

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-210738

(P2016-210738A)

(43) 公開日 平成28年12月15日(2016.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/352 (2006.01)	A 6 1 K 31/352	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-96689 (P2015-96689)  
 (22) 出願日 平成27年5月11日 (2015.5.11)

(71) 出願人 000125370  
 学校法人東京理科大学  
 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地  
 (74) 代理人 100079049  
 弁理士 中島 淳  
 (74) 代理人 100084995  
 弁理士 加藤 和詳  
 (74) 代理人 100099025  
 弁理士 福田 浩志  
 (72) 発明者 篠田 陽  
 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内  
 (72) 発明者 紙透 伸治  
 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内

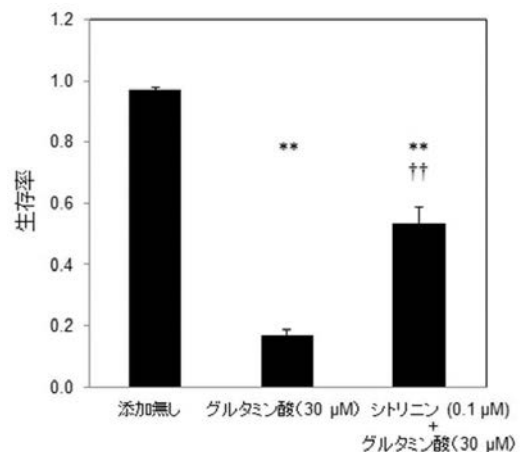
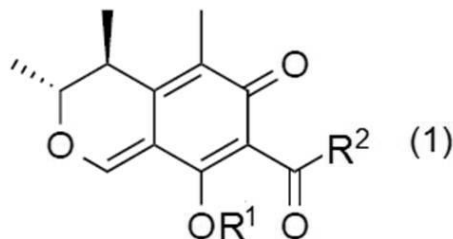
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 中枢神経細胞保護剤、及び中枢神経変性疾患の予防又は治療剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 中枢神経細胞保護剤、及び中枢神経変性疾患の予防又は治療剤の提供。

【解決手段】 式(1)で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれらのプロドラッグ。



(R<sup>1</sup> はH、アルキル基、アラルキル基等；R<sup>2</sup> は - O R<sup>4</sup> 又は - N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup>；R<sup>4</sup> ~ R<sup>6</sup> は各々独立に、H、アルキル基、又はアリール基；R<sup>5</sup> 及びR<sup>6</sup> がアルキル基である場合、R<sup>5</sup> とR<sup>6</sup> とが結合して環構造を形成していてもよい)

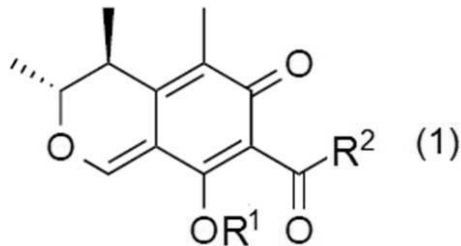
【選択図】 図2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれらのプロドラッグを有効成分として含有する、中枢神経細胞保護剤。

## 【化 1】



10

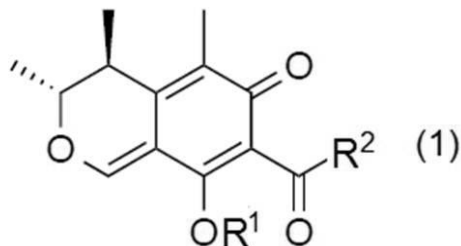
(式中、 $R^1$  は、水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は  $-Si(R^3)_3$  を示し、 $R^3$  はそれぞれ独立に、アルキル基又はアリール基を示す。 $R^2$  は、 $-OR^4$  又は  $-NR^5R^6$  を示し、 $R^4$ 、 $R^5$ 、及び  $R^6$  はそれぞれ独立に、水素原子、アルキル基、又はアリール基を示す。 $R^5$  及び  $R^6$  がアルキル基である場合、 $R^5$  と  $R^6$  とが結合して環構造を形成していてもよい。)

20

## 【請求項 2】

下記式(1)で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれらのプロドラッグを有効成分として含有する、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤。

## 【化 2】



30

(式中、 $R^1$  は、水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は  $-Si(R^3)_3$  を示し、 $R^3$  はそれぞれ独立に、アルキル基又はアリール基を示す。 $R^2$  は、 $-OR^4$  又は  $-NR^5R^6$  を示し、 $R^4$ 、 $R^5$ 、及び  $R^6$  はそれぞれ独立に、水素原子、アルキル基、又はアリール基を示す。 $R^5$  及び  $R^6$  がアルキル基である場合、 $R^5$  と  $R^6$  とが結合して環構造を形成していてもよい。)

