bt_2cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を調査した。HPLC 分析の結果、鶏冠加水分解物の水層 100 ng/mL には、スレオニンが 6.88 ng/mL、アラニンが 2.31 ng/mL、バリンが 1.74 ng/mL、メチオニンが 0.97 ng/mL 含まれていた (**Figures 24, 25, Table 1**)。スレオニン、アラニン、バリン、メチオニンをこの比率で混合し、鶏冠加水分解物の水層と対応する濃度で神経突起形成促進作用を評価した (**Figure 26**)。その結果、4つのアミノ酸の混合物は、水層 100 ng/mL と同等の濃度、すなわちスレオニンが 6.88 ng/mL、アラニンが 2.31 ng/mL、バリンが 1.74 ng/mL、メチオニンが 0.97 ng/mL の濃度で神経突起形成促進作用を示した。鶏冠加水分解物の水層は、100 ng/mL と 300 ng/mL で有意な活性を示した。4つのアミノ酸の混合物と鶏冠加水分解物の水層の活性の傾向は極めて類似していた。バリンとメチオニンは、単独で活性を発揮するために、それぞれ、少なくとも 2 μM (234.3 ng/mL) と 20 μM (2.98 ng/mL) 必要とする (**Figure 18 d, e**)。これらの濃度は、鶏冠加水分解物の水層が活性を発揮する濃度中に含まれる、バリンとメチオニンの濃度よりもはるかに高かった。スレオニンとアラニンは、単独では活性を示さない (**Figure 18 b, f**)。したがって、鶏冠加水分解物の強い神経突起形成促進作用は、スレオニン、アラニン、バリン、メチオニンの相乗効果によるものであると考えられた。

本研究では、アミノ酸の新規活性として、NGF 増強作用の1つである神経突起形成促進活性を見出した。アミノ酸は血液脳関門を通過して脳に到達することができる³⁹。したがって、鶏冠加水分解物は、アルツハイマー病の予防するための有効な食品として期待される。

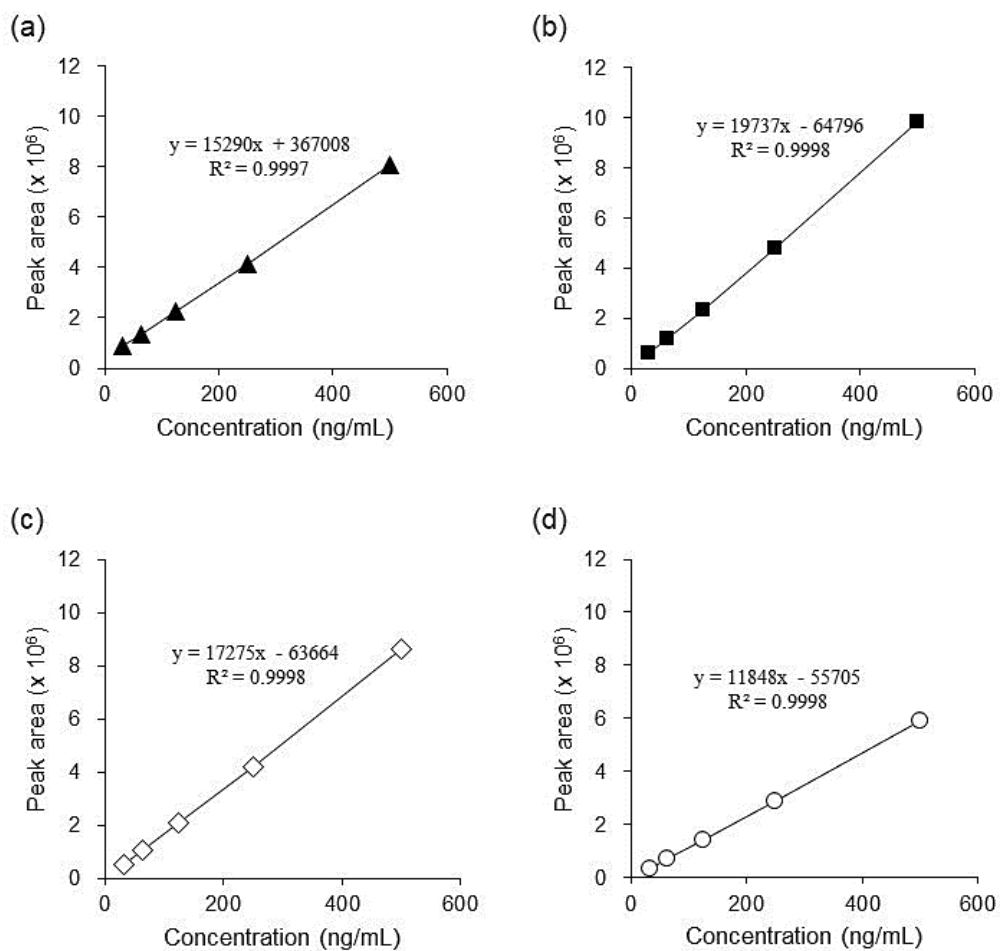


Figure 24. Calibration curves of the reference standards of threonine, alanine, valine, and methionine. Calibration curves of threonine (a), alanine (b), valine (c), and methionine (d) were prepared by plotting the concentration of each compound vs. the area of the peak. Amino acids were labeled with OPA and detected the fluorescence at Ex./Em. = 360 nm/460 nm.

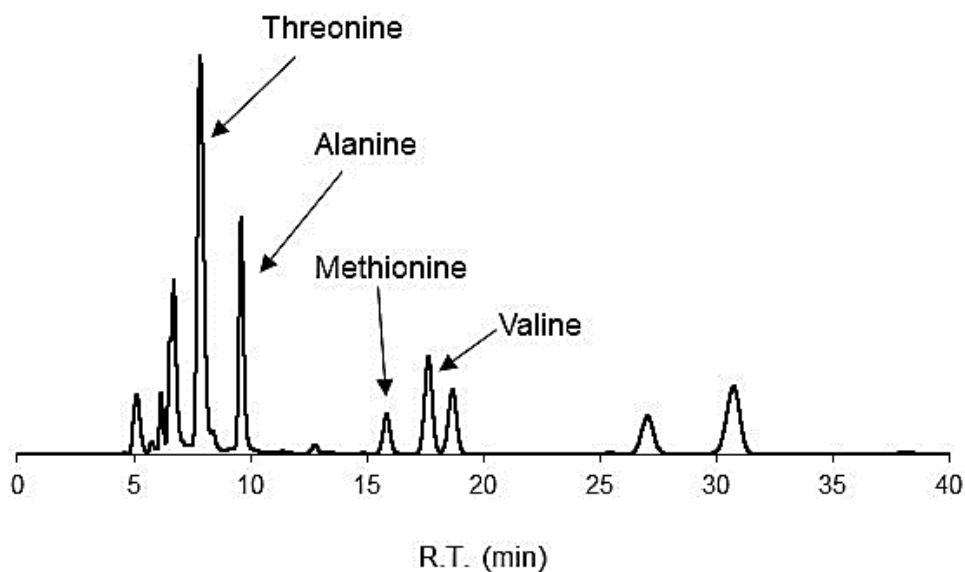


Figure 25. HPLC analysis of the water layer of cockscomb hydrolysate.

Table 1. Quantification of threonine, alanine, valine, and methionine in the water layer (5 mg/mL) of cockscomb hydrolysate.

Cockscomb hydrolysate (5 µg/mL)			
samples	R.T. (min)	peak area	concentration (ng/mL)
Threonine	7.843	4889224	343.8
Alanine	9.598	2218838	115.7
Methionine	15.842	518548	48.5
Valine	17.641	1435259	86.8

Concentration of each compound was determined from the relative peak area with reference to a calibration plot (**Figure 24**) obtained with the authentic commercial standard.

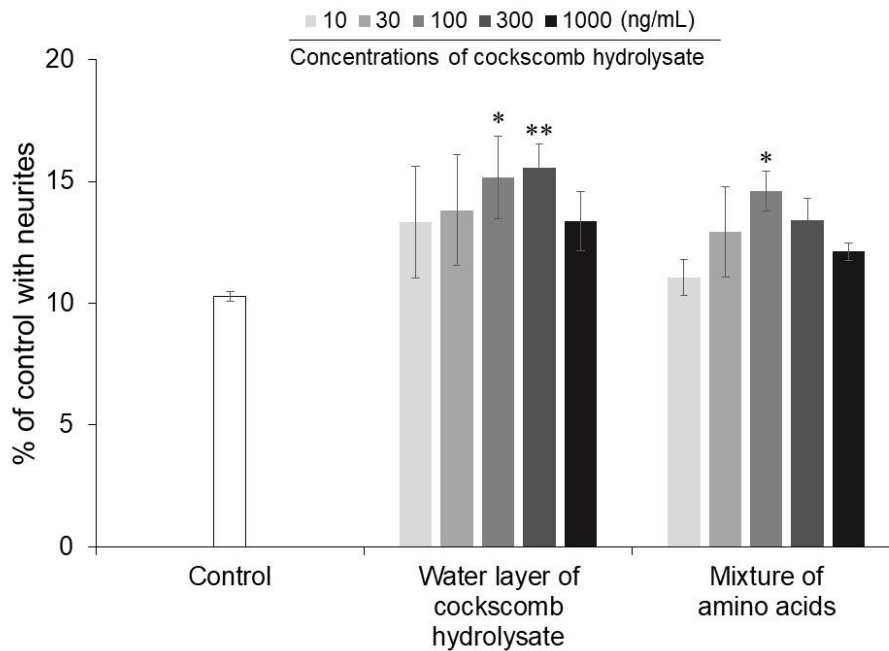


Figure 26. Neurite outgrowth-promoting activities of the water layer of cockscomb hydrolysate and a mixture of threonine, alanine, valine, and methionine in the presence of Bt₂cAMP. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with 10-1000 ng/mL of the water layer or mixture of amino acids consists of threonine, alanine, valine, and methionine corresponding to the concentration of cockscomb hydrolysate. The concentration of each amino acid in the mixture corresponding to the water layer of cockscomb hydrolysate at 100 ng/mL is 6.88 ng/mL for threonine, 2.31 ng/mL for alanine, 1.74 ng/mL for valine, and 0.97 ng/mL for methionine. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test), as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

第4節 第1章の結論

鶏冠加水分解物より、PC12細胞において Bt_2cAMP による神経分化誘導下で、低濃度で有意な神経突起形成促進作用を示す4つの画分を精製した。 ^1H-NMR と HPLC 分析により、4つの活性画分の主成分が、それぞれスレオニン、アラニン、バリン、メチオニンであることが明らかとなった。アミノ酸のスクリーニングにおいて、バリンとメチオニンは活性を示したが、スレオニンとアラニンは活性を示さなかった。アラニンを主成分とする活性画分の ^1H-NMR および HPLC 分析より、バリンがアラニンの約10分の1の割合で画分に混合されていることが明らかとなった。一方、他の3つの活性画分に少量混入している化合物は同定されなかった。活性を有さないアラニンと、活性を有するバリンの混合物は、バリン単独で処理した条件より広い濃度範囲で、高い神経突起形成率を示した。このことより、アラニンがバリンの活性を増強していることが示唆された。また、バリンとメチオニンの混合物は、バリンもしくはメチオニンを単独で処理した場合より広い濃度範囲で、高い神経突起形成率を示した。さらに、鶏冠加水分解物の水層に相当する濃度比率で、スレオニン、アラニン、バリン、メチオニンを混合し、活性を評価したところ、アミノ酸混合物の活性は、水層の活性の傾向と非常によく似ていることが明らかとなった。有意な活性を示したアミノ酸混合物中の各アミノ酸濃度は、いずれも単独では活性を発揮できないほど低濃度であった。これらの結果より、鶏冠加水分解物の強い神経突起形成促進作用は、数種類のアミノ酸の相乗効果によるものであることが示唆された。本研究において、アミノ酸の新規作用として、NGF 増強作用の1つである神経突起形成促進作用を見いだした。アミノ酸は血液脳関門を通過して脳に到達することができる。これらの事実から、鶏冠加水分解物がアルツハイマー型認知症の予防に有効な食品である可能性が明らかとなった。

第2章 シャクヤクの花由来の神経突起形成促進物質

第1節 はじめに

食用花は、食品の美観を向上させるために、食品の添え物として使用されている。また、花に含まれる生物活性物質が健康増進に寄与することから、近年、食用花への関心が高まっている。食用菊 (*Chrysanthemum morifolium*) 花エキス由来のトリテルペンジオール、トリオールおよびその脂肪酸エステルは、抗炎症作用を示すことが報告されている⁴⁰。中国の薬用・食用植物である *Camellia nitidissima* の kaempferol 配糖体は、advanced glycation end-products (AGEs) の生成を抑制することが知られており⁴¹、塩酢漬けの加工食品として用いられる桜の花から見つかった 1-*O*-(*E*)-caffeoyl- β -D-glucopyranoside も AGEs 生成を抑制することが報告されている⁴²。*Prunus persica* から単離された mandelamide は抗脂肪生成作用を示すことが報告されている⁴³。シャクヤク (*Paeonia lactiflora*) の花は、菊の花や桜の花と同様に食用とされている。*Paeonia lactiflora* は、中国や東アジアに自生するヒユ科に属する多年生植物で、甘く爽やかな香りが特徴で、観賞用として広く栽培されている⁴⁴。*Paeonia lactiflora* の根は、古くから薬用として利用されており⁴⁵、根に含まれるモノテルペングルコシドである paeoniflorin は、抗糖尿病活性⁴⁶、抗炎症活性⁴⁷、アミロイド β による神経毒性に対する保護活性⁴⁸を有することが知られている。しかし、ハーブティーとして利用されている *Paeonia lactiflora* の花から抽出された生物活性物質については、これまで報告されていない。

近年、植物性の食品由来成分のアルツハイマー病などの認知機能疾患に対する作用が研究されている。ショウガ (*Zingiber officinale var. officinale*) の根茎から単離された 6-ショウガオールは、PC12 細胞において、脳の記憶や学習に関係する神経栄養因子 (nerve growth factor; NGF) と同等の神経突起形成作用を示す⁴⁹。セロリ (*Smyrniolum olusatrum* L.) の花から単離されたイソフラノジエンは、NGF の存在下で神経突起形成促進作用を示す⁵⁰。これらの化合物は、神経変性疾患の予防や治療に有益な利用が可能であると考

えられている。*Paeonia lactiflora* の花はハーブティーとして日常的に摂取できることから、*Paeonia lactiflora* の花から神経突起形成作用または神経突起形成促進作用を示す化合物を発見することは、健康の維持・増進のみならず、認知機能障害の予防に貢献することが期待される。本章では、*Paeonia lactiflora* の花から抽出した化合物の PC12 細胞における神経突起形成促進作用を調査した。また、単離した化合物とその類似体における構造活性相関を研究した。さらに、抗酸化活性、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性についても評価した。

第2節 実験方法

第1項 実験試薬

Isorhamnetin-3-*O*-glucoside (ChromaDex Inc)、astragalin、isoquercitrin、kaempferol (Cayman Chemical Company)、isorhamnetin (東京化成工業株式会社)、quercetin (シグマアルドリッチジャパン株式会社) を標準試料として、神経突起形成促進作用、抗酸化作用およびアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害活性を評価した。神経分化誘導剤として dibutyryl cyclic AMP (Bt₂cAMP, シグマアルドリッチジャパン株式会社) および recombinant rat β -nerve growth factor (NGF, Cat.556-NGF、R&D SYSTEMS) を用いた。抗酸化作用の評価には、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (シグマアルドリッチジャパン株式会社) を使用した。AChE 阻害活性の評価には、*Electrophorus electricus* 由来の AChE (シグマアルドリッチジャパン株式会社)、酢酸 1-ナフチル (東京化成工業株式会社)、Fast Blue B salt (MP Biomedicals) を使用した。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) には、anti-neurofilament 200 antibody produced in rabbits、anti-rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goats、H₂O₂ (シグマアルドリッチジャパン株式会社)、パラホルムアルデヒド、Tween 20 (富士フイルム和光純薬株式会社)、10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) (Cayman Chemical Company) を使用した。カラムクロマトグラフィーには Diaion HP20 (三菱ケミカル株式会社) および TOYOPEARL HW-40F (東ソー株式会社) を使用した。他のすべての溶媒および緩衝液の調製に使用した試薬は、富士フイルム和光純薬株式会社もしくはナカライテスク株式会社から購入した。

第2項 Nuclear magnetic resonance (NMR) スペクトルの分析

NMR スペクトルは、Varian NMR System 600 MHz、CD₃OD を用いて測定した。化学

シフトの値は ppm で表し、各カップリング定数 (J) は Hz で表した。電子スプレーイオン化 (ESI) 高分解能質量スペクトルは、Bruker Daltonics MicrOTOF II 装置で、直接サンプル注入して測定した。Cell-ELISA および DPPH ラジカル消去アッセイは Infinite 200 Pro M Nano+ (テカンジャパン株式会社) で、AChE 阻害活性は Multiskan FC (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) で測定した。

