

201008020A

厚生労働科学研究費補助金

創薬総合推進研究事業研究事業

抑肝散の精神機能障害に対する効能解析への科学的・生物学的アプローチに関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 遠山正彌

平成23（2011）年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

抑肝散の精神機能障害に対する効能解析への科学的・生物学的アプローチに関する研究 遠山正彌	-----	1
---	-------	---

### II. 分担研究報告

1. 認知症に有効な抑肝散構成生薬センキュウが小胞体ストレスから神経細胞を 救う分子機序の解明に関する研究 遠山正彌	-----	5
2. 認知症に有効な抑肝散成分に関する研究 掛樋一晃	-----	11
3. 統合失調症に有効な抑肝散構成成分の薬理解析と単一成分同定に関する研究 島田昌一	-----	19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（創薬総合推進研究研究事業）  
（総括）研究報告書

抑肝散の精神機能障害に対する効能解析への科学的・生物学的アプローチに関する研究

研究代表者：遠山正彌 大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究所  
研究科長  
大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：抑肝散は認知症、統合失調症に効果的であるとの報告が蓄積されている。本研究では抑肝散の認知症に対する効果は抑肝散を構成するセンキュウに含まれる成分が小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する結果であることを解明した。又抑肝散の統合失調症への効果はチョウトウコウに含まれる因子が各種セロトニン受容体の機能を制御する結果に基づくことを解明した。

#### 研究分担者

掛樋一晃（近畿大学薬学部創薬科学科・教授）

島田昌一（大阪大学大学院医学系研究科・教授）

#### A. 研究目的

高齢化が著しく進む現在、アルツハイマー病などの認知症の治療法の開発はまさに急務である。抑肝散は認知症の行動心理学的症状（BPSD）に効果を示すという臨床結果が蓄積されている。また認知症の予防、進行防止にも有効との結果も報告されている。認知症と並んで抑肝散の著明な効果が認められる疾患は統合失調症である。統合失調症ならびにBPSDには非定型方抗精神病薬が効果的であることも知られている。これらの結果は抑肝散は認知症の治療に有効な成分を含むのみならず統合失調症に有効な成分をも含むことを示している。一方漢方薬は長年の歴史から副作用は少なく安全性が確保されている。しかしながら疾患に有効であるという科学的立証が殆どなされていないため、一般的に広く普及しているとはいえない。本研究は認知症や統合失調症に有効とされている抑肝散の科学的立証を目指すものである。

#### B. 研究方法

認知症研究：抑肝散はソウジュツ、ブクリョウ、センキュウ、チョウトウコウ、トーキ、サイコ、カンゾウから構成されている。抑肝散は乾燥した4gのソウジュツ、4gのブクリョウ、3gのセンキュウ、3gのチョウトウコウ、3gのトーキ、2gのサイコ、1.5gのカンゾウを700CCの蒸留水に溶かし、1時間の煮沸後、300CCに濃縮したものである。

各構成成分の小胞体ストレスに対する防御機序をSK-N-SHヒト神経芽細胞腫、Neuro2aマウス神経芽細胞腫で検討した。効果の認められた成分を除去した抑肝散を用いて小胞体ストレスによる細胞死抑制効果が消失するか否かも検討した。その結果センキュウが小胞体ストレスにより惹起される神経細胞死を抑制する構成成分であることが判明した。そこで分担研究報告に詳しく記載している方法でセンキュウ熱水抽出物成分の分画、センキュウ熱水抽出物成物ブタノール分画、センキュウ熱水抽出物成物水槽層分画のどの分画が小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制するかを検討し、有効分子の同定を行った。

統合失調症研究：抑肝散やそのアルカロイド成分が、中枢神経系に発現しているタイプのセロトニン受容体（1A、2A、2C、7）に対してどの様に作用するかを細胞内Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いて解析した。これらのセロトニン受容体はそれぞれ異なるGタンパクと共役するため、セカンドメッセンジャーも異なり、単純にHEK細胞に各タイプのセロトニン受容体を発現させただけでは、Ca<sup>2+</sup>イメージング法で反応が得られない。本研究ではこの点を解消するため、それぞれのタイプのセロトニン受容体と選択的に共役するG $\alpha$ タンパクとG $\alpha$ 16タンパクとの間でキメラタンパクを作成することにより、全ての種類のGタンパク共役型セロトニン受容体のシグナル伝達をPI turnover系に集約し、Ca<sup>2+</sup>イメージング法で解析を行った。また、実験に用いる各種セロトニン受容体は、RT-PCR法により脳組織から単離した。本研究では抑肝散の構成生薬の釣籐鈎のアルカロイド成分であるガイソシジンメチルエーテル、リンコフィリン、イソリンコフィリン、ヒルスチン、ヒルスチン、コリノキセイン、イソコリノキセインなどがセロト

ニン受容体に与える影響について検討した。

### C. 研究結果

#### 認知症研究

#### 抑肝散は小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制する

カルシウムイオンの恒常性を乱す Thapsigargin (TG) および低酸素刺激を小胞体ストレスとして用いた。またミトコンドリア刺激として用いられる staurosporin (STS) を非小胞体ストレス刺激として使用した。Neuro2a 細胞に TG, 低酸素、STS 刺激を加えると一定数の細胞が細胞死に陥った。抑肝散は TG, 低酸素刺激による細胞死を抑制したが STS 刺激による細胞死は抑制しなかった。しかも抑肝散による神経細胞保護効果は濃度依存性である。抑肝散の構成生薬、センキュウが小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制する

抑肝散を構成する 7 種の生薬、それぞれが TG による小胞体ストレスにより惹起される神経細胞死を抑制するか否かを Neuro2A あるいは SK-N-SH 細胞を用いて検討した。その結果センキュウが TG の誘導性の神経細胞死を抑制、サイコモ弱いものの抑制効果を示した。しかし他の 5 種の成分はなんら効果を示さなかった。