40

## 【請求項 3】

前記中枢神経変性疾患は、グルタミン酸興奮毒性が関与する疾患である、請求項 2 に記載の中枢神経変性疾患の予防又は治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、中枢神経細胞保護剤、及び中枢神経変性疾患の予防又は治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

グルタミン酸は、中枢神経系における興奮性神経伝達物質の 1 つであり、興奮性シナプス後電位、長期増強等の現象に関与する。他方、グルタミン酸は、内因性興奮毒としても

50

作用し、過剰に遊離されたグルタミン酸が神経細胞死を誘発することが知られている。グルタミン酸興奮毒性は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の中樞神経変性疾患の危険因子の1つとしても注目されている（例えば、非特許文献1～6参照）。

【0003】

グルタミン酸による培養神経細胞の細胞死は、グルタミン酸受容体アンタゴニストの添加により減少する。このことは、グルタミン酸受容体及びその下流の機構が活性化することによってグルタミン酸興奮毒性が引き起こされることを示唆している。したがって、グルタミン酸受容体アンタゴニストは、グルタミン酸興奮毒性が関与する中樞神経変性疾患の治療剤の候補化合物となり得る。

10

【0004】

しかし、グルタミン酸受容体アンタゴニストは、ヒトにおいて精神異常が発現するという報告や齧歯類において異常な自発運動活性を引き起こすという報告があり、臨床応用はそれほど進んでいない。このため、グルタミン酸興奮毒性に対して保護作用を示す新たな中樞神経保護剤の開発が望まれていた。

【0005】

一方、シトリニン（citrinin）は、ペニシリウム（*Penicillium*）属菌、アスペルギルス（*Aspergillus*）属菌、モナスカス（*Monascus*）属菌等が産生するマイコトキシンである。シトリニンは、高濃度（例えば、100 μM程度）の場合に毒性を示すが、低濃度の場合の薬理作用については解明されていない点が多い。これまで、シトリニン又はその誘導体の薬理作用としては、アルドースレダクターゼに対する阻害活性が知られている（例えば、特許文献1参照）。しかし、シトリニン又はその誘導体が中樞神経細胞に対する保護作用を示すことは知られていなかった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平4-9332号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Van Den Bosch et al., *Biochimica et biophysica acta*, 1762, 1068-1082 (2006)

30

【非特許文献2】Shaw, C.E. et al., *Current neurology and neuroscience reports*, 1, 69-76 (2001)

【非特許文献3】Schubert, D. et al., *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, 7455-7462 (2001)

【非特許文献4】Dong, X.X. et al., *Acta pharmacologica Sinica*, 30, 379-387 (2009)

【非特許文献5】Blandini, F. et al., *Molecular neurobiology*, 12, 73-94 (1996)

【非特許文献6】Estrada Sanchez, A.M. et al., *Archives of medical research*, 39, 265-276 (2008)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明は、シトリニン又はその誘導体を有効成分とする新規な中樞神経細胞保護剤、及び中樞神経変性疾患の予防又は治療剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

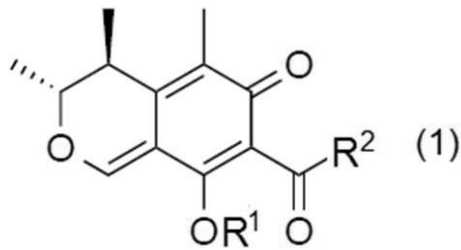
【0009】

上記課題を解決するための具体的な手段には、以下の実施態様が含まれる。

< 1 > 下記式(1)で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれらのプロドラッグを有効成分として含有する、中樞神経細胞保護剤。

50

## 【化 1】

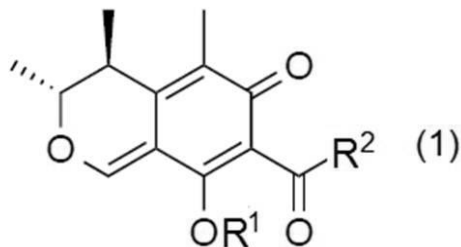


(式中、 $R^1$  は、水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルキルカルボニル基、アリー  
ルカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は  $-Si(R^3)_3$   
を示し、 $R^3$  はそれぞれ独立に、アルキル基又はアリール基を示す。 $R^2$  は、 $-OR^4$  又  
は  $-NR^5R^6$  を示し、 $R^4$ 、 $R^5$ 、及び  $R^6$  はそれぞれ独立に、水素原子、アルキル基  
、又はアリール基を示す。 $R^5$  及び  $R^6$  がアルキル基である場合、 $R^5$  と  $R^6$  とが結合し  
て環構造を形成していてもよい。)