第 3 項 細胞培養

細胞培養の方法は、第 1 章、第 2 節、第 3 項に記載した。

第 4 項 神経突起形成作用、神経突起形成促進作用

神経突起形成作用および神経突起形成促進作用の評価方法は第 1 章、第 2 節、第 4 項に記載した。

第 5 項 *Paeonia lactiflora* の花由来の神経突起形成促進作用を示す化合物の精製

Paeonia lactiflora Pall.の花弁は、2018 年 5 月に県立広島大学庄原キャンパスのフィールド科学教育研究センターで採取した。新鮮な *Paeonia lactiflora* の花弁 (135.90 g, fr. wt.) を 1360 mL の MeOH/H₂O (80/20, v/v) で、室温で 3 日間抽出し、抽出物を蒸発乾固した (19.0 g, dry wt.)。抽出物を 750 mL の H₂O に溶解し、n-hexane (750 mL, 2 回)、EtOAc (750 mL, 2 回)、水飽和 1-BuOH (375 mL, 2 回) の順で分液し、分離した画分をそれぞれ蒸発乾固した (hexane 層: 20.3 mg, EtOAc 層: 5.94 g, 水飽和 1-BuOH 層: 1.21 g, 水層: 7.82 g)。神経突起形成促進作用を示した EtOAc 層を Diaion HP20 カラム (5.0 cm i.d. × 41.0 cm) に供し、段階的に MeOH/H₂O 溶媒 (60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, v/v, 各 800

mL) で溶出させた。MeOH/H₂O (65/35, v/v) で溶出した画分をまとめて濃縮し、その濃縮画分に神経突起形成促進作用を見いだした。さらに、その活性画分 (72.4 mg) を、TOYOPEARL HW-40F (1.5 cm i.d. × 68.0 cm) を用いて、420 mL の MeOH/H₂O (60/40, v/v) で精製し、175 個の画分を得た。画分 90-115 をまとめて濃縮し、その画分が有意な神経突起形成促進作用を示したため、再度 TOYOPEARL HW-40F (1.5 cm i.d. × 67.0 cm) に供し、300 mL の MeOH/H₂O/AcOH (60/39/1, v/v/v) で溶出させて 150 個の画分を得た。有意な神経突起形成促進作用を示した画分 85-90 (compound 1, 2.0 mg) および 99-103 (compound 2, 10.7 mg) を黄色粉末として単離した。

第 6 項 単離した活性化合物の化学構造解析

Compound 1 (isorhamnetin-3-*O*-glucoside) Yellow powder. HRMS: m/z 477.1031 [M-H]⁻ (calcd. for C₂₂H₂₁O₁₂, 477.1038). ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 7.94 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 7.58 (1H, dd, J = 8.1 Hz and 2.1 Hz, H-6'), 6.90 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6 or H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6 or H-8), 5.43 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''), 3.94 (3H, s, OMe), 3.73 (1H, dd, J = 12.0 Hz and 2.4 Hz, H-6''), 3.56 (1H, dd, J = 12.0 Hz and 6.0 Hz, H-6''), 3.47-3.42 (2H, m, H-2'' and H-3''), 3.32-3.29 (overlapped with solvent, H-4''), 3.23 (1H, m, H-5''). これらの ¹H-NMR データは、別の報告にある isorhamnetin-3-*O*-glucoside のデータと一致した⁵¹。また、HPLC による標準品との co-chromatography により、compound 1 は isorhamnetin-3-*O*-glucoside であると同定した。

Compound 2 (astragalin): Yellow powder. HRMS: m/z 447.0926 [M-H]⁻ (calcd. for C₂₁H₁₉O₁₁, 447.0933). ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 8.06 (2H, dd, J = 6.9 Hz and 2.1 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, dd, J = 6.9 Hz and 2.1 Hz, H-3', 5'), 6.40 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6 or H-8), 6.20 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-6 or H-8), 5.27 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1''), 3.69 (1H, dd, J = 12.0 Hz and 2.4 Hz, H-6''), 3.52 (1H, dd, J = 12.0 Hz and 5.4 Hz, H-6''), 3.44 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-2''), 3.41 (1H, t, J = 9.0 Hz, H-3''), 3.32-3.29 (overlapped with solvent, H-4''), 3.21-3.18 (1H, m, H-5''). ¹³C-NMR (150

MHz, CD₃OD): δ 178.1 (C-4), 164.6 (C-7), 161.7 (C-5 or C-9), 160.2 (C-4'), 157.6 (C-2), 157.1 (C-5 or C-9), 134.0 (C-3), 130.9 (C-2', 6'), 121.3 (C-1'), 114.6 (C-3', 5'), 104.3 (C-10), 102.5 (C-1''), 98.4 (C-6 or C-8), 93.3 (C-6 or C-8), 77.0 (C-5''), 76.6 (C-3''), 74.3 (C-2''), 69.9 (C-4''), 61.2 (C-6''). これらの NMR データは、別の報告における astragalín のデータと一致した⁵²。また、HPLC による標準品との co-chromatography により、compound 2 は astragalín であると同定した。

第 7 項 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉作用

DPPH ラジカル消去作用は、既に報告された方法を改変して評価した⁵³。DPPH ラジカル消去作用は、96 ウェルプレートで実施した。EtOH で溶解した DPPH ラジカル (DPPH の終濃度 : 100 μM) 40 μL に、50% クエン酸緩衝液 (10 mM, pH 6.0) /50% EtOH で溶解したフラボノイド (フラボノイドの終濃度 : 10, 20, 40 μM)、または control として 50% クエン酸緩衝液 (10 mM, pH6.0) /50% EtOH を、それぞれ 160 μL ずつ加えた。プレートを暗所で 1 時間、室温でインキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて、524 nm で吸光度を測定した。

第 8 項 アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用

AChE 阻害作用は、既に報告された方法を改変して評価した⁵⁴。AChE 阻害評価は、96 ウェルプレートで実施した。この評価では、認知症の治療に用いられる AChE 阻害剤である donepezil を positive control として使用した。リン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) で溶解したフラボノイド (最終濃度 10, 30, 100 μM) または donepezil (最終濃度 50, 100, 200 nM) 65 μL に対して、AChE 溶液 (100 mM リン酸緩衝液, pH 7.4, 最終濃度 0.1 U/mL) 65 μL を加えた。その後、0.5 mM の酢酸 1-ナフチルを 130 μL 添加し、酵素反応を開始させた。90 秒間混合し、25 °C で 90 秒間インキュベートした後、20 μL の 5% ドデシル

硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、20 μL の Fast Blue B 水溶液（終濃度 0.17 mM）によって発色させた。酵素活性阻害は、紫色に発色したジアゾニウム色素生成後の 620 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定することにより定量した。

第 9 項 Cell-ELISA 法による PC12 細胞のニューロフィラメントの検出

PC12 細胞をコラーゲンコートした 96 ウェルプレートに、 2.0×10^3 cells/90 μL /well で播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 空気相下で培養した。細胞を播種してから 24 時間後、20、60、200 μM の isorhamnetin-3-*O*-glucoside もしくは astragaln（終濃度: 1, 3, 10 μM ）を 5 μL と 200 ng/mL の NGF（終濃度: 10 ng/mL）を 5 μL を培養液に添加した。その後、さらに 48 時間培養し、培地を除去した後、細胞を 100 μL の 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液（100 mM, pH 7.4）で 30 分間、室温で固定した。細胞を固定後、4%パラホルムアルデヒド溶液を除去し、200 μL の PBS(-)（pH 7.4）で 3 回洗浄した。洗浄後、固定した細胞を 50 μL の 0.2% Triton X-100/PBS(-)で 5 分間、室温で透過処理を行った。その後、透過処理した細胞を 200 μL の PBS(-)で 3 回洗浄した後、200 μL の 2.5% BSA/PBS(-)で 1 時間、室温でブロッキングした。ブロッキング後、2.5% BSA/PBS(-)を除去し、一次抗体である 50 μL の anti-neurofilament 200 antibody produced in rabbits/2.5% BSA/PBS(-)（1/1000, v/v）を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。その後、一次抗体を除去し、200 μL の 0.05% Tween 20/PBS(-)で 3 回洗浄し、二次抗体である 50 μL の anti-rabbit IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goats/2.5% BSA/PBS(-)（1/30000, v/v）を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。1 時間後、二次抗体を除去し、0.05% Tween 20/PBS(-)で 3 回洗浄した。抗体に結合した酵素の活性はクエン酸緩衝液（100 mM, pH 5.0）中に 0.1% H_2O_2 を含む 50 μM の 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (ADHP) 溶液（100 μL ）と室温、暗所で反応させることにより検出した。各ウェルの蛍光強度は、マイクロプレートリーダーを用いて Ex./Em.=535/590 nm で測定した。

第3節 結果および考察

第1項 *Paeonia lactiflora* の花由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定

Paeonia lactiflora Pall.の花弁 (135.90 g, fr. wt.) を MeOH/H₂O (80/20, v/v) で抽出し、その抽出物が NGF もしくは Bt₂cAMP 存在下で神経突起形成促進作用を示した (Figure 27)。そこで、*Paeonia lactiflora* の花弁抽出物に含まれる神経突起形成促進物質を単離するために、Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を指標にして精製を行った。抽出物を濃縮した後、H₂O に溶解し、n-hexane、EtOAc、水飽和 1-BuOH で順に分液した。その後、活性を示した EtOAc 層を Diaion HP20 カラムと TOYOPEARL HW-40F カラムで2回精製し、神経突起形成促進作用を示す compound 1 (2.0 mg) と 2 (10.7 mg) を得た。Compound 1 と 2 は、NMR、MS、HPLC 分析 (Figures 28-37) により、それぞれ isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín であると同定した。

単離したフラボノール配糖体である isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín は既知の化合物であり、*Paeonia lactiflora* の花弁に含まれていることは既に報告されている⁵⁵。また、*Sarracenia purpurea* の葉からは isorhamnetin-3-O-glucoside が抗糖尿病活性化合物として単離され^{56,57}、抗菌活性もあることが示されている⁵⁸。*Orostachys japonicus* の地上部からは、カルパイン阻害剤として astragalín が単離された⁵⁹。さらに、astragalín は、アンジオテンシン変換酵素阻害活性⁶⁰や糖化阻害活性⁶¹を示すことが報告されている。本研究では、*Paeonia lactiflora* の花弁から活性を指標にした精製により、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín を単離し、これらの化合物の神経突起形成促進作用を初めて見いだした。

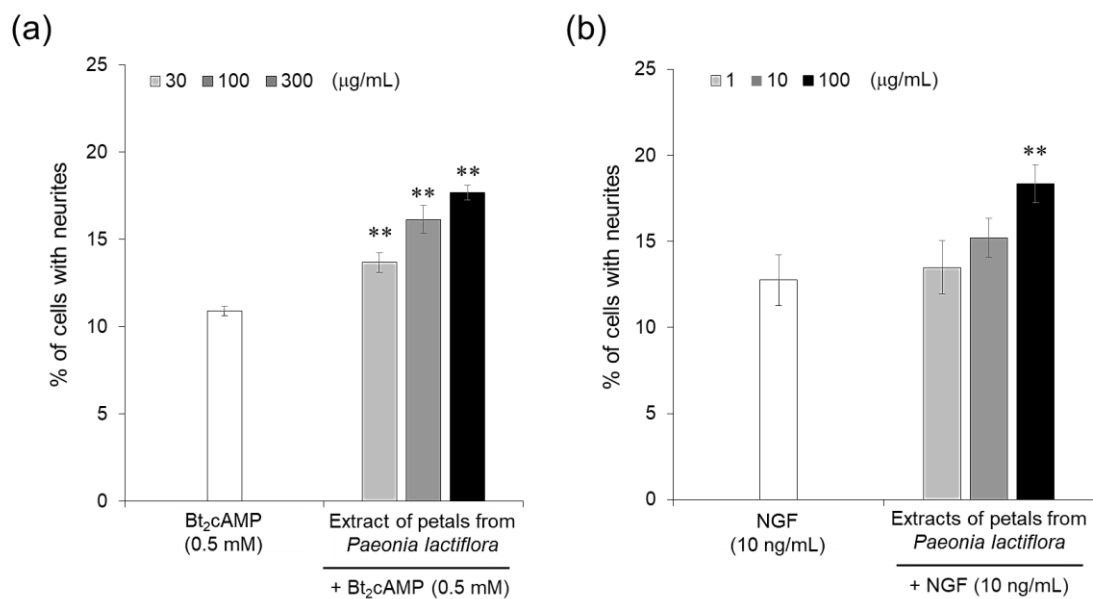


Figure 27 Neurite outgrowth-promoting activity of the extract of the petals from *Paeonia lactiflora* in the presence of Bt₂cAMP or NGF in PC12 cells. (a) Promotion by the extract of the petals from *Paeonia lactiflora* of neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. (b) Promotion by the extract of the petals from *Paeonia lactiflora* of neurite formation induced by NGF in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the extract at 30, 100, and 300 μg/mL in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP or with the extract 1, 10 and 100 μg/mL in the presence of NGF. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h after the addition of Bt₂cAMP or at 48 h after the addition of NGF and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from triplicate cultures. ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only or 10 ng/mL NGF only).

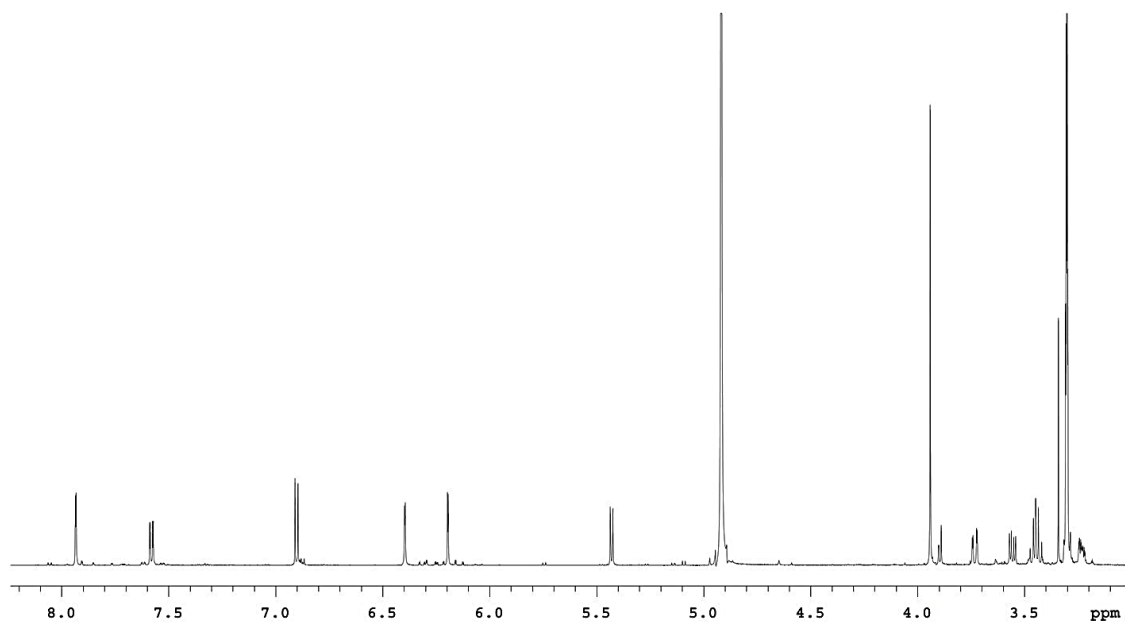


Figure 28 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **1** (isorhamnetin-3-*O*-glucoside)

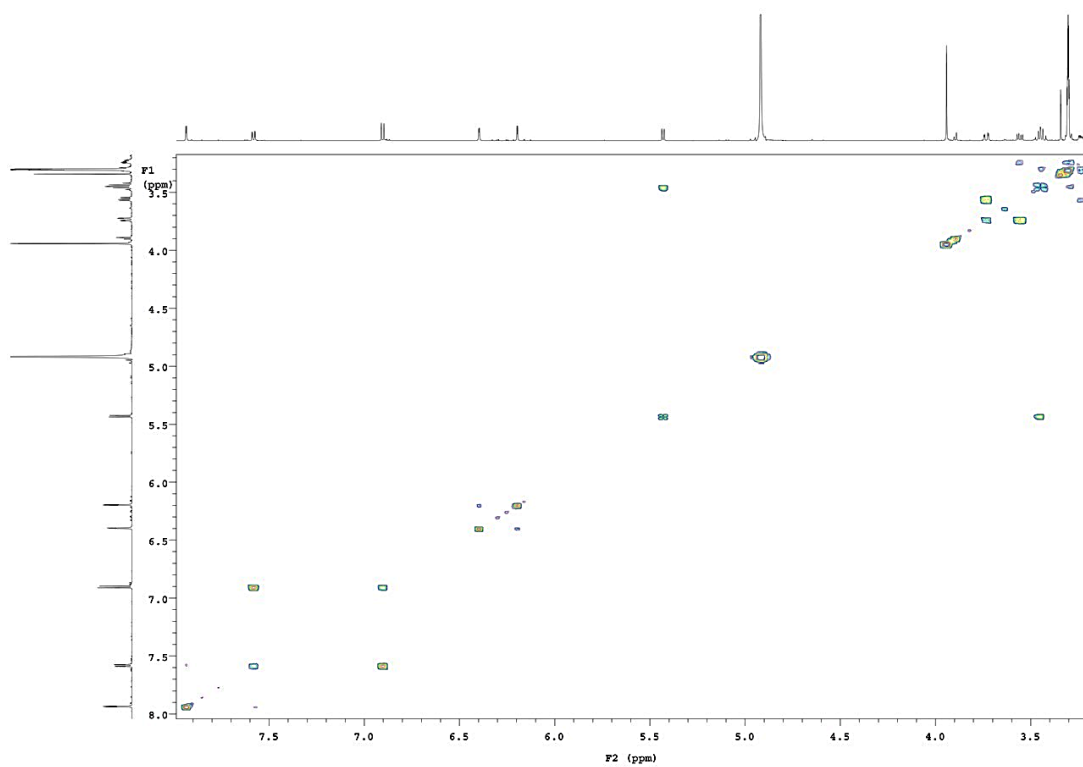


Figure 29 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum of compound **1** (isorhamnetin-3-*O*-glucoside)