神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると一定の神経細胞死が先に述べたように誘導される。神経細胞家族性アルツハイマー病の原因遺伝子変異産物である変異 Presenilin1 (PS1) ( $\Delta$ PS1) を発現させ小胞体ストレスを負荷すると細胞死を引き起こす神経細胞は急増する。抑肝散を前処理した  $\Delta$ PS1 発現神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると細胞死を引き起こす神経細胞が減少する。さらにセンキュウ単独でも濃度依存性に同様の効果が見られた。

#### センキュウや抑肝散による小胞体ストレスから神経細胞を守る分子機序

小胞体ストレスを細胞に負荷すると小胞体に局在する分子シャペロン GRP78/Bip 或いは CHOP を誘導する。GRP78 は小胞体ストレスによる折り畳み不良タンパク質を正常化し小胞体に不良タンパク質が過剰蓄積しないように働き、その結果神経細胞を細胞死から守る。一方 CHOP は JNK カスケードを活性化し細胞を死へと導く。またアルツハイマー病における神経細胞死では小胞体ストレスにより誘導されるカスパー 4 が細胞死の引き金を引くことを我々は明らかとした (J. Cell Biol. 2004) .そこで抑肝散やセンキュウを前処理した小胞体ストレス負荷  $\Delta$ PS1 発現ヒト由来神経細胞においてこれらの因子の変動を検討した。

抑肝散或いはセンキュウを前処理して  $\Delta$  PS1 発現神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると

GRP78 発現が非前処理群に比して高い。一方、CHOP 発現は逆に非前処理群に比して低い。またカスパー 4 の活性化も抑制されていた。

#### センキュウ、抑肝散の熱水抽出物は小胞体ストレスによる細胞死を抑制する

小胞体ストレスを負荷した神経細胞生存率は 69% となり、アポトーシス誘導が観察された。次に、センキュウ熱水抽出物および抑肝散を 0.1mg/mL の濃度で含む DMEM 培地にて、90 分間プレインキュベート後、両溶液を除き、5  $\mu$ M Thapsigargin 溶液を添加し同様に細胞生存率を評価した。結果、センキュウ熱水抽出物では 92%、抑肝散では 87% へと細胞生存率が回復し、センキュウ熱水抽出物および抑肝散中の成分が Thapsigargin により誘導されるアポトーシスを抑制することがわかった。

#### センキュウ熱水抽出物成分の分画

センキュウ熱水抽出物をブタノールと水を用いて成分抽出したところ、脂溶性成分 (ブタノール層) 26.01% (v/v)、水溶性成分 (水層) 79.69% (v/v) が回収された。脂溶性成分 (ブタノール層) を、ESI-TOF MS を用いて解析した結果、センキュウ原末のメタノール抽出物中の成分として報告されている成分のうち、Levistolide、Tokinolide、Z-ligustilide dimmer E や Z,Z'-3,3',8,8'-diligustilide などの脂溶性の高い成分を除く、Senkyunolide 類、Cnidilide、Ligustilide および Ferulic acid などの 13 種類の成分を確認できた。一方、水溶性成分 (水層) について中性糖と遊離アミノ酸の定量を行ったところ、中性糖として水溶性成分 1 mg 当たり 0.602 mg の中性糖を含むことがわかった。また、遊離アミノ酸については水溶性成分 1 mg 当たり 0.010 mg であり、水溶性成分の主要な成分は cnidirhan AG などの多糖類であると考えられた。

#### 多糖類を主成分とするセンキュウ熱水抽出物分画は小胞体ストレスによる細胞死を抑制する

センキュウ熱水抽出物から得られた分画のうち、収量の高い S-Bu-M-Et-M、S-Bu-M-Et-W、S-Bu-M-W、S-W の 4 分画についてアポトーシス抑制効果を調べた。4 分画のうち、S-Bu-M-Et-M、S-Bu-M-Et-W、S-Bu-M-W はそれぞれ細胞生存率が 40%、69%、74% であり、抑制効果は観察されなかったが、多糖類を主成分として含むと考えられる S-W について

は細胞生存率が90%へと回復した。

次に、アポトーシス抑制効果を示した分画 S-W についてその濃度依存性を評価した結果、25 µg/mL 以上の濃度でアポトーシス抑制効果を示すことがわかった。

#### 統合失調症研究

HEK293 細胞に 5-HT1A 受容体、5-HT2A 受容体、5-HT2C 受容体の cDNA を強制発現させ、カルシウムイメージング法で薬剤の感受性を検討した。特に 5-HT1A 受容体は元来 Gi 蛋白と共役し cAMP を減少させるため、そのままではカルシウムイメージング法による測定はできないので、G16/o と G16/i3 のキメラ G 蛋白を 5-HT1A 受容体と共役させることにより、カルシウムイメージング法での測定を可能にした。

これらの方法を用いて検討した結果、投与した多種のアルカロイドの中で一つの成分のみが、セロトニン受容体に影響を与えることが分かった。このアルカロイドは 5-HT1A 受容体、5-HT2A 受容体、5-HT2C 受容体、5-HT7 受容体にそれぞれ作用するが、5-HT1A 受容体に対しては、アゴニストとして働いた。5-HT2A 受容体に対しては、主にアンタゴニストとして働き、5-HT2C 受容体や 5-HT7 受容体に対してもアンタゴニストとして働いた。

