

博士論文

ノビレチンの抗アルツハイマー病作用機構に関する研究

本論文は静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
薬学研究院 博士論文である

2015年9月

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府
薬学研究院 医薬生命化学講座

木村 純子

The anti-Alzheimer activity of nobiletin: A mechanistic study

September 2015

Junko Kimura

略語表

本論文中に用いた略語は以下の通りである。

AChE : acetylcholinesterase
AD : Alzheimer's disease
AICD : APP intracellular domain
ANOVA : analysis of variance
AP-1 : activator protein 1
APP : amyloid precursor protein
A β : β -amyloid
ChAT : choline acetyltransferase
CRE : cAMP response element
CREB : CRE-binding protein
CBP : CREB- binding protein
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO : dimethyl sulfoxide
DTNB : 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
ERK : extracellular signal-regulated kinase
FBS : fetal bovine serum
HRP : horseradish peroxidase
HS : horse serum
IgG : immunoglobulin G
iPS : induced pluripotent stem
L : leucine
LTP : long-term potentiation
mAChR : muscarinic acetylcholine receptor
MAP2 : microtubule associated protein 2
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCI : mild cognitive impairment
MME : membrane metalloendopeptidase
NEP : neprilysin
NeuN : neuronal nuclei
NF-H : neurofilament heavy
NGF : nerve growth factor
NMDA : *N*-methyl-D-aspartate
OBX : olfactory bulbectomy
P : proline
PBS : phosphate-buffered saline
PC12 : rat pheochromocytoma cell line
PDL : Poly-D-Lysine
PKA : protein kinase A
PLL : Poly-L-Lysine
PS1 : presenilin-1
PVDF : polyvinylidene difluoride
QOL : quality of life

目次

緒論.....	1
第1章 ノビレチンおよび類縁体における ERK 活性化能の比較検討.....	5
第1節 序論.....	5
第2節 材料および実験方法.....	6
1-2-1. 材料・試薬.....	6
1-2-2. 細胞培養.....	6
1-2-3. 細胞のノビレチン処理およびタンパク質抽出.....	6
1-2-4. Western blot 法による ERK のリン酸化解析.....	7
1-2-5. データおよび統計解析.....	7
第3節 実験結果.....	8
第4節 考察.....	11
第2章 記憶学習に関わる遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用検討.....	12
第1節 序論.....	12
第2節 NMDA 受容体サブユニット <i>Grin1</i> 、 <i>2a</i> 、 <i>2b</i> および <i>c-fos</i> 遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用解析.....	14
2-2-1. 材料および実験方法.....	14
2-2-1-1. 材料・試薬.....	14
2-2-1-2. 細胞培養.....	14
2-2-1-3. 細胞のノビレチン処理および RNA 抽出.....	14
2-2-1-4. 逆転写反応およびリアルタイム PCR.....	14
2-2-1-5. データおよび統計解析.....	15
2-2-2. 実験結果.....	15
2-2-3. 考察.....	17
第3節 ムスカリン性アセチルコリン受容体および CREB 結合タンパク質遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用解析.....	20
2-3-1. 材料および実験方法.....	20
2-3-1-1. 材料・試薬.....	20
2-3-1-2. 細胞培養.....	20
2-3-1-3. 細胞のノビレチン処理.....	20
2-3-1-4. 逆転写反応およびリアルタイム PCR.....	20
2-3-1-5. データおよび統計解析.....	21
2-3-2. 実験結果.....	21
2-3-3. 考察.....	23
第3章 ノビレチンおよび類縁体におけるアセチルコリン分解酵素阻害作用の検討.....	25
第1節 序論.....	25
第2節 材料および実験方法.....	26
3-2-1. 材料・試薬.....	26
3-2-2. 比色定量法を用いたノビレチン AChE 活性抑制作用の濃度依存性検討.....	26

3-2-3.	データおよび統計解析.....	26
3-2-4.	比色定量法を用いた類縁体の AChE 活性抑制作用測定.....	27
3-2-5.	ノビレチンおよびドネペジルの相互作用検討.....	27
第 3 節	実験結果.....	28
3-3-1.	ノビレチンの濃度依存的 AChE 活性抑制作用.....	28
3-3-2.	類縁体の AChE 活性抑制作用.....	29
3-3-3.	ノビレチンおよびドネペジル併用効果評価.....	30
3-3-4.	考察.....	31
第 4 章	A β の細胞毒性に対するノビレチンの作用検討.....	32
第 1 節	序論.....	32
第 2 節	材料および実験方法.....	34
4-2-1.	材料・試薬.....	34
4-2-2.	細胞培養.....	34
4-2-3.	ノビレチンおよび A β ₁₋₄₂ 処理.....	34
4-2-4.	細胞生存率の測定と解析.....	34
4-2-5.	逆転写反応およびリアルタイム PCR.....	35
第 3 節	実験結果.....	36
4-3-1.	A β 誘発性細胞死に対するノビレチンの抑制作用.....	36
4-3-2.	A β 誘発性遺伝子発現減少とノビレチンによる抑制作用.....	37
第 4 節	考察.....	39
第 5 章	iPS 細胞由来アルツハイマー病モデル神経細胞におけるノビレチンの作用解析.....	40
第 1 節	序論.....	40
第 2 節	材料および実験方法.....	43
5-2-1.	材料・試薬.....	43
5-2-2.	iPS 細胞の神経分化誘導.....	43
5-2-3.	iPS 細胞由来神経細胞のノビレチン処理.....	43
5-2-4.	逆転写反応およびリアルタイム PCR 解析.....	44
5-2-5.	免疫細胞染色.....	44
第 3 節	実験結果.....	45
5-3-1.	iPS 細胞の神経分化確認.....	45
5-3-2.	ノビレチンが A β 産生酵素 BACE1 遺伝子発現に及ぼす作用.....	46
5-3-3.	ノビレチンが A β 分解酵素 NEP 遺伝子発現に及ぼす作用.....	47
5-3-4.	細胞内 A β 蓄積に対するノビレチンの効果.....	48
第 4 節	考察.....	51
総括	53
謝辞	55
参考文献	56

緒論

現在我が国では、超高齢社会に伴う認知症患者数が増加の一途を辿っており、またそれを取り巻く介護負担の増大が深刻な社会問題となっている。2012年の時点で、65歳以上の人口3,070万人のうち約462万人が認知症に罹患していることが厚生労働省より公表された (Fig. 1)^{1,2}。さらに、軽度認知障害 (mild cognitive impairment: MCI) である約400万人を合わせると、65歳以上人口の約28%が「認知症もしくはその予備軍」と言える。2010年に厚生労働省が公表した「認知症高齢者の将来推計」では、我が国の認知症高齢者数は2025年に約470万人に達するとされていたが、その推測を上回る速さで患者数は増加している³。

認知症は、脳疾患により認知機能が持続的に低下し、生活に支障をきたしている状態を示す症状の総称である。その原因疾患として、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD)、脳血管性、レビー小体型および前頭側頭型認知症などが挙げられる。中でも、認知症の約半数を占めるADは、進行性の記憶障害、見当識障害、学習障害、空間認知機能障害などの認知機能低下を臨床的特徴とする、神経変性を伴う脳機能性疾患である⁴。しかしその病因は十分解明されておらず、いまだ確固たる予防ならびに治療法は確立されていない。ADの発症および脳内の神経変性進行の原因の一つとして、 β -アミロイド (β -amyloid: A β) が脳内に蓄積する「アミロイド仮説」が提唱されている^{5,6}。A β の重合により形成されるアミロイド線維や、変性神経突起は、アミロイドプラーク (老人斑) となり、海馬や大脳皮質の神経細胞外へ沈着することが知られており⁷、これはAD患者脳で見られる病理学的な特徴である。またそれ以外にも、可溶性A β ペプチドや、異常リン酸化タウタンパク質などが神経細胞内へ蓄積することが報告されている^{8,9}。現在ADの治療には、神経伝達物質アセチルコリンの分解酵素アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) の阻害剤であるドネペジル (E2020, Aricept[®]) が頻用されている^{10,11}。これはAD患者脳でアセチルコリンの著しい減少が見いだされていることから提唱された「コリン仮説」に基づくものである^{12,13}。しかしながら、当該薬はAD患者に対して症状緩和や進行を遅延するための対症療法を施すにとどまっている。現在また将来的に、高齢者とそれに関わる人々の生活の質、すなわち quality of life (QOL) 向上や健康長寿を目指す観点より、当疾患の予防法および根本的な治療法の確立は我が国において極めて重要かつ急務の課題である。

私が所属する研究チームでは、1990年代よりADの予防ならびに治療に有効な天然物の発見を目的としたスクリーニングを実施してきた。神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) による神経分化モデルとして頻用される、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来培養細胞株 (rat pheochromocytoma cell line: PC12) の亜種であるPC12D細胞を用いて、NGF様の神経賦活作用を有する天然物の探索を実施した。その結果、ミカン科の柑橘であるシークワーサーの果

皮より単離されたポリメトキシフラボンの一種、ノビレチン (3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone; **Fig. 2**) が神経突起伸長作用を有することを見いだした。さらに、以下に述べる AD および記憶障害モデル動物の *in vivo* 実験において、ノビレチンはその障害を顕著に改善することが明らかになった¹⁴⁻¹⁹。

(1) 実験動物の脳室内に、可溶性 $A\beta_{1-40}$ を注入することで空間認知機能障害が誘発されることが知られている²⁰。このように作成した AD モデルラットに対し、 $A\beta$ 注入の前後 7 日間に渡り、ノビレチンを経口投与 (10 or 50 mg/kg) した後、8 方向放射状迷路課題を実施した。その結果、ノビレチン投与群では参照記憶エラーや作業記憶エラーが顕著に減少した。また、当ラットから得た海馬初代培養細胞では、 $A\beta$ 誘発性の転写制御因子 cAMP response element (CRE) -binding protein (CREB) のリン酸化の低下が改善された¹⁴。

(2) アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) のスウェーデン型/ロンドン型二重変異体トランスジェニックマウス (APP-SL7-5 Tg) の脳内では、 $A\beta_{1-42}$ および $A\beta_{1-40}$ の過剰発現が認められる²¹。この AD モデルを用いて、 $A\beta$ の蓄積がまだわずかである 9 ヶ月齢より、ノビレチンを 4 ヶ月間投与 (10 or 50 mg/kg) した。その結果、脳内の不溶性 $A\beta_{1-42}$ および $A\beta_{1-40}$ 量が有意に低下し、免疫組織学的解析により脳内の $A\beta$ 沈着が減少した¹⁹。

(3) コリン作動性神経変性を伴う嗅球摘出 (olfactory bulbectomy: OBX) 誘発性記憶障害モデルマウスに対し、11 日間のノビレチン腹腔内 (50 mg/kg) および経口 (50-100 mg/kg) 投与は、受動的回避実験実施により記憶障害を顕著に改善した^{15,17}。さらに Y 迷路試験を行った結果、11 日間のノビレチン腹腔内 (50 mg/kg) により短期記憶の改善も認められた^{15,17}。

(4) 記憶形成に重要であるグルタミン酸受容体 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) を遮断薬 MK-801 によって機能低下させ、記憶・学習障害を誘発したマウスに対してノビレチンを 1 週間腹腔内投与 (10 or 50 mg/kg) した後、恐怖条件付け実験を行った。その結果、MK-801 誘発性の記憶障害は、ノビレチン非投与群と比較して 40-70% 改善された¹⁸。

(5) 若年期から記憶学習障害を示す老化促進モデルマウス SAMP8 において、ノビレチン投与群では非投与群と比較して有意にその記憶障害が改善された¹⁶。

記憶の形成には、転写因子 CREB 標的遺伝子群の大規模な発現変動が必要であることが報告されている²²⁻²⁴。また、海馬 CA1 領域における CRE 依存性転写は、シナプス可塑性の一種である長期増強 (long-term potentiation: LTP) を顕著に増強させる²⁵。当研究チームではこれまでに、ラット海馬由来の神経初代培養細胞および PC12D 細胞を用いた *in vitro* 実験において、ノビレチンは protein kinase A (PKA)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/CREB 細胞内シグナル経路を活性化し、CRE 依存性転写を惹起するという作用を報告してきた^{15,26}。しかしながら、ノビレチンによってどのような記憶・学習関連遺伝子が発現変動するか、またノ

ビレチンと既存薬との併用効果、A β に対するノビレチンの効果については明らかになっていない。

本研究では、第1章においてPC12D細胞におけるERK1/2のリン酸化を指標にしたノビレチンとその類縁体のERK活性について、Western blot法を用いて検討した。また第2章では、記憶・学習に深く関わる遺伝子に着目し、PC12およびPC12D細胞においてそれら遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用をリアルタイムPCR法により解析した。さらに第3章では、既存薬ドネペジルとの比較検討として、ノビレチンおよび類縁体がAChE阻害作用を有するかを、ヒト赤血球由来AChEを用いて比色定量解析した。第4章においては、PC12細胞を用い、A β が惹起する細胞毒性に対するノビレチンの作用を、細胞生存率の定量と遺伝子発現を指標に検討した。さらに第5章では、A β を過剰産生するヒトinduced pluripotent stem (iPS)細胞由来ADモデル神経細胞を用い、ノビレチンのA β 分解促進作用について検討を行った。なお、本研究で用いたPC12細胞とその亜種PC12D細胞はNGFによる神経様細胞分化にかかる時間が異なるが、基本的な性質は同様である。

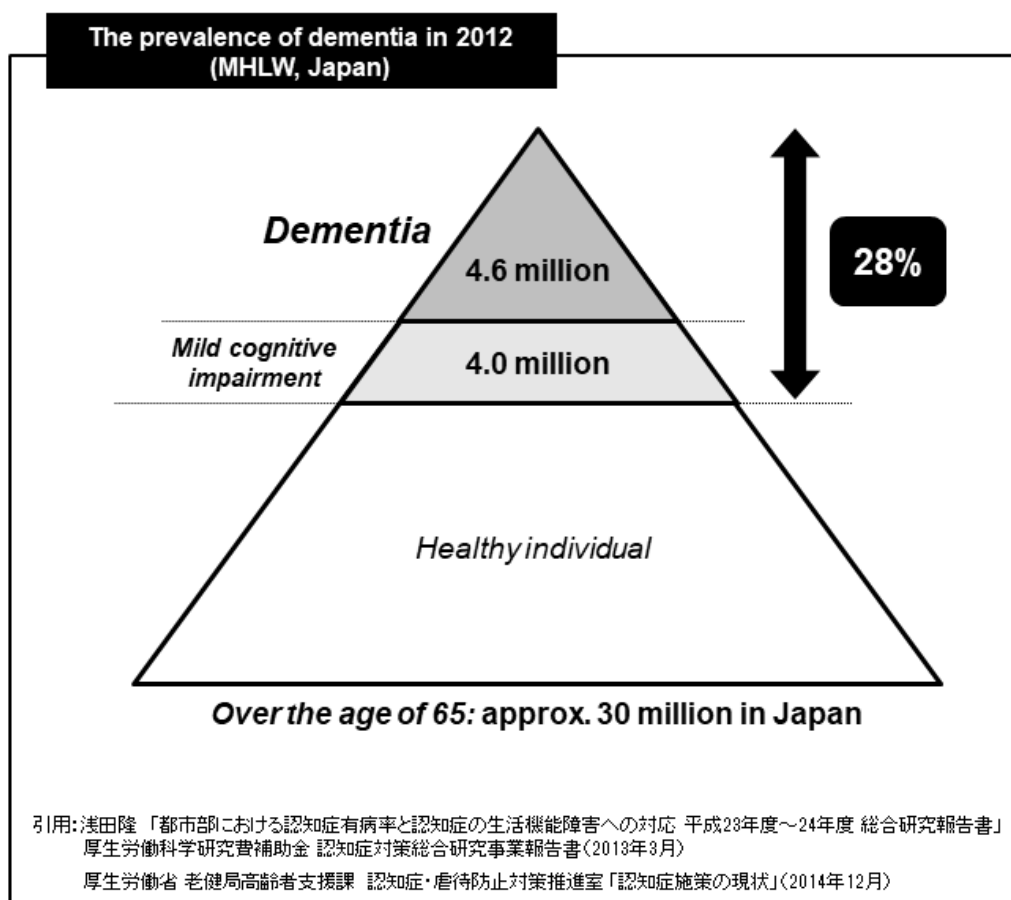


Fig. 1 The prevalence of dementia in Japan

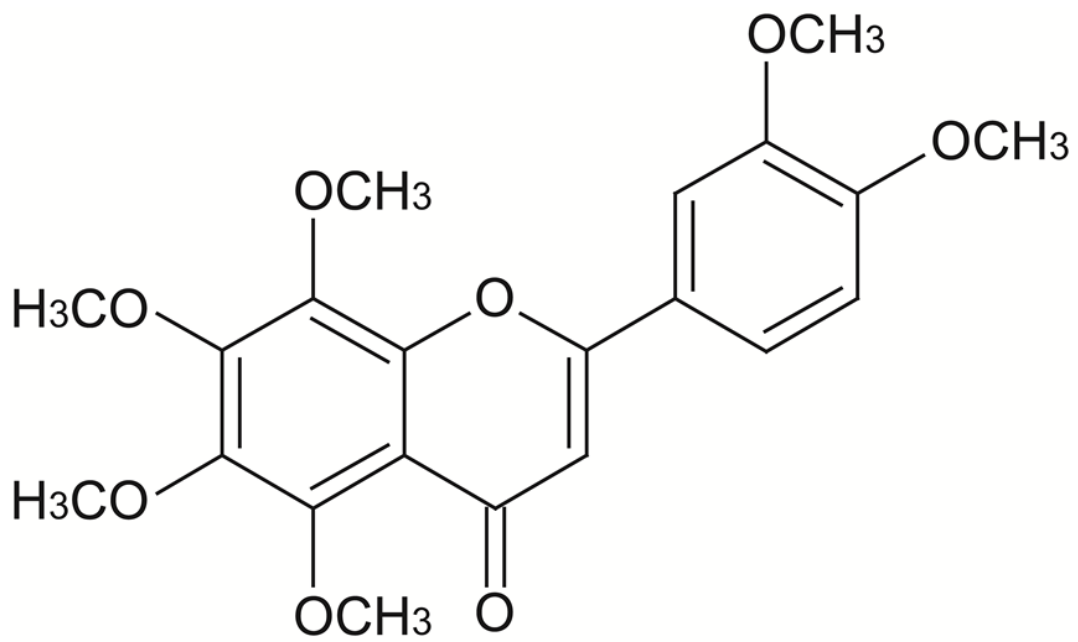
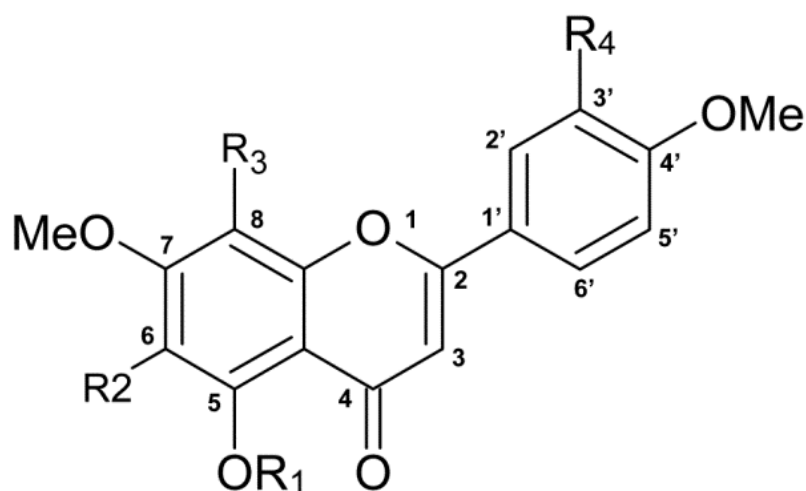


Fig. 2 Chemical structure of nobiletin isolated from citrus peels.

第1章 ノビレチンおよび類縁体における ERK 活性化能の比較検討

第1節 序論

先行研究において、ノビレチンが PKA/ERK/CREB 細胞内シグナル経路を活性化し、CRE 依存性転写を上昇させることが見いだされた^{15,26}。その CRE 依存性転写上昇作用は、ノビレチンのみならずノビレチン類縁体（6-demethoxy nobiletin、tangeretin、5-demethyl nobiletin、sinensetin および 6-demethoxy tangeretin、**Fig. 3**）でも確認されているが¹⁵、それらがノビレチン同様、ERK シグナル経路を介しているか、またノビレチンより強い ERK 活性能を有するかについては不明である。そこで神経分化モデルとして頻用される培養細胞株 PC12 の亜種 PC12D 細胞を用い、ERK1/2 のリン酸化を指標に Western blot 法による解析を行い、ノビレチンとその類縁体の ERK 活性化能の比較検討を行った。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1, Nobiletin	Me	OMe	OMe	OMe
2, 5-Demethylnobiletin	H	OMe	OMe	OMe
3, Tangeretin	Me	OMe	OMe	H
4, Sinensetin	Me	OMe	H	OMe
5, 6-Demethoxytangeretin	Me	H	OMe	H
6, 6-Demethoxynobiletin	Me	H	OMe	OMe

Fig. 3 Chemical structure of nobiletin and its analogs isolated from the peels of *Citrus depressa* Hayata.