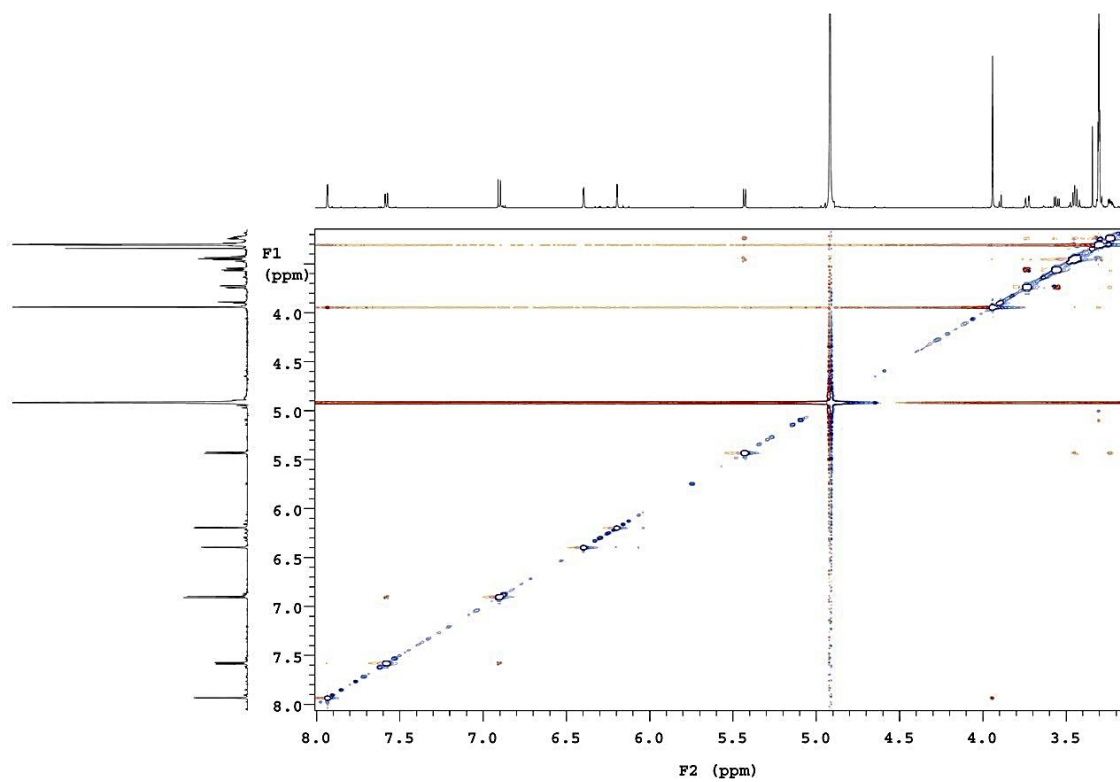


Figure 30. NOESY spectrum of compound **1** (isorhamnetin-3-*O*-glucoside)

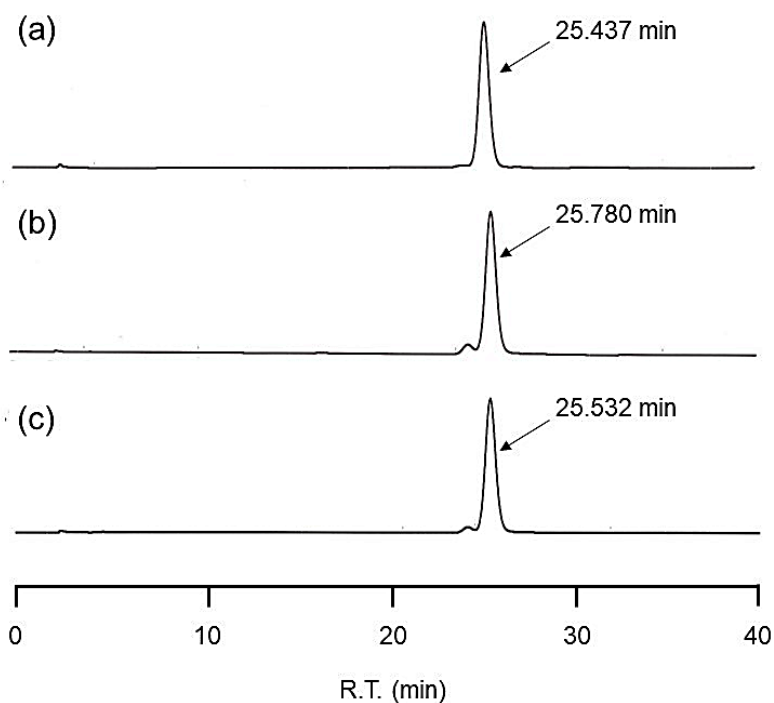


Figure 31. HPLC analyses of compound **1**. (a) HPLC analysis of compound **1**. (b) HPLC analysis of isorhamnetin-3-*O*-glucoside of standard. (c) HPLC co-chromatography analysis of compound **1** and isorhamnetin-3-*O*-glucoside of standard. HPLC analyses were performed on an Inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) with MeOH/H₂O/acetic acid (40/59/1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min. The absorbance at 254 nm was monitored for compound **1** and isorhamnetin-3-*O*-glucoside.

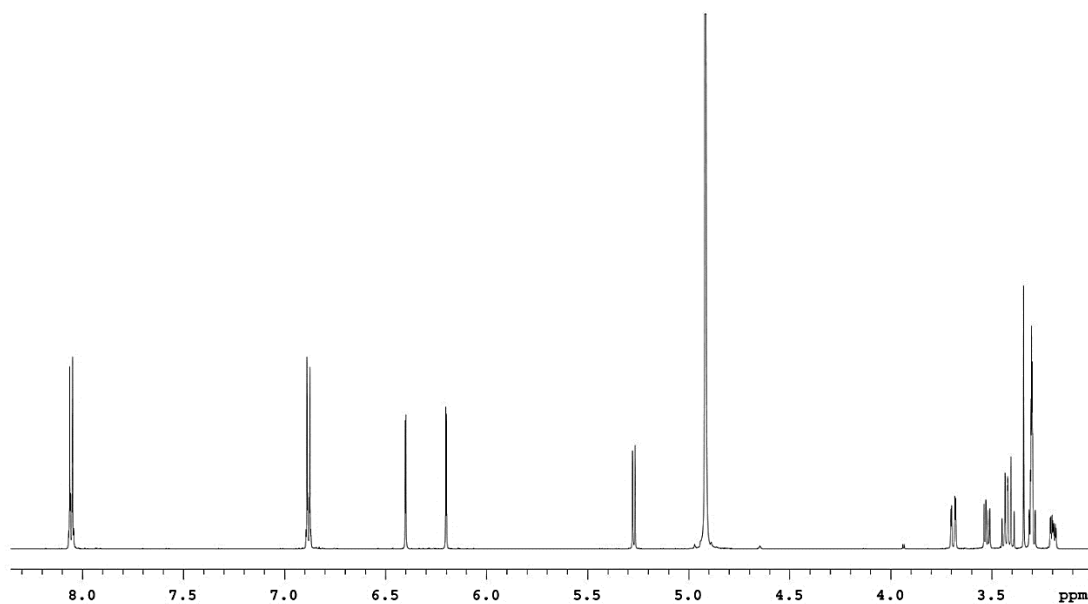


Figure 32. ¹H-NMR spectrum of compound **2** (astragalin)

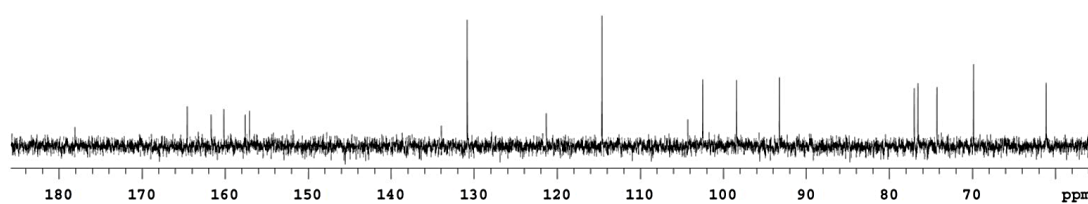


Figure 33. ¹³C-NMR spectrum of compound **2** (astragalin)

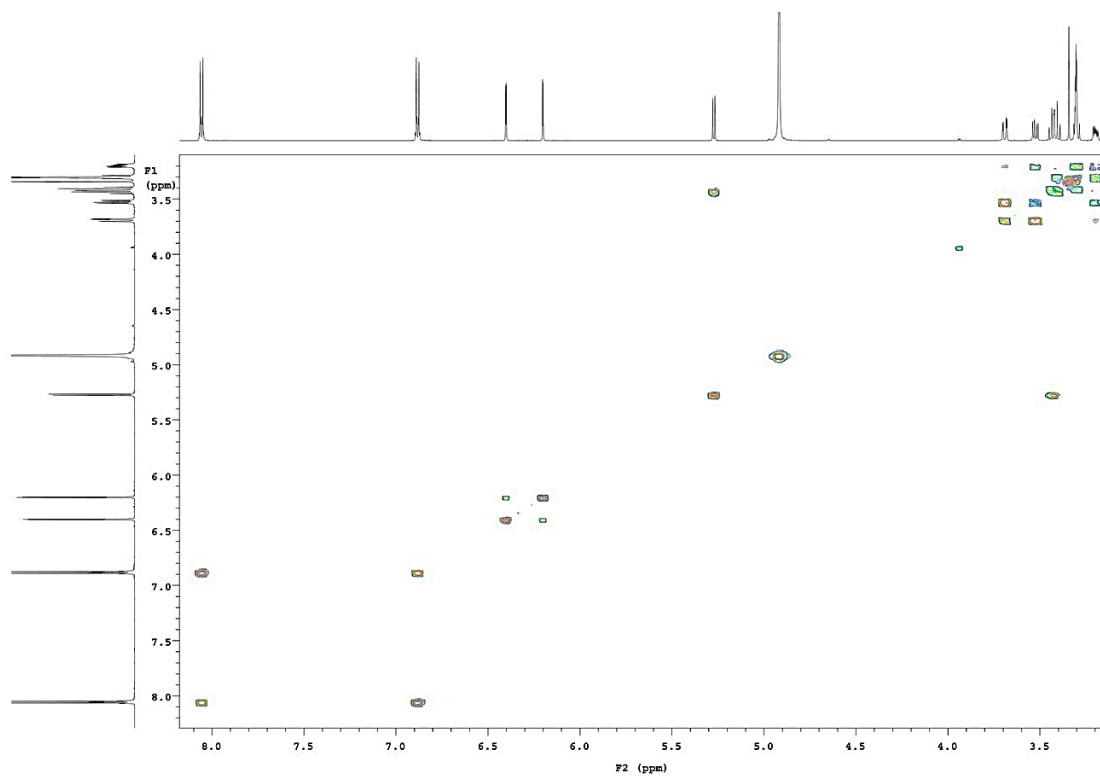


Figure 34. ^1H - ^1H COSY spectrum of compound **2** (astragalin)

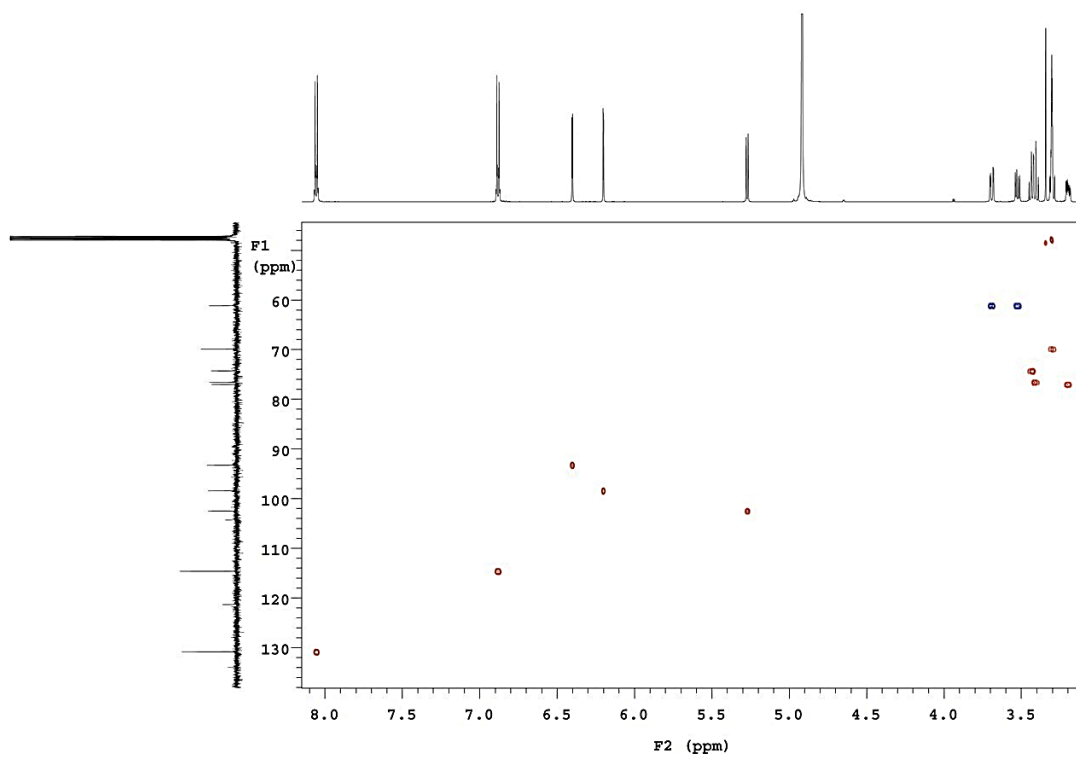


Figure 35. HSQC spectrum of compound **2** (astragalin)

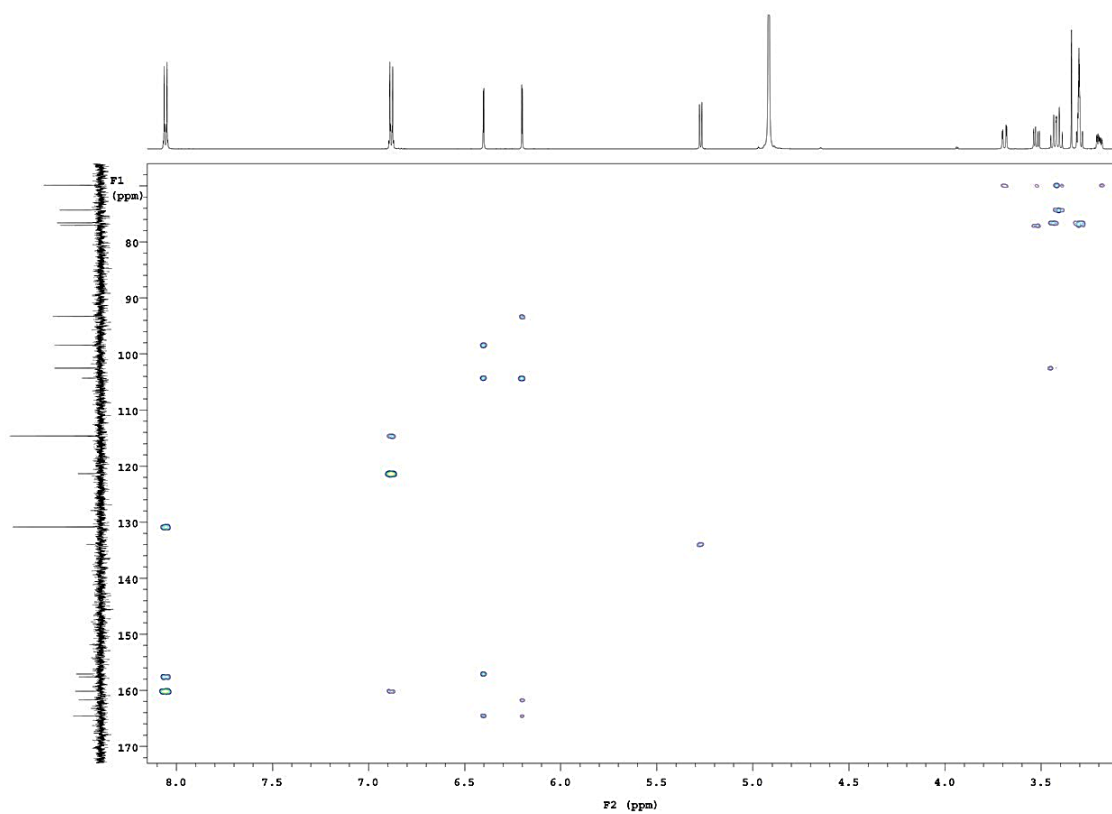


Figure 36. HMBC spectrum of compound **2** (astragalin)

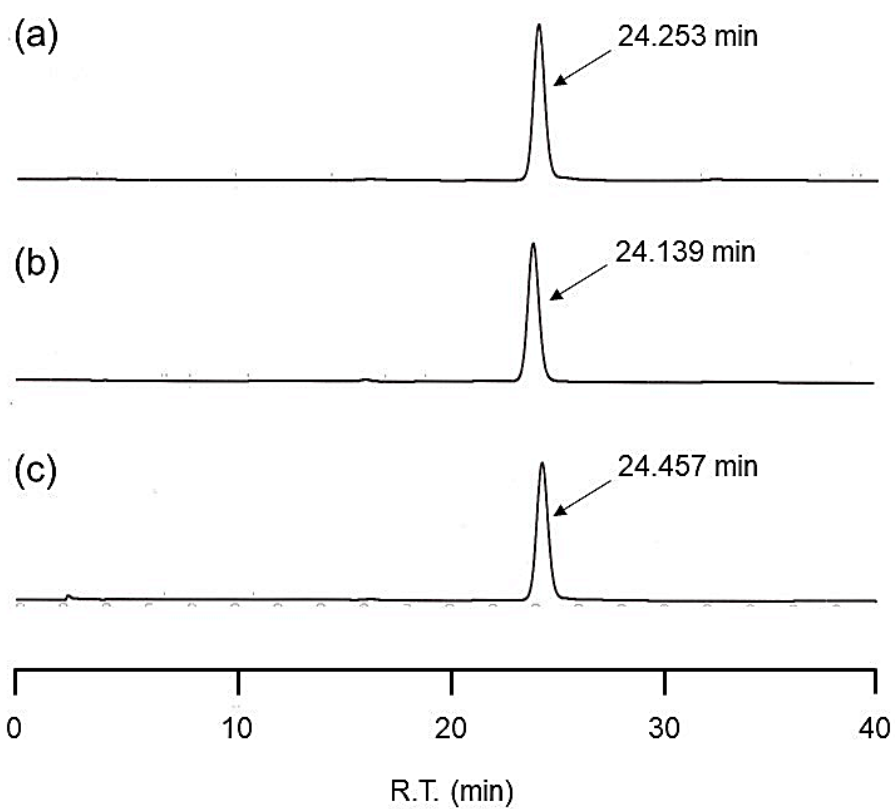


Figure 37. HPLC analyses of compound **2**. (a) HPLC analysis of compound **2**. (b) HPLC analysis of astragalins of standard. (c) HPLC co-chromatography analysis of compound **2** and astragalins of standard. HPLC analyses were performed on an Inertsil ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) with MeOH/H₂O/acetic acid (40/59/1, v/v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min. The absorbance at 254 nm was monitored for compound **2** and astragalins.