#### D. 考察

##### 認知症研究

抑肝散およびその構成生薬であるセンキュウは小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制した。小胞体ストレスによる折り畳み不良タンパク質の蓄積はカスパー 4 を活性化し細胞死へと導く。GRP78 は折り畳み不良タンパク質を正常化し、細胞を死から救済する。一方小胞体ストレスは細胞を死へと導く CHOP も誘導する。GRP78, CHOP 発現のどちらが優位になるかで細胞は死を選ぶか生き残るかが決まる。抑肝散及びセンキュウは GRP78 発現を誘導し、CHOP 発現を抑制した。また細胞死の実行因子であるカスパー 4 の活性化も阻害した。以上の事実は抑肝散、センキュウは小胞体ストレスによる神経細胞死を救済する効果を有することを示す。さらに本研究では抑肝散、センキュウの抽出物の多糖類を含む分画が小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制すること、さらにその中に含まれる単一物質がその効果を担うことも明らかとした。認知症を引き起こすアルツハイマー病は小胞体ストレスに対する脆弱性による神経細胞死がその基本にあり、抑肝散の有効性が科学的に立証できた。さらに単一成分の同定は今後の新薬の開発に大きな道を切り開いた。

##### 統合失調症研究

Gタンパク質共役型のセロトニン受容体のサブ

タイプは多様性に富み、5-HT1受容体はGiタンパク質と共役し細胞内のcAMPを減少させ、5-HT2受容体はGqタンパク質と共役し細胞内のカルシウムを上昇させ、5-HT4~7受容体はGsタンパク質と共役し細胞内のcAMPを上昇させると考えられているが、本研究ではG16/oやG16/i3などのキメラGタンパク質を各種セロトニン受容体とHEK細胞に共発現させることにより、全てのGタンパク質共役型のセロトニン受容体をカルシウムイメージング法でアッセイできるように条件を調整した。

一方、抑肝散の構成生薬の一つである釣藤鈎のインドールアルカロイド成分がセロトニンと類似構造を共有していることに着目し、ガイソジジンメチルエーテル、リンコフィリン、イソリンコフィリン、ヒルスチン、ヒルスチン、コリノキセイン、イソコリノキセインなどがセロトニン受容体の各種サブタイプに親和性があるかどうかを検討した。その結果、その中の一成分のみが5-HT1A受容体に対してアゴニスト、5-HT2A受容体と5-HT2C受容体と5-HT7受容体に対してアンタゴニスト活性を示した。この特徴は、第3世代の非定型抗精神病薬のアリピプラゾールのセロトニン受容体に対する作用の特徴と類似点が多く認められた。このことは、統合失調症に有効な成分が抑肝散に含まれている可能性を示唆するものである。

非定型抗精神病薬と類似した成分が抑肝散の中にも含有されている可能性について検討した。その候補成分として抑肝散の構成生薬の釣藤鈎のインドールアルカロイド成分に着目し、脳に発現しているセロトニン受容体のサブタイプ(1A、2A、2C、7)に対してどの様に影響を与えるかを細胞内Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いて解析した。セロトニン受容体の各種サブタイプはそれぞれ異なるGタンパク質と共役するため、本研究ではキメラGタンパク質を作成することにより、全ての種類のGPCR型のセロトニン受容体のサブタイプをCa<sup>2+</sup>イメージング法で解析した。その結果、釣藤鈎由来のインドールアルカロイドの1成分が5-HT1A受容体に対してはアゴニストとして、5-HT2A受容体、5-HT2C受容体、5-HT7受容体に対してはアンタゴニストとして働くことが分かった。この特徴は、第3世代の非定型抗精神病薬のアリピプラゾールのセロトニン受容体に対する作用の特徴と類似点が多く、統合失調症に有効な成分が抑肝散に含まれている可能性を示唆するものである。

#### E. 結論

抑肝散の認知症に対する効果は小胞体ストレスより神経細胞を守ることに起因することが明らかとなった。さらに抑肝散構成生薬のうちセンキュウ、とりわけセンキュウに含まれる単一物質がこの任を担うことが明らかとなった。

統合失調症に効果的な非定型抗精神病薬と類似した成分が抑肝散の中にも含有されている可能性につい

て検討した。その結果、チョウトウコウ由来のインドールアルカロイドの1成分が5-HT1A受容体に対してはアゴニストとして、5-HT2A受容体、5-HT2C受容体、5-HT7受容体に対してはアンタゴニストとして働くことが分かった。この特徴は、第3世代の非定型抗精神病薬のアリピプラゾールのセロトニン受容体に対する作用の特徴と類似点が多く、統合失調症に有効な成分が抑肝散に含まれている可能性を示唆するものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hiratsuka, T. et al., Yokukansan inhibits neuronal death during ERstress by regulating the unfolded protein response. Plos one 5 (2010) e13280.

##### 2. 学会発表

「抑肝散に含まれるフェルラ酸は ER ストレスによる神経細胞死を抑制する」

発表者：平塚徹、松崎伸介、宮田信吾、木下充弘、掛樋一晃、西田愼二、片山泰一、遠山正彌

学会名：第27回和漢医薬学会学術大会（京都）2010年8月

「Inhibitory effect of Ferulic acid against ER stress could suggest the clinical validity of Yokukansan, a Japanese herbal medicine.」

発表者：平塚 徹、 松崎 伸介、宮田 信吾、木下 充

弘、掛樋 一晃、片山 泰一、遠山 正彌

学会名：第53回日本神経化学会（神戸）大会（Neuro2010）2010年9月

Shoichi Shimada, Yusuke Ishida, Shinya Ugawa, Takashi Ueda, The effect of Uncaria alkaloids on Development in Chinese Herbal Medicine 2010, serotonin receptors, Conference on the Recent Singapore.