## 【0010】

< 2 > 下記式 (1) で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれ  
らのプロドラッグを有効成分として含有する、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤。

## 【化 2】



(式中、 $R^1$  は、水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルキルカルボニル基、アリー  
ルカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は  $-Si(R^3)_3$   
を示し、 $R^3$  はそれぞれ独立に、アルキル基又はアリール基を示す。 $R^2$  は、 $-OR^4$  又  
は  $-NR^5R^6$  を示し、 $R^4$ 、 $R^5$ 、及び  $R^6$  はそれぞれ独立に、水素原子、アルキル基  
、又はアリール基を示す。 $R^5$  及び  $R^6$  がアルキル基である場合、 $R^5$  と  $R^6$  とが結合し  
て環構造を形成していてもよい。)

## 【0011】

< 3 > 上記中枢神経変性疾患は、グルタミン酸興奮毒性が関与する疾患である、< 2 >  
に記載の中枢神経変性疾患の予防又は治療剤。

## 【発明の効果】

## 【0012】

本発明によれば、シトリニン又はその誘導体を有効成分とする新規な中枢神経細胞保護  
剤、及び中枢神経変性疾患の予防又は治療剤を提供することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図 1】実施例 1 (MTT アッセイ) におけるシトリニンの中枢神経細胞に対する保護作  
用を示す図である。

【図 2】実施例 2 (核染色アッセイ) におけるシトリニンの中枢神経細胞に対する保護作  
用を示す図である。

【図 3】実施例 3 (MTT アッセイ) におけるシトリニンの中枢神経細胞に対する長期毒  
性を示す図である。

【図4】実施例4におけるシトリンの興奮性シナプスの数（同図（A））及び抑制性シナプスの数（同図（B））に対する影響を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を適用した中枢神経細胞保護剤、及び中枢神経変性疾患の予防又は治療剤の実施形態の一例について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

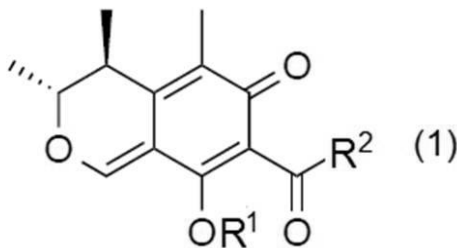
【0015】

< 中枢神経細胞保護剤 >

本実施形態の中枢神経細胞保護剤は、下記式（1）で表される化合物若しくはその薬理的に許容される塩、又はそれらのプロドラッグ（以下、これらを纏めて「特定化合物」と略記することがある。）を有効成分として含有する。

【0016】

【化3】



【0017】

上記式（1）中、 $R^1$  は、水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、又は  $-Si(R^3)_3$  を示し、 $R^3$  はそれぞれ独立に、アルキル基又はアリール基を示す。

【0018】

$R^1$  がアルキル基である場合、アルキル基の炭素数は1～20が好ましい。アルキル基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。また、アルキル基は、環状アルキル部分が含まれていてもよい。アルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基、シクロペンチルメチル基、シクロヘキシルメチル基等が挙げられる。

【0019】

$R^1$  がアラルキル基である場合、アラルキル基のアリール部分としては、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。また、アラルキル基のアルキル部分の炭素数は1～10が好ましい。アルキル部分は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。アラルキル基の具体例としては、ベンジル基、ジフェニルメチル基、トリチル基、フェネチル基、ナフチルメチル基等が挙げられる。

【0020】

$R^1$  がアルキルカルボニル基である場合、アルキルカルボニル基のアルキル部分の炭素数は1～15が好ましい。アルキル部分は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。アルキルカルボニル基の具体例としては、アセチル基、プロパノイル基、ブタノイル基、2-メチルプロパノイル基、ピバロイル基等が挙げられる。

【0021】

$R^1$  がアリールカルボニル基である場合、具体例としては、ベンゾイル基、ナフトイル基等が挙げられる。

【0022】

$R^1$  がアルキルスルホニル基である場合、アルキルスルホニル基のアルキル部分の炭素

10

20

30

40

50

数は 1 ~ 10 が好ましい。アルキル部分は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。アルキルスルホニル基の具体例としては、メチルスルホニル基、エチルスルホニル基、n - プロピルスルホニル基、イソプロピルスルホニル基等が挙げられる。