第2項 Isorhamnetin-3-*O*-glucoside、astragalin およびその類似体の構造活性相関研究

シャクヤクの花弁抽出物より、Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を示す化合物として、isorhamnetin-3-*O*-glucoside (compound 1) と astragalin (compound 2) を単離した。化学構造の違いによる神経突起形成促進作用の影響を調査するために、isorhamnetin-3-*O*-glucoside、astragalin、isoquercitrin、isorhamnetin、kaempferol、quercetin (**Figure 38**) を用いて Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を評価、比較した (**Figure 39**)。Isorhamnetin と quercetin は、神経突起形成促進作用を有するフラボノールとして知られている^{62,63}。フラボノール配糖体のうち、isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin は 1 μM と 3 μM の濃度で有意な神経突起形成促進作用を示したが、isoquercitrin は活性を示さなかった (**Figure 39 a**)。フラボノール類は濃度依存的に神経突起形成促進作用を示し、その強度はどれも同程度であった (**Figure 39 b**)。フラボノール配糖体である isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin は、それらのアグリコンよりも低い濃度で有意に活性を示し、C3 位のグルコースがこれらのフラボノールの活性を増強する効果を発揮することが考えられた。しかし、C3 位にグルコースを有する isoquercitrin は活性を示さなかった。Isoquercitrin は、isorhamnetin-3-*O*-glucoside の B 環を脱メチル化するか、astragalin の B 環に水酸基を付加することで得られるため、3 種のフラボノール配糖体の中で B 環の極性が最も高い。これらのことより、フラボノール配糖体が神経突起形成促進作用を発揮するためには、B 環の極性がある程度低いことが重要であることが示唆された。C3 位にグルコースを有し、B 環の極性がある程度低い isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin は、神経突起形成促進化合物として知られている isorhamnetin や quercetin よりも強い活性を示した。したがって、強い神経突起形成促進作用を示すためには、C3 位にグルコースを有するだけでなく、ある程度極性の低い B 環を有することが重要であることが示唆された。

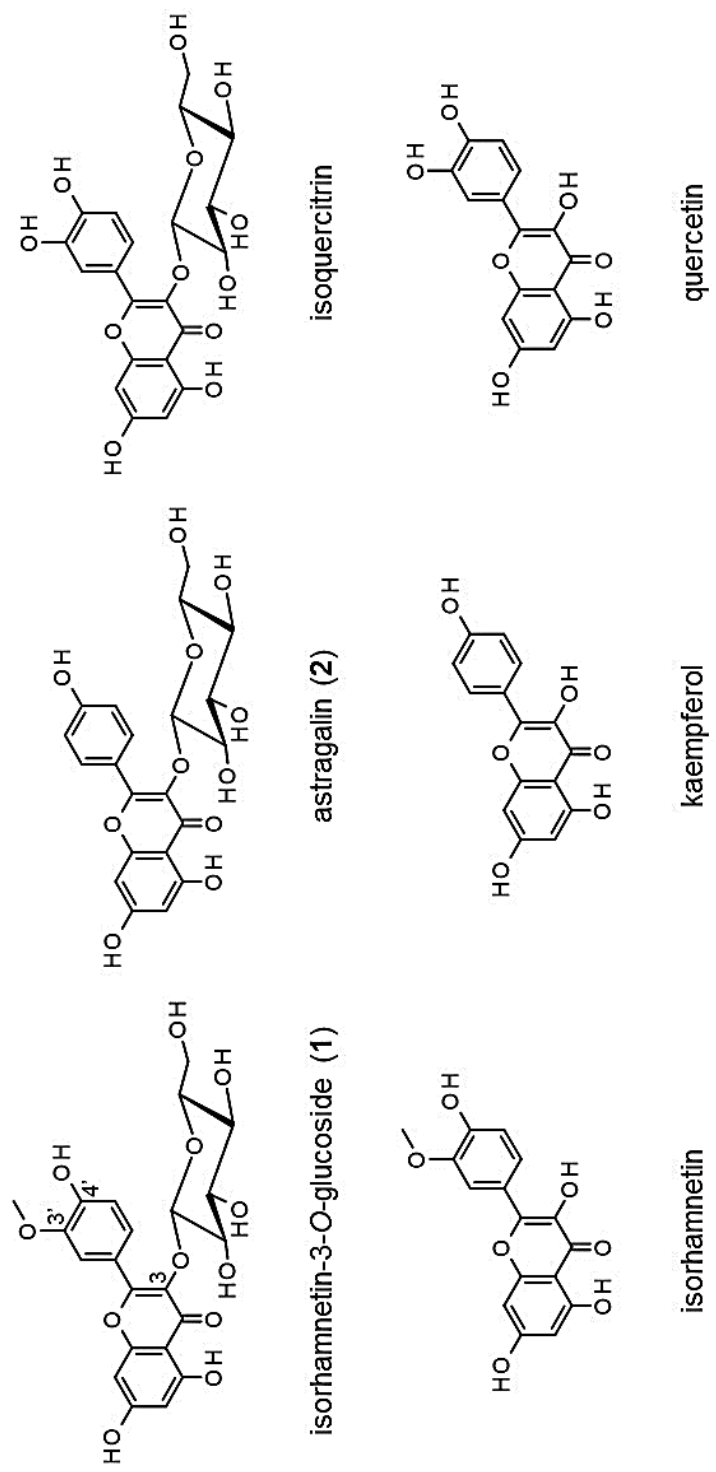


Figure 38. Chemical structures of compounds **1** (isorhamnetin-3-O-glucoside) and **2** (astragalin) isolated from extracts of petals of *Paeonia lactiflora* and the analogs

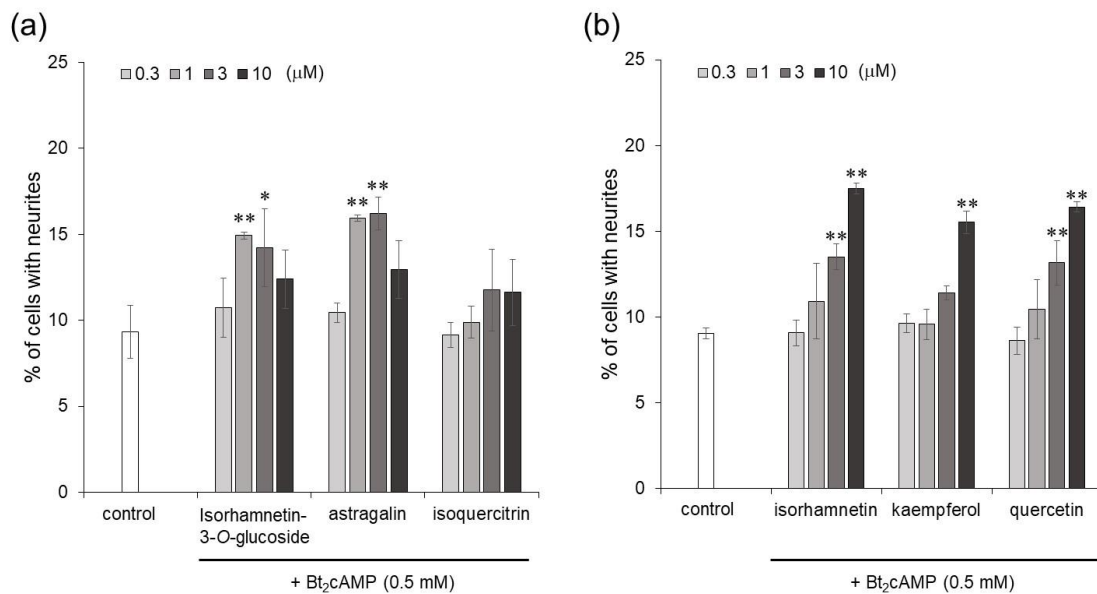


Figure 39. Neurite outgrowth-promoting activities of isorhamnetin-3-*O*-glucoside, astragalol and the analogs in the presence of Bt₂cAMP in PC12 cells. (a) Promotion by flavonol glucosides, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, astragalol and isoquercitrin of neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. (b) Promotion by flavonols, isorhamnetin, kaempferol and quercetin of neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the flavonoids at 0.3, 1, 3 and 10 μM in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only).

第3項 Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalin およびその類似体の 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル捕捉作用

多くのフラボノイドは抗酸化作用を有することが知られている。NGF 刺激によって神経細胞内の活性酸素種 (ROS) 濃度が上昇し、この ROS が細胞内シグナルメディエーターとして作用して神経突起の分化を促進すると考えられている⁶⁴。そこで、神経突起形成促進化合物として *Paeonia lactiflora* の花卉より単離した isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin、およびその類似体の抗酸化作用を調査した。Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalin、isoquercitrin、isorhamnetin、kaempferol、quercetin の抗酸化作用を DPPH ラジカル消去試験により評価した (Figure 40)。Isoquercitrin と quercetin は強い抗酸化作用を示し、isorhamnetin と kaempferol は弱い抗酸化活性を示した。評価したフラボノイドの中で最も強い神経突起形成促進作用を示した isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin は、抗酸化作用をほとんど示さなかった。この結果より、抗酸化作用と神経突起形成促進作用の間には負の相関関係があることが明らかになった。Isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin は比較的弱い抗酸化作用を示したことから、NGF 刺激による神経分化の細胞内シグナルメディエーターである ROS を消去しにくいいため、強い神経突起形成促進作用を発揮していると考えられる。Quercetin など、強い抗酸化作用を示しながら神経突起形成促進作用を示す化合物もあるが、より強い神経突起形成促進作用を示すためには、抗酸化作用が弱いことが重要であると示唆された。

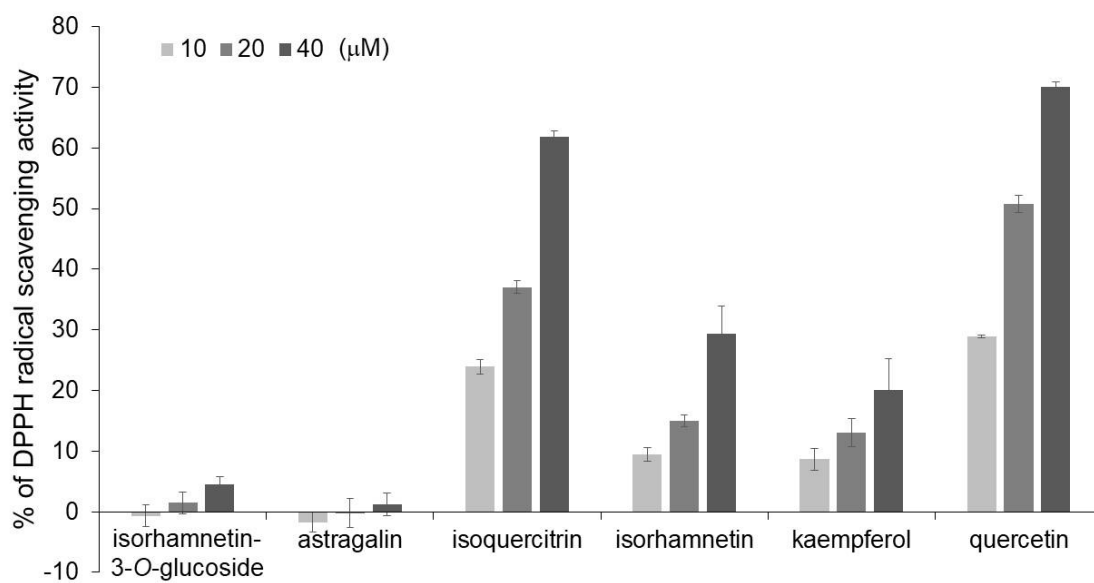


Figure 40. Antioxidant activities of isorhamnetin-3-*O*-glucoside, astragalin and their analogs based on a DPPH radical scavenging assay. Flavonoids were treated at the concentrations of 10, 20 and 40 μM against 100 μM of DPPH radical. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments.

第4項 Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalin およびその類似体のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用

AChE 阻害作用は、神経突起形成促進作用と同様に認知機能障害に有効であることから、AChE 阻害剤は認知症患者の症状緩和のために使用されている⁶⁵。脳内の記憶や学習に関する神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) の濃度が低下すると、認知機能が低下すると考えられている。AChの減少を防ぐためには、AChの分解酵素であるAChEの働きを阻害する必要がある。AChE 阻害剤は、脳内の ACh 量を増加させ、認知機能を維持することができるため、近年、アルツハイマー病などの認知症の対症療法として使用されている⁶⁵。Donepezil は、アルツハイマー病の治療に用いられる AChE 阻害剤の1つである。そこで、強い神経突起形成促進作用を持つ isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin、およびその類似体の AChE 阻害作用を評価し、donepezil と活性を比較した (Figure 41)。6種類のフラボノイドのうち、isoquercitrin と quercetin は強い阻害作用を示し、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin は中程度の阻害作用を示し、isorhamnetin と kaempferol は弱い阻害作用を示した。この結果より、6種類のフラボノイドにおける神経突起形成促進作用と AChE 阻害作用の強度は、それぞれ異なる傾向となった。Isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin は、6種類のフラボノイドの中で、強い神経突起形成促進作用を有するだけでなく、中程度の AChE 阻害作用を有することが明らかとなった。したがって、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalin は、認知機能障害の予防に貢献できる可能性がある。

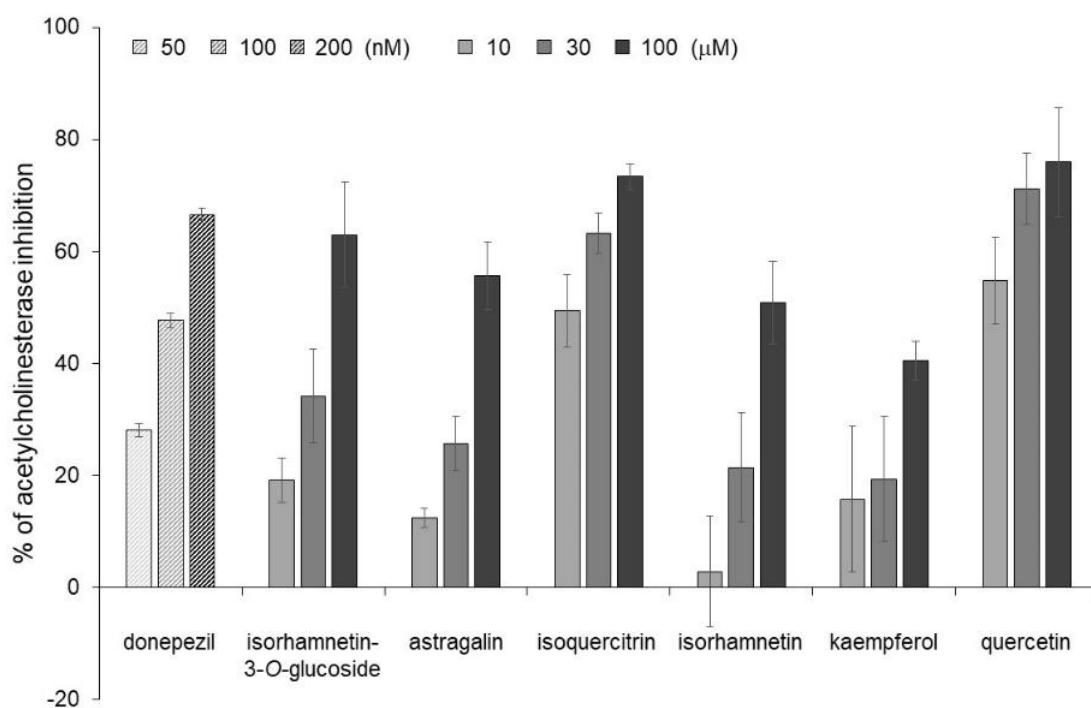


Figure 41. AChE inhibitory activities of isorhamnetin-3-*O*-glucoside, astragalín and their analogs. The reaction mixtures consisted of 10, 30 and 100 μM of flavonoids, 0.1 U/mL of AChE and 0.25 mM of 1-naphthyl acetate solution. Donepezil was used as a positive control and was assessed at concentrations of 50, 100 and 200 nM. After mixing for 90 s and incubating at 25 °C for 90 s, the reaction was stopped with a 5% solution of sodium dodecyl sulfate. The color was developed with Fast Blue B solution, and the absorbance was measured at 620 nm. The data represent means ± standard deviation from three independent experiments.

