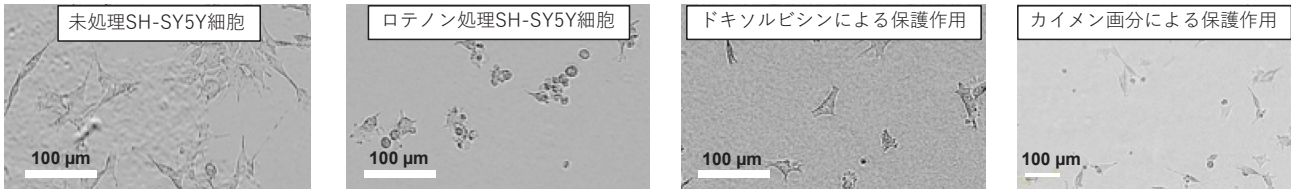
13　海洋生物からのパーキンソン病治療化合物の探索	松永　茂樹

【目的】パーキンソン病を含む神経変性疾患は、罹患者の生活の質を著しく低下させるが有効な治療法が開発されていない。パーキンソン病は、環境中の毒物への暴露がその原因の一部として疑われており、薬物常用者における薬物中の副成分である MPTP の摂取や農薬のロテノンやパラコートに対する暴露が急性パーキンソン病を誘導する。これらの毒物を用いたパーキンソン病モデルに対する神経細胞保護作用を指標として、パーキンソン病治療薬探索のための試験系を作製できる。また、カイメン等の海産無脊椎動物に含まれる天然物の医薬資源としての重要性が再認識されている。このような背景に基づき、パーキンソン病を標的として、海産無脊椎動物を対象に探索研究を行うことを目的とする。

【方法】採取が困難であることから未開拓な化合物資源といえる、深海底に生息するカイメンを探索素材とした。ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対してロテノンが示す毒性から培養細胞を保護する作用を指標として、活性物質の探索を行った。カイメンの抽出物の水溶性画分と脂溶性画分を試験に供した。細胞毒性のため細胞保護活性が検出できなかった場合は、予備分画物を行った。スクリーニングにおいて細胞保護作用を示した試料を大量に抽出し、分画の各段階で SH-SY5Y 細胞に対する細胞保護作用を調べつつ活性成分の精製を行った。

【結果】SH-SY5Y 細胞を用いて、MPTP とロテノンが示す毒性を比較したところ、ロテノンの方が再現性よく顕著な毒性を示したため、本研究ではロテノンを用いることとした。ドキソルビシン処理によりロテノンが示す毒性から細胞が保護されることを確認後、スクリーニングを実施した。284 種のカイメンについて調べた結果、41 種のカイメンの水溶性あるいは脂溶性画分が細胞保護作用を示した。これらの活性の再現性を調べるため、再試験に供すると、活性を示したものは 6 種にとどまった。そこで、これら 6 種の試料から活性成分の探索を進めた。屋久新曽根産カイメン 16-008 と大島新曽根産カイメン 17-017 の抽出物は、溶媒分画物後の ODS フラッシュクロマトグラフィーで、いずれの画分にも生物活性が検出されなかった。大島新曽根産カイメン 18-021 は、溶媒分画後のシリカゲルカラムクロマトグラフィーの後に生物活性が消失した。大島新曽根産カイメン 18-333 は抽出物の溶媒分画物後に生物活性が消失した。大島新曽根産カイメン 17-114 では、溶媒分画物後の ODS フラッシュクロマトグラフィーで活性画分が得られ、これをさらに HPLC で分画して活性画分を得た。その画分の LCMS データに基づき、類縁化合物を探索するとともに活性物質の精製を進めた。生物活性を示す画分は得られたが、構造決定を行うために十分な量の化合物を得ることができなかった。サンゴ曽根産カイメン 08-679 では溶媒分画後の、水画分、1–ブタノール画分、および n-ヘキサン画分に生物活性が認められた。水画分を ODS フラッシュクロマトグラフィーにより分画したところ、水および 75% メタノール溶出画分に活性が認められ、この 75%メタノール画分を用いて活性成分の精製を行った。

SH-SY5Y 神経芽細胞腫細胞を用いたパーキンソン病モデル



13. 海洋生物からのパーキンソン病治療化合物の探索

松永　茂樹

東京大学 大学院農学生命科学研究科 水圏生物科学専攻 水圏天然物化学研究室

Key words：海洋生物，カイメン，パーキンソン病，SH-SY5Y 細胞，ロテノン

緒　言

パーキンソン病を含む神経変性疾患は、罹患者の生活の質を著しく低下させる。有効な治療法が開発されていないにも関わらず、それら疾患の克服のための人的・経済的資源の投入は、がんや心血管系疾患と比べはるかに少ない［1］。パーキンソン病は罹患者数が非常に多く、長年にわたる疫学調査により、環境中の毒物への暴露がその原因の一部として疑われている。すなわち、薬物常用者における薬物中の副成分である MPTP の摂取や農薬のロテノンやパラコートに対する暴露が急性パーキンソン病を誘導する。これらの毒物を用いてパーキンソン病モデルを構築し、このモデルに対する神経細胞保護作用を指標とすることにより、パーキンソン病治療薬を探索することができるようになった［2］。