第2節 材料および実験方法

1-2-1. 材料・試薬

ノビレチンおよび5つの類縁体：6-demethoxy nobiletin (5,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone)、tangeretin (4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavone)、5-demethyl nobiletin (2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-hydroxy-6,7,8-trimethoxychromen-4-one)、sinensetin (3',4',5,6,7-Pentamethoxyflavone) および 6-demethoxy tangeretin (4',5,7,8-tetramethoxyflavone) は、ミカン科のシークワーサー (学名：*Citrus depressa* Hayata) 果皮から抽出・精製された。これらは、東京薬科大学薬学部 漢方資源応用学教室の三巻 祥浩博士のご厚意により分与いただいた^{15,26}。本論文で記すノビレチンおよびその類縁体は、すべて三巻博士に分与いただいたものを使用している。これらは dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) に溶解し、 -20°C で保存した。PC12D 細胞は、東北大学大学院薬学研究科 山國研究室の山國 徹博士のご厚意により分与いただいた。なお、本論文で記す PC12D 細胞は、すべて山國博士に分与いただいたものを使用している。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、粉末培地) および phosphate-buffered saline (PBS) は日水製薬株式会社 (東京)、ウマ血清 (horse serum: HS) は Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA, USA)、ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) は株式会社エムピーバイオジャパン (東京)、L-グルタミンは Sigma-Aldrich Co. LLC.、ペニシリンおよびストレプトマイシンは Meiji Seika ファルマ株式会社 (東京)、BCATM Protein Assay Reagent は Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, USA)、抗リン酸化 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated 抗ウサギ immunoglobulin G (IgG) 抗体、抗 p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体は Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) からそれぞれ入手した。

1-2-2. 細胞培養

PC12D 細胞を 10% 非働化 HS、5% 非働化 FBS、4 mM L-グルタミン、50 units/mL ペニシリン、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含んだ高グルコース DMEM で、 37°C 、5% CO_2 の環境下にて継代培養した。

1-2-3. 細胞のノビレチン処理およびタンパク質抽出

PC12D 細胞を 5×10^5 cells/dish の細胞密度で 35 mm ディッシュに播種し、 37°C 、5% CO_2 の環境下にて 48 時間培養した。その後、30、50 および 100 μM のノビレチン (reference compound)、6-demethoxy nobiletin、tangeretin、5-demethyl nobiletin、sinensetin、6-demethoxy tangeretin および溶媒コントロールとして 0.3% 以下の DMSO (vehicle control) を溶解した低

血清培地（2% 非働化 HS、1% 非働化 FBS）に交換し、37°C、5% CO₂の環境下にて 5、10 または 15 分間刺激培養した。培地を除去した後、冷 PBS で細胞を 2 回洗浄してから PBS を濾紙で除き、lysis buffer [10 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS, leupeptin, antipain, pepstatin A, chymostatin, phosphoramidon, okadaic acid, calyculin A, NaF, Na-orthovanadate, p-APMSF] を添加して細胞を氷上で溶解、セルスクレイパーを用いて細胞を剥がし、1.5 mL チューブに回収した。その後、95°C で 5 分間加熱し、氷中で冷却、5 分間の超音波処理の後に 14,000 rpm、20 分間遠心して細胞ライセートを得た^{14,27}。その後、BCA™ Protein Assay Reagent を用い BCA 法にてそのタンパク質濃度を決定した。

1-2-4. Western blot 法による ERK のリン酸化解析

各タンパク質サンプルを 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、ポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜へ転写した^{14,15}。転写終了後の PVDF 膜は 5% スキムミルクを含む TBS-T バッファー [150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)] にて 1 時間室温でブロッキングした後、1 次抗体である抗リン酸化 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体を含む 5% BSA/TBS-T バッファーに接触させ、オーバーナイト、4°C でインキュベートした。転写膜は室温条件下にて TBS-T バッファーで 15 分間、3 回洗浄した後、2 次抗体である HRP-conjugated 抗 rabbit IgG 抗体を 1 時間室温で接触させ、TBS-T バッファーで洗浄した。免疫反応性は SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate を用いて化学発光法にて X 線フィルムを感光させ、現像して検出した。抗体を除去した後、ERK1/2 についても抗 p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体および HRP-conjugated 抗 rabbit IgG 抗体を用いて、同様に検出した。

1-2-5. データおよび統計解析

検出したバンドは画像解析ソフト Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD) で数値化した後、GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を使用して一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: 1-way ANOVA) を実施、事後比較として Tukey's multiple comparison test を行った。有意水準を両側 5% として検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

第3節 実験結果

ノビレチンとその類縁体の ERK 活性化能を、PC12D 細胞を用いて、ERK1/2 のリン酸化を指標に Western blot 法にて解析した。その結果、30 μM 添加時、6-demethoxy nobiletin、6-demethoxy tangeretin および tangeretin は ERK のリン酸化を亢進した (**Fig. 4A** および **B**)。100 μM 添加時では 6-demethoxy nobiletin および tangeretin で顕著な ERK リン酸化の亢進が検出された。そのリン酸化強度は、ノビレチン > tangeretin > 6-demethoxy nobiletin であった (**Fig. 4A** および **C**)。また、6-demethoxy nobiletin および tangeretin は濃度依存的に ERK リン酸化を亢進することが明らかになった (**Fig. 5A**)。さらに時間依存的な作用を解析した結果、50 μM tangeretin はノビレチンと同様に、添加 5 分後がリン酸化のピークであった。一方、6-demethoxy nobiletin ではその作用は添加 15 分後まで持続することが確認された (**Fig. 5B**)。

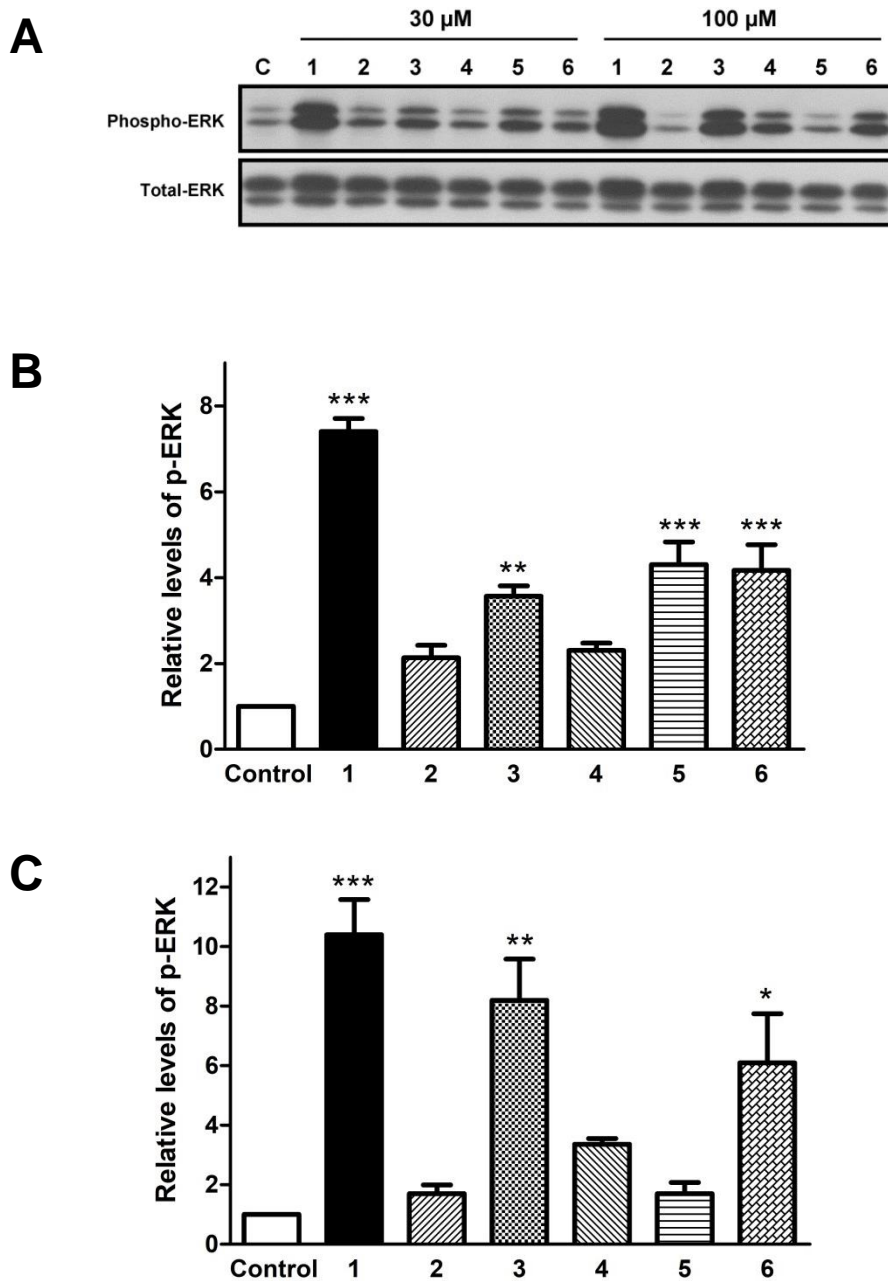


Fig. 4. Effects of nobiletin and its analogs on ERK phosphorylation in PC12D cells. Cells were stimulated with nobiletin or its analogs (30 or 100 μM) for 5 min. Western blotting was performed using anti-phospho-ERK1/2 antibody (A). The membranes were then stripped and reprobed with anti-ERK1/2 antibody. The relative levels of phosphorylation evoked by the compounds at 30 and 100 μM are presented in B and C, respectively. Similar results were obtained from at least three independent experiments. Lanes: Control, vehicle control; 1, nobiletin; 2, 5-demethyl nobiletin; 3, tangeretin; 4, sinensetin; 5, 6-demethoxy tangeretin; and 6, 6-demethoxy nobiletin. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ by 1-way ANOVA (vs. vehicle control).

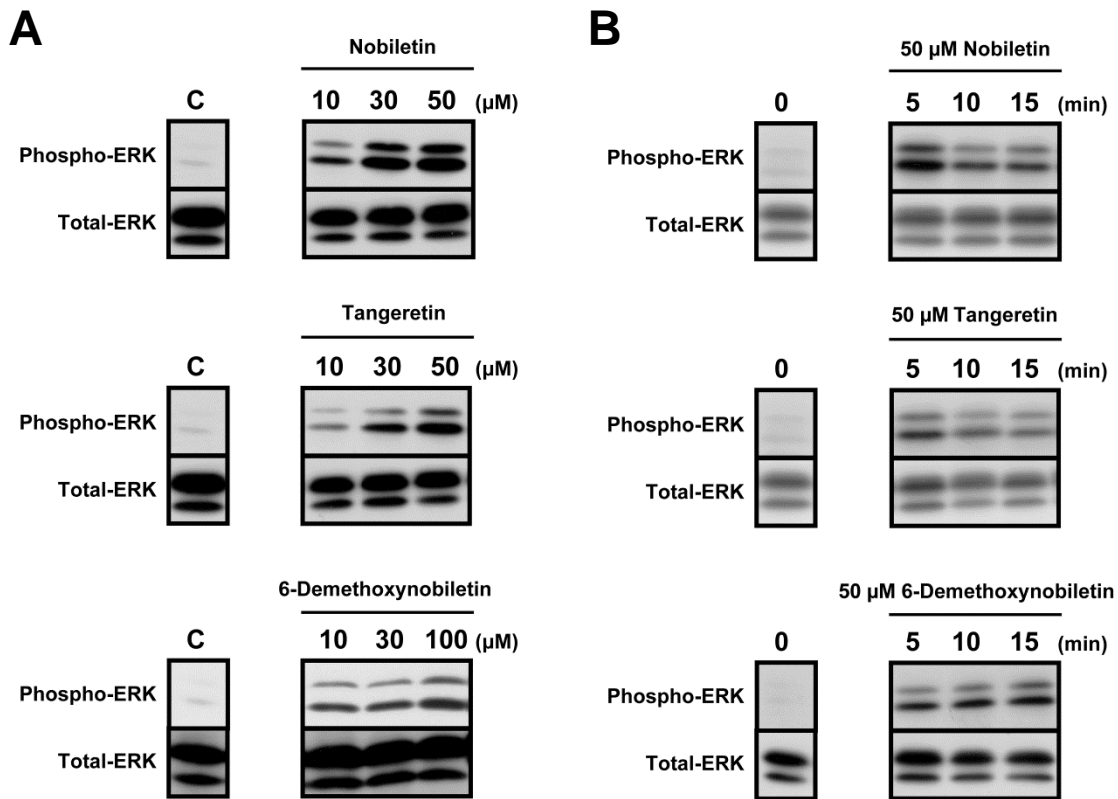


Fig. 5 Nobiletin, tangeretin, and 6-demethoxy nobiletin enhanced ERK phosphorylation in a concentration-dependent manner (**A**). PC12D cells were stimulated with nobiletin (10, 30, and 50 μM), tangeretin (10, 30, and 50 μM), 6-demethoxy nobiletin (10, 30, and 100 μM), or vehicle control (0.3% DMSO; lane C) for 5 min. Time-dependent effects of nobiletin, tangeretin, and 6-demethoxy nobiletin on ERK phosphorylation (**B**). The cells were stimulated with 50 μM nobiletin, tangeretin, or 6-demethoxy nobiletin for the indicated times. ERK phosphorylation was detected by Western blotting using anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK 1/2 antibodies.

第4節 考察

記憶学習の形成には細胞内シグナル伝達因子が重要な役割を果たしていることが知られている^{28,29}。特に mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一つである ERK は、海馬シナプス可塑性や海馬依存性記憶形成に関わる多くのシグナル体系において重要な因子である²⁸。一方、AD 原因物質である A β ペプチドは、ヒト神経芽細胞腫培養細胞株および海馬初代培養細胞において、ERK と CREB のリン酸化を減少させることが報告されている³⁰。

当研究チームでは、ノビレチンが PKA/ERK/CREB シグナル経路を活性化し、それに続く CRE 依存性転写を亢進することを明らかにしてきた^{15,26}。一方で Furukawa らによって、ノビレチン類縁体である tangeretin もまた ERK を活性化することが報告されている³¹。そこで本章では、他のノビレチン類縁体において、ノビレチンと同等もしくはそれ以上の ERK リン酸化能を持つかを検討した。その結果、6-demethoxy nobiletin が、濃度依存的に ERK を活性化することが初めて明らかになった (**Fig. 4** および **5**)。6-Demethoxy nobiletin とノビレチンおよび類縁体の 100 μ M における活性強度は、ノビレチン > tangeretin > 6-demethoxy nobiletin であった (**Fig. 4C**)。これらの結果から、ノビレチンが最も活性能が強いことが示された。さらに、5 位、6 位、8 位、3' 位のメトキシ基が、この作用に重要であることが推測された。一方、ノビレチンによる ERK リン酸化のピークは添加 5 分後であり、それは減弱しながらも 1 時間後まで続くことが Nagase らによって報告されている¹⁵。しかし、6-Demethoxy nobiletin による ERK リン酸化は、添加後 5 分間から 15 分間まではほぼ同等のレベルで惹起されていたことから (**Fig. 5B**)、ノビレチンと比較するためにも今後更なる経時的な ERK リン酸化の検証が必要である。

先行研究において、6-demethoxy nobiletin もまたノビレチンと tangeretin 同様に CRE 依存性転写を活性化している¹⁵。その活性化能は、ノビレチン >> 6-demethoxy nobiletin > sinensetin > tangeretin であり、6-demethoxy nobiletin もノビレチン同様に CREB を介した転写を活性化する作用を持つことが示唆されるが、この結果からもノビレチンが最も強い作用を持つことが示された。Sinensetin においては、CRE 依存性転写能が認められたが、その ERK リン酸化作用は弱かつ (**Fig 4**)。これは sinensetin がノビレチン、tangeretin および 6-demethoxy nobiletin とは別の CRE 依存性転写活性経路を持つことが推測される。

本章では、6-demethoxy nobiletin にもノビレチン同様の作用が見いだされたが、今後さらなる分子作用機序の解析や、ノビレチンとの相加・相乗効果などの検討、さらにモデル動物を用いた記憶障害改善作用の評価が重要かつ不可欠であると考えられる。

第2章 記憶学習に関わる遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用検討

第1節 序論

これまでの先行研究から、ノビレチンが PKA/ERK/CREB 細胞内シグナル経路の活性化を介して CRE 依存性転写を亢進することが明らかになっているが、この転写活性化能の評価は PC12D 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでの結果であり、実際にどのような遺伝子、特に記憶・学習に深く関与する遺伝子が発現亢進するかはわかっていない (Fig. 6)。そこで本章では、ノビレチンが発現亢進する記憶・学習関連遺伝子について、発現解析を試みた。

本研究で着目したのは、以下に述べる記憶・学習に関与、および転写に関わる因子である。シナプスにおける神経伝達に極めて重要であるグルタミン酸受容体 NMDA 受容体、また中枢コリン作動性神経に発現し神経伝達物質アセチルコリンの受容体であるムスカリン性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor: mAChR)、そのリガンドであり、プレシナプスでアセチルコリンを合成する酵素コリンアセチル基転移酵素 (choline acetyltransferase: ChAT)、転写因子 c-Fos、さらに CREB に結合してその作用を増強するコアクチベーター CREB 結合タンパク質 (CREB-binding protein: CBP) である。

はじめに、本章第2節において NMDA 受容体のサブユニット NR1、NR2A、NR2B の各遺伝子 *Grin1*、*2a*、*2b* および最初期応答遺伝子 *c-fos* の発現に及ぼすノビレチンの作用解析について述べる。NMDA 受容体は、海馬 CA1 領域に広く分布する神経伝達物質であるグルタミン酸受容体であり、必須サブユニット NR1、遺伝子の種類により機能に多様性をもたらす調節サブユニット NR2 (A~D) から構成される³²。特に NR1/NR2A および NR1/NR2B から成る受容体が LTP に深く関与することが知られている³³。また、背側海馬に局在する NMDA 受容体の機能不全は、認知障害を惹起することが報告されている³⁴。これら遺伝子発現は、活性化 PKA による CREB のリン酸化 (serine 133) などに附随して起こる。さらに、記憶形成には CREB の活性化とそれに伴って生じる最初期応答遺伝子群の発現上昇、引き続いて CREB 標的遺伝子群の大規模な発現変動が極めて重要である²²⁻²⁴。一方で、転写因子 activator protein 1 (AP-1) を構成する最初期応答遺伝子 *c-fos* を、中枢神経系特異的に欠損させたマウスでは、海馬依存的な空間認識不全と海馬 CA3-CA1 シナプスにおける LTP の減弱を示すことが報告されている³⁵。

次に、本章第3節において mAChR サブタイプ M1 遺伝子 *Chrm1*、コリンアセチル基転移酵素遺伝子 *Chat*、CBP 遺伝子 *Crebbp* の発現に及ぼすノビレチンの作用解析について述べる。AD 患者の脳では中枢コリン作動性神経の進行性変性や脱落が認められ、それは記憶の喪失や認知機能不全を引き起こす^{36,37}。AD におけるシナプス機能不全と神経変性の病因として A β が深く関与していることが知られているが³⁸、その発症と進行には A β だけでなく多様な因子

が関与していると考えられている。その一例として、初期段階の AD では、嗅覚神経系の機能不全が現れる³⁹。嗅球摘出 (OBX) 動物では、中枢コリン作動性神経の逆行性変性が惹起され、記憶障害を生じる⁴⁰。また mAChR は、記憶形成に関わるシナプスの調節に関与しており⁴¹、5 種類のサブタイプ (M1–M5) の中でも M1、M3 および M5 サブタイプが選択的に G タンパク質 (G_q/G₁₁) と共役し、その結果 CREB タンパク質が活性化する⁴²。特に M1 は、その mRNA が海馬に豊富に存在し⁴¹、M1 を介して活性化した細胞内シグナルによって Aβ の沈着が抑制されることが示唆されている⁴²。また、M1 アゴニストにより OBX 誘発性の記憶・学習障害が軽減することが報告されている⁴⁰。さらに、記憶・学習の促進には mAChR だけでなく、アセチルコリンを合成する ChAT も必須な因子である。なお、AD 患者脳では、ChAT 活性の著しい減少が生じる⁴³。一方、記憶・学習の形成過程における遺伝子発現の変動には CREB の活性が必須であるが、それを増強する CBP もその過程において重要な因子である。

以上のことから、遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用について、PC12 および PC12D 細胞を用い、リアルタイム PCR 法による発現解析を行った。

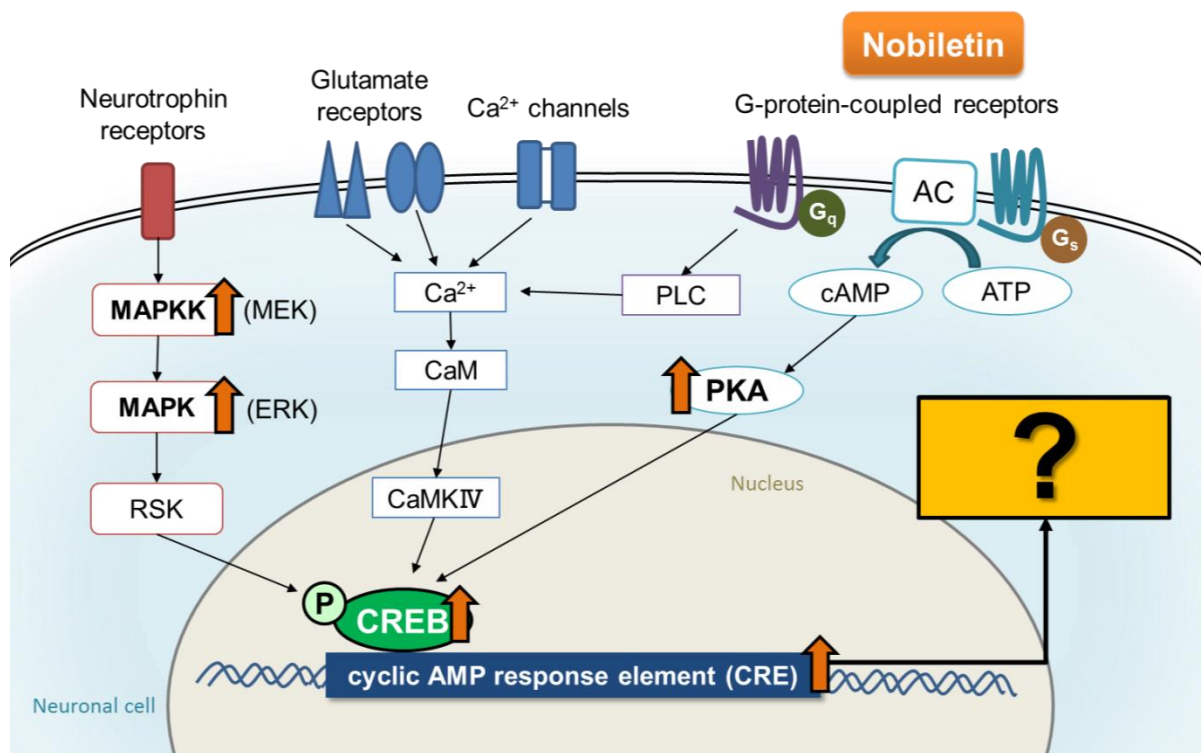


Fig. 6 It remains unclear whether genes involved in learning and memory are modulated by nobiletin.