第5項 Isorhamnetin-3-*O*-glucoside、astragalin の NGF 誘導性の神経突起形成促進作用

構造活性相関研究において、 Bt_2cAMP 存在下で強い神経突起形成促進作用を示した isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin について、NGF 存在下における神経突起形成促進作用を評価した。NGF 誘導下での isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin は、 Bt_2cAMP 誘導時と同様な神経突起形成促進作用を示した (**Figure 42 a**)。NGF 存在下で isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin で処理した PC12 細胞を **Figure 42 b** に示している。この結果より、isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalin は、 Bt_2cAMP 誘導時と同様に、NGF によって誘導される神経突起形成も促進することが明らかになった。

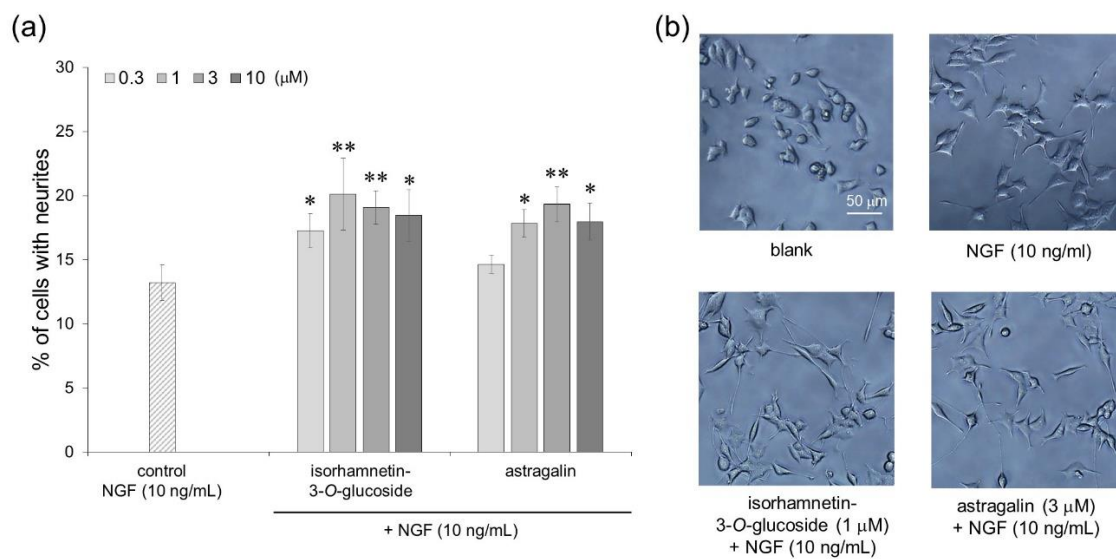


Figure 42. Neurite outgrowth-promoting activities of isorhamnetin-3-*O*-glucoside and astragaline in the presence of NGF. (a) Promotion by isorhamnetin-3-*O*-glucoside and astragaline of neurite formation induced by NGF in PC12 cells. PC12 cells were plated at 2.0×10^3 cells/well and cultured with isorhamnetin-3-*O*-glucoside or astragaline at 0.3-10 μ M in the presence of 10 ng/mL of NGF. The extent of neurite outgrowth was measured at 48 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (10 ng/mL of NGF). (b) Effects of isorhamnetin-3-*O*-glucosides and astragaline on neurite outgrowth induced by NGF. PC12 cells were incubated for 48 h without NGF (blank), with NGF only (control) or with NGF and flavonol glucosides. The final NGF concentration was 10 ng/mL, and the final concentrations of isorhamnetin-3-*O*-glucoside and astragaline were 1 μ M and 3 μ M, respectively. Scale bar = 50 μ m.

第 6 項 Isorhamnetin-3-O-glucoside、astragalín 処理による PC12 細胞のニューロフィラメント発現の促進

ニューロフィラメントは、神経細胞に特異的に発現している IV 型中間径フィラメントで、神経突起の太さの維持に関与している。そこで、PC12 細胞におけるニューロフィラメントの発現の増加を調査することで、神経細胞分化の指標とした。Cell-ELISA では、NGF (control)、NGF 存在下で isorhamnetin-3-O-glucoside もしくは astragalín で刺激した PC12 細胞は、未処理の PC12 細胞 (blank) に比べて有意に高いニューロフィラメント発現を示した (Figure 43)。また、NGF 存在下で 3 μ M の isorhamnetin-3-O-glucoside または 1 μ M の astragalín で刺激した PC12 細胞は、blank の蛍光強度を 100%としたときに、それぞれ 167.7%、167.8%の数値を示し、NGF のみで刺激した PC12 細胞 (control: 156.4%) と比較してニューロフィラメントの発現がわずかに増加する傾向があった。したがって、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín は、ニューロフィラメント発現の増加を伴った神経突起形成促進作用を示すことが明らかとなった。

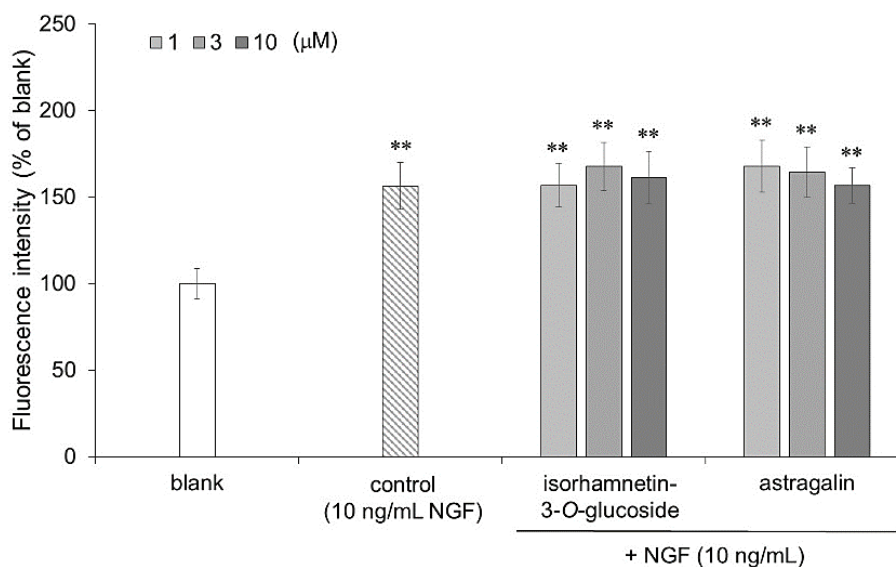


Figure 43. ELISA for neurofilaments in PC12 cells with differentiated neurites stimulated by isorhamnetin-3-*O*-glucoside or astragaline in the presence of NGF. PC12 cells were plated at 2.0×10^3 cells/well and incubated for 48 h without NGF (blank), with NGF only (control) or with NGF and isorhamnetin-3-*O*-glucoside or astragaline at 0.3-10 μ M. ELISA was performed with rabbit anti-neurofilament antibody (1000:1) followed by treatment with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (60000:1). Bound enzyme activity was detected by reaction with ADHP, and the fluorescence intensity at 535 nm/590 nm of each well was measured. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. $**p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the blank.

神経突起形成促進化合物は、脳内の記憶や学習に関連する神経細胞の分化を促進し、アルツハイマー病などの認知機能の治療に有効であると考えられている⁶⁶。Isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín は強い神経突起形成促進作用を有するが、ヒトの腸内細菌叢によって代謝されてアグリコンが生成される⁶⁷。故に、これらのフラボノール配糖体は、脳にまで到達できないことが考えられるため、認知機能障害の治療薬として応用することはできない。一方、関節リウマチ、膀胱炎、前立腺炎などで損傷した組織では、線維芽細胞、マスト細胞、シュワン細胞から NGF の発現が誘導されることがこれまでの研究で明らかにされている⁶⁸⁻⁷⁰。発現した NGF は、損傷した組織を支配する感覚神経を活性化し、損傷部位の修復に関与していると考えられている⁷¹。したがって、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín は、損傷した末梢神経に対する神経分化促進剤となることが期待される。また、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín が代謝されて生成した isorhamnetin と kaempferol は、これらの配糖体よりも弱い、有意な神経突起形成促進作用を示す。Isorhamnetin と kaempferol は、血液脳関門を通過することが報告されており⁷²、脳内で神経突起形成促進作用を発揮して認知機能障害を予防する可能性が示唆される。さらに、isorhamnetin と kaempferol の構造類似体である quercetin を、アルツハイマー病モデルマウス経口投与すると、記憶や認知機能が改善する傾向があることが報告されている⁷³。Isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín を含む *Paeonia lactiflora* の花はハーブティーに利用されているため、それらの化合物の日常的な摂取は可能である。したがって、isorhamnetin-3-O-glucoside と astragalín は、認知機能低下予防のための機能性食品素材と、末梢神経の神経分化促進剤として応用できる可能性がある。

第4節 第2章の結論

Paeonia lactiflora の花卉から、活性を指標にした精製によって、神経突起形成促進化合物として、フラボノール配糖体である isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín を単離した。Isorhamnetin-3-*O*-glucoside の B 環を脱メチル化、もしくは astragalín の B 環に水酸基を付加した化学構造である isoquercitrin について神経突起形成促進作用を評価し、isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín の活性と比較した。また、isorhamnetin-3-*O*-glucoside、astragalín、isoquercitrin にそれぞれ対応するアグリコンである isorhamnetin、kaempferol、quercetin の活性も評価した。Isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín は、他の4つのフラボノイドよりもはるかに強い神経突起形成促進作用を示した。神経突起形成促進作用の構造活性相関を調査した結果、強い神経突起形成促進作用を示すためには、C3 位にグルコースを有するだけでなく、ある程度極性が低い B 環を有することが重要であることが明らかとなった。Isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín は、他の4つのフラボノイドと比較して、比較的弱い抗酸化作用と中程度の AChE 阻害作用を示した。これらの結果より、6種のフラボノイドにおける神経突起形成促進作用の強さと、これらの作用の強さには、異なる傾向があることが明らかとなった。Isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín は、PC12 細胞において、NGF により誘導される形態的な神経突起形成とニューロフィラメントの発現を促進した。Isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín は、生体内で代謝を受けてアグリコンとなることが知られているが、これらのアグリコンも神経突起形成促進作用を示す。したがって、isorhamnetin-3-*O*-glucoside と astragalín は、末梢神経における神経分化促進剤および認知機能低下予防のための機能性食品の素材としての候補化合物になり得ることが示唆される。

第3章 ヒマワリの種子由来の神経突起形成促進物質

第1節 はじめに

植物の種子は油分を多く含み、世界中で食品として親しまれている。ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) 種子は栄養価が高く、食用油として、またローストや塩漬けの零食として利用されている。ヒマワリ油には、ホスファチジルコリンが豊富に含まれていることが報告されている⁷⁴。ホスファチジルコリンは、ミエリンを支えるシナプス形成の材料として利用されている⁷⁵。また、ホスファチジルコリンの摂取は、神経伝達物質であるアセチルコリン濃度を上昇させ、脳内の情報伝達や記憶力の向上に役立つと考えられている⁷⁶。ホスファチジルコリンは神経細胞において神経突起の伸長時に合成され^{77,78}、ホスファチジルコリンの不足は PC12 細胞のアポトーシスを誘導する^{79,80}。したがって、ホスファチジルコリンを摂取することで、認知機能の改善や認知症の予防が期待できると考えられている。これらの効果が報告されているにもかかわらず、ヒマワリ種子の NGF 様作用あるいは NGF 増強活性については調査されていない。

本章では、ヒマワリ種子抽出物から、NGF 増強作用である神経突起形成促進作用を示す化合物を単離・同定することを目的とした。活性を指標にして活性化合物を精製し、¹H-NMR および GC-MS により分析した。そして、神経突起形成促進作用を示す化合物の類似体を用いて構造活性相関を研究した。

第2節 実験方法

第1項 実験試薬

ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.) 種子はサカタのタネから購入した。クロロホルム-d (CDCl_3)、ギムザ染色液、25%グルタルアルデヒド溶液、Tween 20、cholesterol は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。Dibutryl-cAMP (Bt_2cAMP)、anti-neurofilament 200 antibody produced in rabbits、anti-rabbit IgG (whole molecular)-FITC antibody produced in a goat、Triton X-100 はシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。Recombinant rat β -nerve growth factor (NGF, Cat.556-NGF) は R&D SYSTEMS から購入したものをを用いた。ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) はナカライテスク株式会社から購入した。 β -Sitosterol、stigmasterol、campesterol はタマ生化学株式会社から購入した。DAPI-Fluoromount-G は、コスモ・バイオ株式会社から購入した。カラムクロマトグラフィーには、Wakogel C-200 (富士フイルム和光純薬株式会社) および TOYOPEARL HW-40F (東ソー株式会社、日本、東京) を使用した。他のすべての溶媒および緩衝液の調製に使用した試薬は、富士フイルム和光純薬株式会社もしくはナカライテスク株式会社から購入した。

第2項 Nuclear magnetic resonance (NMR)スペクトルと gas chromatography (GC)の分析

^1H -NMR スペクトルは、測定溶媒に CDCl_3 を用い、JEOL NMR system (ECZ400, 400MHz) にて測定した。化学シフトは CDCl_3 (δ_{H} 7.24 ppm) にて調整し、表示した。

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) は、GCMS-QP2020 NX (株式会社島津製作所)、AOC-20i Plus automatic injector (株式会社島津製作所)、HP-5MS キャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , Agilent Technologies) を用いて GC-2030 Nextis

(株式会社島津製作所) で実施した。キャリアガスはヘリウム 99.999% を用い、3 mL/min の定流量で使用した。

第 3 項 細胞培養

細胞培養の方法は、第 1 章、第 2 節、第 3 項に記載した。

第 4 項 神経突起形成作用、神経突起形成促進作用

神経突起形成作用および神経突起形成促進作用の評価方法は第 1 章、第 2 節、第 4 項に記載した。

第 5 項 *Helianthus annuus* の種子由来の神経突起形成促進作用を示す化合物の精製

ヒマワリの種子 (887.28 g) を粉碎し、4436.4 mL の acetone/MeOH (80/20, v/v) を用いて抽出した。ヒマワリの種子の抽出液は、濃縮した後 (164.69 g, oil wt.)、700 mL の MeOH に溶解し、700 mL の n-hexane で 3 回分液した。分離した画分を蒸発乾固し、hexane 層を 159.25 g、MeOH 層を 7.64 g 得た。次に、hexane 層を Wakogel C-200 (7.0 cm i.d. × 29.2 cm) に供し、hexane/EtOAc (100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, v/v, 各 1680 mL, 50/50, v/v, 2240 mL) で段階的に溶出させた。80% hexane/EtOAc 溶出画分をまとめて濃縮し、濃縮画分 (1.62 g) を再び Wakogel C-200 (3.2 cm i.d. × 29.0 cm) に供し、hexane/EtOAc (100/0, 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, v/v, 各 280 mL) により段階的に溶出させた。Hexane/EtOAc (85/15, v/v) で溶出した画分をまとめて濃縮し、さらに、TOYOPEARL HW-40F (2.5 cm i.d. × 82.5 cm) を用いて、EtOH 810 mL で精製し、100 個の画分を得た (416.6 mg)。有意な活性を示した画分 33-35 (123.1 mg) を白色粉末として単離した。

ヒマワリ種子抽出物から精製した活性画分を $^1\text{H-NMR}$ 分光法 (CDCl_3 , 400MHz) により分析した。また、GC-MS 分析により、画分に含まれる化合物の化学構造を決定した。

第6項 ニューロフィラメントの蛍光免疫染色

PC12 細胞をコラーゲンコートした 96 ウェルプレートに、 2.0×10^3 cells/90 μL /well で播種し、 37°C 、5% CO_2 空気気相下で培養した。細胞を播種してから 24 時間後、10 μM の β -sitosterol (終濃度: 0.5 μM) を 5 μL と 200 ng/mL の 200 ng/mL の NGF (終濃度: 10 ng/mL) を 5 μL を培養液に添加した。その後、さらに 48 時間培養し、培地を除去した後、細胞を 100 μL の 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) で 30 分間、室温で固定した。細胞を固定後、4%パラホルムアルデヒド溶液を除去し、200 μL の PBS(-) (pH 7.4) で 3 回洗浄した。洗浄後、固定した細胞を 100 μL の 0.4% Triton X-100/PBS(-) で 10 分間、室温で透過処理を行った。その後、透過処理した細胞を 200 μL の PBS(-) で 3 回洗浄した後、100 μL の 2.5% BSA/PBS(-) で 1 時間、室温でブロッキングした。ブロッキング後、2.5% BSA/PBS(-) を除去し、一次抗体である 50 μL の anti-neurofilament 200 antibody produced in rabbits/2.5% BSA/PBS(-) (1/80, v/v) を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。その後、一次抗体を除去し、200 μL の 0.05% Tween 20/PBS(-) で 3 回洗浄し、二次抗体である 50 μL の anti-rabbit IgG (whole molecular)-FITC antibody produced in a goat/2.5% BSA/PBS(-) (1/80, v/v) を添加し、暗所、室温で 1 時間インキュベートした。1 時間後、二次抗体を除去し、0.05% Tween 20/PBS(-) で 3 回洗浄した。100 μL の DAPI-Fluoromount-G/PBS(-) (8/2, v/v) を加え、10 分間インキュベートし、PC12 細胞を 0.05% Tween 20/PBS(-) で 1 回洗浄し、風乾させた。処理後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, 株式会社キーエンス) にて細胞を観察した (DAPI: Ex. 360/40 nm; Em. 460/50 nm; FITC: Ex. 470/40 nm; Em. 525/50 nm)。

第3節 結果および考察

第1項 *Helianthus annuus* の種子由来の神経突起形成促進作用を示す画分の精製と同定

ヒマワリの (*Helianthus annuus*) 種子 (164.69 g) を acetone/MeOH (80/20, v/v) で抽出し、得られた抽出物は、PC12 細胞において、NGF もしくは Bt₂cAMP 存在下で神経突起形成促進作用を示した (Figure 44)。ヒマワリ種子に含まれる神経突起形成促進化合物を精製するために、Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用を指標にした精製を行った。

ヒマワリ抽出液を MeOH に溶解し、n-hexane で分液した。活性を示した hexane 層を Wakogel C-200 で 2 回、TOYOPEARL HW-40F で精製し、白色粉末 (123.1 mg) を得た。この化合物の ¹H-NMR データは、既報のβ-sitosterol のデータ⁸¹⁻⁸³と類似していたため、単離した化合物はステロール化合物であると考えられた (Figure 45)。しかし、精製した化合物の ¹H-NMR スペクトルには、β-sitosterol の ¹H-NMR スペクトルでは観測されなかったδ 4.9-5.2 上の小さなシグナルが観測された。δ 5.00 とδ 5.14 のシグナルは、stigmasterol の C22 位と C23 の位置にあるトランスオレフィンプロトンの 2 つの特徴的なシグナルと一致した。Stigmasterol の C22 位と C23 位の 2 つのプロトンに由来すると考えられるシグナルの積分値は 0.36 で、ステロールの C6 位のプロトン由来のシグナルの積分値は 1.00 であった (Figure 45)。¹H-NMR のデータから、精製画分はβ-sitosterol と stigmasterol の混合物であり、β-sitosterol を主成分とする化合物であることが示唆された。

