

論文内容要旨

老人性認知症は高齢化社会を迎えている先進諸国で深刻な社会問題となっているが、根本的な治療および予防法は未だに開発されていない。このような状況下で、ヤマブシタケは認知症の予防や改善に対する効果を期待した機能性食品として販売されている。ヤマブシタケの健康食品としての利用が進んだ要因は、静岡大学の河岸らがヤマブシタケ特有の成分として、子実体からヘリセノン A～H を、菌糸体からエリナシン A～I を単離し、ヘリセノン C-H、およびエリナシン A-I が、マウスまたはラットの初代アストロサイトをを用いた *in vitro* の実験系において、神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) の産生を促進すると報告したことにある。NGF は神経細胞の生存と機能維持に必須の成分と考えられている神経栄養因子 (Neurotrophin) の一つである。NGF は中枢において、特にアルツハイマー病で顕著な変性が見られる前脳基底核のコリン作動性ニューロンに作用する神経栄養因子であることから、ヤマブシタケはアルツハイマー病に対する作用を期待した機能性食材として注目されるようになった。しかし、実際にヤマブシタケの成分が生体において NGF の産生を誘導し、認知症の予防または改善作用を示すという科学的根拠はほとんどない。そこで本研究は、ヤマブシタケの認知症に対する作用を科学的に検証し、創薬や新たな機能性食品開発の可能性を検討することを目的として行った。

初めに 1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞を用いて、ヤマブシタケのエタノール抽出物が NGF 遺伝子発現量および NGF タンパク質分泌量を増加させることを確認した。さらにヤマブシタケエタノール抽出物による刺激培養後の 1321N1 細胞培養上清は、PC12 細胞の神経突起伸長を誘導した。この結果は、ヤマブシタケ抽出物がグリア細胞からの神経栄養因子分泌を介して、神経細胞分化を促進させる可能性を示している。またヤマブシタケエタノール抽出物の NGF 遺伝子発現促進の作用機序について検討した結果、JNK のリン酸化を介して NGF 遺伝子発現を促進していると考えられた。次に *in vivo* での作用を確認する為、マウスへのヤマブシタケの経口投与を行った結果、マウスの脳海馬における NGF mRNA 量が有意に上昇した。これにより、ヤマブシタケの NGF 発現促進活性成分は、経口投与によって中枢へ移行し神経系に作用すると考えられた。しかし有効成分と考えられていたヘリセノン類のうち、ヤマブシタケ抽出物中の含有量が高いヘリセノン C、D および E を単離し活性試験を行ったところ、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞の NGF 遺伝子発現を促進しなかった。これはヤマブシタケが、ヘリセノン類以外に脂溶性の活性物質を有していることを示していたが、現在は新しい活性成分を発見するには至っていない。

一方、ヤマブシタケの薬理作用を調べる為の予備的な試験で、ヤマブシタケ抽出物が血小板凝集を阻害することを見出した。この結果はヤマブシタケが血小板凝集抑制作用を介して、脳梗塞や心筋梗塞をはじめとする血栓症の予防に有効であるとともに、血栓生成の抑制によって脳血管障害性認知症の予防に有効な作用を持つ可能性を示していると考えられた。そこで血小板凝集抑制作用の有効成分と作用機序を特定する為の研究を行った。初めにウサギ血小板のコラーゲン誘発性血小板凝集に対する抑制活性を指標として、ヤマブシタケに含まれる血小板凝集抑制活性成分を単離し、ヘリセノン B と同定した。

ヘリセノン B はコラーゲン誘発性血小板凝集を特異的に低濃度で阻害し、U46619（トロンボキサン A₂ アナログ）、トロンビン、アデノシン二リン酸、アドレナリンによる血小板凝集に対する阻害活性は低かった。コラーゲン誘発性血小板凝集は、主に 2 種類の受容体、GPVI と $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンからのシグナルによるアラキドン酸遊離とトロンボキサン A₂ 産生を介して起こる事が知られている。ヘリセノン B はアラキドン酸およびコンプレキシン（GPVI 特異的アゴニスト）による血小板凝集を阻害しなかったことから、 $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンからアラキドン酸遊離までの経路を阻害していると考えられた。さらにヘリセノン B は、コラーゲンおよび $\alpha 2/\beta 1$ インテグリン結合ペプチドへの血小板の接着を阻害したことから、 $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンとコラーゲンの会合を阻害することにより血小板凝集を抑制すると考えられた。またヘリセノン B は、ヒト血小板のコラーゲン誘発性凝集も強力に阻害することが明らかになった。よってヘリセノン B は、これまでに無かった新規の作用機序を持つ抗血小板薬のリード化合物になり得ると考えられた。またヤマブシタケは脳梗塞や心筋梗塞などの血栓症の予防に有効な機能性食品素材として利用できる可能性がある他、認知症においてアルツハイマー病に次いで多いと言われている脳血管障害性認知症の予防効果も期待できると考えられた。ヤマブシタケが NGF 産生誘導作用以外に血小板凝集抑制作用を介しても認知症の発症を抑制する可能性が示された。