第2節 NMDA 受容体サブユニット *Grin1*、*2a*、*2b* および *c-fos* 遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用解析

2-2-1. 材料および実験方法

2-2-1-1. 材料・試薬

Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step Kit は Life Technologies Corp.、RNasy[®] Mini Kit は QIAGEN N.V. (Venlo, Netherlands) からそれぞれ入手した。細胞培養に用いた試薬は、すべて第1章と同じ試薬を使用した。

2-2-1-2. 細胞培養

1章「1-2-2. 細胞培養」と同様の方法で PC12D 細胞の培養を行った。

2-2-1-3. 細胞のノビレチン処理および RNA 抽出

PC12D 細胞を 1.5×10^6 cells / well の細胞密度で 60 mm 径の 6 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ の環境下にて 48 時間培養した。その後、30 μM のノビレチンまたは溶媒コントロールとして 0.1% DMSO を懸濁した低血清培地 (2% 非働化 HS、1% 非働化 FBS) に交換し、37°C、5% CO₂ の環境下にて 1、3、6、12 および 24 時間培養した。

ノビレチン処理した細胞は、RNasy[®] Mini Kit を使用して全 RNA を抽出したのち、25 ゲージの注射針を通して高分子細胞構成成分およびゲノム DNA を剪断し、濃度を定量した後に -80°C で保存した。

2-2-1-4. 逆転写反応およびリアルタイム PCR

50 ng の全 RNA を出発物質とし、Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] 1-Step Kit を用いて、逆転写反応 (48°C : 30 分、95°C : 10 分) およびリアルタイム PCR (95°C : 10 分、1 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 1 分、40-50 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 30 秒、95°C : 15 秒、1 サイクル) を行った。リアルタイム PCR における SYBR[®] Green の検出には、Thermal Cycler Dice[®] Real-Time System およびソフトウェア (タカラバイオ株式会社、滋賀) を使用した。用いたプライマー (タカラバイオ株式会社) を **Table 1** に示した。

Table 1 Real-time PCR primers

検出遺伝子	配列	メーカー
<i>Grin1</i>	NCBI Reference Sequences: NM_017010.1, position: 838	タカラバイオ株式会社
<i>Grin2a</i>	NCBI Reference Sequences: position: NM_012573.3, Position: 1374	タカラバイオ株式会社
<i>Grin2b</i>	NCBI Reference Sequences: NM_012574.1, position: 2734	タカラバイオ株式会社
<i>Actb</i>	NCBI Reference Sequences: NM_031144.2, position: 1100	タカラバイオ株式会社
<i>c-fos</i>	5'-GAT GTT CTC GGG TTT CAA CG-3'(forward) 5'-CTT TCG GAT TCT CCG TTT CT-3' (reverse)	受託合成

2-2-1-5. データおよび統計解析

Ct 値は閾値と増幅曲線の交点を Ct 値 Crossing Point 法で求め、housekeeping 遺伝子である β -actin 遺伝子 (*Actb*) をリファレンスとして各遺伝子発現を相対的に定量し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した⁴⁴。実験値は、平均値 \pm 平均値の標準誤差 (mean \pm SEM, $n=3-4$) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を使用して Student's *t*-test を実施、有意水準を両側 5%として検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

2-2-2. 実験結果

ノビレチンが、PC12D 細胞において NMDA 受容体サブユニット NR1、NR2A および NR2B 遺伝子の発現を変動させるかを検討した。30 μ M ノビレチンまたは溶媒コントロールである 0.1% DMSO にて、1、3、6、12 および 24 時間の処理をし、その後リアルタイム PCR を用いて NR1、NR2A および NR2B 遺伝子の発現解析をした。その結果、ノビレチン処理 24 時間後に、NR1 および NR2A 遺伝子の発現がそれぞれ溶媒コントロールに対し 1.4 倍 ($p<0.05$; **Fig. 7A**)、1.7 倍 ($p<0.05$, **Fig. 7B**) に上昇したことが明らかになった。また、NR2A 遺伝子においては、ノビレチン処理後 3 時間で 1.3 倍 ($p<0.05$) の上昇を示した。一方 NR2B 遺伝子は、ノビレチン処理後 6 時間からその上昇が認められ、24 時間後には溶媒コントロールに対して 2.5 倍 ($p<0.01$; **Fig. 7C**) の増加が確認された。

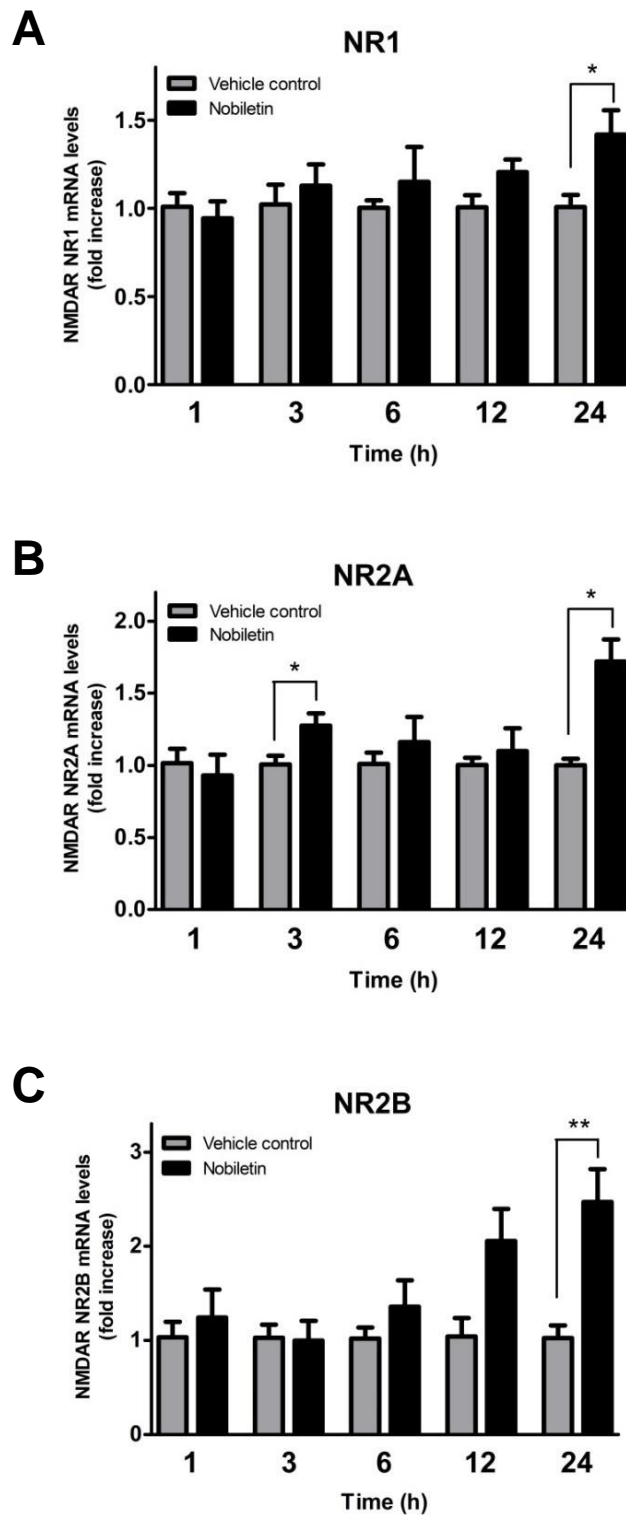


Fig. 7 Effects of nobiletin on expression of the NMDA receptor subunits NR1 (A), NR2A (B), and NR2B (C) mRNA in PC12D cells. The cells were stimulated with 30 μ M nobiletin for the indicated times. Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction analyses were performed using a RNA-to-CT™ 1-Step Kit. Each mRNA level was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Values are presented as mean \pm SEM ($n=3-4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$; Student's t -test comparing vehicle control.

次に、最初期応答遺伝子である *c-fos* の発現解析を行った。その結果、ノビレチン処理後 30 分で溶媒コントロールに対し 3 倍 ($p<0.05$) の顕著な発現上昇を示した。この 30 分をピークとして、その発現亢進は処理後 180 分まで維持された (Fig. 8)。

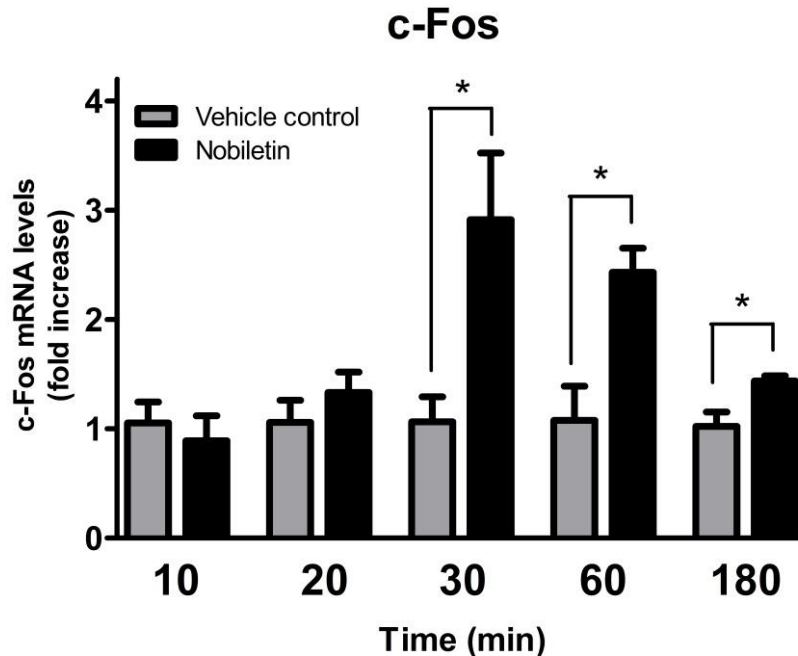


Fig. 8 Effect of nobiletin on *c-Fos* mRNA expression in PC12D cells. The cells were stimulated with 30 μ M nobiletin for the indicated times. Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction analyses were performed using a RNA-to-CT™ 1-Step Kit. Each mRNA level was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Values are presented as mean \pm SEM ($n=3-4$). * $p<0.05$; Student's *t*-test comparing vehicle control.

2-2-3. 考察

NMDA 受容体は、記憶・学習の形成のみならず、空間的記憶の形成に深く関わる背側海馬においてニューロンのシナプス可塑性の調節に重要な働きをすることが近年報告されている^{33,34}。また AD 患者の病態進行に伴い、海馬における NR1 と NR2B の遺伝子およびタンパク質発現レベルが減少することや⁴⁵、海馬選択的 NR1 ノックアウトマウスでは認知不全などの深刻な記憶障害が出現することが知られている⁴⁶。先行研究では、NMDA 受容体のアンタゴニストである MK-801 誘発性学習障害マウスにおいて、ノビレチンが ERK の活性化を介して学習障害を軽減させること¹⁸、PC12D 細胞においてノビレチンが PKA/MEK/ERK/CREB 細胞内シグナル経路の活性化を介して CRE 依存性転写の亢進作用を有することを見いだした^{15,26}。

しかしながら、どのような記憶形成関連遺伝子が発現変動するかは不明であった。そこで、記憶・学習に重要な働きを示す NMDA 受容体サブユニット NR1、NR2A、NR2B 遺伝子および最初期応答遺伝子 *c-fos* に着目し、その発現に及ぼすノビレチンの作用を、PC12D 細胞を用いてリアルタイム PCR により解析した。その結果、ノビレチンはそれら遺伝子の発現を有意に増加させることが明らかになった (Fig. 7 および 8)。特に、NR2B 遺伝子は、ノビレチン処理後 6 時間から発現が上昇しはじめ、24 時間後にはその発現レベルが溶媒コントロールの約 2.5 倍にまで増加した (Fig. 7C)。NR2B はプロモーター領域に CREB 結合部位を持つことから⁴⁷、ノビレチンによる PKA/MEK/ERK/CREB シグナル経路活性の直接的な制御を受けていることが考えられる。この結果は、先行研究にて行われた PC12D 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイで、ノビレチン処理 8 時間後に CRE 依存性転写が亢進したとと関連している¹⁵。一方、NR1 と NR2A の遺伝子発現は、有意ではないが添加 3 時間後からわずかに上昇していた。その後 NR1 と NR2A の発現は、24 時間後にそれぞれ約 1.4 倍 ($p < 0.05$) および約 1.7 倍 ($p < 0.05$) に増加した (Fig. 7A および B)。これは処理後 6 時間から発現が上昇し始めた NR2B とは異なる傾向である。本論文 1 章および Nagase¹⁵らの結果では、ノビレチンによる ERK リン酸化レベルの上昇は、添加約 1 時間後まで持続することが確認されたが、そのピークは添加 5 分後であった。これらの知見と合わせて考えると、ノビレチン添加後に PKA/ERK/CREB 細胞内シグナルの活性化が始まり、CREB の活性化を通じて *c-fos* (Fig. 8) などの最初期応答遺伝子の発現上昇が生じ⁴⁸、その後、後期応答遺伝子群 (late response genes) として NR1 と NR2A 遺伝子発現が、二次、三次的に上昇することが示唆された²³。NR1 および NR2A は、Sp1^{49,50} や AP-1⁴⁹ などの転写因子により発現制御されていることが報告されている。

c-fos ノックアウトマウスは、海馬 CA3-CA1 において LTP 減少と関連した学習障害を示すことが知られている³⁵。先行研究において、虚血誘発性の記憶・学習障害マウス海馬領域の LTP 減弱が、ノビレチンの投与によって改善することが明らかになっている⁵¹。本研究では、PC12D 細胞においてノビレチンが *c-fos* 遺伝子を発現亢進したことが明らかになった (Fig. 8)。前述の通り、c-Fos は転写因子 AP-1 の構成因子のひとつであり、NMDA 受容体サブユニット NR1 はプロモーターに AP-1 結合部位を持つことから、ノビレチンによる *c-fos* 遺伝子発現による二次的な NR1 遺伝子発現への作用が推察された。今後、他の AP-1 構成因子である Fos ファミリー (Fra1、Fra2、FosB など) や Jun ファミリー (c-Jun、JunB、JunD など) 等の各遺伝子発現に対するノビレチンの作用も検討する必要がある。ノビレチンは、*in vivo* 実験において NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 誘発性の記憶障害を改善したが¹⁸、そのメカニズムとして、ノビレチンが NMDA 受容体の発現を増加させて興奮性の神経伝達をより強固にしたことが考えられる (Fig. 9)。

以上のことから、ノビレチンは、CREB 依存転写を介して *c-fos* を発現上昇させ、記憶・学習に参与する遺伝子の発現増加に寄与する可能性が示された。

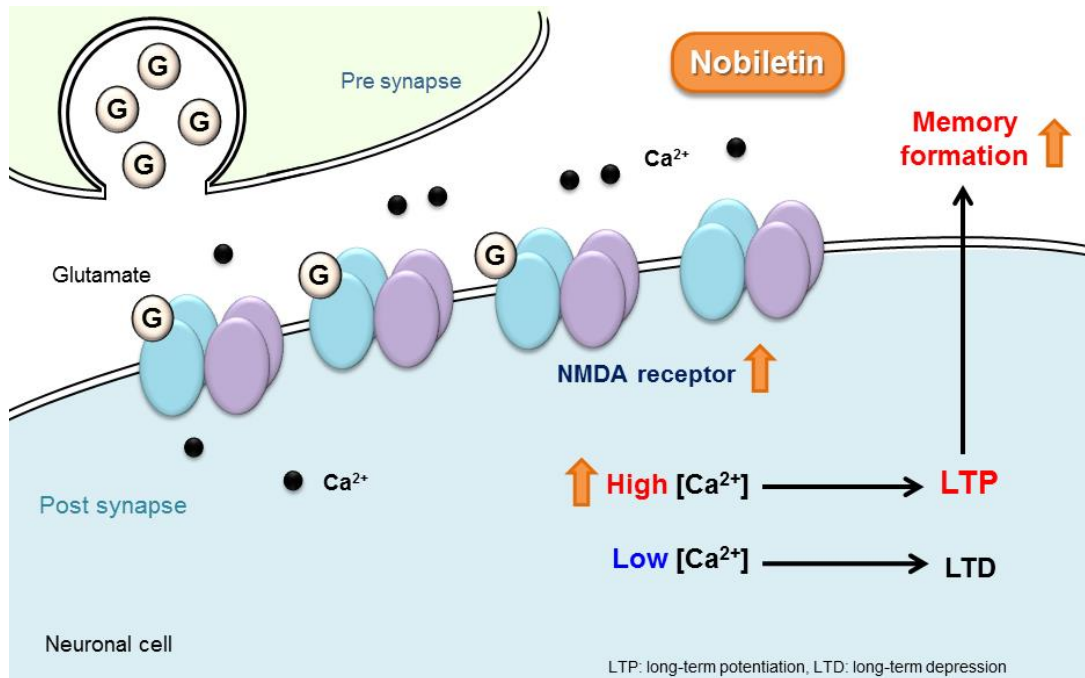


Fig. 9 Potential mechanism of memory enhancing effect via NMDA receptor by nobiletin.

第3節 ムスカリン性アセチルコリン受容体および CREB 結合タンパク質遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用解析

2-3-1. 材料および実験方法

2-3-1-1. 材料・試薬

PC12 細胞は、理研バイオリソースセンター（茨城）から購入した。DMEM 液体培地（低グルコース、L-グルタミン含有）、HS、FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン混合液および SYBR[®] Green Cells-to-CT[™] Kits は Life Technologies Corp.、BioCoat Poly-D-Lysine (PDL) 96-multiwell plate は Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA) からそれぞれ入手した。

2-3-1-2. 細胞培養

PC12 細胞の培養は、理研バイオリソースセンターにて確認、推奨されている条件に従って行った。PC12 細胞を 10% 非働化 HS、5% 非働化 FBS、4 mM L-グルタミン、50 units/mL ペニシリン 50 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM で、37°C、5% CO₂ の環境下にて継代培養した。

2-3-1-3. 細胞のノビレチン処理

PC12 細胞を 1.5×10^4 cells / well の細胞密度で PDL コーティング 96 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ の環境下にて 24 時間培養した。それから低血清培地（0.5% 非働化 HS）に交換し、同環境下で 24 時間培養した。その後、100 µM のノビレチンまたは溶媒コントロールとして 0.1% DMSO を懸濁した低血清培地で 3、6、12、24 時間培養した。培養後、SYBR[®] Green Cells-to-CT[™] Kits を使用して、逆転写反応に用いる細胞ライセートを調製した。

2-3-1-4. 逆転写反応およびリアルタイム PCR

得られた細胞ライセートを逆転写反応（37°C : 60 分、95°C : 5 分）およびリアルタイム PCR（95°C : 10 分、1 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 1 分、40-50 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 30 秒、95°C : 15 秒、1 サイクル）を行った。リアルタイム PCR における SYBR[®] Green の検出には、Thermal Cycler Dice[®] Real-Time System およびソフトウェア（タカラバイオ株式会社、滋賀）を使用した。用いたプライマー（タカラバイオ株式会社）を **Table 2** に示した。

Table 2 Real-time PCR primers

検出遺伝子	配列	メーカー
<i>Chrm1</i>	NCBI Reference Sequences: NM_080773.1, position: 1159	タカラバイオ株式会社
<i>Chat</i>	NCBI Reference Sequences: NM_001170593.1, position: 922	タカラバイオ株式会社
<i>Crebbp</i>	NCBI Reference Sequences: NM_133381.3, position: 152	タカラバイオ株式会社
<i>Actb</i>	NCBI Reference Sequences: NM_031144.3, position: 1097	タカラバイオ株式会社

2-3-1-5. データおよび統計解析

Ct 値は閾値と増幅曲線の交点を Ct 値 Crossing Point 法で求め、housekeeping 遺伝子である β -actin 遺伝子 (*Actb*) をリファレンスとして各遺伝子発現を相対的に定量し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した⁴⁴。実験値は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD, $n=3-4$) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を使用して Student's *t*-test を実施、有意水準を両側 5% として検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

2-3-2. 実験結果

PC12 細胞を 100 μ M ノビレチンおよび溶媒コントロールとして 0.1% DMSO で処理 (3、6、12、24 時間) し、リアルタイム PCR を用い mAChR サブタイプ M1、ChAT、CBP 各遺伝子の発現解析をした。その結果、ノビレチン処理 3 時間後、M1 遺伝子は溶媒コントロールに対し 2.5 倍 ($p<0.001$; **Fig. 10A**) に上昇した。それから処理 6 時間 (4.0 倍、 $p<0.01$)、12 時間後 (2.8 倍、 $p<0.05$) までノビレチンによる遺伝子発現の上昇が持続した。その後、処理 24 時間後にはコントロールと同等のレベルまで下がった (not significant)。

一方、ChAT 遺伝子発現は、溶媒コントロールに対し、ノビレチン処理 3 時間後に 1.7 倍 ($p<0.01$; **Fig. 10B**)、6 時間後に 2.1 倍 ($p<0.05$) に上昇した。しかしながら、24 時間後に溶媒コントロールの 0.1 倍 ($p<0.05$) に減少した。