【0023】

R<sup>1</sup> がアリールスルホニル基である場合、具体例としては、ベンゼンスルホニル基、ナフタレンスルホニル基等が挙げられる。

【0024】

R<sup>1</sup> が - Si ( R<sup>3</sup> )<sub>3</sub> で表される基である場合、R<sup>3</sup> におけるアルキル基の炭素数は 1 ~ 6 が好ましい。アルキル基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよい。また、R<sup>3</sup> におけるアリール基としては、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。 - Si ( R<sup>3</sup> )<sub>3</sub> で表される基の具体例としては、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基、tert - ブチルジメチルシリル基、トリーソプロピルシリル基、tert - ブチルジフェニルシリル基等が挙げられる。

10

【0025】

R<sup>1</sup> に含まれるアルキル部分又はアリール部分は、置換基を有していてもよい。

例えば、R<sup>1</sup> に含まれるアルキル部分は、置換基として、ハロゲン原子（フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子等）を有していてもよい。

また、R<sup>1</sup> におけるアラルキル基のアリール部分は、置換基として、炭素数 1 ~ 4 のアルキル基、アリール基（フェニル基、ナフチル基等）、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、- COOR<sup>7</sup>、- OR<sup>7</sup>、- NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>、又は - NR<sup>10</sup>COR<sup>11</sup> を有していてもよい。R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup>、及び R<sup>11</sup> はそれぞれ独立に、炭素数 1 ~ 10 のアルキル基又はアリール基（フェニル基、ナフチル基等）を示す。

20

また、R<sup>1</sup> におけるアリールカルボニル基及びアリールスルホニル基は、置換基として、炭素数 1 ~ 5 のアルキル基、ニトロ基、又はトリフルオロメチル基を有していてもよい。

【0026】

上記式 ( 1 ) 中、R<sup>2</sup> は、- OR<sup>4</sup> 又は - NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> を示し、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、及び R<sup>6</sup> はそれぞれ独立に、水素原子、アルキル基、又はアリール基を示す。R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> がアルキル基である場合、R<sup>5</sup> と R<sup>6</sup> とが結合して環構造を形成していてもよい。

【0027】

R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、又は R<sup>6</sup> がアルキル基である場合、アルキル基の炭素数は 1 ~ 18 が好ましい。アルキル基は、直鎖状、分岐鎖状、及び環状のいずれであってもよい。アルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、n - プロピル基、イソプロピル基、n - ブチル基、イソブチル基、tert - ブチル基、n - ペンチル基、イソペンチル基、シクロペンチル基、n - ヘキシル基、イソヘキシル基、シクロヘキシル基等が挙げられる。R<sup>5</sup> 及び R<sup>6</sup> がアルキル基である場合、R<sup>5</sup> と R<sup>6</sup> とが結合して形成される基としては、ピペリジノ基等が挙げられる。また、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、又は R<sup>6</sup> がアリール基である場合、具体例としては、フェニル基、ナフチル基等が挙げられる。

30

【0028】

R<sup>2</sup> に含まれるアルキル基又はアリール基は、置換基として、ハロゲン原子を有していてもよい。

40

【0029】

上記式 ( 1 ) で表される化合物は、薬理的に許容される塩の形態であってもよい。例えば、上記式 ( 1 ) で表される化合物が酸性官能基を有する場合には、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩などの形態であってもよい。また、上記式 ( 1 ) で表される化合物が塩基性官能基を有する場合には、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等の無機酸との塩の形態であってもよく、酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p - トルエンズルホン酸等の有機酸との塩の形態であってもよい。

50

なお、「薬理的に許容される塩」には、水、エタノール等の薬理的に許容される溶媒との溶媒和物も含まれる。

【0030】

上記式(1)で表される化合物又はその薬理的に許容される塩は、プロドラッグの形態であってもよい。本明細書における「プロドラッグ」とは、生体内において上記式(1)で表される化合物又はその薬理的に許容される塩に変換される化合物を意味する。

上記式(1)で表される化合物がヒドロキシ基を有する場合、プロドラッグとしては、ヒドロキシ基がアシル化、アルキル化、リン酸化、又はホウ酸化された化合物が挙げられる。

