トピックス

アルツハイマー病に対するカテキン代謝物の効果とその作用メカニズム解明に繋がる代謝物の化学的合成

Effect of catechin metabolites on Alzheimer's disease and chemical synthesis of compounds to clarify their action mechanism

アルツハイマー病（AD）は，認知症を引き起こす原因のうち最も割合の高い神経変性疾患である．認知症の有病率は 65 歳以上において 13 人に 1 人といわれており，そのうち 50 ～ 70％が AD であると推測されている[1]．その初期症状として数年間で記憶障害がみられ，次第に身体的機能が低下して寝たきりとなり，最終的に死に至る．日本では 2012 年に AD での死亡者数が全死因の約 0.5％となっているが，死因のひとつである老衰に，認知症による死者が相当数含まれている可能性がある[2]．一方，老衰が死因として適切でないとされている米国では，2000 年から 2008 年の間に AD による死者数が 66％も増加し全死因の 6 位となり，今後も増加する可能性が予想されている．また，AD は医療費のみでなく，介護する家族に様々な経済的負担を負わせている[3]．このように AD は，私たちの健康と生活に大きな被害をもたらしているにも拘らず，根本的な治療方法は未だ確立されていない．

AD 患者の脳神経組織の特徴として，タウ・タンパク質の過剰なリン酸化及び凝集による神経原線維変化（neurofibrillary tangles：NFTs）と，アミロイドβ（Aβ）の凝集による老人斑がある[4]．Aβはアミロイド前駆タンパク（APP）がβ- 及びγ- セクレターゼにより分解されて生成するタンパク質である．これが脳内に蓄積することで凝集体であるＡβオリゴマーを形成し[5]，さらに凝集すると老人斑となる．その神経細胞毒性が神経細胞にダメージを与え，細胞死を引き起こすと考えられている．一方 Aβオリゴマーは，タウ・タンパク質のリン酸化を調節するプロテインキナーゼ（ERK1/2）とホスファターゼに作用してタウ・タンパク質のリン酸化を促進し，リン酸化されたタウ・タンパク質が凝集することで NFTs となる．これが老人斑と同様に神経神胞死を引き起こす原因となっていることが予想されている（図 1）[6) 7)]．