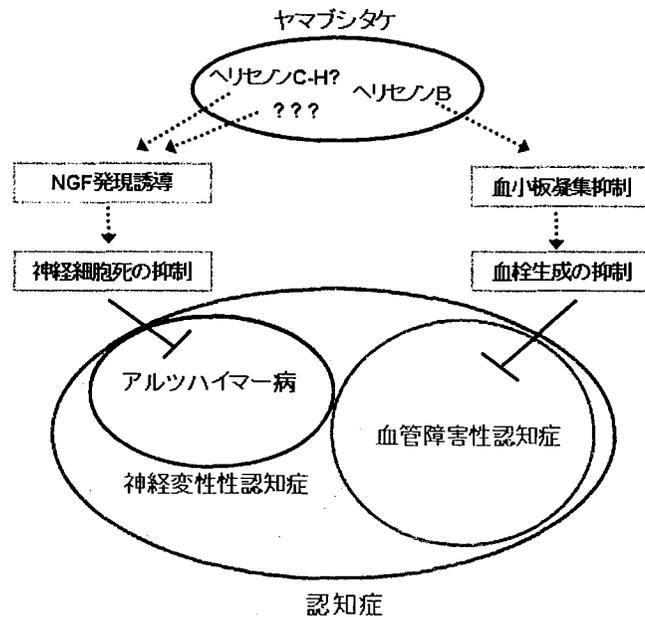
以上の結果を受けて、本研究はヤマブシタケの成分が *in vivo* で中枢へ作用し、認知機能を改善させる作用があるかを検討した。アミロイド $\beta(25-35)$ ペプチド誘発性認知機能低下モデルマウスにヤマブシタケ凍結乾燥粉末 5% (w/w) を混合した餌を 3 週間与えた後、動物の認知機能を 2 種類の行動薬理学試験、Y-迷路試験および新規対象認識試験によって評価した。その結果ヤマブシタケは、両試験において A $\beta(25-35)$ の脳室内投与による認知機能の低下を有意に抑制した。この結果は活性成分が腸管から中枢へ移行し、認知機能に対する作用を発現することを示した。前の試験で見られたヤマブシタケの経口投与による脳海馬での NGF 遺伝子発現促進が、認知機能低下抑制に関与している可能性も考えられた。

さらにヤマブシタケがヒトに対しても認知機能障害の改善作用を示すことを確かめる為、軽症記憶障害と判断された患者 30 名を対象としてプラセボを用いた二重盲検並行群間試験を行ない、長谷川式 (HDS-R) に準ずる認知機能評価スケールを指標として検証した。ヤマブシタケ摂取群はヤマブシタケ乾燥粉末を 96% 含む錠剤を 1 日 3g ずつ摂取し、プラセボ群はヤマブシタケの代わりにコーンスターチと乳糖を含む同色同形状の錠剤を同量摂取した。その結果、試験 8 週目以降でヤマブシタケ群はプラセボ群に比べて有意に認知機能スケールのスコアが上昇し、認知機能の改善が見られた。同時に行った血液検査、尿検査や医師による診断では、ヤマブシタケの副作用と考えられる有害な事象は確認されなかったことから、ヤマブシタケ摂取の安全性に問題はないと考えられた。この結果からヤマブシタケは、ヒトにおいても経口摂取で認知機能に作用し、ヤマブシタケの継続的な摂取は、重篤な副作用を生じることなく軽度の認知症の改善に有効に働くと考えられた。

以上の結果より、ヤマブシタケは下図に示すように、①中枢神経系でグリア細胞の NGF 産生を促進させ神経細胞の維持と活性化をすること、②血小板凝集抑制作用により血管内での血栓生成を阻害して脳血管障害を抑制すること、の二種類の作用機序により、認知症を予防または改善する可能性があると考え