また、上記式(1)で表される化合物がカルボキシ基を有する場合、プロドラッグとしては、カルボキシ基がエステル化又はアミド化された化合物が挙げられる。

また、上記式(1)で表される化合物がアミノ基を有する場合、プロドラッグとしては、アミノ基がアシル化、アルキル化、又はリン酸化された化合物が挙げられる。

【0031】

上記式(1)で表される化合物のうち、 $R^1$ が水素原子であり、 $R^2$ がヒドロキシ基である化合物(シトリン)は、市販品を入手することができる。また、シトリン以外の上記特定化合物は、シトリンを出発原料とし、常法に従ってエーテル化、エステル化、酸アミド化等の工程を経ることによって製造することができる。

【0032】

上記式(1)で表される化合物又はその薬理的に許容される塩は、中枢神経細胞に対する保護作用を示し、特に、グルタミン酸興奮毒性に基づく神経細胞死を抑制することができる。このため、上記特定化合物を用いることにより、中枢神経細胞保護剤を製造することができる。中枢神経細胞保護剤は、医薬用途に用いるものであってもよく、医薬以外の用途(研究用途等)に用いるものであってもよい。

【0033】

中枢神経細胞保護剤は、使用態様に応じて、上記特定化合物以外の成分を含有してもよい。例えば、中枢神経細胞保護剤は、製剤素材として慣用の有機又は無機の担体を含有してもよい。この担体は、固形製剤においては、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等として、液状製剤においては、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤等として配合される。また、中枢神経細胞保護剤は、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を含有してもよい。また、血液脳関門の通過性を向上させるため、中枢神経細胞保護剤は、上記特定化合物がリポソーム等に内包されたものであってもよい。

【0034】

中枢神経細胞保護剤を医薬用途に用いる場合、中枢神経細胞保護剤の剤形は特に制限されない。中枢神経細胞保護剤の剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、フィルム剤等の経口剤；注射剤、外用剤、坐剤、ペレット、経鼻剤、経肺剤(吸入剤)、点眼剤等の非経口剤；などが挙げられる。

【0035】

中枢神経細胞保護剤を医薬用途に用いる場合、中枢神経細胞保護剤の投与量は、投与対象、投与経路、対象疾患、症状等に応じて適宜決定される。

【0036】

< 中枢神経変性疾患の予防又は治療剤 >

本実施形態の中枢神経変性疾患の予防又は治療剤は、上記特定化合物を有効成分として含有する。上記特定化合物は中枢神経細胞保護剤の場合と同様であるため、詳細な説明を省略する。

【0037】

前述したように、上記式(1)で表される化合物又はその薬理的に許容される塩は、中枢神経細胞に対する保護作用を示し、特に、グルタミン酸興奮毒性に基づく神経細胞死を抑制することができる。このため、上記特定化合物を用いることにより、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤を製造することができる。

10

20

30

40

50

なお、「予防」には、中枢神経変性疾患の発症を防ぐことのほか、発症の時期を遅らせることも含まれる。また、「治療」には、中枢神経変性疾患に起因する症状を消失又は軽減させることのほか、症状の進行の度合いを抑制することも含まれる。

【0038】

中枢神経変性疾患としては、グルタミン酸興奮毒性が関与する疾患が好ましく、具体的には、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脳血管障害等の虚血神経障害、小脳失調、エイズ（AIDS）脳症などが挙げられる。

【0039】

中枢神経変性疾患の予防又は治療剤は、上記特定化合物以外の成分を含有していてもよい。例えば、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤は、製剤素材として慣用の有機又は無機の担体を含有していてもよい。この担体は、固形製剤においては、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤等として、液状製剤においては、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤等として配合される。また、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤は、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の製剤添加物を含有していてもよい。また、血液脳関門の通過性を向上させるため、中枢神経変性疾患の予防又は治療剤は、上記特定化合物がリポソーム等に内包されたものであってもよい。

10

【0040】

中枢神経変性疾患の予防又は治療剤の剤形は特に制限されない。中枢神経変性疾患の予防又は治療剤の剤形としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、トローチ剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤、フィルム剤等の経口剤；注射剤、外用剤、坐剤、ペレット、経鼻剤、経肺剤（吸入剤）、点眼剤等の非経口剤；などが挙げられる。

20

【0041】

中枢神経変性疾患の予防又は治療剤の投与量は、投与対象、投与経路、対象疾患、症状等に応じて適宜決定される。

【0042】

中枢神経変性疾患の予防又は治療剤を投与対象者に投与することにより、中枢神経変性疾患の予防又は治療方法が提供される。すなわち、上記特定化合物を有効成分として含む医薬組成物を投与することを含む中枢神経変性疾患の予防又は治療方法が提供される。