次に、CBP 遺伝子の発現に対するノビレチンの作用を解析した結果、ノビレチン添加 6 時間後から発現が上昇しはじめ、12 時間後にピークを迎えた (2.1 倍、 $p<0.01$; **Fig. 11**)。添加 24 時間後、その発現レベルは溶媒コントロールと同等のレベルに下がることが確認された。

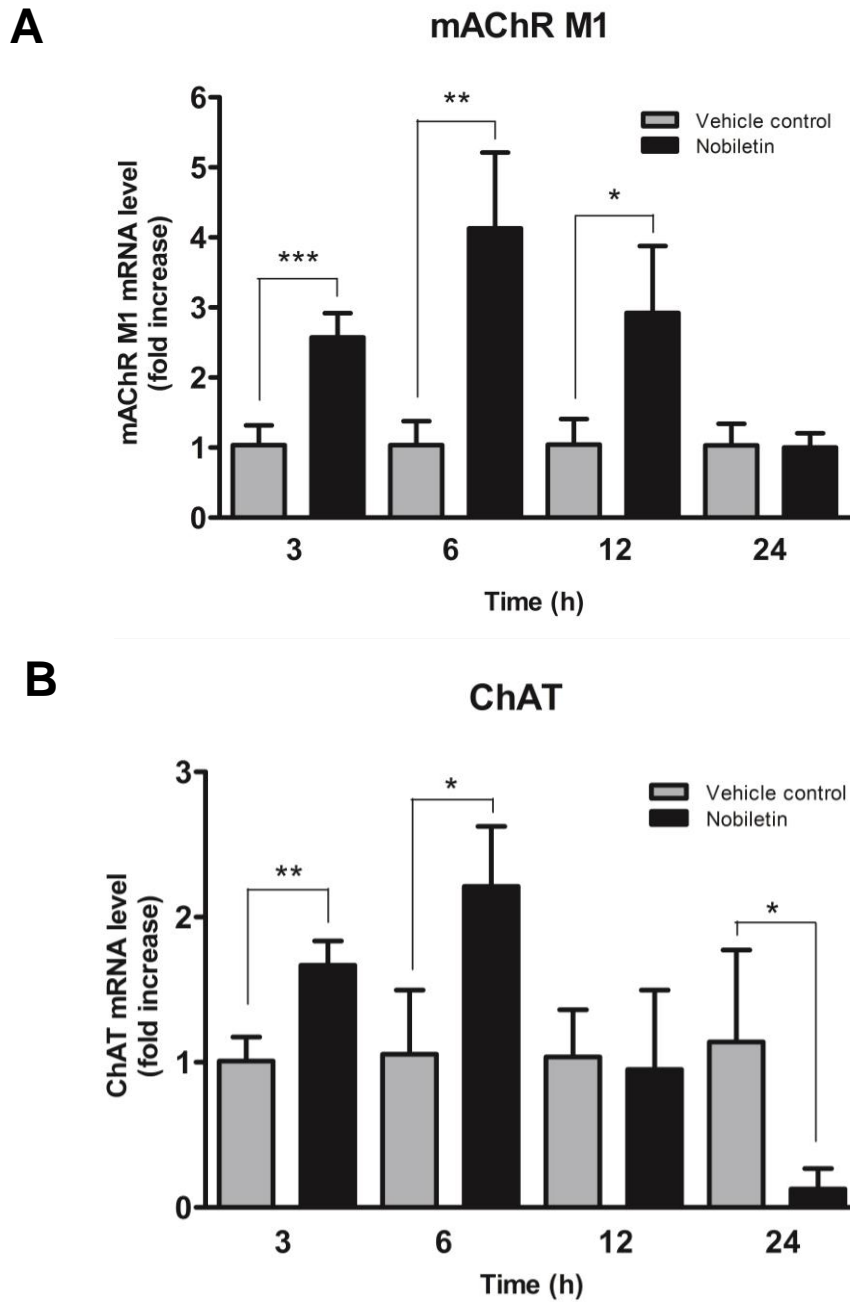


Fig. 10 Effects of nobiletin on the expression of mAChR M1 (A) and ChAT (B) genes in PC12 cells. The cells were stimulated with nobiletin at 100 μ M or 0.1% DMSO as vehicle control for 3, 6, 12, and 24 h. Increases in mAChR M1 (A) and ChAT (B) mRNA levels were evaluated by real-time PCR and analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The values are presented as mean \pm SD ($n=3-4$). *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, and ***, $p<0.001$ vs. vehicle control.

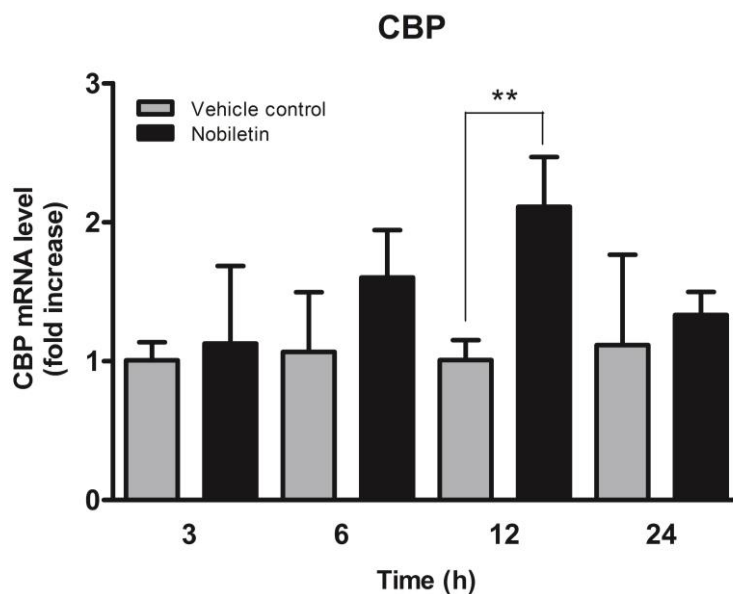


Fig. 11 Effect of nobiletin on the expression of CBP gene in PC12 cells. The cells were stimulated with nobiletin at 100 μ M or 0.1% DMSO as vehicle control for 3, 6, 12, and 24 h. Increase in CBP mRNA levels were evaluated by real-time PCR and analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The values are presented as mean \pm SD ($n=3-4$). **: $p<0.01$ vs. vehicle control.

2-3-3. 考察

mAChR サブタイプ M1 は、Gq/11 共役型の神経伝達物質 AChR であり、脳では海馬や大脳皮質、線条体などの大脳領域に多く発現し、M1 選択的アゴニストにより、OBX 誘発性記憶・学習障害が軽減することが報告されている^{40,52}。また、吸入麻酔薬 sevoflurane 誘発性認知障害を示した老齢ラットにおいて、海馬 M1 の mRNA 量が有意に減少することが観察されている⁵³。このように M1 は記憶・学習形成の過程において、極めて重要であることが知られている。本研究では、PC12 細胞においてノビレチンが mAChR サブタイプ M1 遺伝子の発現レベルを増加させることを明らかにした (Fig. 10A)。

さらに、OBX マウス脳内における ChAT タンパク質発現と、神経細胞や神経線維の染色に有用な AChE 染色レベルの低下をそれぞれノビレチンが抑制したことから、当マウスにおける記憶障害の改善はノビレチンがコリン作動性神経変性を抑制したことに起因することが示唆されている¹⁷。Fig. 10B に示したように、ノビレチンによる ChAT 遺伝子発現の亢進作用が見られたことは先行研究の考察を裏付ける結果となり、ノビレチンが中枢コリン作動性神経を保護することで記憶障害を改善する可能性を示した。

その一方、ノビレチン処理 24 時間後に、ChAT 遺伝子の顕著な発現減少が見られた (0.1-fold vs. control; **Fig 10B**)。その理由として、PC12 細胞において CRE 依存性転写のリプレッサーである inducible cAMP element repressor を介した転写抑制が生じたことが考えられる^{54,55}。しかしながら、ノビレチンの 11 日間腹腔内投与 (50 mg/kg/day) により、OBX 誘発性記憶障害マウス海馬における ChAT タンパク質減少が顕著に回復することが、先行研究で明らかになっている¹⁷。従って、動物に対する長期的なノビレチン投与は、ChAT を減少させることなく、コリン変性を伴う記憶障害改善に有効であると考えられる。

さらに、CREB はリン酸化されることで転写コアクチベーターである CBP と結合し、転写促進能が高まる⁵⁶。このことは短期および長期記憶両方の形成に重要な現象である^{23,57,58}。また、CBP のコンディショナルノックアウトマウスでは、空間記憶や連合記憶形成における強い機能障害が現れる⁵⁷。本研究では、ノビレチンが PC12 において CBP の遺伝子発現亢進することが明らかになった (**Fig.11**)。このことからノビレチンは CREB を介した転写をさらに増強する作用があることが示唆された。

これら受容体とリガンドの発現をノビレチンが亢進することにより、興奮性神経伝達が増進し神経細胞内の小胞体から Ca^{2+} の放出が増加することや、病態におけるコリンシグナル経路の回復が脳でも起きる可能性が示された (**Fig. 12**)。

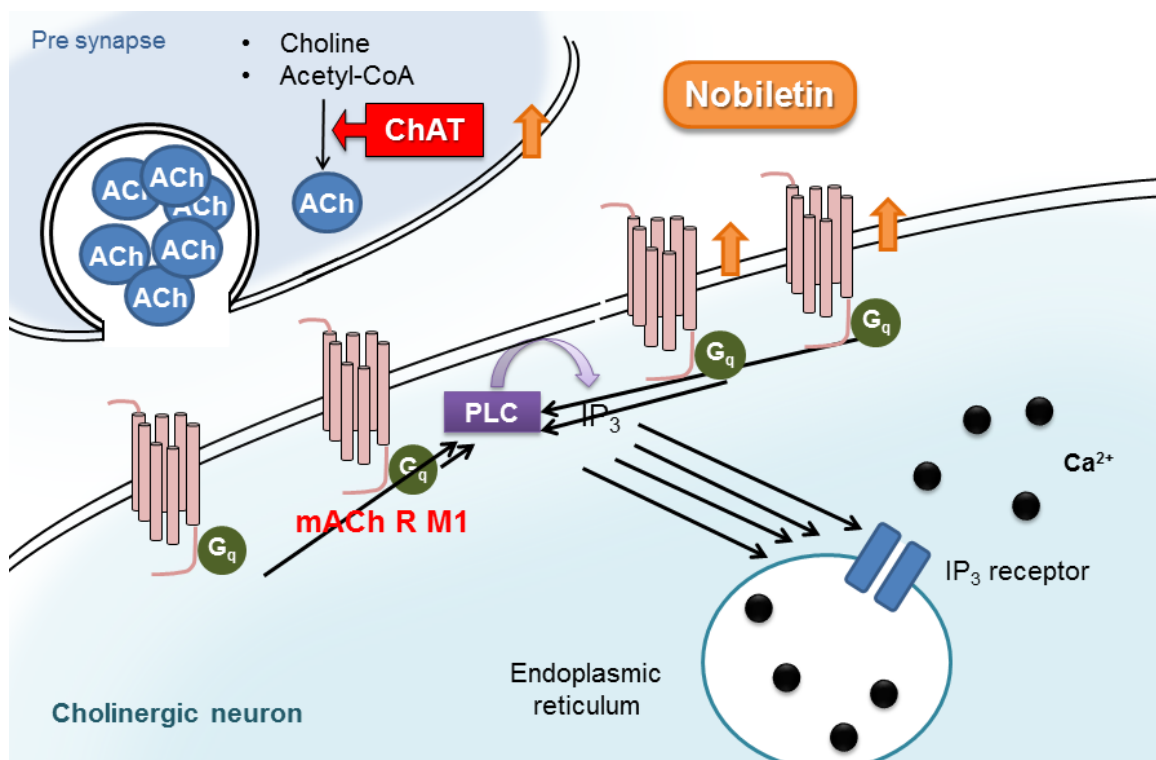


Fig. 12 Potential mechanism of memory enhancing effect by nobiletin in CNS cholinergic neuron.

第3章 ノビレチンおよび類縁体におけるアセチルコリン分解酵素阻害作用の検討

第1節 序論

現在代表的な AD 治療薬として、主にアセチルコリン分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤ドネペジルが AD の進行を遅らせるために使用されている^{10,11}。当該薬は AChE の作用を可逆的に抑制し、脳内の ACh を増加させる ($IC_{50} = 6.7 \text{ nM}$)¹⁰。

これまでに、ノビレチンおよび5つの類縁体 (6-demethoxy nobiletin, tangeretin, 5-demethyl nobiletin, sinensetin および 6-demethoxy tangeretin; **Fig. 3**) と、ドネペジルの作用に対する影響についての検討はなされていない。そこで本章では、ノビレチンおよびその類縁体がドネペジル同様の AChE 阻害作用を有するか、比色定量法 (Ellman 法、**Fig. 13**) に基づいて検証した^{59,60}。基質であるアセチルチオコリンは AChE の作用によりチオコリンと酢酸に加水分解される。生成されたチオコリンは、検出試薬である 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) と定量的に反応し、黄褐色の 5-thio-2-nitrobenzoic acid を生成する。この呈色強度は反応液中の AChE 活性を反映するため、吸光度を測定することで AChE 活性を数値として算出することが可能となる。その反応液中にノビレチンおよび各類縁体を添加することで、それらの AChE 活性抑制作用を検出し解析した。

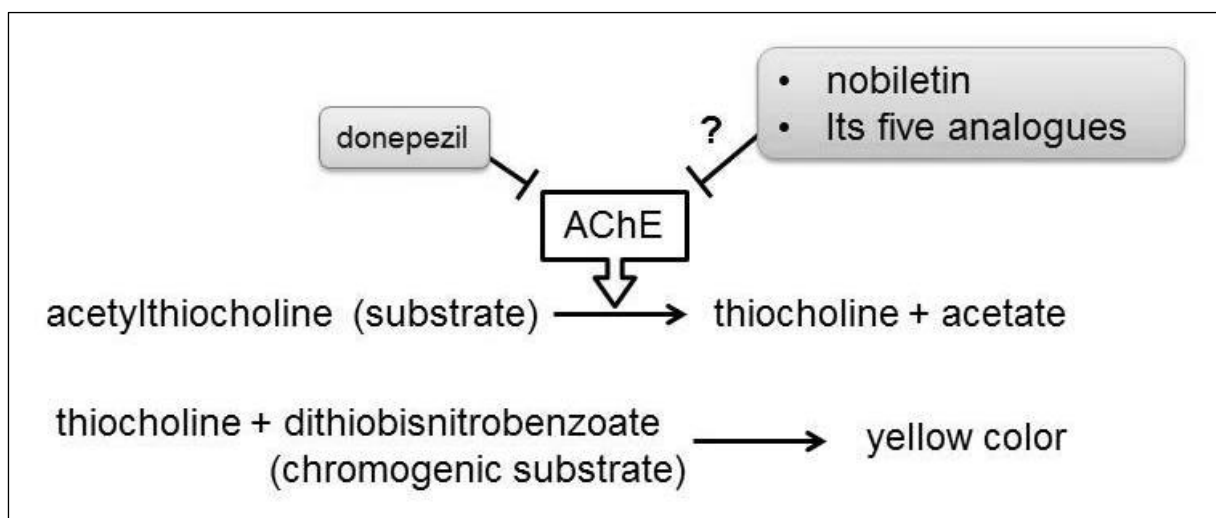


Fig. 13 Colorimetric determination of AChE activity⁵⁹.

第2節 材料および実験方法

3-2-1. 材料・試薬

ヒト赤血球由来 AChE (91 units/mL)、よう化アセチルチオコリン、DTNB は Sigma-Aldrich Co. LLC. より入手した。比色定量には、株式会社日立ハイテクサイエンス (東京) の分光光度計 (U-1800) を使用した。

3-2-2. 比色定量法を用いたノビレチン AChE 活性抑制作用の濃度依存性検討

ノビレチンおよび5つの類縁体のヒト AChE 阻害作用は、比色定量法 (Fig. 13) に基づいて実施した^{59,60}。0.1 M リン酸バッファー (pH 8.0) に、最終濃度 0.33 mM DTNB および 0.25 units AChE を溶解し、そこに 0.001、0.01、0.003、0.1、0.3、1 mM ノビレチンまたはコントロールとして DMSO (最終濃度 1%) を懸濁した混合物を調製した ($n=3$)。また、被検物質に代わり 6.7 nM ドネペジル (IC_{50}) を混合したものをポジティブコントロールとし、リン酸バッファーと DTNB のみのサンプルをブランクとした。これらサンプルをディスポーザブルキュベットに入れ、25°Cの恒温槽にて 10 分間プレインキュベートした。その後、最終濃度 0.52 mM よう化アセチルチオコリンを加え、キュベットを傷つけないようすばやくピペッティングしたのち、分光光度計にて波長 412 nm における吸光度 (A_{412}) を測定し、これを 0 分の値とした。その後、25°Cの恒温槽にてインキュベートし、各サンプル反応開始 1 分後および 2 分後の経時的な値を同様に測定した。

3-2-3. データおよび統計解析

0~2 分間の酵素反応が律速になっていないことをグラフプロットの直線性で確認した後、AChE 抑制作用は次の数式を用いて計算した。

$$R = \Delta A / \{1.36 \times 10^4 \times \text{total volume (mL)} \times [1/\text{enzyme (mg)}]\}$$

$$\left(\begin{array}{l} R: \text{AChE 活性値 (unit / mg)} \\ \Delta A: A_{412}/\text{min} \\ 1.36 \times 10^4: \text{DTNB 吸光係数} \end{array} \right)$$

以上により求めた AChE 活性値を blank 補正し、コントロールを 100%としたときの各被検物質およびドネペジルの抑制作用の相対値を求めた。実験値は、平均値±平均値の標準誤差 (mean ± SEM, $n=3-4$) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を用いて 1-way ANOVA を実施、

事後比較として Tukey's multiple comparison test を行った。有意水準を両側 5% として検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3-2-4. 比色定量法を用いた類縁体の AChE 活性抑制作用測定

「3-2-2. 比色定量法を用いたノビレチン AChE 活性抑制作用の濃度依存性検討」と同様の方法で、100 μM のノビレチン、5-demethyl nobiletin、6-demethoxy nobiletin、sinensetin、tangeretin および 6-demethoxy tangeretin 添加時の AChE 抑制活性を検討した ($n=4$)。コントロールとして DMSO 最終濃度は 0.33% とした。被検物質に代わり 6.7 nM ドネペジルを混合したものをポジティブコントロールとし、リン酸バッファーと DTNB のみのサンプルを blank とした。AChE 活性値の計算および統計解析については「3-2-3. データおよび統計解析」と同様に行った。

3-2-5. ノビレチンおよびドネペジルの相互作用検討

「1.2.2 比色定量法によるノビレチンの濃度依存的 AChE 活性抑制作用の測定」に記した方法で、50 または 100 μM のノビレチン単独もしくは 6.7 nM のドネペジルを併用添加した時の AChE 抑制活性を検討した ($n=3$)。コントロールとして DMSO (最終濃度 0.3%)、リン酸バッファーと DTNB のみのサンプルを blank とした。AChE 活性値の計算および統計解析については「3-2-3. 解析」と同様に行った。

第3節 実験結果

3-3-1. ノビレチンの濃度依存的 AChE 活性抑制作用

比色定量法によりノビレチンのヒト AChE 活性阻害作用の濃度依存性を検討した。各濃度ノビレチンの吸光度から AChE 阻害作用を求め、コントロールに対する相対値をとして示した。その結果、ノビレチンは濃度依存的に AChE 活性を阻害することが明らかとなった (Fig. 14)。

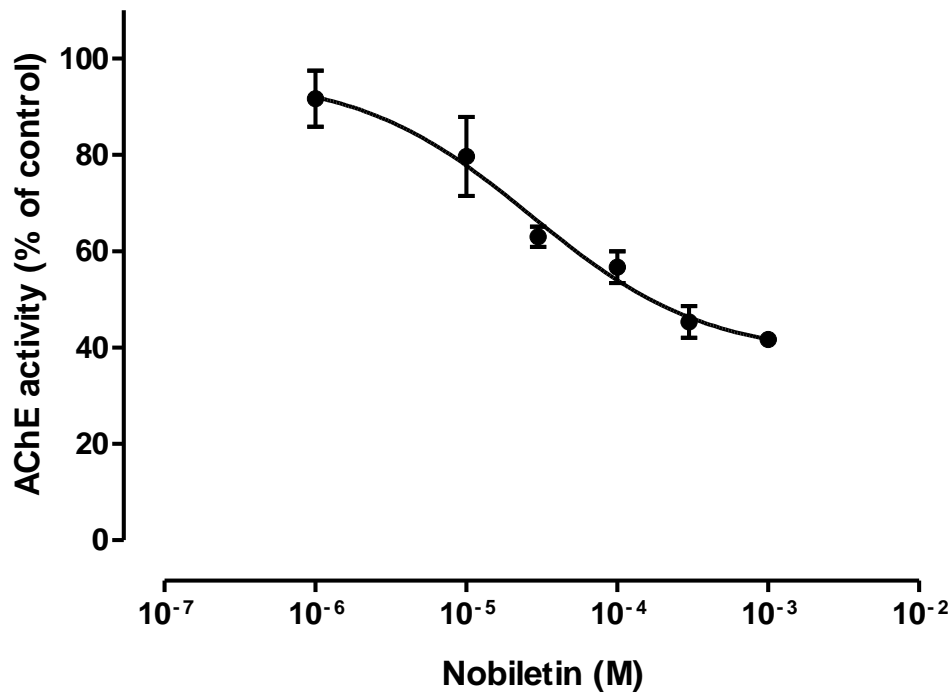


Fig. 14 Concentration-dependent inhibition of the human AChE activity by nobiletin. The AChE activities at the indicated concentrations of nobiletin were spectrophotometrically measured. The values represent the mean \pm SEM ($n=3$).