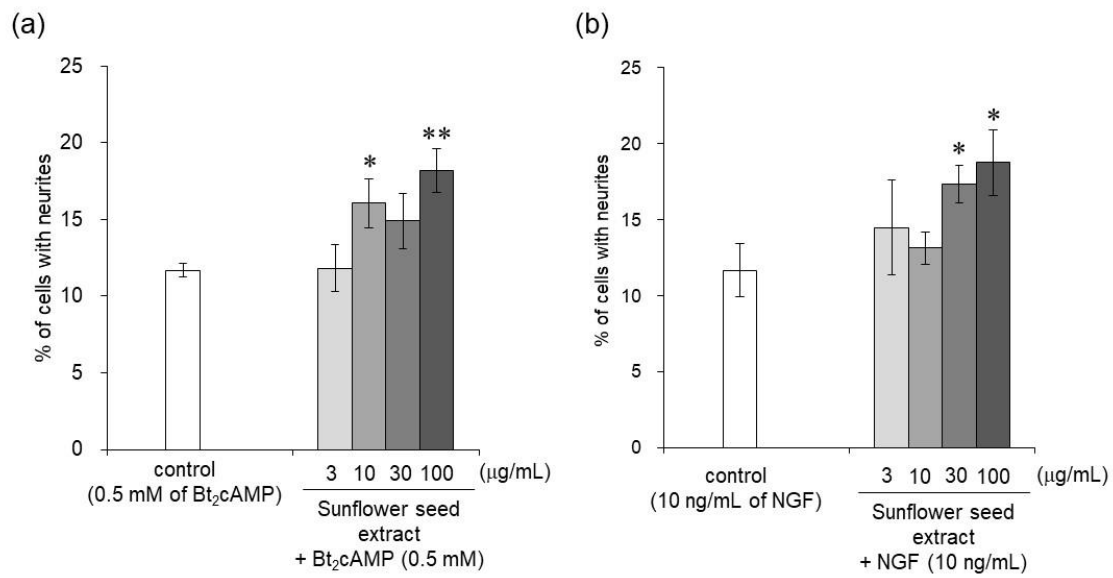


Figure 44. Neurite outgrowth-promoting activity of the extract of seeds from *Helianthus annuus* in the presence of Bt₂cAMP or NGF in PC12 cells. (a) Promotion by the extract of seeds from *Helianthus annuus* of neurite formation induced by Bt₂cAMP in PC12 cells. (b) Promotion by the extract of seeds from *Helianthus annuus* of neurite formation induced by NGF in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the extract at 3, 10, 30 and 100 µg/mL in the presence of 0.5 mM of Bt₂cAMP. The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h after the addition of Bt₂cAMP or at 48 h after the addition of NGF and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm standard deviation from three independent experiments. ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with the control (0.5 mM Bt₂cAMP only or NGF only).

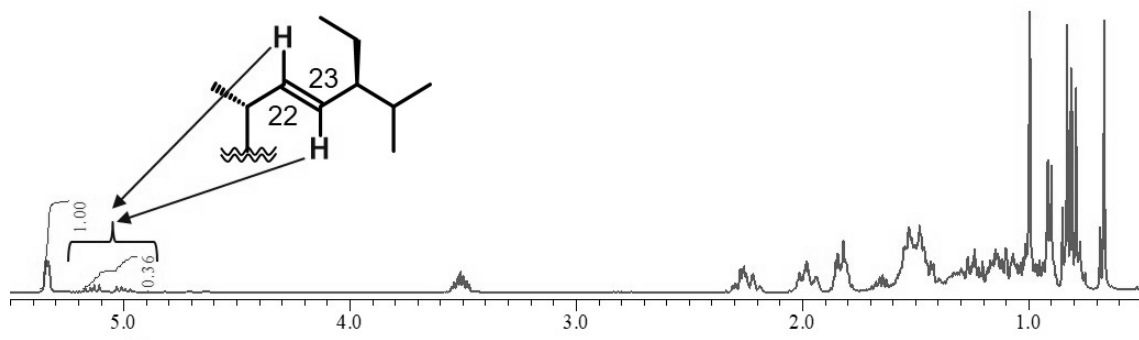


Figure 45. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the purified fraction. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed that the purified fraction was sterol. The arrows show two characteristic signals of trans-protons attached to the C22-C23 double bond of stigmasterol.

ヒマワリの種子抽出物より精製して得られた β -sitosterol を主成分とする活性画分について、画分中の成分を明らかにするために、GC-MSによる分析を行った。GC-MSのデータから、活性画分は3つの化合物 (compound **1**, **2**, **3**) の混合物であり、化合物の保持時間はそれぞれ約 16.2、16.5、17.0 分であることがわかった (**Figure 46 a**)。また、compound **1**, **2**, **3** の保持時間は、それぞれ標準物質の campesterol、stigmasterol、 β -sitosterol の保持時間と一致した (**Figure 46 a**)。また、compound **1**, **2**, **3** の分子イオンおよびフラグメントイオンは、それぞれ標準物質の campesterol、stigmasterol、 β -sitosterol のものと一致した (**Figure 46 b**)。また、GC-MS では、campesterol、stigmasterol、 β -sitosterol のピーク面積比が約 1:2:7 であることが示された (**Figure 46 a**)。したがって、この画分は β -sitosterol、stigmasterol、campesterol の混合物であり、その主成分は β -sitosterol であることが明らかとなった。

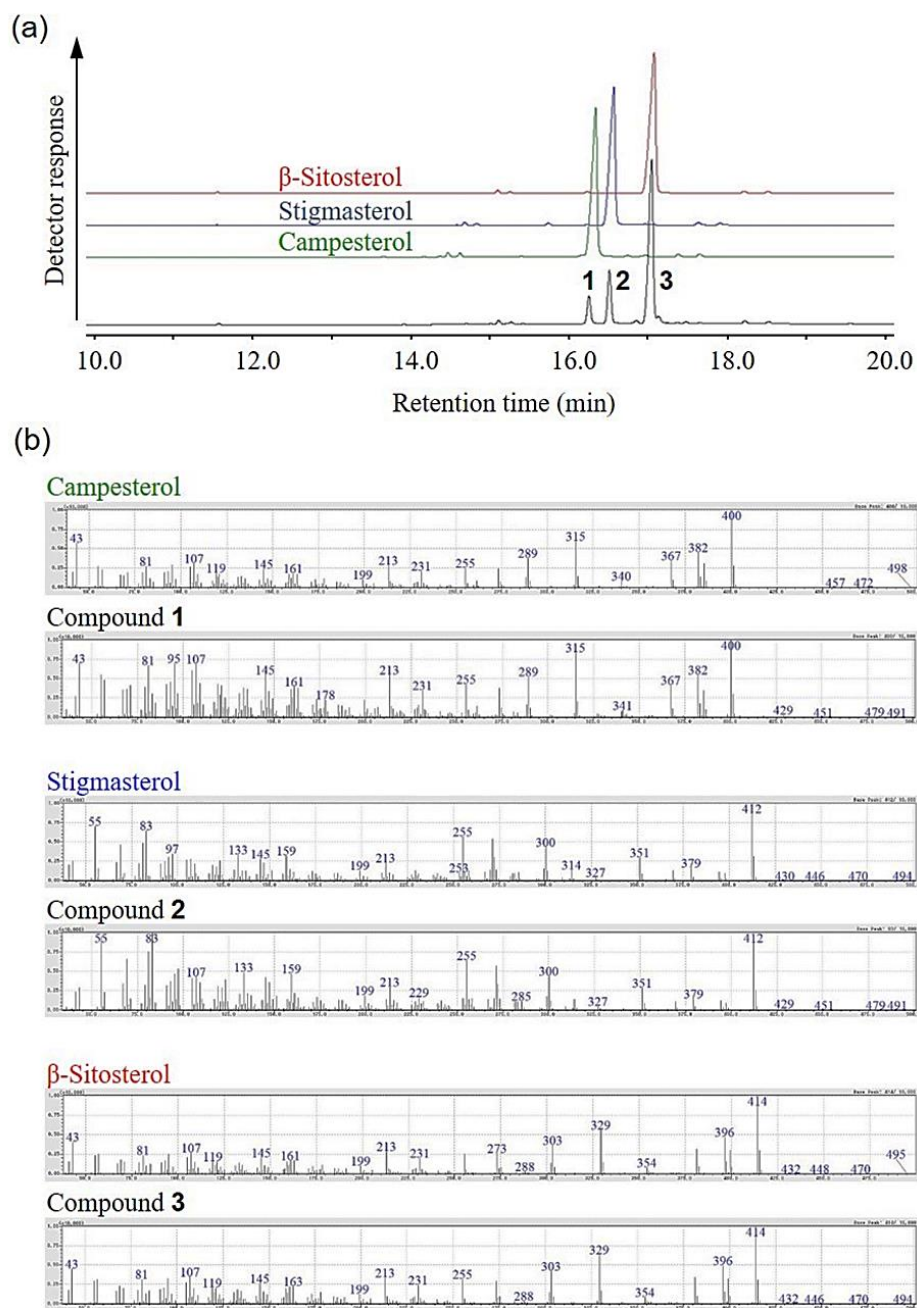


Figure 46. GC-MS chromatograms of the purified fraction and standards of campesterol, stigmasterol and β -sitosterol. (a) Total ion chromatograms of campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and purified fraction. (b) GC-MS fragment ions of the purified fraction and standards of campesterol, stigmasterol and β -sitosterol.

第2項 ステロール化合物の神経突起形成促進作用

ヒマワリ種子抽出物について、神経突起形成促進作用を指標にした精製を行い、 β -sitosterol、stigmasterol、campesterol の混合物を得た。 β -sitosterol と campesterol の構造は、コレステロール骨格の C24 位にそれぞれエチル基とメチル基を有している (Figure 47) Stigmasterol は、 β -sitosterol の C22 位に不飽和二重結合を持つ構造である (Figure 47)。ヒマワリ油には、 β -sitosterol、stigmasterol、campesterol に加えて、少量の cholesterol が含まれていることが知られている⁸⁴。そこで、 β -sitosterol、stigmasterol、campesterol、cholesterol の Bt₂cAMP 誘導性の神経突起形成促進作用の強さを比較した。

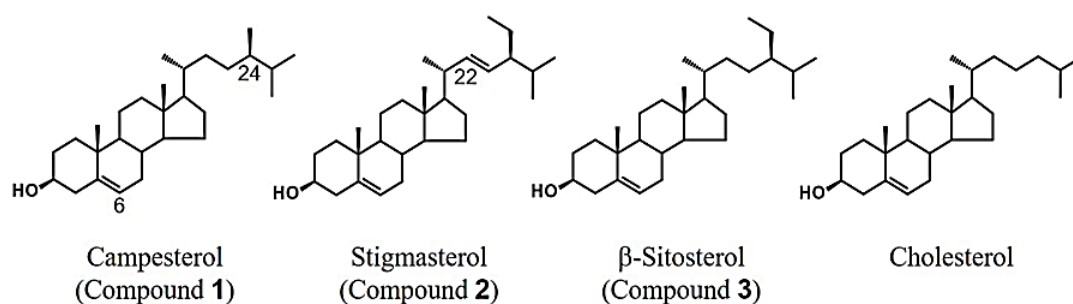


Figure 47. Structures of purified compounds and cholesterol.

β -Sitosterol と stigmasterol は、0.5-5 μ M で有意な神経突起形成促進作用を示し、活性の強さは同程度であった (**Figure 48 a**)。Campesterol は 0.5 μ M で有意な活性を示したが、 β -sitosterol に比べ、神経突起形成率は低かった (**Figure 48 b**)。Cholesterol は、活性を示さなかった (**Figure 48 b**)。 β -Sitosterol、stigmasterol、campesterol、cholesterol の4つのステロールの活性を比較したところ、 β -Sitosterol と stigmasterol は同様の有意な活性を示し、 β -sitosterol の C22 位への炭素-炭素二重結合の導入は活性に影響しないことが示唆された。また、 β -sitosterol、campesterol、cholesterol の順で活性が増強したため、cholesterol の C24 位に付く側鎖の長さによって活性が向上すると考えられた。その結果、 β -sitosterol と stigmasterol は、評価した 4 種類のステロールの中で強い神経突起形成促進作用を有することがわかった。また、ヒマワリ種子から精製した、 β -sitosterol、stigmasterol、campesterol の混合物からなる活性画分は、 $^1\text{H-NMR}$ および GC-MS 分析により、 β -sitosterol を主成分とすることが明らかになった (**Figures 45, 46**)。したがって、 β -sitosterol が、ヒマワリ種子抽出物から精製した神経突起形成促進作用を示す画分における、主要化合物であることが示唆された。

ヒマワリ種子抽出物において神経突起形成促進作用を示す主な化合物である β -sitosterol は、よく知られた植物ステロールの 1 つであり、アボカド、大豆、トウモロコシなどに含まれている^{85,86}。 β -Sitosterol は、抗炎症作用⁸⁷、抗がん作用⁸⁸があることがこれまでに報告されている。しかし、 β -sitosterol の神経突起形成促進作用は報告されておらず、本研究で、新規の作用として初めて見いだした。

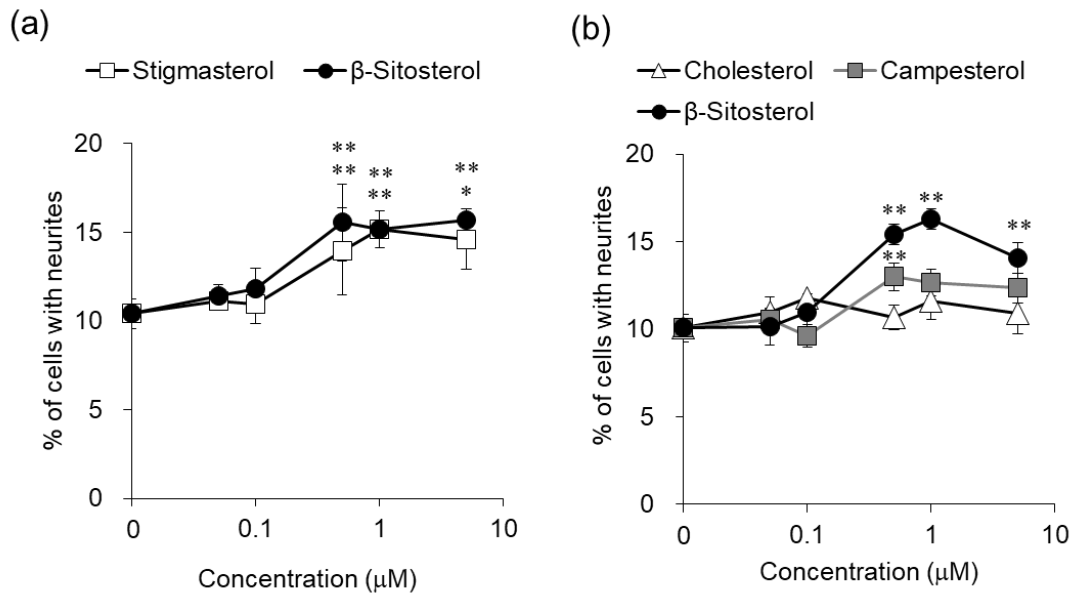


Figure 48. Neurite outgrowth-promoting activities of sterols in the presence of Bt_2cAMP in PC12 cells. (a) Promotion by β -sitosterol and stigmasterol of neurite formation induced by Bt_2cAMP in PC12 cells. (b) Promotion by β -sitosterol, campesterol and cholesterol of neurite formation induced by Bt_2cAMP in PC12 cells. PC12 cells were plated at 4.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at 0.05–5 μM in the presence of 0.5 mM of Bt_2cAMP . The extent of neurite outgrowth was measured at 24 h and is expressed as the mean percentage of 300–400 cells. The data represent means \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with control (0.5 mM Bt_2cAMP only).

第3項 NGF 誘導下における β -sitosterol の神経突起形成促進作用

Bt₂cAMP 存在下で強い神経突起形成促進作用を示した β -sitosterol について、NGF 存在下における神経突起形成促進作用を評価した。その結果、 β -sitosterol は、NGF 存在下において、0.5 および 1 μ M で有意な神経突起形成促進作用を示した (**Figure 49**)。このことから、 β -sitosterol は、Bt₂cAMP と同様に NGF によって誘導される神経突起形成を促進することができることが証明された。

次に、PC12 細胞において、NGF 存在下で、 β -sitosterol によって促進された神経突起形成における神経細胞分化を免疫染色によって観察した。ニューロフィラメントは、神経細胞に特異的に発現する IV 型中間フィラメントであり、神経の太さの維持に参与している。 β -Sitosterol は 0.5 μ M と 1 μ M で有意な活性を示し、0.5 μ M の条件が最も強い活性を示した (**Figure 49**)。そこで、NGF 存在下、0.5 μ M の β -sitosterol で刺激した PC12 細胞の神経突起形成を、顕微鏡を用いて観察した (**Figure 50**)。また、 β -sitosterol の刺激による PC12 細胞の神経突起形成と細胞体でのニューロフィラメントの発現を免疫蛍光染色により確認した。この結果から、NGF によって誘導された PC12 細胞の神経分化は、 β -sitosterol での刺激によって促進されることが示唆された。これによって、 β -sitosterol が NGF 作用増強剤として有用であることが初めて明らかとなった。 β -Sitosterol の AChE 阻害活性は、以前に報告されている⁸⁹。また、 β -sitosterol がアルツハイマー型認知症の原因の 1 つと考えられているアミロイドペプチドの蓄積を抑制する⁹⁰。さらに、 β -sitosterol が BBB を通過し、マウスの脳細胞に蓄積することが報告されている⁹¹。これらの報告に加え、本研究で新たに β -sitosterol の神経突起形成促進作用が見出された。したがって、 β -sitosterol は、効果的なアルツハイマー型認知症の予防の候補化合物であることを示唆している。

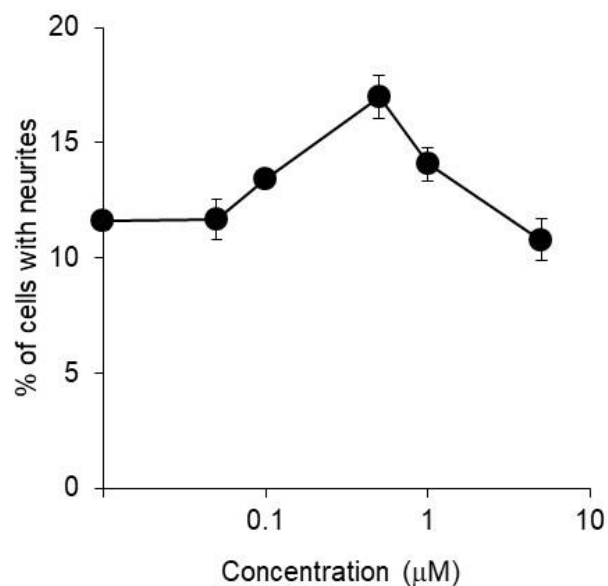


Figure 49. Neurite outgrowth-promoting activity of β -sitosterol in the presence of NGF in PC12 cells. PC12 cells were plated at 2.0×10^3 cells/well and cultured with the samples at 0.05-5 μ M in the presence of 10 ng/mL of NGF. The extent of neurite outgrowth was measured at 48 h and is expressed as the mean percentage of 300-400 cells. The data represent means \pm SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test) as compared with control (10 ng/mL of NGF only).