30

【実施例】

【0043】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0044】

[実施例1：シトリンの中枢神経細胞に対する保護作用の確認（MTTアッセイ）]

胎生18日齢のウイスター系ラットに麻酔を施した後、頭部を切断して脳を取り出し、取り出した脳を氷冷したHEPES（2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸）緩衝塩溶液（Life Technologies Japan製）中に浸漬した。皮質組織をパイン（Sigma-Aldrich Japan製）で処理し、組織を細分化した後、ポリエチレンイミン（Sigma-Aldrich Japan製）でコートされた96ウェルプレートに細胞を播種した。そして、37℃、5体積%CO<sub>2</sub>の条件下、B-27サプリメント（Life Technologies Japan製）及びGlutaMAX（Life Technologies Japan製）を添加したNeurobasal培地（Life Technologies Japan製）中で培養した。

40

【0045】

培養開始後15日目に、シトリンをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解したシトリン溶液を、シトリンの終濃度が0.1μMとなるように培地中に添加し、21時間培養した。その後、グルタミン酸の終濃度が30μMとなるように培地中にグルタミン酸水溶液を添加し、更に3時間培養した。このときの培養後の細胞を「シトリン投与群」とする。また、シトリン溶液の代わりにシトリン投与群と同量のDMSOを添加する対照群と、シトリン溶液及びグルタミン酸水溶液の代わりにシトリン投与群と同量

50



のDMSO及び水を添加する対照群とを準備した。

【0046】

その後、シトリニン投与群及び対照群の細胞について、MTT細胞増殖アッセイキット（Millipore製）を用いてMTTアッセイを行った。具体的には、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）に5mg/mLのMTT（3-（4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル）-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド）を溶解した溶液を、MTTの終濃度が50µg/mLとなるように培地中に添加し、37℃、5体積%CO<sub>2</sub>の条件下で1時間培養した。その後、培地を除去し、ホルマザンを溶解するために100µLのDMSOを添加した。そして、マイクロプレートリーダー（Molecular Devices製）を用い、対照波長630nmとして波長570nmにおける吸光度を測定し、細胞の生存率を求めた。

10

【0047】

MTTアッセイで測定された細胞の生存率を図1に示す。図1において、生存率は「平均値±標準誤差」で示している。ただし、シトリニン溶液及びグルタミン酸水溶液の代わりにDMSO及び水を添加した対照群における平均値が1.0となるように、各群の平均値を正規化している。対照群のサンプル数nはいずれもn=18であり、シトリニン投与群のサンプル数nはn=12である。

図1から分かるように、グルタミン酸（30µM）を添加した場合には、グルタミン酸を添加しない場合と比較して細胞の生存率が有意に低下した（ $p < 0.01$ ）。しかし、グルタミン酸（30µM）に加えてシトリニン（0.1µM）を添加した場合には、シトリニンを添加しない場合と比較して細胞の生存率が有意に上昇した（ $p < 0.01$ ）。この結果から、シトリニンは中枢神経細胞に対する保護作用を示すことが分かる。

20

【0048】

[実施例2：シトリニンの中枢神経細胞に対する保護作用の確認（核染色アッセイ）]

実施例1と同様にして、胎生18日齢のウイスター系ラットの脳から細胞を採取し、B-27サプリメント（Life Technologies Japan製）及びGlutaMAX（Life Technologies Japan製）を添加したNeurobasal培地（Life Technologies Japan製）中で培養した。

【0049】

培養開始後15日目に、シトリニンをDMSOに溶解したシトリニン溶液を、シトリニンの終濃度が0.1µMとなるように培地中に添加し、21時間培養した。培地を取り除き、0.01質量%のDAPI（4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール）（（株）同仁化学研究所製）を含有するPBS溶液で細胞を1分間処理した後、細胞をPBSで洗浄した。取り除いた培地を戻し、グルタミン酸の終濃度が30µMとなるように培地中にグルタミン酸水溶液を添加し、更に3時間培養した。このときの培養後の細胞を「シトリニン投与群」とする。また、シトリニン溶液の代わりにシトリニン投与群と同量のDMSOを添加する対照群と、シトリニン溶液及びグルタミン酸水溶液の代わりにシトリニン投与群と同量のDMSO及び水を添加する対照群とを準備した。