3-3-2. 類縁体の AChE 活性抑制作用

比色定量法により 100 μ M ノビレチンおよび類縁体のヒト AChE 活性阻害作用を比較検討した。その結果、sinensetin と 6-demethoxy nobiletin において、コントロールに対し有意な抑制作用が示された (Fig. 15)。

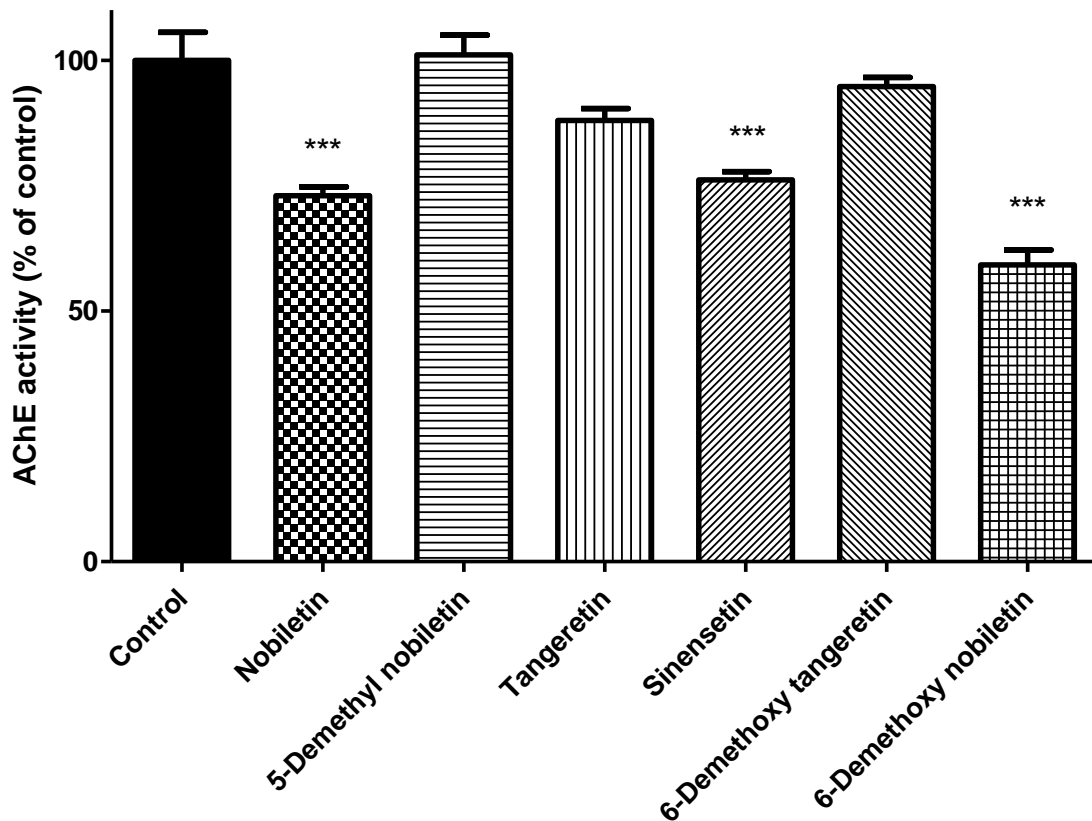


Fig. 15 Inhibitory effect of nobiletin and its analogues on human AChE activity. The AChE activities at the indicated concentrations of nobiletin and its analogues were spectrophotometrically measured. The values represent the mean \pm SEM ($n=4$). Statistically significant difference from the control (DMSO alone), ***, $p<0.001$.

3-3-3. ノビレチンおよびドネペジル併用効果評価

ノビレチンと IC₅₀濃度のドネペジルの併用効果を検討した結果、50 または 100 μM ノビレチン両濃度において、いずれも有意な相乗効果は見られなかった (Fig. 16)。

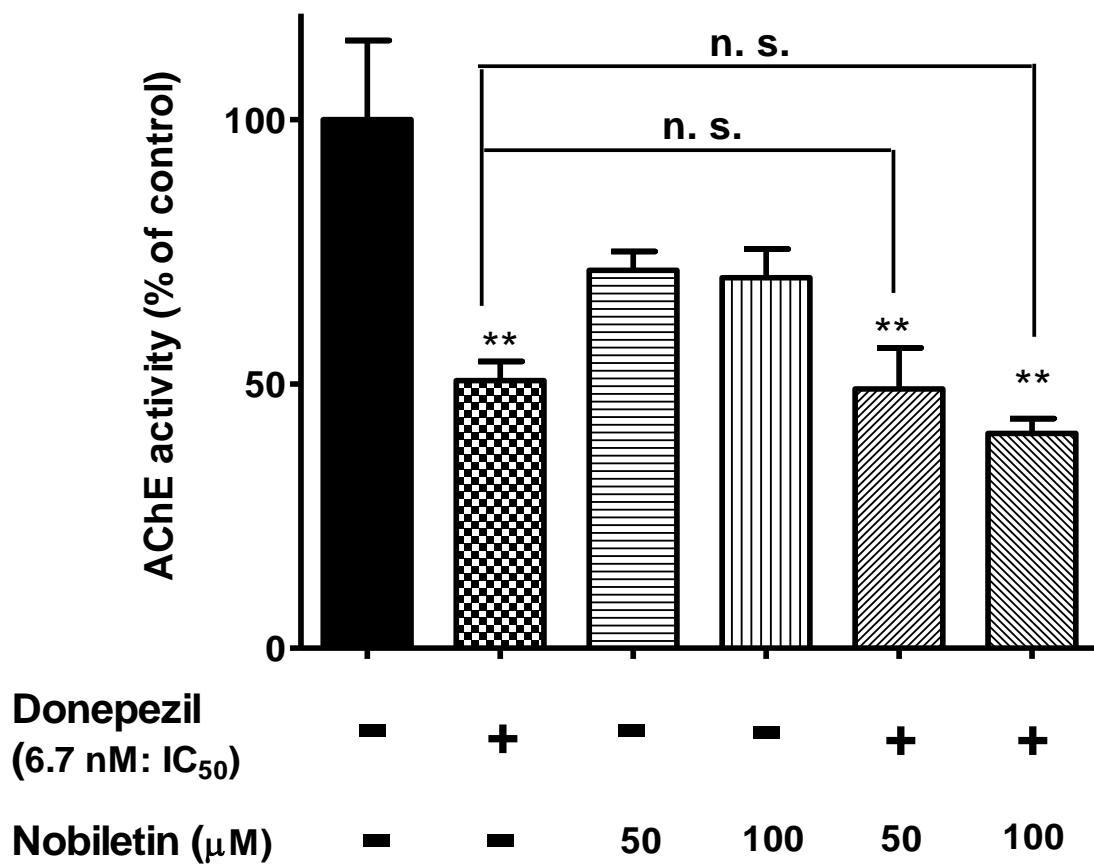


Fig. 16 Analysis of combined inhibitory effect of nobiletin and donepezil on AChE activity. The AChE activities at the indicated concentrations of nobiletin and/or donepezil were spectrophotometrically measured. The values represent the mean ± SEM ($n=3$). Statistically significant difference from the control (DMSO alone), **, $p<0.01$.

3-3-4. 考察

AD 患者の死後脳の病理学的な解析により、神経伝達物質アセチルコリンの合成酵素である ChAT 活性が、正常な脳と比較して著しく低下していること⁶¹⁻⁶³、前脳基底核のコリン作動性神経細胞の脱落が認められたことから¹²、AD においてアセチルコリンとその受容体を持つコリン作動性神経が深く関与することが示唆され「コリン仮説」が提唱された¹³。そのことから、脳内のアセチルコリンを増加させることで認知障害が改善されるという概念が生まれた。ドネペジルはこのコリン仮説に基づいた、アセチルコリン分解酵素を抑制する抗 AD 薬である¹⁰。本章では、ノビレチンがアセチルコリン分解酵素抑制作用を有するか、ヒト赤血球由来アセチルコリン分解酵素を用いた *in vitro* 系で既存薬との比較検証を実施した。

ノビレチンは濃度依存的に抑制作用を示したが、1 mM (10^{-3} M) ノビレチン濃度でも約 60% の抑制活性であった (**Fig. 14**)。また 100 μ M の類縁体についても抑制作用を検討した。ノビレチンと同様 sinensetin と 6-demethoxy nobiletin にコントロールに対して有意な抑制活性が見られたが、その活性は約 20–40% と極めて弱いことが示された (**Fig. 15**)。さらに、ノビレチンと IC₅₀ (6.7 nM) ドネペジルの併用における効果を検討した結果、相加および相乗効果は確認されなかった (**Fig. 16**)。

以上の結果から、ノビレチンの記憶障害改善作用における主たる作用機序はドネペジルと異なることが示された。今後、併用することを考慮した細胞毒性解析や、ドネペジルによるノビレチンの細胞内シグナル活性に及ぼす影響など、更なる検討が必要である。

第4章 A β の細胞毒性に対するノビレチンの作用検討

第1節 序論

ADの病理的特徴として、A β の神経細胞への蓄積が知られている。A β は不溶性または可溶性の形態を持つが、不溶性A β はアミロイド線維を形成し脳内に凝集・蓄積、いわゆる老人斑として神経細胞外に沈着する。このことにより活性酸素が発生し神経細胞傷害を誘発する⁷。一方、神経細胞膜で切り出されたA β ペプチドの一部は、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、様々な細胞毒性を惹起する（Fig. 17）³⁸。この可溶性A β モノマーやオリゴマーは、細胞内に蓄積し、LTPを顕著に抑制すること報告されている^{64,65}。またミトコンドリアに局在するA β は障害を引き起こし、細胞死を招く⁶⁶。特に強い凝集能・毒性を示すA β_{1-42} ペプチドは、神経変性を起こし⁶⁵、細胞内シグナル伝達とCRE依存性転写の攪乱を惹起する^{30,67,68}。ADを標的とするためには、細胞生存率や遺伝子発現に及ぼすA β の影響を、記憶に関与する因子の遺伝子発現を指標に解析すること、さらにそれに対するノビレチンの作用を明らかにすることは必須である。

近年当研究チームでは、若年期から記憶学習障害を示す老化促進モデルマウスSAMP8において、ノビレチンが有意に記憶障害を回復することを明らかにした¹⁶。SAMP8脳内の還元型グルタチオン（通常生体内に存在する型）はノビレチン非投与群で減少が認められ、その減少はノビレチン投与によりコントロールである通常加齢マウスSAMR1と同程度まで回復することが示された。また酸化型グルタチオン（酸化ストレスにより変換されたグルタチオン）は、ノビレチン投与群で有意に減少することが示された。さらに、マンガニンイオンを活性中心に持つスーパーオキシドジスムターゼMn-SOD活性や、グルタチオン存在下で抗酸化作用を示す酵素で加齢により減少することが知られているグルタチオンペルオキシダーゼが、ノビレチン投与により有意に増加することも明らかになった。以上のことから、ノビレチンは脳内でのグルタチオンや抗酸化酵素の活性亢進を通して抗酸化システムを活性化することが示唆された¹⁶。

一方、ミトコンドリア機能障害は初期ADの特徴であり、活性酸素種産生などがAD患者脳やADモデルマウスで認められている⁶⁶。これらの知見より、ノビレチンはA β によるミトコンドリア機能障害から惹起される酸化ストレスを減少させることで細胞死を抑制していることが示された。

そこで本章では、神経細胞様に分化したPC12細胞を用いて以下の検討を実施した。はじめに、A β 誘発性の細胞死に対するノビレチンの作用をWST-8アッセイで検討した。つぎに、NMDA受容体NR1遺伝子発現を指標にA β が遺伝子発現に及ぼす影響とそれに対するノビレチンの作用を、リアルタイムPCR法により解析した。

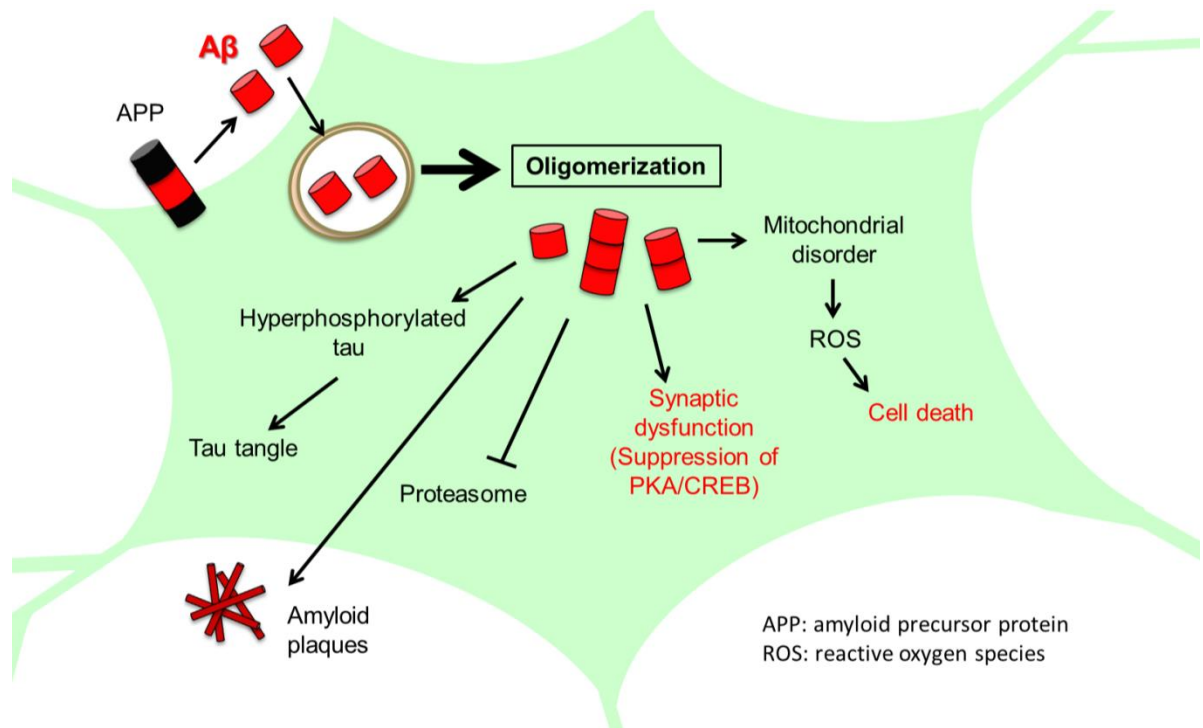


Fig. 17 Cytotoxic effects of intraneuronal Aβ peptide³⁸.

第2節 材料および実験方法

4-2-1. 材料・試薬

PC12 細胞、細胞培養試薬、リアルタイム PCR 試薬および PDL コーティング 96 ウェルプレートは、2 章「2-3-1-1. 材料・試薬」に記したと同様のものを用いた。Amyloid β -Protein (Human, 1-42) は株式会社ペプチド研究所 (大阪)、Cell Counting Kit-8 は株式会社同仁化学研究所 (熊本)、Nerve Growth Factor-7S from mouse submaxillary glands は Sigma-Aldrich Co. LLC. からそれぞれ入手した。

4-2-2. 細胞培養

2 章「2-3-1-2. 細胞培養」と同様の方法で PC12 細胞の培養を行った。

4-2-3. ノビレチンおよび $A\beta_{1-42}$ 処理

PC12 細胞を 1.0×10^3 cells / well の細胞密度で PDL コーティング 96 ウェルプレートに播種し ($n=5$)、 37°C 、5% CO_2 の環境下にて 24 時間培養した後、NGF (最終濃度 50 ng/mL) を含む低血清培地 (0.5% 非働化 HS) に交換し、2 日ごとに半量培地交換、3~4 日間分化培養した。その後、30、100 μM ノビレチンまたは 0.1% DMSO (溶媒コントロール) を含む低血清培地に交換し、3 時間のノビレチン前処理培養を行った後、30、100 μM ノビレチンまたは 0.1% DMSO を含む低血清培地それぞれに、1、5、10 μM $A\beta_{1-42}$ または 1% DMSO を共添加して 24 時間、 37°C 、5% CO_2 の環境下にて 24 時間培養した (DMSO 最終濃度 : 1.1%)。

4-2-4. 細胞生存率の測定と解析

細胞生存率の測定は、Cell Counting Kit-8 の説明書に従って WST-8 アッセイを実施した。ノビレチンおよび $A\beta_{1-42}$ 処理した PC12 生細胞培養液中に、Cell Counting Kit-8 溶液を添加、アルミホイルで遮光し、呈色反応として 37°C 、5% CO_2 の環境下にて 2 時間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー Infinite[®] M200 (テカンジャパン株式会社、神奈川) で 450 nm (measurement) / 630 nm (reference) の吸光度を測定した。また、無細胞のウェルをブランク、1.1% DMSO のウェルをコントロールとした。

得られた数値をもとに、細胞生存率は以下の式で求めた。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100$$

実験値は、平均値±標準偏差 (mean ± SD, n=3-5) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を用いて二元配置分散分析を実施、事後比較として Bonferroni multiple comparison test を行った。有意水準を両側 5%として検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

4-2-5. 逆転写反応およびリアルタイム PCR

SYBR[®] Green Cells-to-CT[™] Kits を使用して逆転写反応に用いる細胞ライセートを調製した。得られた細胞ライセートを逆転写反応 (37°C : 60 分、95°C : 5 分) およびリアルタイム PCR (95°C : 10 分、1 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 1 分、40-50 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 30 秒、95°C : 15 秒、1 サイクル) を行った。リアルタイム PCR における SYBR[®] Green の検出には、Thermal Cycler Dice[®] Real-Time System およびソフトウェアを使用した。用いたプライマーは、第 2 章の表 1 に示した。

Ct 値は閾値と増幅曲線の交点を Ct 値 Crossing Point 法で求め、housekeeping 遺伝子である β -actin 遺伝子 (*Actb*) をリファレンスとして各遺伝子発現を相対的に定量し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した⁴⁴。実験値は、平均値±標準偏差 (mean ± SD =3-5) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を使用して Student's *t*-test を実施、有意水準を両側 5%として検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

第3節 実験結果

4-3-1. A β 誘発性細胞死に対するノビレチンの抑制作用

WST-8 アッセイにて細胞生存率を定量した結果、A β_{1-42} 単独添加後の細胞生存率は、A β_{1-42} 濃度依存的に減少した (Fig. 18)。1 μ M A β_{1-42} で約 10%、5 μ M では約 20%、10 μ M では 40% の細胞生存率の減少が確認された。一方で、30 μ M ノビレチン前処理後 A β_{1-42} を添加し共存下で培養した細胞では、1 μ M A β_{1-42} で約 10% の細胞生存率の減少が見られたが、5 μ M、10 μ M A β_{1-42} 添加時の減少は見られなかった (Table 3)。10 μ M A β_{1-42} 添加時では、処理/未処理群間でノビレチンによる有意な細胞生存率減少抑制が示された。

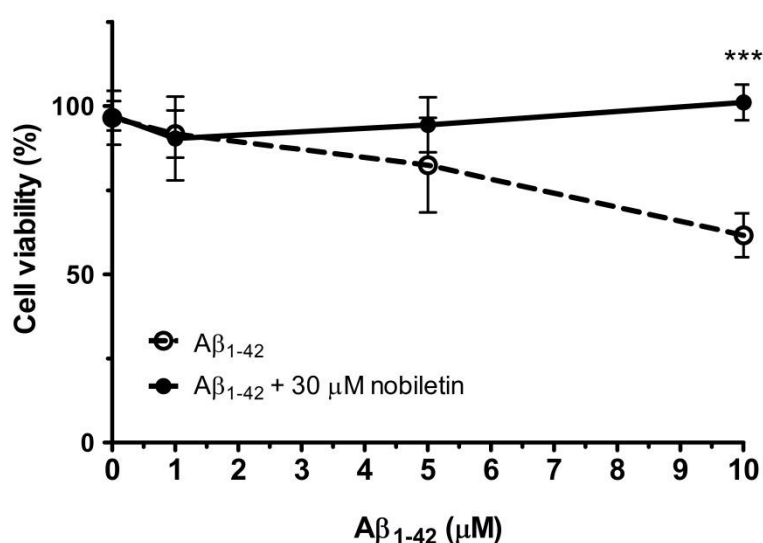


Fig. 18 Inhibition of A β -induced cell death by nobiletin in nerve-like PC12 cells.

Table 3 Cell viability

A β_{1-42} (μ M)	Cell viability (%)			
	A β_{1-42}		A β_{1-42} + 30 μ M nobiletin	
	Mean	SD	Mean	SD
0	96.5	8.0	97.1	4.3
1	91.7	7.0	90.3	12.5
5	82.4	14.0	94.4	8.2
10	61.6	6.5	101.0	5.3

4-3-2. A β 誘発性遺伝子発現減少とノビレチンによる抑制作用

はじめに、A β が遺伝子発現におよぼす影響を、NMDA 受容体サブユニット NR1 遺伝子発現を指標に検討した。神経様分化 PC12 細胞に A β_{1-42} 添加、24 時間培養しリアルタイム PCR 法で解析した結果、A β_{1-42} 濃度依存的に NR1 遺伝子発現は減少した (Fig. 19)。コントロールと比較して、1 μ M A β_{1-42} では約 20%、5 μ M では約 25%、10 μ M では約 40%の発現減少が確認された。

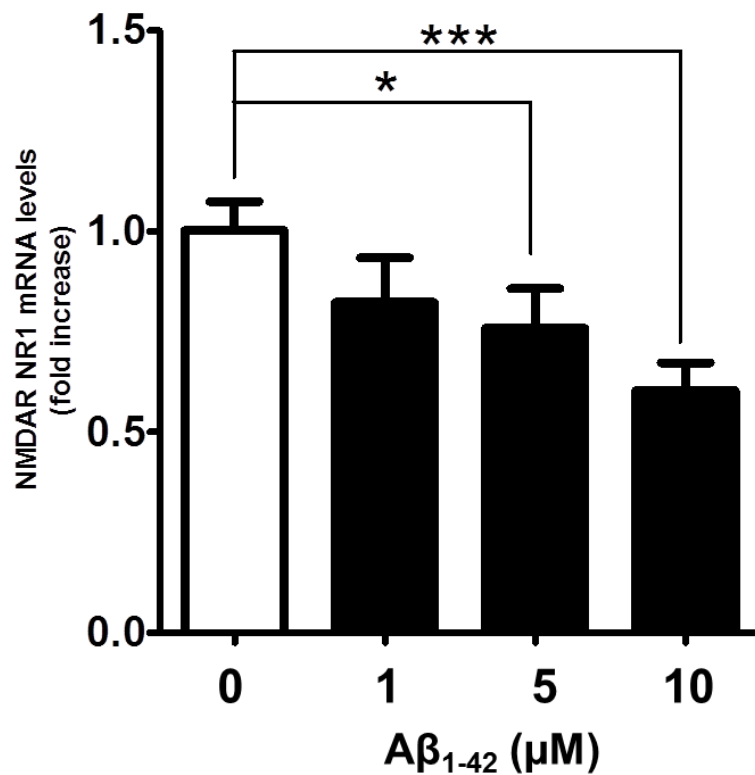


Fig. 19 A β -induced suppression of NR1 gene expression in nerve-like cells.