これに対して，ポリフェノールの一種であるカテキンの代謝物が，AD の原因物質の生成を阻害することが報告されている．しかし，詳細な研究が行われてい

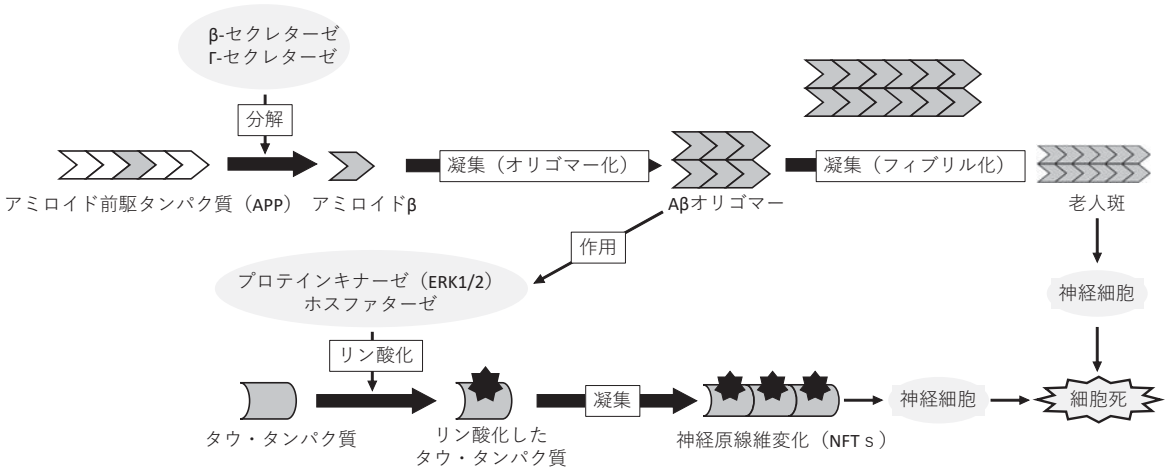

図 1　予想されている AD による神経細胞死のメカニズム

ないため，その作用メカニズムの全容は明らかとなっていない．

ポリフェノールとは植物の二次代謝物であり，分子内に複数のフェノール性ヒドロキシ基をもつ化合物の総称のことである[8]．また，環構造やフェノール性ヒドロキシ基が結合する位置と数の違いより，フラボノイド，単純フェノール，縮合型タンニンなどに分類される．このうち，カテキンはフラボノイドの一種であり，A ～ C 環から構成される特徴的な化学構造をもち，機能性研究のターゲットとなっている（図 2）．カテキンは，緑茶やカカオに豊富に含まれており[9]，摂取すると腸管上皮細胞に取り込まれ，小腸上皮や肝臓で第Ⅰ相反応が行われた後，第Ⅱ相反応により，グルクロン酸転移酵素によるグルクロン酸抱合，硫酸転移酵素による硫酸抱合，カテコール-*O*-メチル転移酵素によるメチル化などの代謝を受け，循環血流中に入るため，未変化体はほとんど血液中には存在しない[10)11)]．

2008 年に Ono らは，ブドウ由来のポリフェノール抽出物（GSPE；カテキンやその重合物であるプロシアニジン主成分）が，*in vitro* で Aβ のオリゴマー化とフィブリル化を防ぐ可能性があることを報告した[12]．また，Wang らは，AD のマウスモデルである Tg2576 マウスに GSPE を経口投与すると，脳内の Aβ オリゴマーを減少させ，認知機能の低下を大幅に軽減させる可能性を示唆した[13]．さらに，彼らは GSPE がタウ・タンパク質の凝集を阻害し，既に凝集しているタウ・タンパク質を解離させる作用もあることを示した[14]．加えて，AD の TMHT マウスモデルを GSPE で処理した結果，ERK 1/2 によりリン酸化されるタウ・タンパク質の Thr181 及び Ser396/400/404 でのリン酸化の低下と同時に，脳における不溶性タウ・タンパク質の蓄積を有意に減少させることを発見した[6]．彼らは，そのうちの（+）- カテキン（1），（−）- エピカテキン（2）の血漿中に存在する代謝物が，（+）- カテキン-5-*O*-β-グルクロニド（7），（+）-3'-*O*-メチル-カテキン-5-*O*-β-グルクロニド（8），（−）- エピカテキン-5-*O*-β-グルクロニド（10），及び（−）-3'-*O*-メチル-エピカテキン-5-*O*-β-グルクロニド（11）であることを特定した（図3）．また，Natsume らは，尿中に存在する 2 の主な代謝物が（−）-3'-*O*-メチル-エピカテキン（5），（−）-エピカテキン-7-*O*-β-グルクロニド，及び（−）-3'-*O*-メチル-エピカテキン-7-*O*-β-グルクロニドであることを報告した．これらの結果は，1 と 2 の主な代謝物がメチル化及び / またはグルクロン酸抱合されたものであると裏付けた[15)-17)]．

カテキン代謝物の構造の特徴として，抗酸化能においてはグルクロン酸抱合の位置による還元電位の違いから，活性の強度が変化することが報告されている[18]．しかし，前述した Aβ のオリゴマー化とフィブリル化，あるいはタウ・タンパク質の凝集に対する効果についての生化学的及び薬理学的特性は報告されていない．そこで Docampo-Palacios らは，それらの特性を解明するために，（+）-カテキンメチル化抱合体 3，4，（−）-エピカテキンメチル化抱合体 5，6，（+）-カテキン及び（−）-エピカテキングルクロン酸抱合体とそれらがメチル化された抱合体 7，10，11，12，及び合成方法が確立されていない（+）-カテキンメチル化グルクロン酸抱合体 8，9 の合成研究を行った[20]．