30

【0050】

その後、0.05質量%のPI（ヨウ化プロピジウム）（AnaSpec製）を細胞に添加し、10分間処理した。PI処理後の細胞をPBSで洗浄し、4質量%のバラホルムアルデヒドを含有する0.1Mのリン酸バッファーで固定化した。固定化された細胞に退色防止剤入りの蛍光法組織染色用水系封入剤（Fluoromount/Plus、Diagnostic BioSystems製）をマウントし、デジタル冷却CCD（Charge Coupled Device）カメラ（CoolSNAP HQ2、Photometrics製）を備えた蛍光顕微鏡（Eclipse TE2000-E、（株）ニコン製）を用いて蛍光像を取得した。DAPIで核染色された細胞（DAPI陽性細胞）はグルタミン酸の処理前に死んでいる細胞であるため、細胞数の計測に際して除外した。死細胞は、細胞形状で確認するほか、核がPIで染色され、且つ、DAPIで染色されていないことを基準として確認した。生細胞は、PI及びDAPIのいずれによっても核が染色されていないことを基準として確認した。そして、生細胞数を全細胞数（DAPI陽性細胞を除く）で除することにより、生存率を求めた。

40

50

## 【0051】

核染色アッセイで測定された細胞の生存率を図2に示す。図2において、生存率は「平均値±標準誤差」で示している。シトリン溶液及びグルタミン酸水溶液の代わりにDMSO及び水を添加した対照群のサンプル数nはn=20であり、シトリン溶液の代わりにDMSOを添加した対照群のサンプル数nはn=21であり、シトリン投与群のサンプル数nはn=12である。

図2から分かるように、グルタミン酸(30μM)を添加した場合には、グルタミン酸を添加しない場合と比較して細胞の生存率が有意に低下した(p<0.01)。しかし、グルタミン酸(30μM)に加えてシトリン(0.1μM)を添加した場合には、シトリンを添加しない場合と比較して細胞の生存率が有意に上昇した(p<0.01)。この結果から、シトリンは中枢神経細胞に対する保護作用を示すことが分かる。

10

## 【0052】

[実施例3:シトリンの長期曝露による中枢神経細胞に対する毒性の確認(MTTアッセイ)]

実施例1と同様にして、胎生18日齢のウイスター系ラットの脳から細胞を採取し、B-27サプリメント(Life Technologies Japan製)及びGlutaMAX(Life Technologies Japan製)を添加したNeurobasal培地(Life Technologies Japan製)中で培養した。

## 【0053】

培養開始後15日目に、シトリンをDMSOに溶解したシトリン溶液を、シトリンの終濃度が0.1μM、1.0μM、10μM、又は100μMとなるように培地中に添加し、14日間培養した。そして、シトリン溶液の添加後、1日目、2日目、5日目、及び14日目の時点で、MTT細胞増殖アッセイキット(Millipore製)を用いて、実施例1と同様にMTTアッセイを行った。

20

## 【0054】

MTTアッセイで測定された細胞の生存率を図3に示す。図3において、生存率は「平均値±標準誤差」で示している。ただし、シトリン溶液の代わりにシトリン投与群と同量のDMSOを添加した対照群における平均値が1.0となるように、各群の平均値を正規化している。対照群及びシトリン投与群のサンプル数nはいずれもn=9である。

図3から分かるように、シトリンが高濃度(100μM)である場合には生存率が有意に低下したが(p<0.01)、シトリンが低濃度(0.1μM~10μM)である場合には生存率は有意な低下を示さなかった。この結果から、シトリンの濃度が0.1μM~10μMの範囲である場合、少なくとも14日間は中枢神経細胞に対する毒性を示さないことが分かる。

30

## 【0055】

[実施例4:シトリンによるシナプス結合への影響の確認]

実施例1と同様にして、胎生18日齢のウイスター系ラットの脳から細胞を採取し、B-27サプリメント(Life Technologies Japan製)及びGlutaMAX(Life Technologies Japan製)を添加したNeurobasal培地(Life Technologies Japan製)中で培養した。

40

## 【0056】

培養開始後15日目に、シトリンをDMSOに溶解したシトリン溶液を、シトリンの終濃度が0.1μM、1.0μM、又は10μMとなるように培地中に添加し、2日間培養した。その後、4質量%のparaホルムアルデヒドを含有する0.1Mのリン酸バッファで細胞を固定化し、PBSで洗浄した後、5質量%の正常ロバ血清を含有する2xPBS溶液でブロッキングを行った。ブロッキング後、各サンプルを1次抗体とともに4で一晩反応させ、PBSで洗浄後、2次抗体とともに室温(25℃)で1時間反応させた。各サンプルをPBSで洗浄後、細胞に退色防止剤入りの蛍光法組織染色用水系封入剤(Fluoromount/Plus、Diagnostic BioSystems製)をマウントし、デジタル冷却CCDカメラ(SPOT、Diagnostic Instruments製)を備えた蛍光顕微鏡(Eclipse E800、(株)ニ