この A β 誘発性遺伝子発現減少に対するノビレチンの作用を調べるため、神経様 PC12 細胞をノビレチンで前処理したのち、A β_{1-42} を添加してノビレチンとの共存下で 24 時間培養しリアルタイム PCR 法で NR1 遺伝子の発現を解析した。その結果、**Fig. 20** に示した通り 1 μ M A β_{1-42} による発現減少を 30 μ M ノビレチンがコントロールレベル同等に回復した。さらに、10 μ M A β_{1-42} による発現減少を 100 μ M ノビレチンが約 15% 回復することが示された。

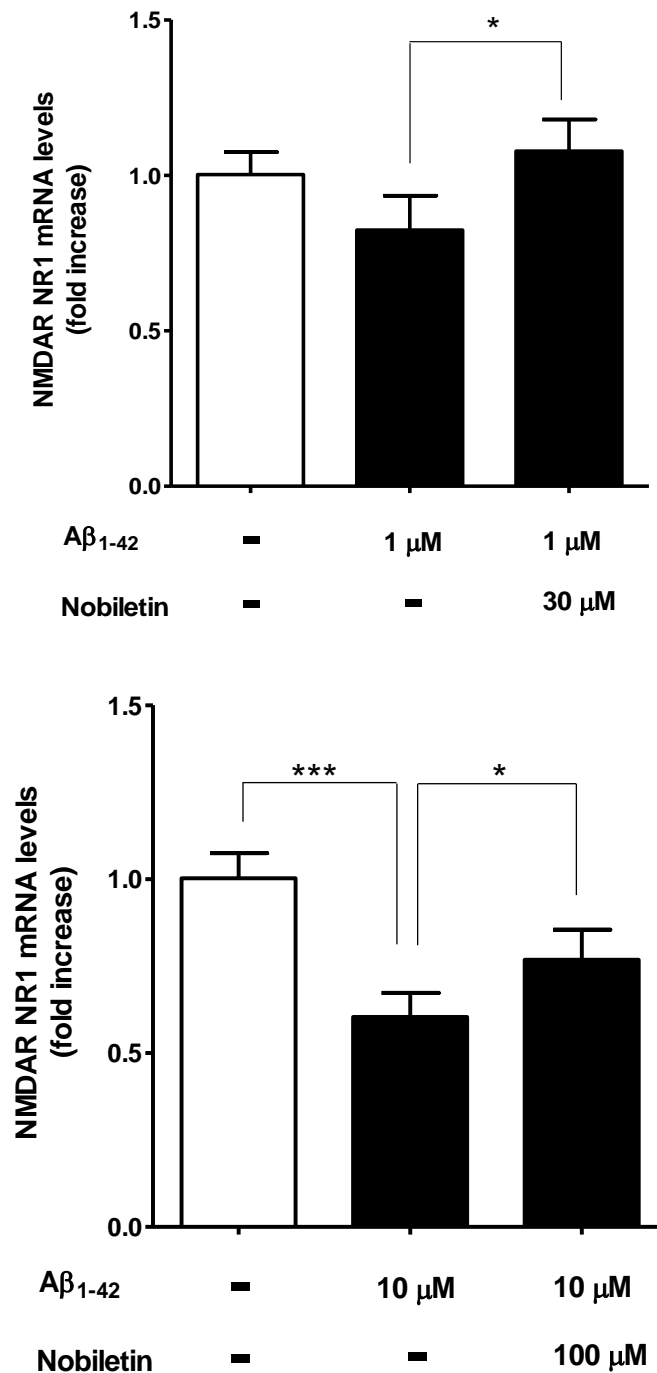


Fig. 20 Protection of A β -induced suppression of NR1 gene expression by nobiletin.

第4節 考察

本章では、A β 、特に毒性と凝集能が高い A β_{1-42} の細胞毒性に対するノビレチンの作用を検討した。その結果、A β_{1-42} は濃度依存的に細胞生存率の低下すなわち細胞死を惹起したが、この A β_{1-42} 誘発性細胞死はノビレチンによって抑制されることが示された (Fig. 18 および Table 3)。このことは、先行研究におけるノビレチンの酸化ストレス減少作用による細胞死抑制の分子作用機序の一端であることが考えられる。

海馬初代培養系で A β は PKA の活性を濃度依存的に減少させ、グルタミン酸誘発性 CREB 活性化を抑制することが報告されている⁶⁷。ノビレチンが A β 誘発性 NMDA 受容体サブユニット NR1 遺伝子発現減少を抑制したことから (Fig. 20)、ノビレチンは A β 誘発性細胞内シグナル抑制を回復することが示唆された。しかし、細胞生存率の低下 (Fig. 18) と遺伝子発現の減少 (Fig. 19) には相関が見られることから、A β 誘発性遺伝子発現減少は細胞死に伴って生じたとも考えられ、更なる検討が必要である。

A β ペプチドの形態は、溶媒、静置時間および静置温度に依存することが報告されている⁶⁹。DMSO に溶解すると可溶性 A β オリゴマーと不溶性 A β 線維の混在となり、水に溶解した場合はそのほとんどが不溶性の線維となる。培養細胞系においては、線維化した A β は細胞内シグナルを過剰活性化し ERK シグナルの調節不全を引き起こして CRE 依存性転写を破綻させるが、反対に生理学的濃度の A β は CRE 依存性転写を亢進させる⁶⁸。当実験系では、A β を DMSO 溶解した結果、細胞死と遺伝子発現減少から A β 細胞毒性とそれに対するノビレチンの作用が認められたが、AD における A β 形態を反映しているかは不明である。そこで次章において、自身で A β を過剰産生する iPS 細胞由来 AD モデル神経細胞を用い、より病態に近い *in vitro* 評価系としてノビレチンの作用を検討した。

第5章 iPS細胞由来アルツハイマー病モデル神経細胞におけるノビレチンの作用解析

第1節 序論

前章では、神経様分化 PC12 細胞を用いて、A β 誘発性細胞毒性にノビレチンが作用することを示した。しかしながら、A β 形態と細胞毒性が病態を反映しているかは不明であった。また本研究で明らかにしてきた酸化ストレスからの細胞保護や遺伝子発現減少の抑制などのノビレチンの作用は、AD の原因物質である A β の産生や作用を抑制またはその分解や排出を促進することで発揮していることが想定される (Fig. 21)。現在 AD 患者に対して頻用されている AChE 阻害剤ドネペジルは、A β の産生抑制や分解促進を目的としない。すなわちこれは対症療法であり、真の治療薬とは言えない。A β の産生を抑えたり、分解や排出を促進したりすることが可能な物質こそが、AD の早期予防や進行抑制に極めて有効であると考えられる。

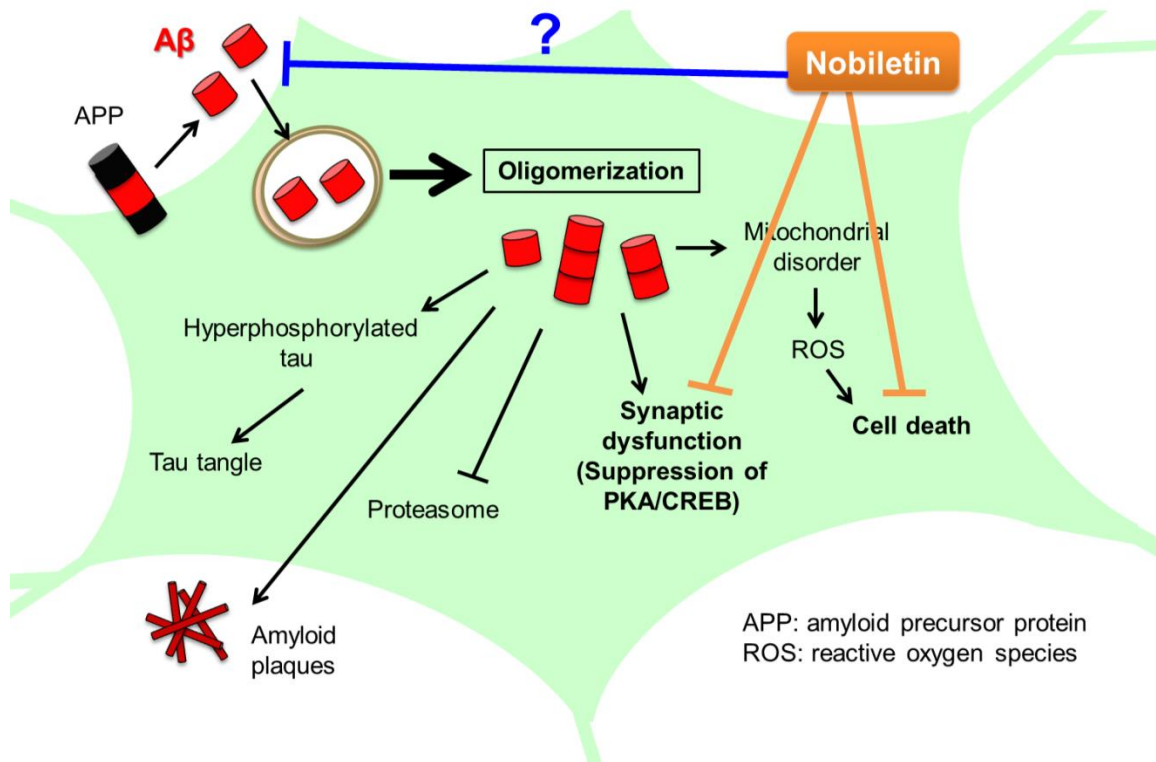


Fig. 21 Model of potential effect of nobiletin on attenuation of A β -induced cytotoxicity.

近年、神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 培養細胞株を用いた系において、ノビレチンが A β 分解酵素である中性エンドペプチダーゼ、ネプリライシン (neprilysin: NEP, 異名 membrane metalloendopeptidase: MME)⁷⁰ の遺伝子およびタンパク質発現とその酵素活性を亢進することを新たに見いだした⁷¹。そこで本章では、「ノビレチンは A β 分解を促進する」との仮説を立て、検証を行った (Fig. 22)。また、ノビレチンが A β 産生抑制に作用するか否かの確認も行った。

一方、Fig. 23 に示すヒト iPS 細胞由来 AD モデル神経細胞を用いて、ノビレチンの A β 分解促進作用を評価するための、新たな AD 病態モデル細胞系を確立した⁷²。当細胞は、家族性 AD で見いだされたプレセニリン 1 (presenilin-1: PS1) の 117 番目のプロリン (proline: P) がロイシン (leucine: L) に置換した変異を持ち、その結果として A β を過剰産生することが報告されている⁷³。PS1 は APP から A β を切り出し、その産生に関与する γ -セクレターゼを構成する主要な酵素である。当細胞を用いることで、より AD 病態を反映した *in vitro* 系における A β の影響が検出可能と考え、ノビレチンの作用を検討した。本章では、はじめに当細胞系でノビレチンが A β 産生酵素 β -セクレターゼである BACE1 遺伝子の発現を抑制するかリアルタイム PCR で確認した。次にノビレチンが NEP 遺伝子発現を亢進するかを同様に解析した。最後に、細胞内 A β の量的変化について抗 A β 抗体を用いた免疫細胞染色で確認し、仮説の検証を試みた。

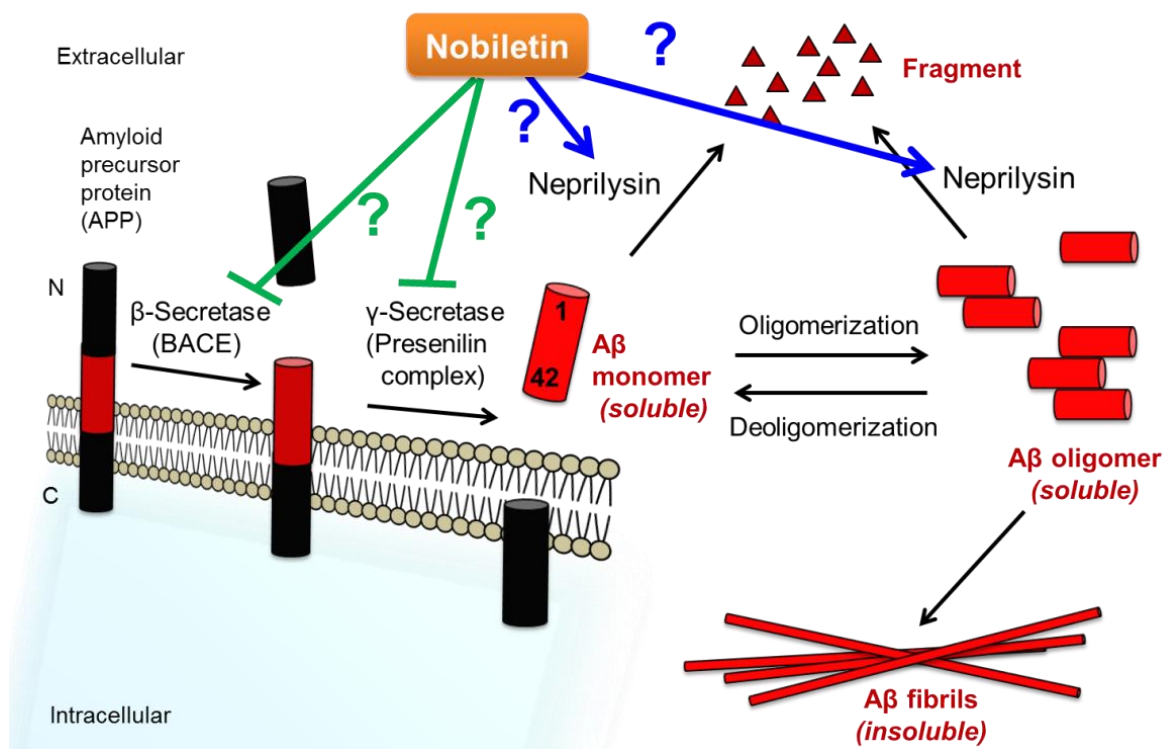


Fig. 22 A β production and degradation⁷⁰.

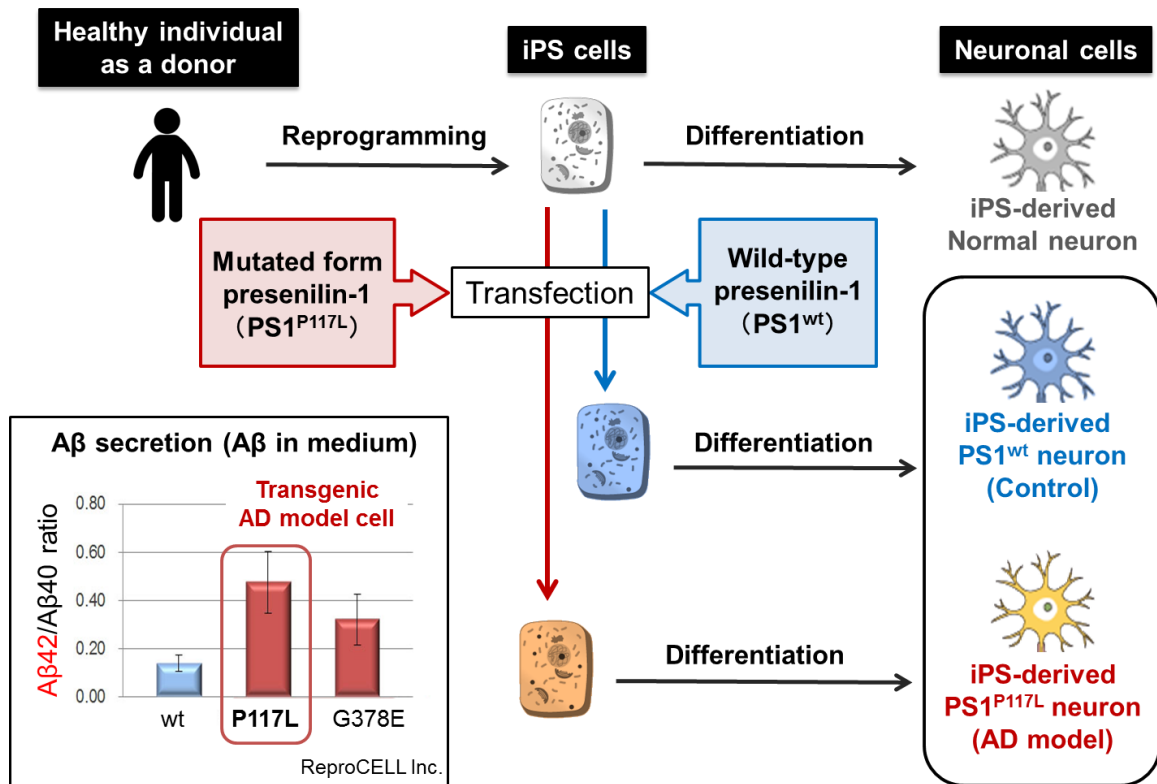


Fig. 23 Preparation of iPS cell-derived AD model neuron.

第2節 材料および実験方法

5-2-1. 材料・試薬

iPS 細胞由来神経細胞キット (iPS-PS1^{P117L}: AD model および -PS1^{WT}: normal model、専用培地、培養用分化溶液、コーティング試薬含む) は、株式会社リプロセル (東京) から購入した。Poly-L-Lysine (PLL) 溶液は Sigma-Aldrich Co. LLC.、平底ノンコート 96 ウェルプレートおよび SYBR[®] Green Cells-to-CT[™] Kits は Life Technologies Corp.、16 ウェルガラスチェンバースライドは Thermo Fisher Scientific, Inc.、抗 A β ₁₋₁₆ (6E10) 抗体は Covance Inc., (Princeton, NJ, USA)、抗マウス-FITC 抗体および Neuro-Chrom[™] FluoroPan Neuronal Marker は Millipore Corp., (Billerica, MA, USA)、Hoechst33342 は株式会社同仁化学研究所から入手した。

5-2-2. iPS 細胞の神経分化誘導

96 ウェルプレートに 0.002% PLL/PBS を加え 2 時間インキュベートした後、PBS でウェルを洗浄した。続いてコーティング溶液/PBS を加えオーバーナイトでインキュベートした。コーティングした 96 ウェルプレートに、キットの Thawing solution で PS1^{P117L} および PS1^{WT} 神経細胞を解凍した後、遠心にて回収し、50 units/mL ペニシリン 50 μ g/mL ストレプトマイシンを含む Maturation medium に懸濁、 3.0×10^4 cells/well になるよう播種した。その後、3-4 日ごとに Maturation medium を半量交換し、37°C、5% CO₂ の環境下にて分化培養した。また、神経分化確認のため、コーティングした 16 ウェルガラスチェンバースライドに播種した細胞を 14 日以降 21 日まで培養した。その後、細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定、0.2% TritonX-100 で膜透過処理を行い、3% BSA でブロッキングし、1% BSA で 50 倍希釈した Neuro-Chrom[™] FluoroPan Neuronal Marker (Alexa488 標識した抗 neuronal nuclei (NeuN) 抗体、抗 microtubule associated protein 2 (MAP2) 抗体、抗 β III tubulin 抗体および抗 neurofilament heavy (NF-H) 抗体カクテル) に接触させ室温で 2 時間静置した。1 μ g/mL 濃度の Hoechst33342 で核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で神経分化を観察した。

5-2-3. iPS 細胞由来神経細胞のノビレチン処理

神経分化した iPS-PS1^{P117L} および-PS1^{WT} 神経細胞に、10, 30, or 100 μ M のノビレチンまたは溶媒コントロールである 0.1% DMSO を懸濁した Maturation medium を添加し、24 時間培養した。その後、SYBR[®] Gre-en Cells-to-CT[™] Kits を使用して、逆転写反応に用いる細胞ライセートを調製した。

5-2-4. 逆転写反応およびリアルタイム PCR 解析

得られた細胞ライセートを逆転写反応 (37°C : 60 分、95°C : 5 分) およびリアルタイム PCR (95°C : 10 分、1 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 1 分、40-55 サイクル、95°C : 15 秒、60°C : 30 秒、95°C : 15 秒、1 サイクル) を行った。リアルタイム PCR における SYBR® Green の検出には、Thermal Cycler Dice® Real-Time System およびソフトウェアを使用した。用いたプライマーを **Table 4** に示した。

Ct 値は Crossing Point 法で求め、housekeeping 遺伝子である β -actin 遺伝子 (*Actb*) をリファレンスとして各遺伝子発現を相対的に定量し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出した⁴⁴。実験値は、平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm SD, $n=3-4$) で表した。GraphPad Prism 5.0 software を使用して 1-way ANOVA を実施、事後比較として Tukey's multiple comparison test を行った。有意水準を両側 5% として検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