メチル化抱合体の合成においては，González-Manzano らによって報告された方法を応用して[19]，1 または 2 をヨウ化メチルとアセトン中で反応させ，メチル化抱合体である 3-6 を得た（図 2）[20]．これらを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でモニターした結果，4' 位が優先的にメチル化されていることが明らかとなった．さらに，HPLC 分析によって，（+）-3'-*O*-メチル-カテキン 3 と（+）-4'-*O*-メチル-カテキン 4 の比率は 3：7 であり，（−）-3'-*O*-メチル-エピカテキン 5 と（−）-4'-*O*-メチル-エピカテキン 6 の比率は 4：6 であることが算出された．これらメチル基の位置は，NMR の HMBC

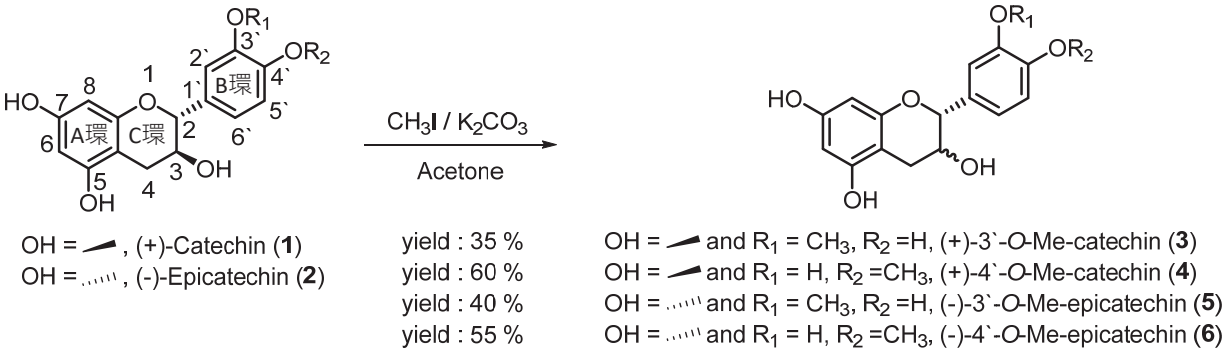

図 2　メチル化抱合体の合成方法

スペクトルにより帰属され，他のメチル化抱合体の形成は検出されなかったことから，この反応条件下でのメチル化の優先部位が B 環であることが示された[20]．

グルクロン酸及び，メチル化グルクロン酸抱合体の合成については，それらの出発原料となる 1 と 2 は共に pH 5 以下では重合反応が，pH 9 以上では C 環が開きエピメリ化などの副反応が起こってしまう問題があった．そこで，pH の変化による副反応を防ぐため，ヒドロキシ基を *tert*-ブチルジメチルシリル（TBS）基により保護した．TBS 基はヒドロキシ基に容易に導入することができ，さまざまな反応条件下で安定している上に，穏やかな条件下で選択的に脱保護することができる．目的物の合成は図 3 に示す（a）-（e）の 5 ステップで行った．（a）1 及び 2 と過剰の TBSCl を反応させ，ヒドロキシ基を TBS 基で保護した．（b）TFA を用いて選択的に 5 位の TBS 基を脱保護し，グルクロン酸抱合体を形成するためのヒドロキシ基のみを無保護とした．（c）トリクロロアセトアミドイル-α-D-グルクロン酸メチルを糖供与体として，抱合体 25-30 とした．これらは，精製せずに次の反応へ進んだ．（d）メチルエステル基のアルカリ加水分解，及び（e）TBAF による TBS 基の脱保護により 7-12 を得ることに成功した（図 3）[20]．