動植物や微生物には、生物種毎に、多様な化学構造の二次代謝産物（天然物）が生物種にしたがって含まれる。天然物は医薬品に占める割合が高く、生物活性物質の優れた供給源である。生物活性物質の探索に用いるライブラリーには、分子構造の多様性や生体に対する高い親和性が求められるが、生体内で生合成され体内を移動し、局所的に保存される等の履歴のある天然物ライブラリーはそのような特質を有する。近年、海産無脊椎動物に由来する抗がん剤（カイメン由来のエリブリンおよび群体ボヤ由来のヨンデリス）が相次いで認可され、カイメン等の海産無脊椎動物に含まれる天然物の医薬資源としての重要性が再認識されている［3，4］。

このような背景に基づき、パーキンソン病を標的として、海産無脊椎動物（カイメン）を対象に探索研究を行う。本研究では、効率よく探索研究を進めるため、以下のような工夫を講じることとする。

1．未探索資源の利用　生物資源を用いた探索研究では、対象生物種の多様性が、発見される化合物の多様性に結びつく。本研究では、浅海および深海に生息する大型種に加え、少量しか得られないため、従来は研究対象とされなかった深海底の浚渫（ドレッジ）で取得される、多種多様な小型生物種を探索源に加える。

2．有用物質発見に直結する生物活性試験の運用　本研究では、パーキンソン病の病態を反映させた培養細胞を用いる表現型試験を実施する。表現型試験は、分子標的が未知であっても実施でき、細胞全体が化合物にさらされるため、生細胞における全ての代謝系やシグナル伝達経路の存在下で化合物が示す作用を調べることができる。さらに、細胞膜透過性を示す化合物が選択的に取得される［5］。細胞膜透過性は、医薬品等への応用を考える上で重要な性質である。

3．抽出物の予備分画　抽出物中に微量の活性成分が含まれる場合、含量の高い成分による非特異的なアッセイ系の撹乱、あるいは、濃度不足のため活性成分の生物活性を検出できないことがある。これらの問題点を克服するためには、抽出物を予備分画して、妨害成分と活性物質を別々に試験できるようにすることが大切である。

4．既知化合物同定の迅速化　既知化合物を速やかに同定してその単離・同定に割く労力を削減するため、活性を示す試料の LC-MS データと化合物データベースを用いて、既知化合物を速やかに同定する。

方　法

1.　試料

当研究室所蔵のカイメンを用いた。カイメンは、南西諸島近辺のサンゴ曽根、ゴン曽根、大島新曽根あるいは屋久新曽根の水深 150～300 m の海底において、ドレッジを用いて採取し、採取後、実験に供するまで凍結保存した。

大型個体に加え小型個体も試料として用いた。

2. 生物活性試験

SH-SY5Y 細胞を 96 穴プレートに播種し 24 時間インキュベート後、検定用試料溶液を添加した。2 時間後にロテノン溶液を添加し、2 時間毎に IncuCyteZoom によるタイムラプスイメージング観察を行った。観察終了後、MTT 法により細胞の生残を調べた。

3. スクリーニング用試料の調製

カイメンの小片を切り出しエタノールで抽出した。抽出物を水とクロロホルムで二層分配に付し、それぞれの層を水溶性画分と脂溶性画分とし、試験に供した。細胞毒性のため細胞保護活性が検出できなかった試料については、水溶性画分は水と 1–ブタノール、脂溶性画分は含水 90%メタノールと n-ヘキサンによる二層分配あるいは ODS フラッシュクロマトグラフィー（含水アセトニトリルによるステップグラジエント溶出）による分画を行い試験に供した。

4. 抽出および分画

スクリーニングにおいて細胞保護作用を示した凍結カイメンを解凍後、エタノール中で摩砕し、抽出液を得た。残渣をさらにクロロホルム–メタノール（1 : 1）で抽出し、先の抽出液と合一後、減圧濃縮、溶媒分画、ODS フラッシュクロマトグラフィー、および ODS カラムを用いる HPLC により精製を行った。分画の各段階で、SH-SY5Y 細胞に対する細胞保護作用試験を行った。