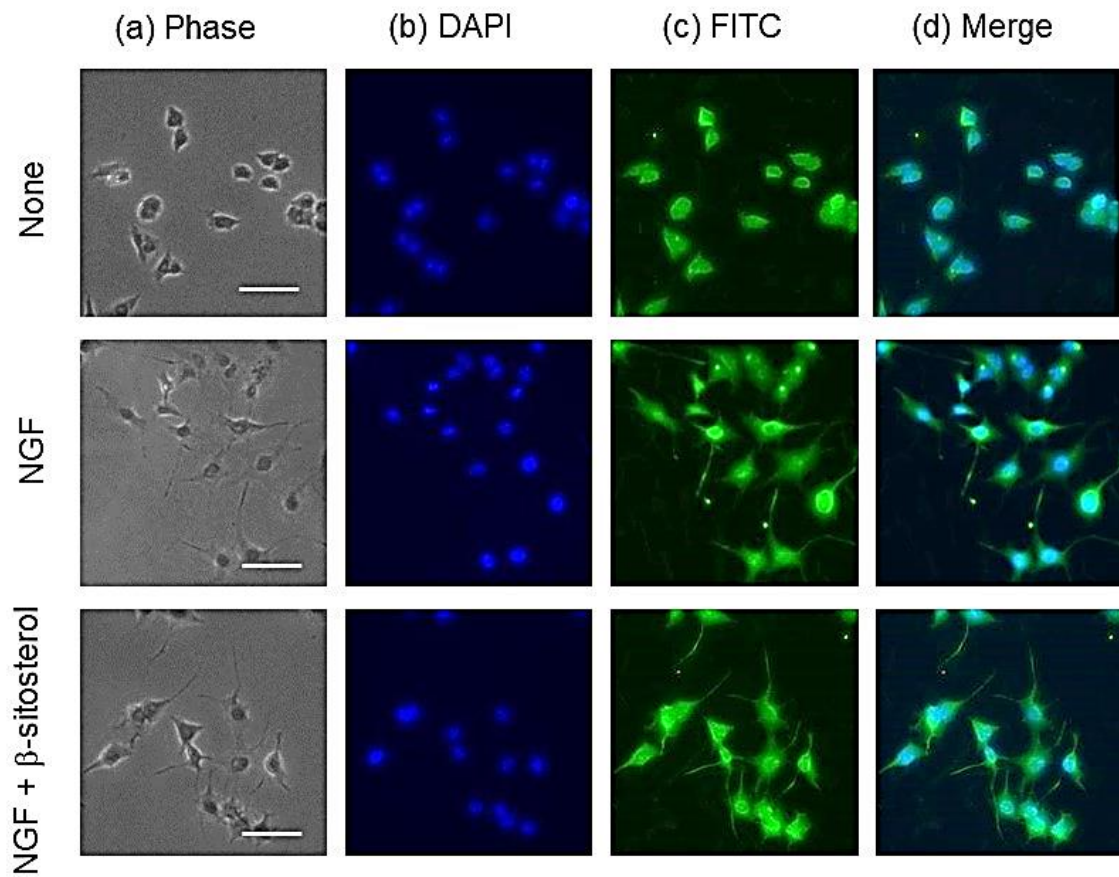


Figure 50. Immunostaining of neurofilaments of PC12 cells with differentiated neurites stimulated by β -sitosterol in the presence of NGF. PC12 cells were incubated for 48 h without or with NGF (10 ng/mL) and β -sitosterol (0.5 μ M) or with NGF (10 ng/mL) alone. Immunostaining was performed with rabbit anti-neurofilament antibody, followed by treatment with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG. The nuclei of PC12 cells were treated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) and examined under a fluorescence microscope. (a) Phase contrast, (b) DAPI-treated nuclei, (c) green fluorescence for FITC-treated neurofilaments and (d) merged images. Scale bar = 50 μ m.

第4節 第3章の結論

ヒマワリ種子抽出物から、Bt₂cAMP 存在下で PC12 細胞の神経突起形成促進作用を示す画分を精製した。¹H-NMR および GC-MS 分析により、活性画分はβ-sitosterol、stigmasterol、campesterol の混合物であり、β-sitosterol が主成分であることが明らかになった。次に、Bt₂cAMP 存在下でのβ-sitosterol、stigmasterol、campesterol および cholesterol の神経突起形成促進作用を比較した。β-sitosterol と stigmasterol は4種のステロールの中で最も強い活性を示し、cholesterol は全く活性を示さなかった (β-sitosterol ≧ stigmasterol > campesterol > cholesterol)。ヒマワリ種子抽出物の精製画分にはβ-sitosterol が主成分として含まれており、評価した4種のステロールの中で stigmasterol と同様にβ-sitosterol が強い活性を示したことから、精製画分中の神経突起形成促進作用の作用本体はβ-sitosterol であると推測された。β-Sitosterol、stigmasterol、campesterol の神経突起形成促進作用は、本研究によって、新規の作用として、初めて見いだされた。また、4種類のステロールの構造活性相関研究より、β-sitosterol の C22 位の炭素-炭素二重結合の導入は活性に影響しないこと、ステロールの C24 位の側鎖の長さが活性に重要であることが明らかとなった。さらに、β-sitosterol は PC12 細胞において、NGF によって誘導されるニューロフィラメント発現を伴う神経突起形成促進作用を示した。β-Sitosterol は血液脳関門を通過することが知られているため、β-シトステロールの摂取は、アルツハイマー型認知症の予防や改善に効果的である可能性がある。

総括

近年、アルツハイマー型認知症による認知症患者が増加している。NGFの減少は、アルツハイマー型認知症の原因の1つであると考えられている。加齢に伴い、記憶や学習に関連する海馬のNGFの濃度が低下し、神経突起が維持できなくなることで、神経突起の損傷や神経細胞死が起り、認知機能が低下すると考えられている。学習能力の低い老齢ラットにNGFを1ヶ月投与すると学習能力が向上することが報告されていることから、脳内のNGF量を増加させることでアルツハイマー型認知症を改善できると考えられてきた。しかし、NGFは分子量が大きいため、血液脳関門を通過できず、アルツハイマー型認知症の治療薬としての応用は困難である。したがって、アルツハイマー型認知症の予防には、NGF産生作用、NGF様作用、NGF増強作用を示し、血液脳関門を通過できる化合物が必要である。本研究では、NGF作用の1つである神経突起形成作用に着目し、食品由来の神経突起形成作用（NGF様作用）もしくは神経突起形成促進作用（NGF増強作用）を示す化合物を単離、同定することを目的とした。動物性の食品として鶏冠加水分解物、植物性の食品としてシャクヤクの花抽出物とヒマワリの種子抽出物が有意な神経突起形成促進作用を示したため、これらの食品について、活性を指標にした精製を行った。

第1章では、鶏冠加水分解物より、神経突起形成促進作用を示す4つの画分を精製した。¹H-NMRおよびHPLC分析により、4つの活性画分の主成分がそれぞれスレオニン、アラニン、バリン、メチオニンであることが明らかとなった。標準品のアミノ酸を用いたスクリーニングでは、バリンとメチオニンは活性を示したが、スレオニンとアラニンは活性を示さなかった。アラニンを主成分とする活性画分は、¹H-NMRとHPLC分析から、アラニンの約10分の1の割合でバリンを含んでいることが明らかとなった。活性を有さないアラニンと、活性を有するバリンの混合物は、バリン単独で作用させた条件よりも、広い濃度範囲で高い神経突起形成率を示し、アラニンがバリンの活性を増強していることが示唆された。また、活性を有する2つのアミノ酸であるバリンとメチオニ

ンの混合物は、それぞれ単独で作用させた条件よりも、広い濃度範囲で高い神経突起形成率を示した。さらに、スレオニン、アラニン、バリン、メチオニンからなる混合物を、鶏冠加水分解物由来の水層に相当する濃度で添加した場合の活性は、水層の活性と非常によく似ていた。有意な活性を示したアミノ酸混合物中の各アミノ酸濃度は、いずれも単独では活性を発揮できないほど低濃度であった。したがって、鶏冠加水分解物の強い神経突起形成促進作用は、数種類のアミノ酸の相乗効果によるものであることが示唆された。

第2章では、シャクヤクの花弁抽出物より、低濃度で神経突起形成促進作用を示す2つのフラボノール配糖体である *isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* を単離した。単離した2つのフラボノール配糖体とその類似体を用いて活性を比較した結果、*isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* が、評価したフラボノイドの中で最も強い活性を示した。構造活性相関を研究したところ、強い神経突起形成促進作用を発揮するためには、フラボノールのC3位にグルコースを有していることと、極性がある程度低い極性を有していることが重要であることが示唆された。また、*isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* は、比較的弱い抗酸化作用と、中程度のAChE阻害作用を有していた。*Isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* は、NGF存在下でのPC12細胞において、神経突起に特異的に存在するニューロフィラメントの発現を促進させ、神経突起形成を促進していることが明らかとなった。*Isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* は、生体内で代謝を受けてアグリコンとなるが、これらのアグリコンも神経突起形成促進作用を示す。したがって、*isorhamnetin-3-O-glucoside* と *astragalín* は、末梢神経における神経分化促進剤もしくは認知機能低下予防の機能性食品成分としての候補化合物として応用に期待できる。

第3章では、ヒマワリ種子の抽出物より、神経突起形成促進作用を示す β -sitosterolを主成分とする画分を得た。この活性画分は、主成分である β -sitosterolの他に *stigmasterol* と *campesterol* を含んだ混合物であった。 β -Sitosterol、*stigmasterol*、*campesterol*、*cholesterol*の神経突起形成促進作用を比較した結果、 β -sitosterol と *stigmasterol* が最も強い活性を

示し、campesterol が弱い活性を示し、cholesterol は活性を示さなかった。この結果より、 β -sitosterol の C22 位の炭素-炭素二重結合の導入は活性に影響しないこと、ステロールの C24 位の側鎖の長さが活性に重要であることが明らかとなった。また、 β -sitosterol は、単離した活性画分の主成分であり、最も強い活性を示したため、ヒマワリ種子抽出物の神経突起形成促進作用の作用本体であることが示唆された。さらに、免疫蛍光染色の結果、 β -sitosterol によって促進する神経突起形成は、ニューロフィラメントの発現を伴うことが示された。NGF 増強活性を示した β -sitosterol は、アルツハイマー型認知症の予防のための食品成分の候補となる可能性がある。

本研究で見いだした、食品由来の神経突起形成促進化合物が、認知症疾患に対する治療薬や予防食品、末梢神経における神経分化促進剤、および関連する研究の発展に寄与することを期待する。

参考文献

- [1]. 「日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究」(平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金特別研究事業 九州大学 二宮 利治教授)、厚生労働科学研究成果データベース、2015 年、<https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/23685>
- [2]. Wortmann, M. Dementia: A global health priority-Highlights from an ADI and World Health Organization report. *Alzheimer's Res. Ther.* **2012**, *4*, 40.
- [3]. Vasic, V.; Barth, K.; Schmidt, M.H.H. Neurodegeneration and neuro-regeneration-Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4272.
- [4]. Salloway, S.; Sperling, R.; Fox, N.C.; Blennow, K.; Klunk, W.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L.S.; Porsteinsson, A.P.; Ferris, S.; Reichert, M.; Ketter, N.; Nejadnik, B.; Guenzler, V.; Miloslavsky, M.; Wang, D.; Lu, Y.; Lull, J.; Tudor, I.C.; Liu, E.; Grundman, M.; Yuen, E.; Black, R.; Brashear, H.R.; Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 322-333.
- [5]. Arya, A.; Chahal, R.; Rao, R.; Rahman, M.H.; Kaushik, D.; Akhtar, M.F.; Saleem, A.; Khalifa, S.M.A.; El-Seedi, H.R.; Kamel, M.; Albadrani, G.M.; Abdel-Daim, M.M.; Mittal, V. Acetylcholinesterase inhibitory potential of various sesquiterpene analogues for Alzheimer's disease therapy. *Biomolecules* **2021**, *11*, 350.
- [6]. Zheng, C.; Geetha, T.; Gearing, M.; Babu, J.R. Amyloid β -abrogated TrkA ubiquitination in PC12 cells analogous to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2015**, *133*, 919-925.
- [7]. Kristiansen, M.; Ham, J. Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1025-1035.
- [8]. Hawkins R.A.; O'Kane R.L.; Simpson I.A.; Viña J.R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 218S-226S.
- [9]. Poduslo, J.F.; Curran, G.L. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the

- neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Mol. Brain Res.* **1996**, *36*, 280-286.
- [10]. Fischer, W.; Wictorin, K.; Björklund, A.; Williams, L.R.; Varon, S.; Gage, F.H. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* **1987**, *329*, 65-68.
- [11]. 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.
- [12]. Gunning, P.W.; Landreth, G.E.; Bothwell, M.A.; Shooter, E.M. Differential and synergistic actions of nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells, *J. Cell Biol.* **1981**, *89*, 240-245.
- [13]. Vaudry, D.; Stork, P.J.; Lazarovici, P.; Eiden, L.E. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: Making the right connections. *Science* **2002**, *296*, 1648-1649.
- [14]. Stessin, A.M.; Zippin, J.H.; Kamenetsky, M.; Hess, K.C.; Hess, K.C.; Levin, L.R. Soluble adenylyl cyclase mediates nerve growth factor-induced activation of Rap1. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17253-17258.
- [15]. Lee, V.; Trojanowski, J.Q.; Schlaepfer, W.W. Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain Res.* **1982**, *238*, 169-180.
- [16]. Amato, A.; Terzo, S.; Mulè, F. Natural compounds as beneficial antioxidant agents in neurodegenerative disorders: A focus on Alzheimer's disease. *Antioxidants* **2019**, *8*, 608.
- [17]. Payne, A.; Nahashon, S.; Taka, E.; Adinew, G.M.; Soliman, K.F.A. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): New therapeutic perspectives for neuroprotection, aging, and neuroinflammation for the modern age. *Biomolecules* **2022**, *12*, 371.
- [18]. Caruana, M.; Cauchi, R.; Vassallo, N. Putative role of red wine polyphenols against brain pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front. Nutr.* **2016**, *3*, 31.
- [19]. Ogura, M.; Takabe, W.; Yagi, M.; Wakayama, S.; Yonei, Y. Study for investigation of symptomatic improvement and safety of the ingestion of rooster comb degradation product

- containing low-molecular hyaluronic acid (INJUV) in individuals with knee and lower back pain; open-label trial with no control group. *Glycative Stress Research* **2018**, *5*, 55-67.
- [20]. Kanazawa, K. Research and development for bioavailable functional foods in food science. *Food Sci. Technol. Res.* **2018**, *24*, 183-191.
- [21]. Lee, H.W.; Park, Y.S.; Jung, J.S.; Shin, W.S. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* **2002**, *8*, 319-324.
- [22]. Hirano, S.; Iwata, M.; Yamanaka, K.; Tanaka, H.; Toda, T.; Inui, H. Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbits. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 2623-2625.
- [23]. Sakai, S.; Akiyama, H.; Sato, Y.; Yoshioka, Y.; Linhardt, R.J.; Goda, Y.; Maitani, T.; Toida, T. Chondroitin sulfate intake inhibits the IgE-mediated allergic response by down-regulating Th2 responses in mice. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19872-19880.
- [24]. Matsufuji, H.; Matsui, T.; Seki, E.; Osajima, K.; Nakashima, M.; Osajima, Y. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 2244-2245.
- [25]. Matsufuji, H.; Matsui, T.; Ohshige, S.; Kawasaki, T.; Osajima, K.; Osajima, Y. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1398-1401.
- [26]. Manso, M.A.; Miguel, M.; Even, J.; Hernández, R.; Aleixandre, A.; López-Fandiño, R. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **2008**, *109*, 361-367.
- [27]. Morimatsu, F.; Ito, M.; Budijanto, S.; Watanabe, I.; Furukawa, Y.; Kimura, S. Plasma cholesterol-suppressing effect of papain-hydrolyzed pork meat in rats fed hypercholesterolemic diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1996**, *43*, 145-153.
- [28]. Neuman, M.G.; Nanau, R.M.; Oruña-Sanchez, L.; Coto, G. Hyaluronic acid and wound