Table 4 Real-time PCR primers

検出遺伝子	配列	メーカー
<i>NEP (MME)</i>	NCBI Reference Sequences: NM_000902.3, position: 5037	タカラバイオ株式会社
<i>BACE1</i>	NCBI Reference Sequences: NM_012104.4, position: 1266	タカラバイオ株式会社
<i>Actb</i>	NCBI Reference Sequences: NM_031144.3, position: 1097	タカラバイオ株式会社

5-2-5. 免疫細胞染色

「5-2-2. iPS 細胞の神経分化誘導」に記したと同様に、PLL およびコーティング溶液でコーティングした 16 ウェルガラスチェンバースライドに、iPS-PS1^{P117L} および-PS1^{WT} 神経細胞を 3.6×10^4 cells/well の細胞密度で播種し 14~21 日間分化培養した。その後、3, 10, or 30 μ M のノビレチンまたは溶媒コントロールである 0.1% DMSO を懸濁した Maturation medium を添加し、24 時間培養した。細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで固定、0.2% TritonX-100 で膜透過処理を行い、3% BSA でブロッキングした後、1 次抗体として A β の N 末 1-16 残基を認識する抗 A β ₁₋₁₆ (6E10) 抗体を 1% BSA で 500 倍希釈して添加し、4°C に一晚静置した。1 次抗体を PBS で洗浄後、蛍光標識 2 次抗体として 1% BSA で 100 倍希釈した抗マウス-FITC 抗体で室温に 1 時間静置した。1 μ g/mL 濃度の Hoechst33342 で核を染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

第3節 実験結果

5-3-1. iPS 細胞の神経分化確認

神経細胞特異的なタンパク質 NeuN、MAP2、 β III-tubulin、NF-H の抗体カクテルである Neuro-Chrom™ FluoroPan Neuronal Marker によって、ニューロン核・樹状突起・軸索を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して神経分化を確認した。分化培養 14 日目の iPS-PS1^{P117L}(AD) および PS1^{WT} (normal) 細胞において、明確なシグナルが観察され、神経分化が示された (Fig. 24)。

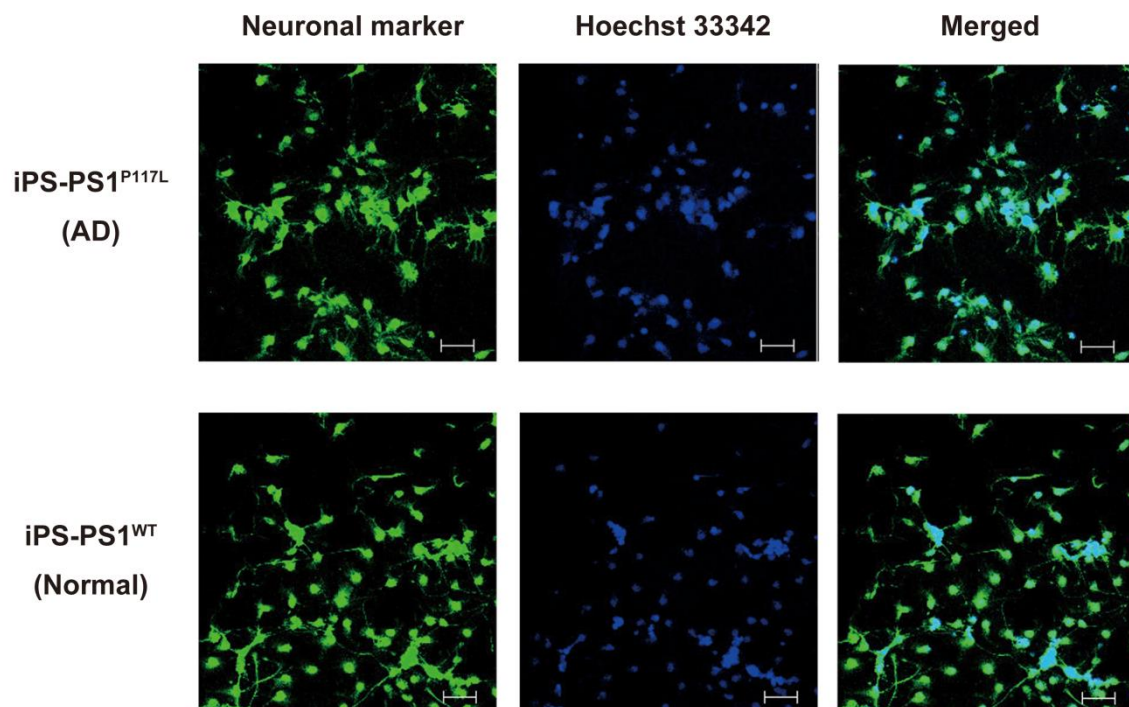


Fig. 24 Confirmation of iPS-PS1^{P117L} and -PS1^{WT} cells differentiation into neurons. After 14 days for culture, both types of cells were fixed, made permeable, and then immunostained with a cocktail of antibodies against neuronal markers (green). Nuclei were stained with Hoechst33342 (blue). Neuro-differentiation was observed by using confocal laser microscopy. Scale bar: 50 μ m.

5-3-2. ノビレチンが A β 産生酵素 BACE1 遺伝子発現に及ぼす作用

A β を産生する酵素、BACE1 の遺伝子発現をノビレチンが抑制するかをリアルタイム PCR で解析し、検討した。その結果、PS1^{P117L} および PS1^{WT} 神経細胞において、ノビレチンは検討した濃度条件すべてで、その発現を抑制しないことが示された (Fig. 25)。

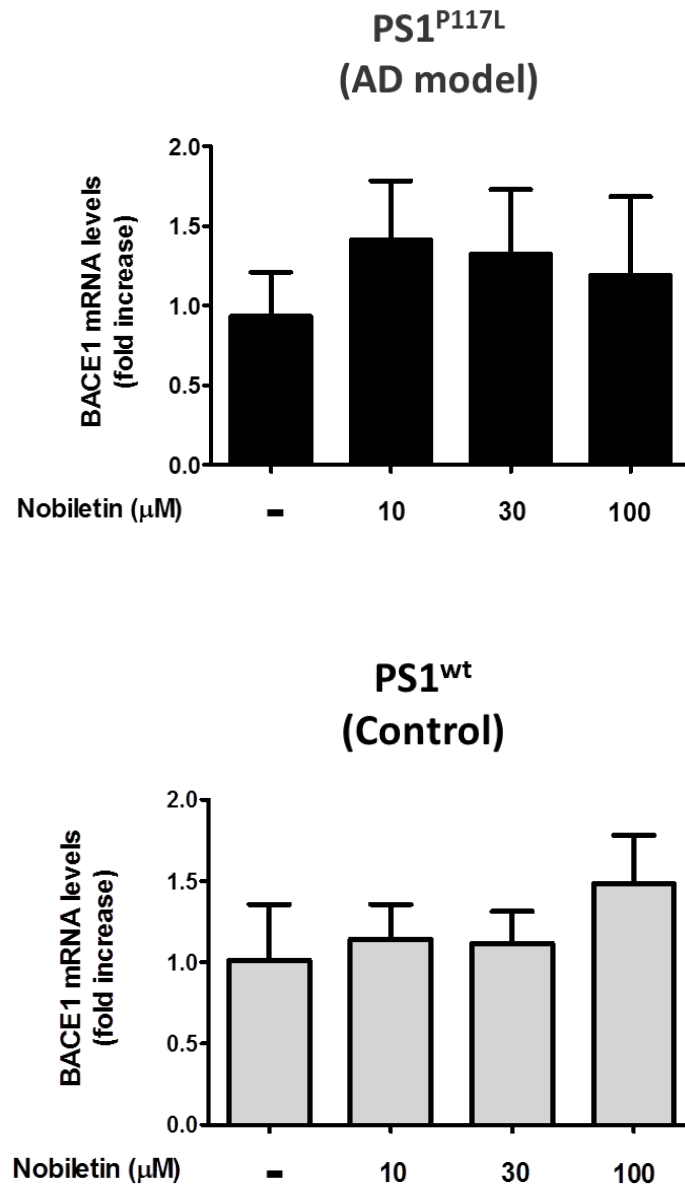


Fig. 25 Effect of nobiletin on the expression of BACE1 gene in iPS-derived neuronal cells. The cells were stimulated with nobiletin at 10, 30, 100 μ M or 0.1% DMSO as vehicle control for 24 h. The values are presented as mean \pm SD ($n=3-5$).

5-3-3. ノビレチンが A β 分解酵素 NEP 遺伝子発現に及ぼす作用

次に、AD モデル神経細胞においても A β 分解酵素である NEP 遺伝子の発現を、ノビレチンが亢進するかを検討した。その結果、PS1^{P17L} AD モデル神経細胞において、10 μ M ノビレチンによる有意な遺伝子発現亢進が確認された (Fig. 26)。30 および 100 μ M 濃度ではその亢進は見られなかった。一方、PS1^{WT} コントロール細胞においても、有意ではないが 30 μ M ノビレチンで発現が亢進する傾向が見られた。また、basal の NEP mRNA 発現レベルは、PS1^{P17L} AD モデル神経細胞の方がコントロール細胞より約 2 倍高いことが明らかになった。

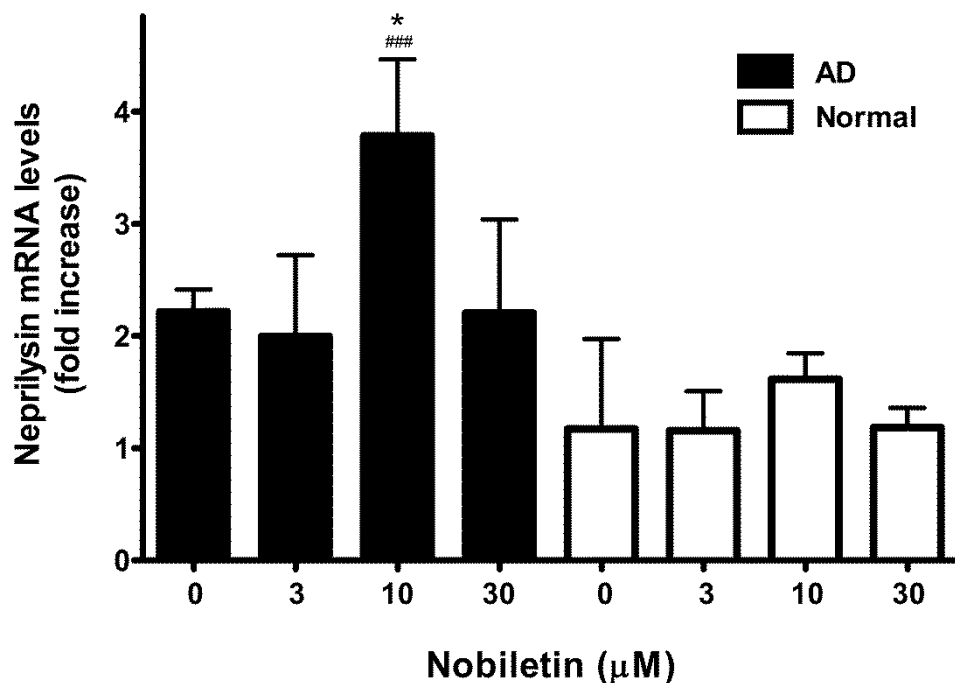
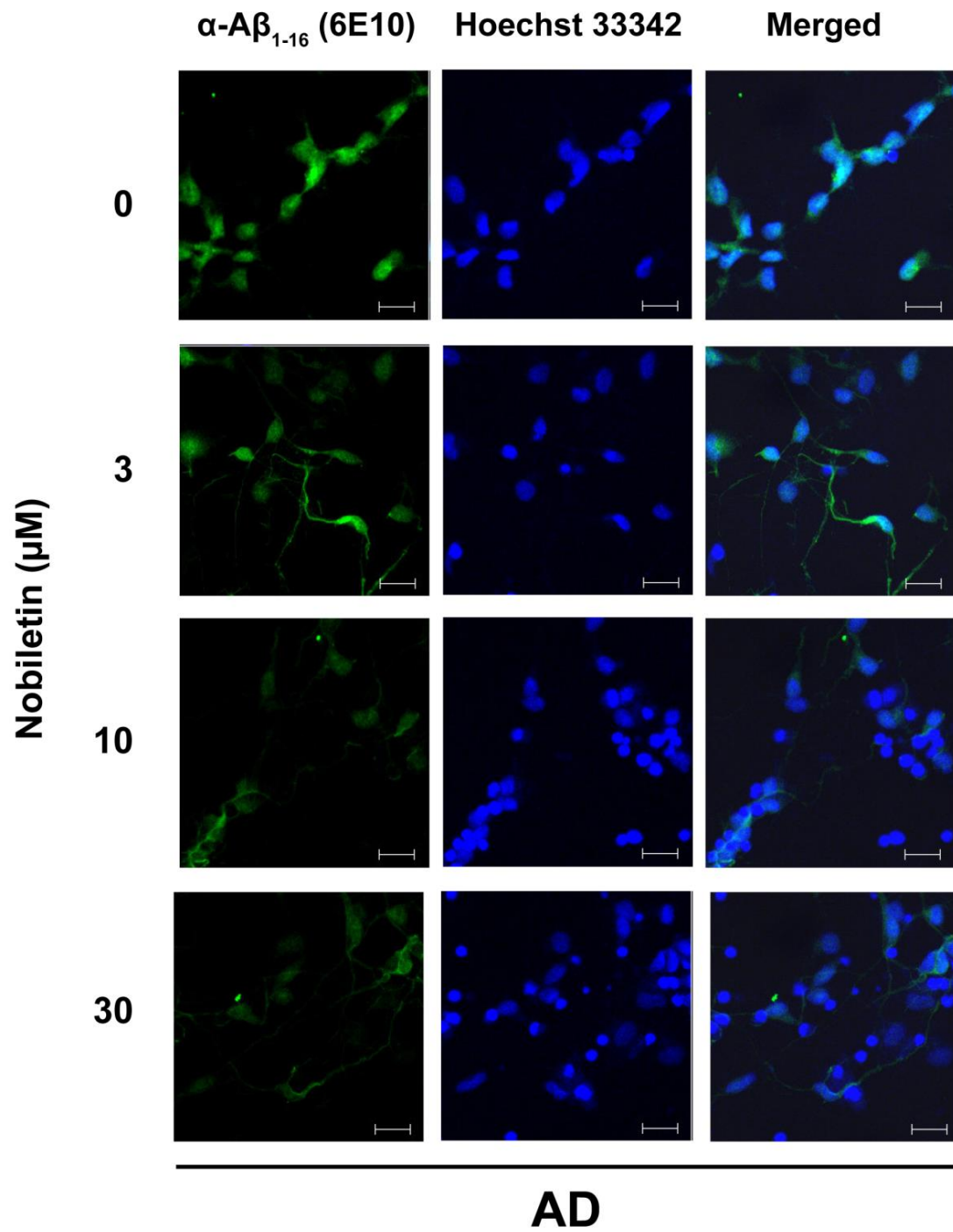


Fig. 26 Effect of nobiletin on the expression of the neprilysin gene in the neurons. The iPS cell-derived AD and normal model neurons were stimulated with nobiletin at 3, 10 or 30 μ M or with 0.1% DMSO as a vehicle control for 24 h. Then, neprilysin mRNA levels were evaluated by real-time PCR. The values are presented as the mean \pm standard deviation (SD, $n=3-4$). *, $p<0.05$ vs. vehicle-treated AD model, ###; $p<0.001$ vs. vehicle-treated normal model neurons.

5-3-4. 細胞内 A β 蓄積に対するノビレチンの効果

ネプリライシン発現亢進により、ノビレチンによる細胞内 A β の量的な変化が生じるか、抗 A β 抗体を用いて免疫細胞染色にて検討した。その結果、PS1^{P117L}AD モデル神経細胞において、control vehicle 処理では極めて強い A β のシグナルが検出され、A β の蓄積が観察された (Fig. 27A)。その A β 蓄積は、3 μ M ノビレチンによって明らかに減少し、10 μ M ノビレチンでは、さらなる減少が認められた。3 および 10 μ M にかけての濃度依存的なノビレチンの A β 減少作用が見られたのに対し、30 μ M ノビレチン処理時ではその減少が確認されなかった。一方、PS1^{WT} コントロール神経細胞では、A β の顕著なシグナルは検出されず、バックグラウンドレベルであった (Fig. 27B)。

A



B

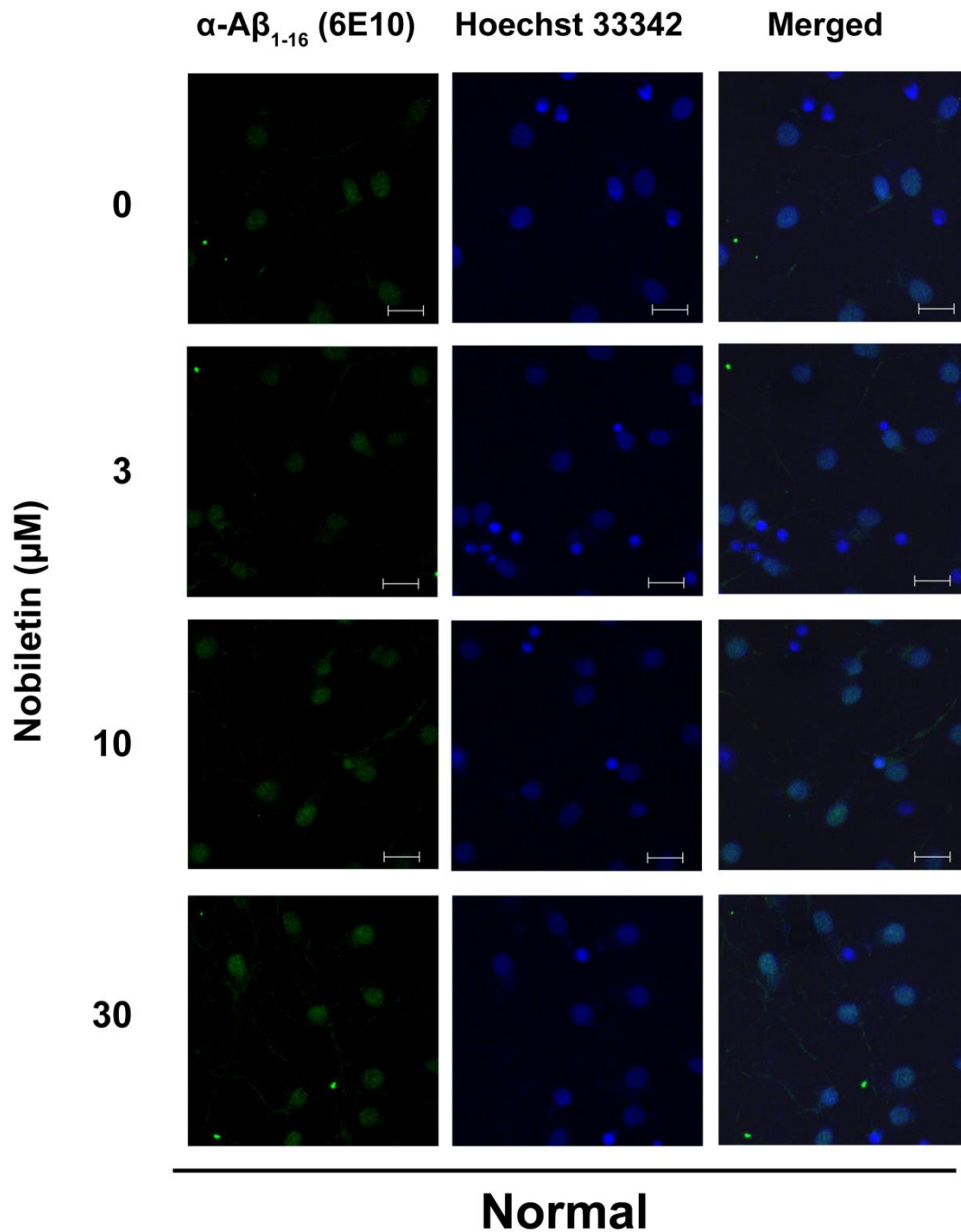


Fig. 27 Immunocytochemical analysis of the intraneuronal A β by immunostaining with A β antibody. The AD (A) and normal (B) model neurons were treated with 3, 10 or 30 μ M nobiletin for 24 h, and then fixed and made permeable. Both types of neurons were then immunostained with anti-A β_{1-16} (6E10) antibody (green). Nuclei were stained with Hoechst33342 (blue). The fluorescence signals of A β and nuclei were observed by confocal laser microscopy. Scale bar: 20 μ m.