#### 総説

島田昌一、石田雄介、鵜川真也、植田高史、キメラGタンパク質を用いたGタンパク質共役型受容体（GPCR）のアッセイ、脳21、14:68-73、2011.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

統合失調症の予防又は治療薬  
（特願2010-002364） 出願中

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 分担研究報告書

### 認知症に有効な抑肝散構成生薬センキュウが 小胞体ストレスから神経細胞を救う分子機序の解明

研究分担者 遠山正彌 大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学  
研究科長  
大阪大学大学院医学系研究科・教授

#### 研究要旨

抑肝散及びその構成生薬センキュウは小胞体ストレス負荷による神経細胞死を分子シヤペロンGRP78発現を高め、CHOP発現を抑え、結果小胞体ストレスにおける細胞死実行因子カスパー4の活性化を抑制することにより細胞死を救済している。小胞体ストレスに対する脆弱性はアルツハイマー病における神経細胞死の原因であり認知症の基となっている。抑肝散が認知症に有効であるとの報告が相次いでいるが、本研究はそれらの臨床的データに科学的証左を与えるものである。

#### A. 研究目的

日本の認知症の有病率はやがて10%に達すると推定されており、高齢化が進む我が国において、厚生労働行政と治療薬開発の両面からの対応が急務である。一方抑肝散は徘徊など認知症の周辺症状のみならず、認知症の進行の防止や、予防、回復に効果があることが臨床的に数多く報告されるようになって来た。もし、認知症に対する抑肝散作用の科学的解明と効果物質の抽出が成功すれば抑肝散は、副作用の少ない効果的な認知症治療薬として科学的認知を得ることとなり、又その成分の同定は新規創薬にも道を開く。本研究はこの抑肝散の効能改を科学的に立証し、抑肝散の作用機序を分子レベルで解明することにある。一方我々はアルツハイマー病における神経細胞死が小胞体ストレスに対する防御機序の欠如が原因であることを世界で初めて明らかとした (Nature Cell Biol, 1999, 2001)。そこで本研究では抑肝散を構成する7種の生薬のうち

どの生薬が小胞体ストレスに対して防御作用を有するかを明らかにすることを試みた。

#### B. 研究方法

抑肝散はソウジュツ、ブクリョウ、センキュウ、チョウトウコウ、トーキ、サイコ、カンゾウから構成されている。抑肝散は乾燥した4gのソウジュツ、4gのブクリョウ、3gのセンキュウ、3gのチョウトウコウ、3gのトーキ、2gのサイコ、1.5gのカンゾウを700CCの蒸留水に溶かし、1時間の煮沸後、300CCに濃縮したものである。各構成成分の小胞体ストレスに対する防御機序をSK-N-SHヒト神経芽細胞腫、Neuro2aマウス神経芽細胞腫で検討した。効果の認められた成分を除去した抑肝散を用いて小胞体ストレスによる細胞死抑制効果が消失するか否かも検討した。

#### C. 研究結果

抑肝散は小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制する

カルシウムイオンの恒常性を乱す Thapsigardin (TG) および低酸素刺激を小胞体ストレスとして用いた。またミトコンドリア刺激として用いられる staurosporin (STS) を非小胞体ストレス刺激として使用した。Neuro2a 細胞に TG, 低酸素、STS 刺激を加えると一定数の細胞が細胞死に陥った。抑肝散は TG, 低酸素刺激による細胞死を抑制したが STS 刺激による細胞死は抑制しなかった。しかも抑肝散による神経細胞保護効果は濃度依存性である。

#### 抑肝散の構成生薬、センキュウが小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制する

抑肝散を構成する 7 種の生薬、それぞれが TG による小胞体ストレスにより惹起される神経細胞死を抑制するかどうかを Neuro2A あるいは SK-N-SH 細胞を用いて検討した。その結果センキュウが TG の誘導性の神経細胞死を抑制、サイコモ弱いものの抑制効果を示した。しかし他の 5 種の成分はなんら効果を示さなかった。

神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると一定の神経細胞死が先に述べたように誘導される。神経細胞家族性アルツハイマー病の原因遺伝子変異産物である変異 Presenilin1 (PS1) ( $\Delta$ PS1) を発現させ小胞体ストレスを負荷すると細胞死を引き起こす神経細胞は急増する。抑肝散を前処理した  $\Delta$ PS1 発現神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると細胞死を引き起こす神経細胞が減少する。さらにセンキュウ単独でも濃度依存性に同様の効果が見られた。

#### センキュウや抑肝散による小胞体ストレスから神経細胞を守る分子機序

小胞体ストレスを細胞に負荷すると小胞体に局在する分子シャペロン GRP78/Bip あるいは CHOP を誘導する。GRP78 は小胞体ストレスによる折り畳み不良タンパク質を正常化し小胞体に不良タンパク質が過剰蓄積しないように働き、その結果神経細胞を細胞死から守る。一方 CHOP は JNK カスケードを活性化し細胞を死へと導く。ま

たアルツハイマー病における神経細胞死では小胞体ストレスにより誘導されるカスパー 4 が細胞死の引き金を引くことを我々は明らかとした (J. Cell Biol. 2004) .そこで抑肝散やセンキュウを前処理した小胞体ストレス負荷  $\Delta$ PS1 発現ヒト由来神経細胞においてこれらの因子の変動を検討した。

抑肝散或いはセンキュウを前処理して  $\Delta$ PS1 発現神経細胞に小胞体ストレスを負荷すると GRP78 発現が非前処理群に比して高い。一方、CHOP 発現は逆に非前処理群に比して低い。またカスパー 4 の活性化も抑制されていた。

#### D. 考察

抑肝散およびその構成生薬であるセンキュウは小胞体ストレスにより誘導される神経細胞死を抑制した。小胞体ストレスによる折り畳み不良タンパク質の蓄積はカスパー 4 を活性化し細胞死へと導く。GRP78 は折り畳み不良タンパク質を正常化し、細胞を死から救済する。一方小胞体ストレスは細胞を死へと導く CHOP も誘導する。GRP78, CHOP 発現のどちらが優位になるかで細胞は死を選ぶか生き残るかが決まる。抑肝散及びセンキュウは GRP78 発現を誘導し、CHOP 発現を抑制した。また細胞死の実行因子であるカスパー 4 の活性化も阻害した。以上の事実は抑肝散、センキュウは小胞体ストレスによる神経細胞死を救済する効果を有することを示す。認知症を引き起こすアルツハイマー病は小胞体ストレスに対する脆弱性による神経細胞死がその基本にあり、抑肝散の有効性が科学的に立証できた。

#### E. 結論

抑肝散の認知症に対する効果は小胞体ストレスより神経細胞を守ることに起因することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hiratsuka, T. et al., Yokukansan inhibits neuronal death during ERstress by regulating the unfolded protein response. Plos one 5 (2010) e13280.