合成したこれらの化合物は，カテキン代謝物が示す AD 原因物質の生成に対する阻害作用を解明するための研究に役立てることができる．

一方最近，カテキン及びその重合物の摂取刺激が，視床下部の神経活動を亢進させること[21]，また海馬に

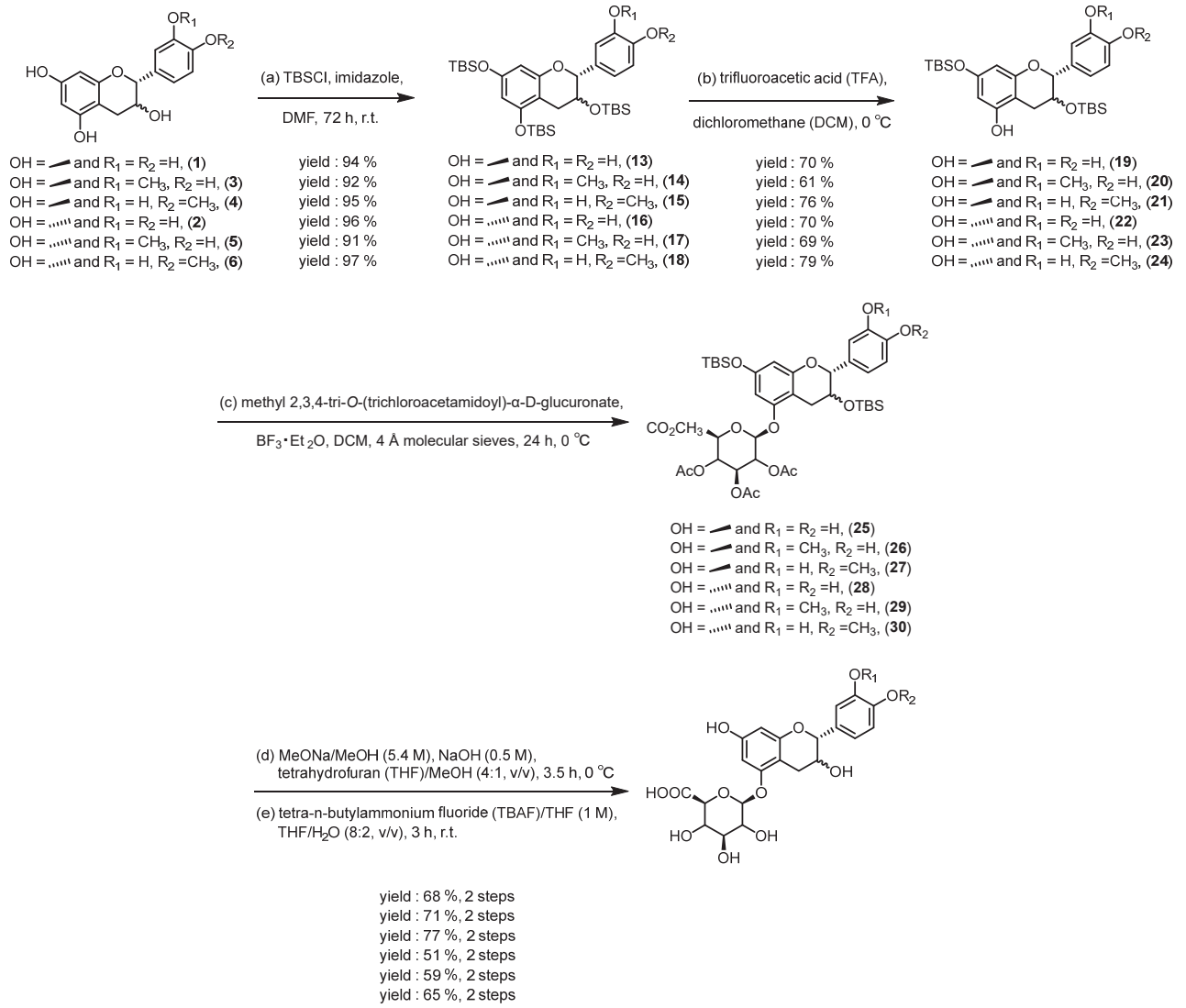

図 3　グルクロン酸及びメチル化グルクロン酸抱合体の合成方法

おける生体神経生成を促すことも報告されている[22]．カテキン類の脳への作用の解明には，代謝物の合成を含む様々なアプローチが必要であり，その全容が解明されることで新たな AD 治療薬の開発へ応用できる可能性がある．