えられた。またヤマブシタケに含まれる有効成分が経口摂取によっても中枢神経系に作用し、認知機能を改善する可能性があることが示された。

アルツハイマー病の治療は、現在国内で承認されているアリセプトのようなアセチルコリン作動性神経伝達改善薬に加え、今後β-アミロイドペプチドの脳内蓄積を直接抑制する治療法が開発されると思われる。その一方では神経栄養因子により神経変性を抑制する治療法も同時に研究されており、将来的に神経栄養因子療法を加えた多剤併用療法が開発される可能性もある。今後さらにヤマブシタケのNGF発現誘導活性成分とその作用機序の研究が進めば、新しい神経栄養因子療法の開発につながる可能性もあると考えられる。またヤマブシタケは血小板凝集抑制作用を有し、脳血管障害性認知症の予防に対しても効果が見込めることが明らかになった。これまで考えられてきた以上に多様な作用で認知症に有効性を示すきのこであると考えられる。ヤマブシタケの活性成分と作用機序を今後さらに明らかにし、創薬や新たな機能性食品の開発に向けた研究を進めることには大きな意義があると考えられる。



ヤマブシタケの認知症予防および改善作用機序

審査結果の要旨

老人性認知症は社会的に大きな問題であり、その根本的な治療および予防法の開発が強く望まれている。認知症の予防や治療を期待した機能性食品も多くある。ヤマブシタケはアルツハイマーに対する作用を期待した機能性食材としてすでに広く食されているが、実際にヤマブシタケの成分が生体において認知症の予防または改善作用を示すという科学的根拠は乏しかった。本論文は、ヤマブシタケの認知症に対する有効性を科学的に検証することを目的として、その抽出物あるいはその成分の NGF 産生作用と血小板凝集抑制作用、さらに生体レベルでの認知症改善作用について解析した結果を記したものである。

まず、ヒトアストロサイトーマ細胞を用い、ヤマブシタケ抽出物の NGF 産生増大作用を確認した。さらにヤマブシタケを経口投与したマウスにおいて海馬における NGF 遺伝子発現が亢進することを見だし、生体レベルでも NGF 産生を誘導することを示した。

次に、ヤマブシタケにはウサギ血小板凝集抑制作用があることを見だし、その活性成分の同定と作用機構の解明を試みた。まずヤマブシタケに含まれる血小板凝集抑制活性成分としてヘリセノン B を同定した。興味深いことにヘリセノン B は、コラーゲン誘発血小板凝集を強く阻害するものの、トロンボキサン A₂ アナログ、トロンビン、アデノシン二リン酸、アドレナリンによる血小板凝集に対する作用は弱かった。コラーゲンによる血小板凝集は主に 2 種類の受容体 GPVI と $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンからのシグナルによるアラキドン酸遊離を介したものであるが、ヘリセノン B はアラキドン酸あるいは GPVI のアゴニストであるコンブルキシンによる血小板凝集を抑制せず、コラーゲンおよび $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンとの血小板の結合を抑制することを明らかにした。これらのことから、ヘリセノン B はコラーゲンと $\alpha 2/\beta 1$ インテグリンの結合を阻害して血小板凝集を抑制するという新規の作用機序をもつ抗血小板薬開発のリード化合物になることを示唆した。

最後に、ヤマブシタケ成分が *in vivo* において認知機能を改善させるか解析した。アミロイド β (25-35) ペプチド誘発性認知機能低下モデルマウスに、ヤマブシタケ凍結乾燥粉末混合餌を 3 週間与え、Y- 迷路試験および新規対象認識試験により認知機能を評価した。その結果、いずれの試験においても認知機能の低下を有意に抑制した。さらに、軽症記憶障害と判断された患者 30 名に対し、プラセボを用いた二重盲検並行群間試験を行ない、長谷川式 (HDS-R) に準じる認知機能評価スケールを指標として検証した結果、8 週間以上の摂取により認知機能の改善が認められることを示した。

以上のように本研究の結果、ヤマブシタケは NGF 産生誘導作用とともに、血小板凝集抑制作用を示すこと、マウス、ヒトにおいて実際に認知機能の改善作用を示すことを明らかにした。これらの研究成果はヤマブシタケが神経変性性認知症や血管障害性認知症の改善、予防に有効な機能性食品であることを科学的に示している。よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。