### 2. 学会発表

「抑肝散に含まれるフェルラ酸は ER ストレスによる神経細胞死を抑制する」

発表者：平塚徹、松崎伸介、宮田信吾、木下充弘、掛樋一晃、西田慎二、片山泰一、遠山正彌

学会名：第 27 回和漢医薬学会学術大会（京都）2010 年 8 月

「Inhibitory effect of Ferulic acid against ER stress could suggest the clinical validity of Yokukansan, a Japanese herbal medicine.」

発表者：平塚 徹、松崎 伸介、宮田 信吾、木下 充弘、掛樋 一晃、片山 泰一、遠山 正彌

学会名：第 53 回日本神経化学会（神戸）大会（Neuro2010）2010 年 9 月

Shoichi Shimada, Yusuke Ishida, Shinya Ugawa, Takashi Ueda, The effect of Uncaria alkaloids on Development in Chinese Herbal Medicine 2010, serotonin receptors, Conference on the Recent Singapore.

### 3. その他 なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得  
統合失調症の予防又は治療薬  
（特願2010-002364）出願中

2. 実用新案登録  
なし

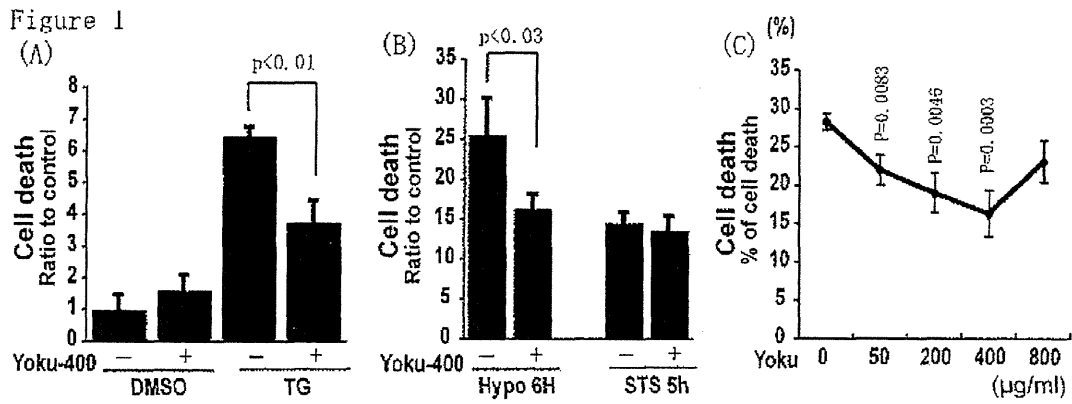


Figure 1 抑肝散は小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。(A) 小胞体ストレス (TG) 負荷により神経細胞死が起きる。抑肝散投与では細胞死が救済される (TG+Yoku-400)。(B) 低酸素刺激 (Hypo) による神経細胞死も抑肝散は救済する (Hypo6H+Yoku-400) がミトコンドリア由来の細胞死 (STS) には保護効果を示さない。(C) 抑肝散は濃度依存性に小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。

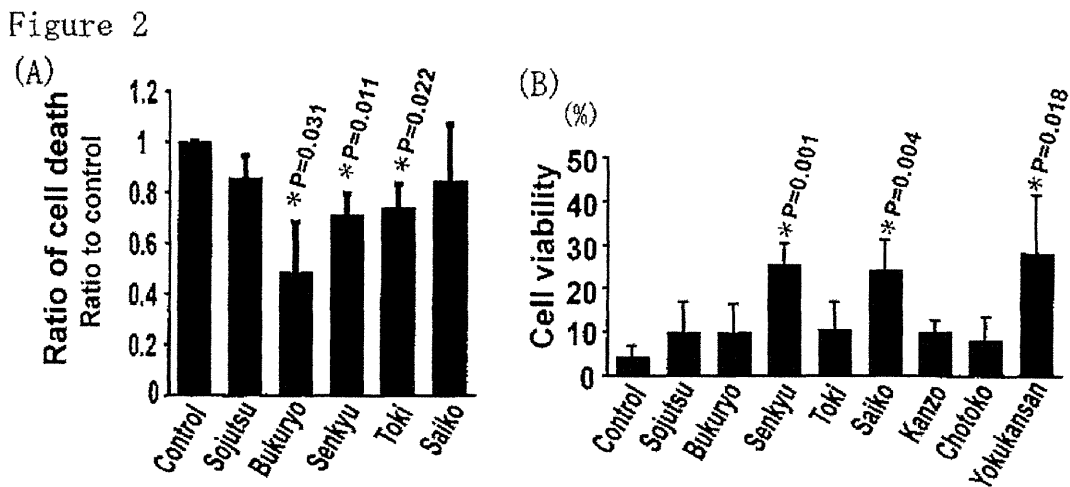


Figure 2 センキュウは小胞体ストレスによる神経細胞死に対して強い保護効果を持つ。その効果はヒト由来の神経細胞を用いたときに著明となる (B) ..A はマウス由来の神経細胞。