- healing. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *18*, 53-60.
- [29]. Ye, J.; Zhang, H.; Wu, H.; Wang, C.; Shi, X.; Xie, J.; He, J.; Yang, J. Cytoprotective effect of hyaluronic acid and hydroxypropyl methylcellulose against DNA damage induced by thimerosal in Chang conjunctival cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 1459-1466.
- [30]. Torigoe, K.; Tanaka, H.F.; Ohkochi, H.; Miyasaka, M.; Yamanokuchi, H.; Yoshida, K.; Yoshida, T. Hyaluronan tetrasaccharide promotes regeneration of peripheral nerve: *In vivo* analysis by film model method. *Brain Res.* **2011**, *1385*, 87-92.
- [31]. Tanaka, M.; Koyama, Y.; Nomura, Y. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 930-932.
- [32]. Blomstrand, E.; Saltin, B. BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *281*, E365-E374.
- [33]. Hiroshige, K.; Sonta, T.; Suda, T.; Kanegae, K.; Ohtani, A. Oral supplementation of branched-chain amino acid improves nutritional status in elderly patients on chronic haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2001**, *16*, 1856-1862.
- [34]. Gluud, L.L.; Dam, G.; Les, I.; Marchesini, G.; Borre, M.; Aagaard, N.K.; Vilstrup, H. Branched-chain amino acids for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *5*, CD001939.
- [35]. González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L. Metabolite profiling for the identification of altered metabolic pathways in Alzheimer's disease. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *107*, 75-81.
- [36]. Parlesak, A.; Bode, C.; Bode, J.C. Free methionine supplementation limits alcohol-induced liver damage in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1998**, *22*, 352-358.
- [37]. Van Brummelen, R.; du Toit, D. L-Methionine as immune supportive supplement: A clinical evaluation. *Amino Acids.* **2007**, *33*, 157-163.
- [38]. Li, Q.; Cui, J.; Fang, C.; Zhang, X.; Li, L. S-Adenosylmethionine administration

- attenuates low brain-derived neurotrophic factor expression induced by chronic cerebrovascular hypoperfusion or beta amyloid treatment. *Neurosci. Bull.* **2016**, *32*, 153-161.
- [39]. Connor, B.; Dragunow, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res. Rev.* **1998**, *27*, 1-39.
- [40]. Ukiya, M.; Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Kasahara, Y.; Kimura, Y.; Koike, K.; Nikaido, T.; Takido, M. Constituents of compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-*O*-fatty acid esters from edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3187-3197.
- [41]. Yang, R.; Wang, W.X.; Chen, H.J.; He, Z.C.; Jia, A.Q. The inhibition of advanced glycation end-products by five fractions and three main flavonoids from *Camellia nitidissima* Chi flowers. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 252-259.
- [42]. Shimoda, H.; Nakamura, S.; Morioka, M.; Tanaka, J.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Effect of cinnamoyl and flavonol glucosides derived from cherry blossom flowers on the production of advanced glycation end products (AGEs) and AGE-induced fibroblast apoptosis. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1328-1335.
- [43]. Lee, D.; Kim, J.Y.; Qi, Y.; Park, S.; Lee, H.L.; Yamabe, N.; Kim, H.; Jang, D.S.; Kang, K.S. Phytochemicals from the flowers of *Prunus persica* (L.) Batsch: Anti-adipogenic effect of mandelamide on 3T3-L1 preadipocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *49*, 128326.
- [44]. Sang, T.; Crawford, D.; Stuessy, T. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* **1997**, *84*, 1120.
- [45]. He, D.Y.; Dai, S.M. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Paeonia lactiflora* pall., a traditional Chinese herbal medicine. *Front. Pharmacol.* **2011**, *2*, 10.
- [46]. Hsu, F.L.; Lai, C.W.; Cheng, J.T. Antihyperglycemic effects of paeoniflorin and 8-debenzoylpaeoniflorin, glucosides from the root of *Paeonia lactiflora*. *Planta Med.* **1997**, *63*, 323-325.
- [47]. Zhu, X.; Fang, Z.H. New monoterpene glycosides from the root cortex of *Paeonia*

- suffruticosa* and their potential anti-inflammatory activity. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 301-305.
- [48]. Zhong, S.Z.; Ge, Q.H.; Li, Q.; Qu, R.; Ma, S.P. Peoniflorin attenuates A β ₍₁₋₄₂₎-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats. *J. Neurol. Sci.* **2009**, *280*, 71-78.
- [49]. Seow, S.L.S.; Hong, S.L.; Lee, G.S.; Malek, S.N.A.; Sabaratnam, V. 6-Shogaol, a neuroactive compound of ginger (*jahe gajah*) induced neuritogenic activity via NGF responsive pathways in PC-12 cells. *Bmc Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 334.
- [50]. Mustafa, A.M.; Maggi, F.; Papa, F.; Kaya, E.; Dikmen, M.; Öztürk, Y. Isofuranodiene: A neuritogenic compound isolated from wild celery (*Smyrniium olusatrum* L., Apiaceae). *Food Chem.* **2016**, *192*, 782-787.
- [51]. Kim, A.R.; Jin, Q.; Jin, H.G.; Ko, H.J.; Woo, E.R. Phenolic compounds with IL-6 inhibitory activity from *Aster yomena*. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37*, 845-851.
- [52]. Han, S.; Hanh Nguyen, T.T.; Hur, J.; Kim, N.M.; Kim, S.B.; Hwang, K.H.; Moon, Y.H.; Kang, C.; Chung, B.; Kim, Y.M.; Kim, T.S.; Park, J.S.; Kim, D. Synthesis and characterization of novel astragalin galactosides using β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microb. Technol.* **2017**, *103*, 59-67.
- [53]. Doi, N.; Togari, H.; Minagi, K.; Iwaoka, Y.; Tai, A.; Nakaoji, K.; Hamada, K.; Tatsuka, M. 2-O-Octadecylascorbic acid represses RhoGDI β expression and ameliorates DNA damage-induced abnormal spindle orientations. *J. Cell. Biochem.* **2021**, *122*, 739-751.
- [54]. Olennikov, D.N.; Kashchenko, N.I.; Chirikova, N.K.; Akobirshoeva, A.; Zilfikarov, I.N.; Vennos, C. Isorhamnetin and quercetin derivatives as anti-acetylcholinesterase principles of marigold (*Calendula officinalis*) flowers and preparations. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1685.
- [55]. Shu, X.; Duan, W.; Liu, F.; Shi, X.; Geng, Y.; Wang, X.; Yang, B. Preparative separation of polyphenols from the flowers of *Paeonia lactiflora* Pall. by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. B* **2014**, *947-948*, 62-67.

- [56]. Muhammad, A.; Guerrero-Analco, J.A.; Martineau, L.C.; Musallam, L.; Madiraju, P.; Nachar, A.; Saleem, A.; Haddad, P.S.; Arnason, J.T. Antidiabetic compounds from *Sarracenia purpurea* used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nation. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1284-1288.
- [57]. Kong, C.S.; Seo, Y. Antiadipogenic activity of isorhamnetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2012**, *34*: 907-911.
- [58]. Liu, H.; Mou, Y.; Zhao, J.; Wang, J.; Zhou, L.; Wang, M.; Wang, D.; Han, J.; Yu, Z.; Yang, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* **2010**, *15*, 7933-7945.
- [59]. Je Ma, C.; Jung, W.J.; Lee, K.Y.; Kim, Y.C.; Sung, S.H. Calpain inhibitory flavonoids isolated from *Orostachys japonicus*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 676-679.
- [60]. Kameda, K.; Takaku, T.; Okuda, H.; Kimura, Y.; Okuda, T.; Hatano, T.; Agata, I.; Arichi, S. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 680-683.
- [61]. Kim, H.Y.; Moon, B.H.; Lee, H.J.; Choi, D.H. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 227-230.
- [62]. Xu, S.L.; Choi, R.C.; Zhu, K.Y.; Leung, K.W.; Guo, A.J.; Bi, D.; Xu, H.; Lau, D.T.; Dong, T.T.; Tsim, K.W. Isorhamnetin, a flavonol aglycone from *Ginkgo biloba* L., induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: potentiating the effect of nerve growth factor. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 278273.
- [63]. Chan, G.K.L.; Hu, W.W.H.; Zheng, Z.X.; Huang, M.; Lin, Y.X.Y.; Wang, C.Y.; Gong, A.G.W.; Yang, X.Y.; Tsim, K.W.K.; Dong, T.T.X. Quercetin potentiates the NGF-induced effects in cultured PC 12 cells: identification by HerboChips showing a binding with NGF. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2018**, *2018*: 1502457.
- [64]. Suzukawa, K.; Miura, K.; Mitsushita, J.; Resau, J.; Hirose, K.; Crystal, R.; Kamata, T.

- Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13175-13178.
- [65]. Arya, A.; Chahal, R.; Rao, R.; Rahman, M.H.; Kaushik, D.; Akhtar, M.F.; Saleem, A.; Khalifa, S.M.A.; El-Seedi, H.R.; Kamel, M.; Albadrani, G.M.; Abdel-Daim, M.M.; Mittal, V. Acetylcholinesterase inhibitory potential of various sesquiterpene analogues for Alzheimer's disease therapy. *Biomolecules* **2021**, *11*, 350.
- [66]. Fukuyama, Y.; Kubo, M.; Harada, K. The search for, and chemistry and mechanism of, neurotrophic natural products. *J. Nat. Med.* **2020**, *74*, 648-671.
- [67]. Du, L.Y.; Zhao, M.; Xu, J.; Qian, D.W.; Jiang, S.; Shang, E.X.; Guo, J.M.; Duan, J.A. Analysis of the metabolites of isorhamnetin 3-*O*-glucoside produced by human intestinal flora in vitro by applying ultraperformance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2489-2495.
- [68]. Aloe, L.; Tuveri, M.A.; Carcassi, U.; Levi-Montalcini, R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum.* **1992**, *35*, 351-355.
- [69]. Lowe, E.M.; Anand, P.; Terenghi, G.; Williams-Chestnut, R.E.; Sinicropi, D.V.; Osborne, J.L. Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis. *Br. J. Urol.* **1997**, *79*, 572-577.
- [70]. Miller, L.J.; Fischer, K.A.; Goralnick, S.J.; Litt, M.; Burleson, J.A.; Albertsen, P.; Kreutzer, D.L. Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* **2002**, *59*, 603-608.
- [71]. Wu, C.; Boustany, L.; Liang, H.; Brennan, T.J. Nerve growth factor expression after plantar incision in the rat. *Anesthesiology* **2007**, *107*, 128-135.
- [72]. Rangel-Ordonez, L.; Noldner, M.; Schubert-Zsilavec, M.; Wurglics, M. Plasma levels and distribution of flavonoids in rat brain after single and repeated doses of standardized *Ginkgo biloba* Extract EGb 761. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1683-1690.
- [73]. Paula, P.C.; Angelica Maria, S.G.; Luis, C.H.; Gloria Patricia, C.G. Preventive effect of

- quercetin in a triple transgenic Alzheimer's disease mice model. *Molecules* **2019**, *24*, 2287.
- [74]. Van Nieuwenhuyzen, W.; Tomás M.C.; Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 472-486.
- [75]. Magaquian, D; Delgado Ocaña, S.; Perez, C.; Banchio, C. Phosphatidylcholine restores neuronal plasticity of neural stem cells under inflammatory stress. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 22891.
- [76]. Chung, S.Y.; Moriyama, T.; Uezu, E.; Uezu, K.; Hirata, R.; Yohena, N.; Masuda, Y.; Kokubu, T.; Yamamoto, S. Administration of phosphatidylcholine increases brain acetylcholine concentration and improves memory in mice with dementia. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1484-1489.
- [77]. Carter, J.M.; Waite, K.A.; Campenot, R.B.; Vance, J.E.; Vance, D.E. Enhanced expression and activation of CTP: Phosphocholine cytidyltransferase β 2 during neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44988-44994.
- [78]. Araki, W.; Wurtman, R.J. Control of membrane phosphatidylcholine biosynthesis by diacylglycerol levels in neuronal cells undergoing neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11946-11950.
- [79]. Yen, C.L.; Mar, M.H.; Meeker, R.B.; Fernandes, A.; Zeisel, S.H. Choline deficiency induces apoptosis in primary cultures of fetal neurons. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1704-1710.
- [80]. Posse de Chaves, E.; Vance, D.E.; Campenot, R.B.; Vance, J.E. Axonal synthesis of phosphatidylcholine is required for normal axonal growth in rat sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* **1995**, *128*, 913-918.
- [81]. Sajjadi, S.E.; Shokoohinia, Y.; Mehramiri, P. Isolation and characterization of steroids, phthalide and essential oil of the fruits of *Kelussia odoratissima* Mozaff., an endemic mountain celery. *Res. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 35-41.
- [82]. Chaturvedula, V.S.; Prakash, I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *Int. Curr. Pharm. J.* **2012**, *1*, 239-242.
- [83]. Luhata, L.P.; Munkombwe, N.M. Isolation and characterization of stigmasterol and β -

- sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.* **2015**, *2*, 88-95.
- [84]. Jabeur, H.; Zribi, A.; Makni, J.; Rebai, A.; Abdelhedi, R.; Bouaziz, M. Detection of chemlali extra-virgin olive oil adulteration mixed with soybean oil, corn oil, and sunflower oil by using GC and HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 4893-4904.
- [85]. Al-Okbi, S.Y.; Mohamed, D.A.; Hamed, T.E.; Esmail, R.S.; Donya, S.M. Prevention of renal dysfunction by nutraceuticals prepared from oil rich plant foods. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, 618-627.
- [86]. Almeida, C.A.S.; Baggio, S.R.; Mariutti, L.R.B.; Bragagnolo, N. One-step rapid extraction of phytosterols from vegetable oils. *Food Res. Int.* **2020**, *130*, 108891.
- [87]. Loizou, S.; Lekakis, I.; Chrousos, G.P.; Moutsatsou, P. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 551-558.
- [88]. Bin Sayeed, M.S.; Ameen, S.S. β -Sitosterol: A promising but orphan nutraceutical to fight against cancer. *Nutr. Cancer* **2015**, *67*, 1214-1220.
- [89]. Ayaz, M.; Junaid, M.; Ullah, F.; Subhan, F.; Sadiq, A.; Ali, G.; Ovais, M.; Shahid, M.; Ahmad, A.; Wadood, A.; et al. Anti-Alzheimer's studies on β -sitosterol isolated from *Polygonum hydropiper* L. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 697.
- [90]. Shi, C.; Liu, J.; Wu, F.; Zhu, X.; Yew, D.T.; Xu, J. β -Sitosterol inhibits high cholesterol-induced platelet β -amyloid release. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2011**, *43*, 691-697.
- [91]. Vanmierlo, T.; Weingärtner, O.; van der Pol, S.; Husche, C.; Kerksiek, A.; Friedrichs, S.; Sijbrands, E.; Steinbusch, H.; Grimm, M.; Hartmann, T.; et al. Dietary intake of plant sterols stably increases plant sterol levels in the murine brain. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 726-735.

論文目録

主論文

Neurite outgrowth-promoting compounds from cockscomb hydrolysate

Takeru Koga, Akihiro Tai,

Nutrients, 14, 1422, March, 2022, Published

Neurite outgrowth-promoting compounds from the petals of *Paeonia lactiflora* in PC12 cells

Takeru Koga, Hideyuki Ito, Yuji Iwaoka, Toshiro Noshita, Akihiro Tai,

Molecules, 27, 7670, November, 2022, Published

Neurite outgrowth-promoting activity of compounds in PC12 cells from sunflower seeds

Takeru Koga, Takaiku Sakamoto, Eiji Sakuradani, Akihiro Tai,

Molecules, 25, 4748, October, 2020, Published

副論文

Synthesis and biological activity of (\pm)-7,3',4'-trihydroxyhomoisoflavan and its analogs

Toshiro Noshita, Kentaro Fujita, Takeru Koga, Hidekazu Ouchi, Akihiro Tai,

Bioorg Med Chem Lett., 31, 127674, January, 2021, Published

Synthesis of ascorbic acid derivatives with different types of C 8 straight acyl chain and their neurite outgrowth-enhancing activities

Yuji Iwaoka, Misaki Fukushima, Hideyuki Ito, Takeru Koga, Naoaki Kawahara, Akihiro Tai,

J. Nutr. Sci. Vitaminol., 68, 236-239, June, 2022, Published

Degranulation inhibitors from petals of *Coreopsis grandiflora*

Takeru Koga, Nanako Shiki, Hideyuki Ito, Yuji Iwaoka, Akihiro Tai,

Rec. Nat. Prod., 16, 645-650, November-December, 2022. Published

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました徳島大学大学院社会産業理工学研究部 田井章博教授に心より感謝いたします。

本論文をご精読いただき有用な指摘をいただきました、櫻谷英治教授、浅田元子教授に深くお礼申し上げます。また、浅田元子教授には、副指導としても3年間、研究のご指導をしていただきました。心から感謝いたします。そして、アドバイザー教員として、3年間ご指導いただきました田端厚之准教授に心より感謝いたします。

シャクヤクの花由来の神経突起形成促進化合物に関する研究で、有用なご助言いただきました岐阜医療科学大学薬学部 野下俊朗教授に深謝いたします。また、シャクヤクの花より単離した神経突起形成促進化合物の NMR 測定および、研究に関するご助言をいただきました岡山県立大学保健福祉学部 伊東秀之教授、岩岡裕二助教に心から感謝いたします。そして、ヒマワリ種子由来の神経突起形成促進化合物に関する研究における GC-MS の測定は、櫻谷英治教授、阪本鷹行講師のご協力により遂行することができました。ここに感謝の意を表します。

鶏冠加水分解物をご供与していただきました株式会社らいむに、心よりお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、研究室の皆様には、多大なご協力とご支援をいただきました。県立広島大学時代の先輩方や同期たち、徳島大学時代の後輩たちと、たくさんの仲間を支えられ、言い尽くせないほどのご恩を受けました。ありがとうございました。

最後に、本当に長い間、温かく見守り、明るく励まし、博士課程へ進学した私を遠い地から応援してくれた両親に、心から感謝いたします。