結果および考察

1. 生物活性スクリーニング

まず、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞を用いて、MPTP とロテノンが示す毒性を比較したところ、ロテノンの方が再現性よく毒性を示したため、スクリーニングにはロテノンを用いることとした。そこで、ドキソルビシン処理によりロテノンが示す毒性から細胞が保護されることを確認した後に、細胞保護作用を指標としてスクリーニングを実施した。2008 年に採取した 121 種のうち 21 種、2016 年に採取した 43 種のうち 5 種、2017 年に採取した 37 種のうち 5 種、および 2018 年に採取した 83 種のうち 10 種のカイメンが、ロテノンによる毒性から SH-SY5Y 細胞を保護する作用を示した（図 1）。そこで、再現性よく細胞保護作用を示した 6 つの試料を用いて、以下に記したように活性成分の探索を行った。

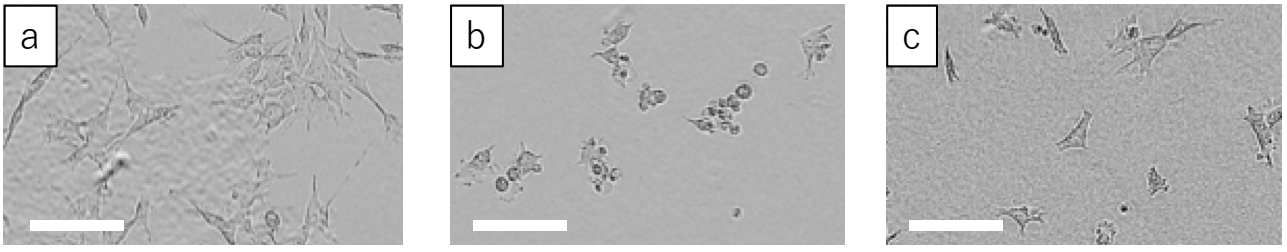


図 1. SH-SY5Y 細胞を用いた生物活性試験

a）試料未添加の SH-SY5Y 細胞

b）ロテノン処理により細胞死が誘導された SH-SY5Y 細胞

c）ドキソルビシンの投与により、ロテノンによる毒性から保護された SH-SY5Y 細胞スケールバー：100 μm

2. 4 種の未同定種カイメンの抽出物の分画

屋久新曽根産カイメン 16-008（カイメン識別番号）、いずれも大島新曽根産のカイメン 17-017、18-021、および 18-333（図 2）がスクリーニングにおいて再現性よく、細胞保護活性を示した。そこで、それぞれのカイメンの抽出物の分画を行った。

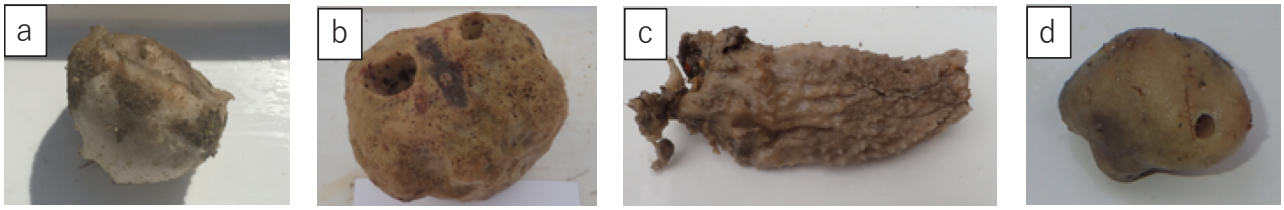


図 2. 分画に供したカイメンの写真
a）屋久新曽根産カイメン 16-008
b）大島新曽根産カイメン 17-017
c）大島新曽根産カイメン 18-021
d）大島新曽根産カイメン 18-333

カイメン 16-008 の抽出物を溶媒分画物に付したところ、1–ブタノール画分にだけ生物活性が認められたため、これを ODS フラッシュクロマトグラフィーで分画を行ったところ、いずれの画分にも生物活性が認められなかった。カイメン 17-017 の抽出物の溶媒分画物は、1–ブタノール画分およびクロロホルム画分に生物活性が認められたため、それぞれの画分を ODS フラッシュクロマトグラフィーにより分画したが、いずれの画分にも生物活性が認められなかった。カイメン 18-021 は、溶媒分画における n-ヘキサン画分に生物活性が認められたため、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画したが、いずれの画分にも生物活性は認められなかった。カイメン 18-333 はスクリーニングでは再現性よく生物活性を示したが、抽出物の溶媒分画物はいずれも生物活性を示さなかった。

これら 4 種のカイメンは、粗抽出物がいずれも再現性よく細胞保護活性を示したにもかかわらず、分画を進めると生物活性が消失した。生物活性物質が不安定なため分解により消失した、精製が進むにつれ活性物質の溶解度が低下し溶媒に不溶化した、活性物質が容器の壁に付着し溶出されなかった、混合物として生物活性を示すため精製が進むと生物活性が消失した、などの理由が考えられた。