Figure 3

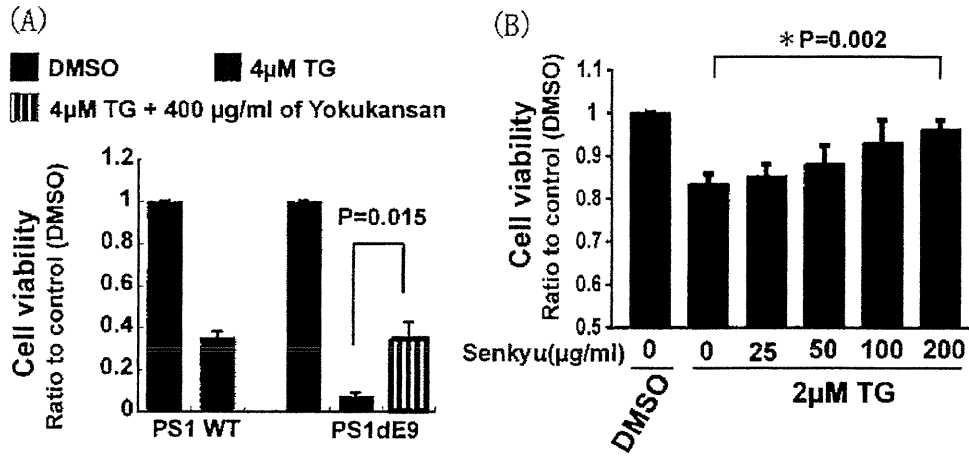


Figure 3 (A) 正常の PS1 が発現している細胞に小胞体ストレスを負荷すると神経細胞死が起きる (A; PS1WT)。変異 PS1(PS1dE9)発現細胞では小胞体ストレス誘導性の細胞死が増強される。抑肝散はこの細胞死を抑制する。(B) センキュウは濃度依存性に変異 PS1 発現細胞で惹起される小胞体ストレス依存性神経細胞死を救済する。

Figure 4

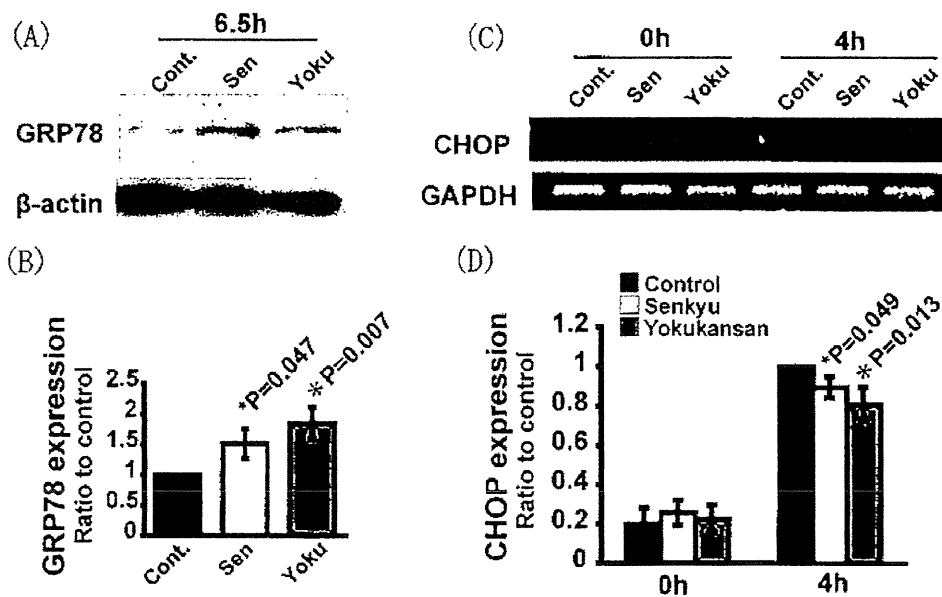


Figure 4 (A, B) センキュウ (Sen) と抑肝散『Yoku』は小胞体ストレスを負荷された神経細胞で正常に比して GRP78 発現を増強する。(C, D) センキュウと抑肝散は同じ細胞で CHOP 発現を低下させる。