第4節 考察

本章では、ノビレチンは A β 分解を促進する、または A β 産生を抑制する、との仮説を立て、よりヒト AD 病態に近いモデル神経細胞を用いたノビレチンの作用検討を行った。はじめに、A β 産生酵素である β -セクレターゼ BACE1 の遺伝子発現に及ぼすノビレチンの作用を解析した結果、ノビレチンによるその発現抑制は見られなかった (Fig. 25)。一方、神経芽細胞腫由来の SK-N-SH 培養細胞で、A β 分解酵素であるネプリライシンの発現や活性がノビレチンにより亢進することが示されたため⁷¹、A β_{1-42} を過剰産生する iPS 由来 AD モデル神経細胞を用いて、ネプリライシン遺伝子 NEP の発現に及ぼすノビレチンの作用を解析した。その結果、10 μ M ノビレチン処理において AD モデル細胞で有意な NEP 遺伝子発現亢進が認められた (Fig. 26)。このことからノビレチンは A β_{1-42} を過剰産生する神経細胞でも A β 分解酵素遺伝子を発現亢進し、その作用には至適濃度があることが示唆された。コントロールの神経細胞でもノビレチンによる NEP 遺伝子発現上昇の傾向が見られたが、最もその作用が強いのは 30 μ M ノビレチン濃度と AD モデル細胞よりノビレチン感受性が低いことが推測された。これは AD モデル細胞では、sublethal な濃度の A β により細胞内シグナルの過剰活性が生じており、ノビレチンに対する感受性が高じていると考えられる^{30,68}。また、ノビレチンを添加していない基礎的な状態での AD モデル細胞で、コントロール細胞の約 2 倍の NEP 発現が確認された (Fig. 26)。 γ -セクレターゼによって切断される APP の細胞内領域 APP intracellular domain (AICD) は、様々な細胞内因子と共役して核内に到達し、NEP 転写を調節していることが近年示唆されている⁷⁴。本研究で用いた AD モデル細胞における A β 過剰産生は、PS1 家族性変異に由来することから、AICD もまたコントロール細胞より多く産生されていると考えられる。従って、AICD を介した NEP 遺伝子発現の亢進が AD モデル細胞で生じているために、AD モデル細胞の方がコントロール細胞より基礎的な NEP 遺伝子の発現が高く検出されたことが推測される。

また、免疫細胞染色により、10 および 30 μ M ノビレチンで細胞内 A β が減少することが明らかになり (Fig. 27)、このことは遺伝子発現の結果とも相関していた。神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 培養細胞での結果と合わせ、ノビレチンは A β 分解酵素を発現亢進して増加させ、その活性をより増強することで可溶性 A β モノマーやオリゴマーの分解を促進して、A β 毒性から細胞を保護していることが示唆された (Fig.28)。今後、細胞内 A β および細胞外に放出された A β について、ELISA 法などを用いた定量的な解析が必要である。

A β オリゴマー形成を介して不溶性 A β 線維が重合され、アミロイドプラークとして脳内に凝集・沈着する。先行研究での APP-SL 7-5 Tg AD モデルマウス海馬のアミロイドプラーク沈着をノビレチンが減少した¹⁹ ことの分子作用機序として、ノビレチンがネプリライシン発現

亢進を介して A β 分解酵素活性を増加させていることが考えられた。ネプリライシンは AD 創薬開発において、近年非常に注目されている^{74,75}。このことからノビレチンは、AD 予防や重篤な病状進行の抑制のための、極めて有用な素材であることが示された。

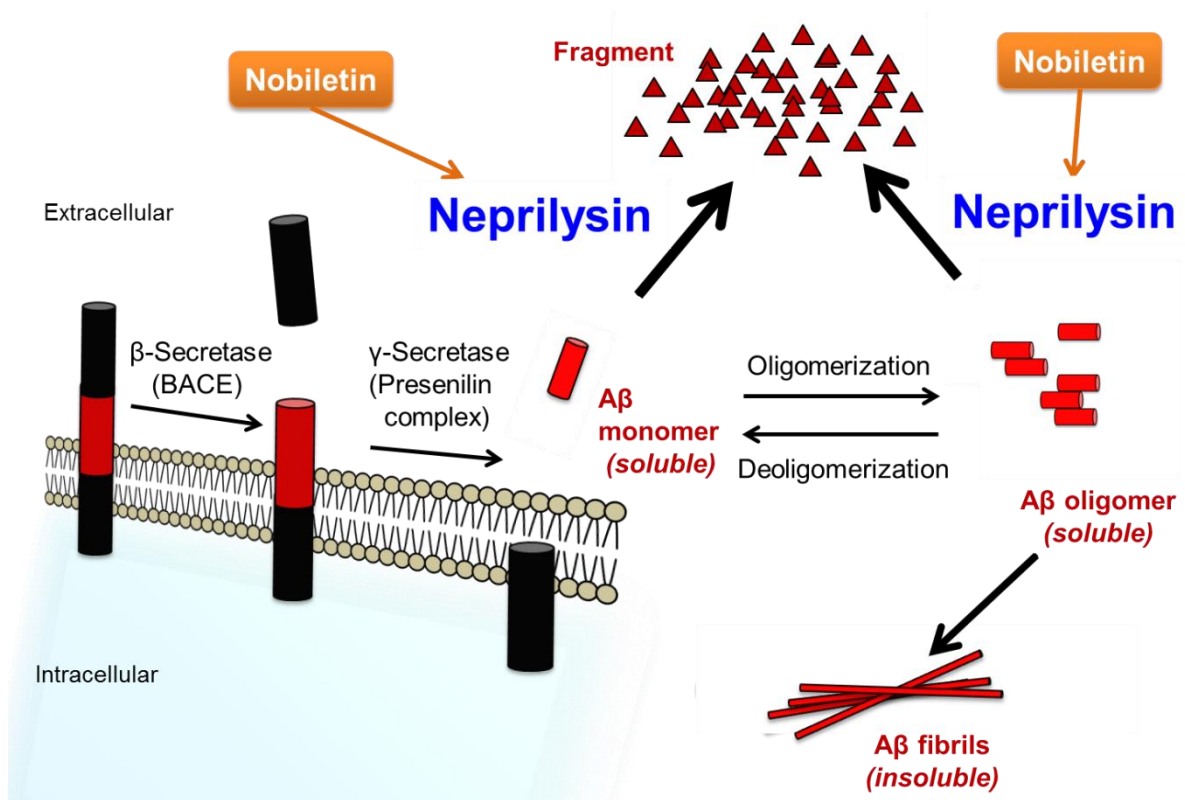


Fig. 28 Potential mechanism of action of nobiletin on A β degradation.

総括

我が国は現在超高齢社会を迎え、認知症の患者数は今後増加の一途を辿り、またそれら疾患に対する介護への負担も増大していくことが予想される。認知症の半数を占める AD の根本的な予防・治療薬の確立はいまだなされていない。これまでに、柑橘類果皮由来ポリメトキシフラボンの一種ノビレチンが極めて強力な記憶障害改善作用を持つことが、次に示す記憶障害モデル動物を用いた *in vivo* 実験で明らかとなっている。

- (1) 脳室内への A β 注入による AD モデルラット
- (2) APP-Tg AD モデルマウス
- (3) コリン作動性神経変性を伴う OBX 誘発性記憶障害モデルマウス
- (4) NMDA 受容体遮断薬誘発性記憶障害モデルマウス
- (5) 老化促進モデルマウス

さらにその作用機序として、ノビレチンが PKA/ERK/CREB 細胞内シグナル経路を活性化し CRE 依存性転写を亢進することを見いだした。しかしながらこのことは一端にすぎず、記憶障害改善作用における分子作用機序については未だ不明であった。ノビレチンが天然物由来創薬シーズや機能性食品として確立するためには、作用機構の解明とより強力なエビデンスが必須である。

本研究では、はじめに、第 1 章にてノビレチン同等もしくはそれ以上の ERK 活性能を持つノビレチン類縁体 (6-demethoxy nobiletin, tangeretin, 5-demethyl nobiletin, sinensetin および 6-demethoxy tangeretin) の Western blot 法による解析を行い評価した。その結果、6-demethoxy nobiletin が ERK 活性能を持つ新規知見を得たが、ノビレチン以上の活性は見られなかった。そこでノビレチンに焦点を絞り、次の検討を行った。

第 2 章では、ノビレチンにより記憶学習に関与する遺伝子亢進について検討した。神経分化モデルとして頻用される PC12 細胞の亜種 PC12D 細胞を用い、以下の遺伝子についてリアルタイム PCR により発現解析した。

- グルタミン酸受容体：NMDA 受容体サブユニット NR1、NR2A および NR2B 遺伝子
- コリン受容体：ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ M1 遺伝子
- アセチルコリン合成酵素：コリンアセチル基転移酵素遺伝子
- 転写因子：c-Fos 遺伝子
- CREB コアクチベーター：CREB 結合タンパク質遺伝子

その結果、上記遺伝子はノビレチンにより有意にその発現が亢進することが明らかとなった。また、先行研究において NMDA 受容体アンタゴニスト誘発性記憶障害マウスで、ノビレチンがその障害を改善することが見いだされているが、本研究結果より、ノビレチンが NMDA

受容体を増加させることが示唆された。さらに、先行研究の OBX 誘発性記憶障害マウスにおいて ChAT タンパク質の減少をノビレチンが抑制したこと、その記憶障害を改善したことから、本研究結果は、ノビレチンによりアセチルコリン受容体とアセチルコリンが増加することでコリンシグナル経路が回復することが示唆された。一方、転写に関わる因子、c-Fos と CBP の発現亢進は、記憶形成過程における大規模な遺伝子発現の変動に寄与することが考えられた。

また第 3 章では、既存薬ドネペジルとの比較として、ノビレチンとその類縁体におけるアセチルコリン分解酵素アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害作用の検討を行った。ヒト赤血球由来 AChE の阻害活性を比色定量法で解析した結果、ノビレチン、sinensetin および 6-demethoxy nobiletin に弱い AChE 阻害作用が見いだされたが、作用濃度をドネペジルと比較するとこれら化合物の活性は極めて弱く、特にノビレチンの記憶障害改善作用はこの機序を主としないことが明らかになった。

第 4 章では、AD の原因物質の一つである A β の細胞毒性と、それに対するノビレチンの作用を検討した。はじめに神経様分化 PC12 細胞を A β 添加培地で培養すると、A β 濃度依存的な細胞死が認められた。そこでノビレチンで前処理した後に A β を添加し、ノビレチン/A β 共存下で培養した結果、A β 誘発性の細胞死が抑制された。また、同様に NMDA 受容体 NR1 遺伝子の発現を指標にリアルタイム PCR で解析した結果、NR1 遺伝子発現は A β 濃度依的に減少し、それはノビレチンによって回復することが示された。このことから、A β の毒性からノビレチンが細胞を保護していることが示唆された。

そこでノビレチンが原因である A β そのものを抑制しているのではないかと考え、第 5 章ではより病態を反映した iPS 由来 AD モデル神経細胞を用いて、ノビレチンの A β に対する作用を検証した。はじめに、当細胞をノビレチン添加培地で培養し、A β 産生酵素 BACE1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で解析した結果、その発現抑制は確認されなかった。そこで A β 分解酵素であるネプリライシンの遺伝子発現を解析したところ、有意な発現亢進が認められた。そこで、抗 A β 抗体を用いて免疫細胞染色を実施した結果、ノビレチンによる細胞内 A β の減少が観察された。以上のことから、ノビレチンはネプリライシンの発現亢進を介して活性を増強させ、A β モノマーおよびオリゴマー分解を促進することが示唆された。これらデータをより実証するために、今後、細胞内および細胞外分泌 A β の定量的解析やネプリライシン酵素活性測定がさらに必要である。

本研究の結果は、ノビレチンが AD の予防または進行抑制に有効な天然物由来の新薬シーズならびに機能性食品としての可能性を示した。これらの新規知見をもとにしてさらに研究を進展することは、AD 予防ならびに進行抑制のための治療のブレイクスルーとなり、高齢者の QOL 向上につながるが大いに期待できる。

謝辞

本研究に際して、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、静岡県立大学薬学研究院 医薬生命化学教室 奥 直人教授、ならびに東北大学名誉教授、静岡県立大学薬学部客員教授、東北福祉大学感性福祉研究所特任教授 大泉 康先生に深甚なる謝意を表します。

本研究を進めるにあたり、親身なるご指導を賜りました、静岡県立大学大学院薬学研究院 医薬生命化学教室 清水 広介博士に深く感謝致します。

本論文のご高覧と、ご指導およびご鞭撻を賜りました、静岡県立大学大学院薬学研究院 生化学教室 鈴木 隆教授、静岡県立大学大学院薬学研究院 統合生理学教室 武田 厚司教授、ならびに静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究院 人類遺伝学研究室 小林 公子教授に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言とご協力を頂きました、静岡県立大学大学院薬学研究院 医薬生命化学教室 浅井 知浩准教授、小出 裕之博士、静岡県立大学薬学部名誉教授 出川 雅邦先生、東邦大学薬学部 公衆衛生学教室 根本 清光教授、静岡県立大学大学院薬学研究院 薬食研究推進センター長 山田 静雄先生、静岡県立大学大学院薬学研究院 薬物動態学教室 尾上 誠良教授、富山大学和漢医薬学総合研究所 複合薬物薬理学分野 藤原 博典博士、東京薬科大学薬学部 漢方資源応用学教室 三卷 祥浩教授、横須賀 章人博士、東北大学大学院薬学研究科 山國研究室 山國 徹准教授、昭和大学歯学部 口腔解剖学教室 瀧戸 二郎博士、そして静岡県立大学薬学部 医薬生命化学教室の諸氏に、心より感謝の意を表します。

本当にありがとうございました。

2015 年 9 月

木村 純子

参考文献

1. 朝田 隆. 都市部における認知症有病率と認知症の生活機能への対応 平成23年度～24年度 総合研究報告書. 厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業 (2013).
2. 厚生労働省 老健局高齢者支援課 認知症・虐待防止対策推進室. 認知症施策の現状. (2014).
3. 厚生労働省 老健局高齢者支援課 認知症・虐待防止対策推進室. 「認知症高齢者の日常生活自立度」Ⅱ以上の高齢者数について. (2012),
4. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **11**, 332–384 (2015).
5. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal. *J. Neurochem.* **110**, 1129–1134 (2009).
6. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
7. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of amyloid β -protein: synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006338 (2012).
8. Gouras GK, Tampellini D, Takahashi RH, Capetillo-Zarate E. Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **119**, 523–541 (2010).
9. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**, 777–781 (2006).
10. Sugimoto H, Iimura Y, Yamanishi Y, Yamatsu K. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds. *J. Med. Chem.* **38**, 4821–4829 (1995)
11. Sabbagh M, Cummings J. Progressive cholinergic decline in Alzheimer's Disease: consideration for treatment with donepezil 23 mg in patients with moderate to severe symptomatology. *BMC Neurol.* **11**, 21 (2011).
12. Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**, 1184–1190 (1983).
13. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408–414 (1982).
14. Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y. Nobiletin restoring β -amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci. Lett.* **400**, 230–234 (2006).
15. Nagase H, Omae N, Omori A, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 1330–1336 (2005).
16. Nakajima A, Aoyama Y, Nguyen TT, Shin EJ, Kim HC, Yamada S, Nakai T, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Ohizumi Y, Yamada K. Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav. Brain Res.* **250C**, 351–360 (2013).

17. Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, Omae N, Song SY, Kato C, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. *J. Pharmacol. Sci.* **105**, 122–126 (2007).
18. Nakajima A, Yamakuni T, Matsuzaki K, Nakata N, Onozuka H, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonism by activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 784–790 (2007).
19. Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 739–744 (2008).
20. Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. β -Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci. Lett.* **170**, 63–66 (1994).
21. Shin RW, Ogino K, Shimabuku A, Taki T, Nakashima H, Ishihara T, Kitamoto T. Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of A β and tau. *Acta Neuropathol.* **113**, 627–636 (2007).
22. Yin JC, Tully T. CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 264–268 (1996).
23. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci.* **33**, 230–240 (2010).
24. Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* **28**, 436–445 (2005).
25. Impey S, Mark M, Villacres EC, Poser S, Chavkin C, Storm DR. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **16**, 973–982 (1996).
26. Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y, Kasahara J, Hinohara Y, Kondo S, Mimaki Y, Sashida Y, Tank AW, Fukunaga K, Ohizumi Y. Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry* **44**, 13683–13691 (2005).
27. Al Rahim M, Nakajima A, Saigusa D, Tetsu N, Maruyama Y, Shibuya M, Yamakoshi H, Tomioka Y, Iwabuchi Y, Ohizumi Y, Yamakuni T. 4'-Demethylnobiletin, a bioactive metabolite of nobiletin enhancing PKA/ERK/CREB signaling, rescues learning impairment associated with NMDA receptor antagonism via stimulation of the ERK cascade. *Biochemistry* **48**, 7713–7721 (2009).
28. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 311–317 (2004).
29. Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD. The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J. Neurosci.* **27**, 12732–12742 (2007).
30. Ma QL, Harris-White ME, Ubeda OJ, Simmons M, Beech W, Lim GP, Teter B, Frautschy SA, Cole GM. Evidence of A β - and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J. Neurochem.* **103**, 1594–1607 (2007).

31. Furukawa Y, Okuyama S, Amakura Y, Watanabe S, Fukata T, Nakajima M, Yoshimura M, Yoshida T. Isolation and characterization of activators of ERK/MAPK from citrus plants. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1832–1845 (2012).
32. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 682–696 (2010).
33. Riedel G. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* **140**, 1–47 (2003).
34. Melik E, Babar E, Ozen E, Ozgunen T. Hypofunction of the dorsal hippocampal NMDA receptors impairs retrieval of memory to partially presented foreground context in a single-trial fear conditioning in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **16**, 241–247 (2006).
35. Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, Strekalova T, Zacher C, Layer LE, Kvello A, Reschke M, Spanagel R, Sprengel R, Wagner EF, Gass P. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J. Neurosci.* **23**, 9116–9122 (2003).
36. Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**, 209–245 (2002).
37. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* **221**, 555–563 (2011).
38. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
39. Christen-Zaech S, Kraftsik R, Pillevuit O, Kiraly M, Martins R, Khalili K, Miklossy J. Early olfactory involvement in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **30**, 20–25 (2003).
40. Hozumi S, Nakagawasai O, Tan-No K, Nijima F, Yamadera F, Murata A, Arai Y, Yasuhara H, Tadano T. Characteristics of changes in cholinergic function and impairment of learning and memory-related behavior induced by olfactory bulbectomy. *Behav. Brain Res.* **138**, 9–15 (2003).
41. Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13541–13546 (1996).
42. Wess J, Eglén RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 721–733 (2007).
43. Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **163**, 495–529 (2000).
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
45. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Dis.* **15**, 80–92 (2004).
46. Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* **3**, 238–244. (2000).

47. Klein M, Pieri I, Uhlmann F, Pfizenmaier K, Eisel U. Cloning and characterization of promoter and 5'-UTR of the NMDA receptor subunit $\epsilon 2$: evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene* **208**, 259–269 (1998).
48. Sheng M, Greenberg, ME. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**, 477–485 (1990).
49. Zimmer M, Fink TM, Franke Y, Lichter P, Spiess J. Cloning and structure of the gene encoding the human *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1). *Gene* **159**, 219–223 (1995).
50. Liu A, Zhuang Z, Hoffman PW, Bai G. Functional analysis of the rat *N*-methyl-D-aspartate receptor 2A promoter: multiple transcription starts points, positive regulation by Sp factors, and translational regulation. *J. Biol. Chem.* **278**, 26423–26434 (2003).
51. Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Nakajima A, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Yamakuni T, Ohizumi Y, Fukunaga K. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res.* **1295**, 218–229 (2009).
52. Fisher A, Pittel Z, Haring R, Bar-Ner N, Kliger-Spatz M, Natan N, Egozi I, Sonogo H, Marcovitch I, Brandeis R. M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J. Mol. Neurosci.* **20**, 349–356 (2003).
53. Peng S, Zhang Y, Li GJ, Zhang DX, Sun DP, Fang Q. The effect of sevoflurane on the expression of M1 acetylcholine receptor in the hippocampus and cognitive function of aged rats. *Mol. Cell. Biochem.* **361**, 229–233 (2012).
54. Lalli E, Lee JS, Lamas M, Tamai K, Zazopoulos E, Nantel F, Penna L, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. The nuclear response to cAMP: role of transcription factor CREM. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **351**, 201–209 (1996).
55. Chang JH, Vuppalachchi D, van Niekerk E, Trepel JB, Schanen NC, Twiss JL. PC12 cells regulate inducible cyclic AMP (cAMP) element repressor expression to differentially control cAMP response element-dependent transcription in response to nerve growth factor and cAMP. *J. Neurochem.* **99**, 1517–1530 (2006).
56. Radhakrishnan I, Pérez-Alvarado GC, Parker D, Dyson HJ, Montminy MR, Wright PE. Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* **91**, 741–752 (1997).
57. Chen G, Zou X, Watanabe H, Van Deursen JM, Shen J. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *J. Neurosci.* **30**, 13066–13077 (2010).
58. Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Xu H, Shang Y, Endoh K, Iwamoto T, Mamiya N, Okano E, Hasegawa S, Mercaldo V, Zhang Y, Maeda R, Ohta M, Josselyn SA, Zhuo M, Kida S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J. Neurosci.* **31**, 8786–8802 (2011).
59. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95 (1961).
60. Magnotti RJ, Eberly J, Quarm D, McConnell R. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clin. Chem.* **33**, 1731–1735 (1987).
61. Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN. Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* **99**, 459–496 (1976).

62. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **308**, 1403 (1976).
63. Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* **1**, 189 (1977).
64. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**, 535–539 (2002).
65. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112 (2007).
66. Chen JX, Yan SS. Role of mitochondrial amyloid- β in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **20 Suppl 2**, S569–S578 (2010).
67. Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. Amyloid β -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13217–13221 (2002).
68. Echeverria V, Ducatenzeiler A, Chen CH, Cuellar AC. Endogenous β -amyloid peptide synthesis modulates cAMP response element-regulated gene expression in PC12 cells. *Neuroscience* **135**, 1193–1202 (2005).
69. Stine WB, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. *In vitro* characterization of conditions for amyloid- β peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 11612–11622 (2003).
70. Iwata N, Higuchi M, Saido TC. Metabolism of amyloid- β peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **108**, 129–148 (2005).
71. Fujiwara H, Kimura J, Sakamoto M, Yokosuka A, Mimaki Y, Murata K, Yamaguchi K, Ohizumi Y. Nobiletin, a flavone from *Citrus depressa*, induces gene expression and increases the protein level and activity of neprilysin in SK-N-SH cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 351–355 (2014).
72. Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**, 487–96 (2013).
73. Wisniewski T, Dowjat WK, Buxbaum JD, Khorkova O, Efthimiopoulos S, Kulczycki J, Lojkowska W, Wegiel J, Wisniewski HM, Frangione B. A novel Polish presenilin-1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer's disease and leads to death as early as the age of 28 years. *Neuroreport* **9**, 217–221 (1998).
73. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Haupenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T. Neprilysin and A β clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **5**, 98 (2013).
74. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saido TC. Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci. Rep.* **3**, 1472 (2013).