Key words :Alzheimer's disease, flavonoid metabolites, chemical synthesis, mechyl, glucuronide

Department of Bioscience and Engineering, College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology
Shouei Hanashiro, Naomi Osakabe, Yoshitomo Suhara
芝浦工業大学システム理工学部生命科学科
花城　翔詠，越阪部　奈緒美，須原　義智

利益相反自己申告：申告すべきものなし

（2021.12.20 受付）

文　献

1）長濱康弘（2011）アルツハイマー病，レビー小体型認知症の高次脳機能障害．高次脳機能研究 **31**，250-260
2）奥町恭代，山下大輔，肥後智子，高田俊宏（2015）一般市中病院で死亡した高度認知症高齢者の病態および死亡時病名の検討．日老医誌 **52**，354-358
3）Tarawneh R, Holtzman DM (2012) The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006148
4）Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis : a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555
5）服部尚樹，北川香織，中山靖久，稲垣千代（2008）アミロイドβタンパクの神経毒性機構．日本理誌 **131**，326-332
6）Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM (2010) Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* **22**, 653-661
7）Bloom GS (2014) Amyloid-β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* **71**, 505-508
8）寺尾純二，芦田均（2006）機能性ポリフェノール．化学と生物 **44**，688-698
9）海野けい子（2020）カテキン 緑茶カテキンが脳の老化を予防する．化学と生物 **58**，621-627
10）室田佳恵子（2020）食品由来フラボノイドの生体利用性：代謝による構造変化と機能性発現 フラボノイドの吸収代謝性と機能性の関係．化学と生物 **58**，302-308
11）越阪部奈緒美（2016）ポリフェノールパラドックス．化学と生物 **54**，726-731
12）Ono K, Condron MM, Ho L, Wang J, Zhao W, Pasinetti GM, Teplow DB (2008) Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid β-protein self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem* **283**, 32176-32187
13）Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, Humala N, Teplow DB, Pasinetti GM (2008) Grape-derived polyphenolics prevent Abeta oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 6388-6392
14）Ho L, Yemul S, Wang J, Pasinetti GM (2009) Grape seed polyphenolic extract as a potential novel therapeutic agent in tauopathies. *J Alzheimer's Dis* **16**, 433-439
15）Wang J, Ferruzzi MG, Lap Ho L, Blount J, Janle EM, Gong B, Pan Y, Gowda GA, Raftery D, Arrieta-Cruz I, Sharma V, Cooper B, Lobo J, Simon JE, Zhang C, Cheng A, Qian X, Ono K, Teplow DB, Pavlides C, Dixon RA, Pasinetti GM (2012) Brain-targeted proanthocyanidin metabolites for Alzheimer's disease treatment. *J Neurosci* **32**, 5144-5150
16）Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J (2003) Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med* **34**, 840-849
17）Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J (2005) Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of Perilla frutescens extract in humans. *Eur J Nutr* **44**, 1-9
18）Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* **458**, 224-230
19）González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C, Dueñas M (2009) Preparation and characterization of catechin sulfates, glucuronides, and methylethers with metabolic interest. *J Agric Food Chem* **57**, 1231-1238
20）Docampo-Palacios ML, Alvarez-Hernández A, de Fátima Â, Lião LM, Pasinetti GM, Dixon RA (2020) Efficient Chemical Synthesis of (Epi)catechin Glucuronides: Brain-Targeted Metabolites for Treatment of Alzheimer' s Disease and Other Neurological Disorders. *ACS Omega* **5**, 30095-30110
21）Fujii Y, Suzuki K, Hasegawa Y, Nanba F, Toda T, Adachi T, Taira S, Osakabe N (2018) Single oral administration of flavan 3-ols induces stress responses monitored with stress hormone elevations in the plasma and paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* **682**, 106-111
22）Fujii Y, Sakata J, Sato F, Onishi K, Yamato Y, Sakata K, Taira S, Sato H, Osakabe N (2021) Impact of short-term oral dose of cinnamtannin A2, an (-)-epicatechin tetramer, on spatial memory and adult hippocampal neurogenesis in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **585**, 1-7