Figure 5

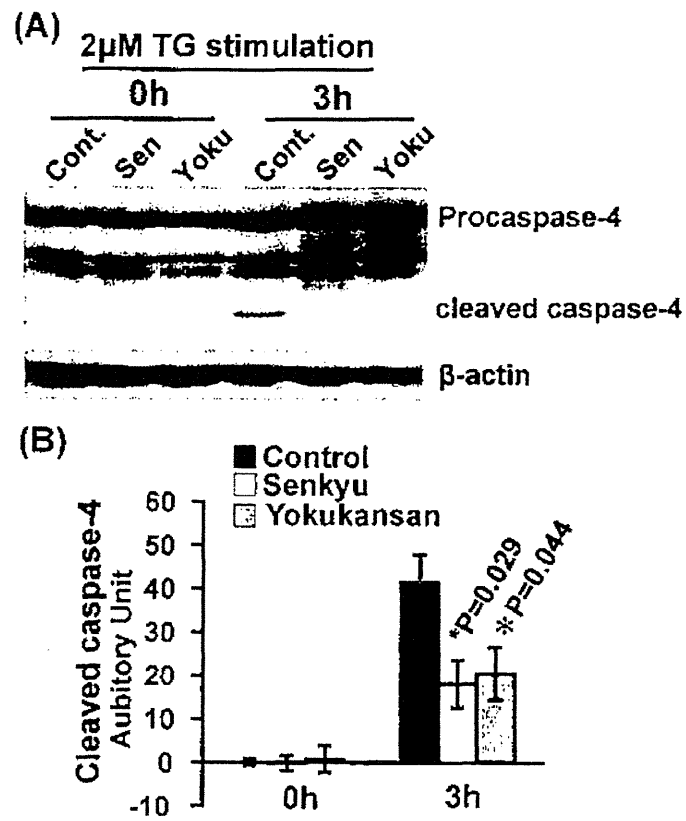


Figure 5 (A,B) センキュウ及び抑肝散はカスパーズ4の活性化を阻害する。

## 抑肝散の精神機能障害に対する効能解析への科学的分子生物学的アプローチ

### 分担研究報告書：抑肝散中のアポトーシス抑制成分の探索

研究分担者 掛樋一晃 近畿大学薬学部創薬科学科

研究要旨：アルツハイマー病を含めた認知症の治療法の開発は、今後高齢化がますます進む状況にある我が国において早急に対応すべき課題である。本研究で取り上げる抑肝散は認知症の問題行動(BPSD)に効果を示すことが明らかにされているが、抑肝散はBPSDの精神諸症状を抑制しながら、一方で身体機能を向上させるという抗精神病薬とは異なる特徴的な効果が認められ、抑肝散の有効性について医学的根拠を立証するために、抑肝散中の成分を明らかにするとともに、当該成分による作用機序の解明が望まれている。本研究では、小胞体ストレス負荷による神経芽細胞腫細胞のアポトーシス誘導に対する抑制効果を指標として、抑肝散中の神経諸症状を改善するアポトーシス抑制活性を示す成分を探索した。

#### A.研究目的

アルツハイマー病を含めた認知症の治療法の開発は、今後高齢化が進む我が国において早急に対応すべき課題である。本研究で取り上げる抑肝散は認知症の問題行動(BPSD)に効果を示すことが、BPSD動物モデルを用いた研究から明らかにされているが、抑肝散はBPSDの精神諸症状を抑制しながら、身体機能を向上させるという抗精神病薬とは異なる特徴的な効果が認められている。抑肝散が示すこれらの特徴は認知症のBPSDに対する治療法として有用であるばかりでなく、身体機能を向上させることで、認知症患者の

Quality of Lifeの向上にも寄与することが期待される。

本研究課題では認知症に対する抑肝散の向精神作用に関する作用機序を基礎医学と臨床医学の両側面から明らかにすることを目的としているが、そのためには、認知症の諸症状に効果を示す抑肝散中の成分を明らかにするとともに、当該成分による作用機序を明らかにする必要がある。既に、抑肝散中の生薬成分の1つであるセンキュウに、幻覚や妄想などアルツハイマー病の周辺症状の原因と考えられる脳神経の細胞死を抑制する効果があることが見出されている。この神経細胞のアポトー

シスに対する抑制効果は、認知症の諸症状に効果を示す抑肝散中の有効成分探索の指標としても有用であると考えられる。

本研究ではアルツハイマー病の原因遺伝子の一つとして知られているプレセニン1の変異株である神経芽細胞腫 (SK-N-SH) において、小胞体 Ca 依存性 ATPase 阻害剤である Thapsigargin による小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシスを指標とする *in vitro* 評価系を用いて、センキュウ中のアポトーシス抑制活性を示す有効成分の探索を行った。

## B. 研究方法

### B.1. SK-N-SH を用いるアポトーシス抑制効果の評価

ヒト神経芽細胞腫細胞 (SK-N-SH) を 10% FCS を含む DMEM 中で培養し、サブコンフルエント状態の細胞を 0.25% トリプシン溶液を用いて回収した。回収した細胞は 10 mL の PBS で 2 回洗浄後、40000 cell/mL となるように 10% FCS を含む DMEM を用いて分散した。40000 cell/mL の細胞分散液 100  $\mu$ L (4000 cell) を Tissue culture 用 96 ウェルプレートの各ウェルに分注し、約 40 時間培養した。培養後、各ウェルの培養液を捨て 200  $\mu$ L の PBS で各ウェルを洗浄した。ポジティブおよびネガティブコントロール群を除くすべてのウェルに被検体物質を含む血清不含の DMEM 液 100  $\mu$ L を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 90 分間インキュベートした。各ウェルの培養液を捨て、200  $\mu$ L の PBS で各ウェルを洗浄後、コントロール群を除く全てのウェルに 5  $\mu$ M Thapsigargin を含む血清不含の DMEM 液 100  $\mu$ L を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 時間インキュベートした。各ウェルの培養液を捨て、200  $\mu$ L の PBS で各ウェルを洗浄後、WST-1

proliferation 試薬を含む血清不含の DMEM 液 100  $\mu$ L を加え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3 時間インキュベートし、450 nm の紫外外部吸収をマイクロプレートリーダーにより測定した。

### B.2 センキュウ熱水抽出物成分の分画 (Fig.2)

センキュウ熱水抽出物 20 g にブタノール 300 mL と蒸留水 100 mL を加えて分液ロート内で激しく攪拌し、移し静置後、ブタノール層と水層を回収した。ブタノール層はエバポレーターを用いて減圧濃縮乾固 (分画 S-Bu)、水層は凍結乾燥 (分画 S-W) により回収した。同じ操作を 5 回繰り返す、計 100 g のセンキュウ熱水抽出物から、分画 S-Bu を 26.01 g、分画 S-W を 79.69 g 得た。次に、分画 S-Bu を 50 mL のメタノールに溶解し、メタノール可溶部を回収し、エバポレーターを用いて減圧濃縮乾固 (分画 S-Bu-M) した。一方、メタノール不溶部については、メタノールを留去後、蒸留水 10 mL に溶解し、凍結乾燥 (分画 S-Bu-W) した。分画 S-Bu-M は酢酸エチルと蒸留水を加え分液ロート内で激しく攪拌し静置後、酢酸エチル層 (S-Bu-M-Et) と水層 (S-Bu-M-W) を回収した。次に、分画 S-Bu-M-Et を 10 mL のメタノールに溶解し、メタノール可溶部を回収し、エバポレーターを用いて減圧濃縮乾固 (分画 S-Bu-M-Et-M) した。一方、メタノール不溶部については、メタノールを留去後、蒸留水 10 mL に溶解し、凍結乾燥 (分画 S-Bu-M-Et-M-W) した。分画 S-Bu-W は酢酸エチルと蒸留水を加え分液ロート内で激しく攪拌し、静置後、酢酸エチル層 (S-Bu-W-Et) と水層 (S-Bu-W-W) を回収した。次に、分画 S-Bu-W-Et を 10 mL のメタノールに溶解し、メタノール可溶部を回収し、エバポレーターを用いて減圧濃縮乾固 (分画 S-Bu-W-Et-M) した。一方、メ