3. 2 種の未同定種カイメンの抽出物からの活性成分の精製

大島新曽根産カイメン 17-114、およびサンゴ曽根産カイメン 08-679 の抽出物が再現性よく、細胞保護活性を示したため、それぞれのカイメンの抽出物の分画を行った（図 3）。



図 3. 分画物を精製に付したカイメンの写真およびカイメン 17-114 由来の画分が示した細胞保護作用
a）大島新曽根産カイメン 17-114
b）サンゴ曽根産カイメン 08-679
c）カイメン 17-114 由来の活性画分が示すロテノン処理 SH-SY5Y 細胞に対する保護作用
スケールバー：100 μm

カイメン17-114は溶媒分画物の1–ブタノール画分が生物活性を示し、90%メタノール画分が細胞毒性を示した。1–ブタノール画分をODSフラッシュクロマトグラフィーにより分画したところ、40%アセトニトリル画分が最も強い

活性を示したため、これをODSカラム（Cosmosil MS Ⅱ）を用いるHPLCで分画し、各分画物の生物活性を調べるとともにLCMSによる分析を行った。その結果、活性画分はESIMSにおいてm/z 357、375および405にイオンピークを与える成分が含まれていたが、これらの情報から化合物の同定は行えなかった。そこで、得られた活性画分をODSカラム（Cosmosil AR Ⅱ）を用いるHPLCで分画したが、得られた画分の収量が低く生物活性の顕著な向上は認められなかった。そこで、溶媒分画で得られた別の画分をLCMS分析に供し、LCMSで活性画分と同様のイオンを与える画分を探したところ、90%メタノール画分に該当する成分が含まれることが判明した。そこで、これをSephadex LH-20を用いるカラムクロマトグラフィーおよびODSカラムを用いるHPLCで精製し、目的のイオンを含むピークを分取した。このようにしてピークを得たが、LCMSで分析を行うと依然として不純物が多く含まれ、収量が非常に少なく構造決定を行うことはできなかった。この画分以外にも活性を示した画分（図3）があったが、この画分からも活性成分を単離することはできなかった。

カイメン08-679の抽出物を溶媒分画に付したところ、水画分、1–ブタノール画分、およびn-ヘキサン画分に細胞保護作用が認められた。そこで、水画分をODSフラッシュクロマトグラフィーにより分画したところ、水および75%メタノール溶出画分に活性が認められた。そこで、75%メタノール画分をODSカラムを用いるHPLC（グラジエント溶出）で精製したところ、低濃度のアセトニトリルで溶出する画分と高濃度のアセトニトリルで溶出する画分に生物活性が認められた。どちらの活性画分とも紫外部吸収を示さなかった。現在、この画分を含め、カイメン08-679から得られた画分から活性物質の精製を進めている。

本項では、スクリーニングにおいて最も顕著な活性を示した2種のカイメンの抽出物の分画について述べた。どちらのカイメンも、分画操作後の分画物が再現性よく細胞保護作用を示したため、適切な精製条件が設定できれば、活性物質の単離が期待できる。いずれの試料も、深海でドレッジにより採取されたもので、カイメンの試料量が少なかった。ドレッジによる試料採集では、GPCによって採集地点を再現することは可能であるが、同一試料を取得するためには、偶然と僥倖に頼らざるを得ず、同一試料を大量に取得することは、著しく困難である。ただし、高機能無人操作潜水艇（ROV）による試料の採集が行えれば、再現性よく同じカイメンを採取し、活性物質の単離・精製および構造決定が実現することが期待されるが、今回の研究期間にROVを用いた採集を行うことはできなかった。

以上、本研究により、深海ドレッジで採取した数種カイメンに、ロテノンが示す毒性から神経細胞を保護する成分が含まれることが示された。活性物質の単離・構造決定のための研究を継続して行っている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筆者の研究室の Philipp Moosmann 博士、福原和哉博士、および安田秋絵である。

文　献

1） Phillips MI. Gene, stem cell, and future therapies for orphan diseases. Clin Pharmacol Ther. 2012 Aug;92(2):182-92. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22739143 DOI: 10.1038/clpt.2012.82

2） Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. Mol Neurodegener. 2017 Jan 24;12(1):10. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28118852 DOI: 10.1186/s13024-017-0149-0

3） Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 2012 Mar 23;75(3):311-35. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22316239 DOI: 10.1021/np200906s

4） Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nat Rev Drug Discov. 2015 Feb;14(2):111-29. Epub 2015 Jan 23. PMID: 25614221 DOI: 10.1038/nrd4510

5） Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. Nat Rev Drug Discov. 2014 Aug;13(8):588-602. Epub 2014 Jul 18. PMID: 25033736 DOI: 10.1038/nrd4366