50

コン製)を用いて蛍光像を取得した。

1次抗体としては、マウス抗vGluT1抗体(Synaptic Systems)、ウサギ抗vGAT抗体(Synaptic Systems)、又はニワトリ抗MAP2抗体(Merck Millipore)を用いた。vGluT1は興奮性シナプスのマーカーであり、vGATは抑制性シナプスのマーカーであり、MAP2は樹状突起を識別するためのマーカーである。2次抗体としては、Alexa色素で標識された2次抗体(Life Technologies Japan製)を用いた。

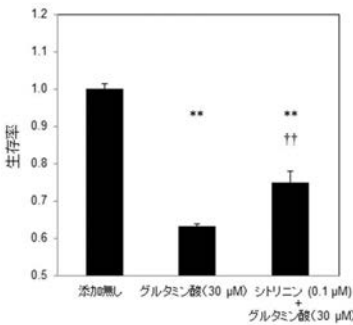
【0057】

樹状突起20μm当たりの興奮性シナプスの数及び抑制性シナプスの数をそれぞれ図4(A)、(B)に示す。図4(A)において、シトリン濃度が0μM、0.1μM、1.0μM、10μMである群のサンプル数nは、それぞれn=67、n=36、n=43、n=38である。また、図4(B)において、シトリン濃度が0μM、0.1μM、1.0μM、10μMである群のサンプル数nは、それぞれn=11、n=17、n=15、n=14である。

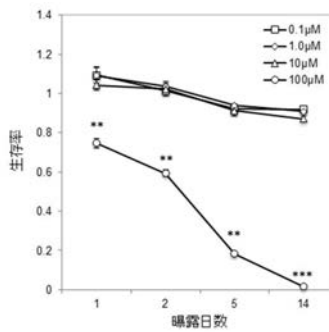
10

図4(A)、(B)から分かるように、シトリンが低濃度(0.1μM~10μM)である場合には、興奮性シナプスの数及び抑制性シナプスの数は有意な変化を示さなかった。この結果から、シトリンの濃度が0.1μM~10μMの範囲である場合、シナプス結合に影響を与えないことが分かる。

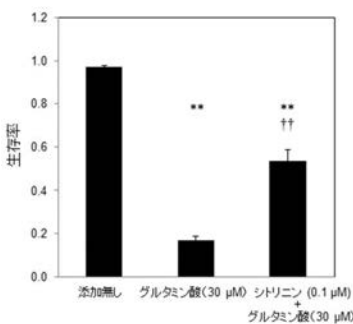
【図1】



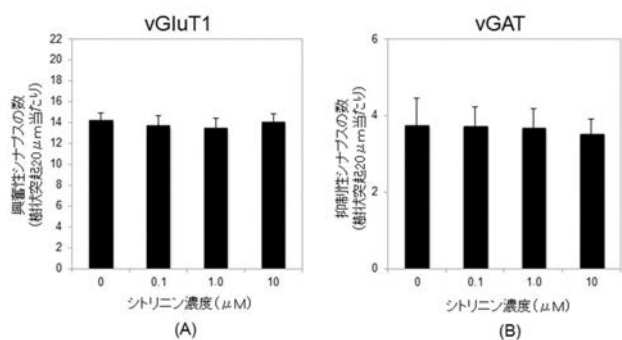
【図3】



【図2】



【図4】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 25/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 25/16	
<b>A 6 1 P 21/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 21/02	
<b>A 6 1 P 9/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 9/10	
<b>A 6 1 P 9/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 9/00	
(72)発明者	古市 貞一		
	東京都新宿区神楽坂一丁目3番地	学校法人東京理科大学内	
(72)発明者	菅原 二三男		
	東京都新宿区神楽坂一丁目3番地	学校法人東京理科大学内	
(72)発明者	今堀 龍志		
	東京都新宿区神楽坂一丁目3番地	学校法人東京理科大学内	
Fターム(参考)	4C086 AA01 AA02 BA08 GA13 MA01 MA04 NA14 NA15 ZA02 ZA16		
	ZA18 ZA36 ZA94 ZC41 ZC55		