タノール不溶部については、メタノールを留去後、蒸留水 10 mL に溶解し、凍結乾燥(分画 S-Bu-W-Et-M-W)した。

### B.3 センキュウ熱水抽出物ブタノール分画の ESI-IT-TOF MS による分析

装置には Shimadzu ESI-IT-TOF MS を使用した。分離カラムには KYA 社製 HiQ-Sil ODS (2.1 x 150 mm) を使用し、流速は 0.2 mL/min、カラム温度は 40 °C とした。検出は 254 nm により行った。移動相の溶液 A には 0.5% acetic acid/H<sub>2</sub>O、溶液 B にはアセトニトリルを用いた。グラジエント条件は、試料注入後 5 分間で溶出液 B を 15 % から 20% 上昇させ、溶出液 B が 20 分に 50 %、その後 10 分間で 100% となるようにグラジエント溶出した。センキュウ熱水抽出物から得られたブタノール分画(分画 S-Bu)は 0.5% acetic acid/15% MeOH 水溶液に溶解し、1 mg/mL の試料溶液を 10 μL を試料注入した。質量分析はスプレー電圧 3.5kV、スプレー温度 200 °C としてポジティブイオンモードにより測定した。

### B.4 センキュウ熱水抽出物水層分画の中性糖および遊離アミノ酸

中性糖の定量はフェノール硫酸法により行った。センキュウ熱水抽出物から得られた(分画 S-W)およびグルコースを蒸留水で溶解し、試料溶液およびグルコース溶液(200 μL)に 5% フェノール水溶液(200 μL)を加え混和後、濃硫酸(1 mL)を加えすばやく混和した。室温まで冷却後、分光光度計を用いて 490 nm の吸光度を測定し、グルコース溶液を用いて作成した検量線から中性糖量を算出した。

遊離アミノ酸の定量はニンヒドリン反応により行った。センキュウ熱水抽出物から得られた(分画 S-W)およびグリシンを蒸留水で溶解し、試料溶液およびグリシン溶液(2 mL)に 0.2%ニ

ンヒドリン-EtOH 水溶液(1 mL)を加え混和し沸騰水浴で 2 分間加熱した。室温まで冷却後、分光光度計を用いて 570 nm の吸光度を測定し、グリシン溶液を用いて作成した検量線から遊離アミノ酸量を算出した。

### B.5 センキュウ熱水抽出物分画のアポトーシス抑制効果

B.2 で得られたセンキュウ熱水抽出物分画のうち、S-Bu-M-Et-M、S-Bu-M-Et-W、S-Bu-M-W、S-W の 4 分画 25 mg に 0.5 mL の DMSO を加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、4.5 mL の PBS を加え攪拌し、遠心分離後の上清を回収した。回収した上清は血清不含の DMEM 液により希釈し、アポトーシス抑制活性測定用試料溶液とした。

## C. 研究結果

### C.1 SK-N-SH を用いたアポトーシス抑制効果の評価

SK-N-SH に対する Thapsigargin によるアポトーシス誘導およびセンキュウ熱水抽出物ならびに抑肝散によるアポトーシス抑制効果を Fig.1 に示す。Thapsigargin を含まない DMEM 培地のみを用いた場合の細胞生存率を 100% とすると、5 μM Thapsigargin 溶液を添加した場合には、細胞生存率は 69% となり、アポトーシス誘導が観察された。次に、センキュウ熱水抽出物および抑肝散を 0.1mg/mL の濃度で含む DMEM 培地にて、90 分間プレインキュベート後、両溶液を除き、5 μM Thapsigargin 溶液を添加し同様に細胞生存率を評価した。結果、センキュウ熱水抽出物では 92%、抑肝散では 87% へと細胞生存率が回復し、センキュウ熱水抽出物および抑肝散中の成分が Thapsigargin により誘導されるアポトーシスを抑制することがわかった。

## C.2 センキュウ熱水抽出物成分の分画

センキュウ熱水抽出物をブタノールと水を用いて成分抽出したところ、脂溶性成分(ブタノール層)26.01% (v/v)、水溶性成分(水層)79.69% (v/v)が回収された(Fig.2)。これまでの報告から、脂溶性成分として senkyunolide、ligustilide、cnidilide butylidenephthalide などのフタリド類、水溶性成分としては L-Ara、D-Gal、D-GlcA からなる cnidirhan AG ( arabinogalactan )、D-glucose とそのアセチル体からなる cnidirhan SI などの多糖類が含まれると考えられる。脂溶性成分(ブタノール層)を、ESI-TOF MS を用いて解析した結果、センキュウ原末のメタノール抽出物中の成分として報告されている成分のうち、Levistolide、Tokinolide、Z-ligustilide dimmer E や Z,Z'-3,3',8,8'-diligustilide などの脂溶性の高い成分を除く、Senkyunolide 類、Cnidilide、Ligustilide および Ferulic acid などの 13 種類の成分を確認できた(Fig.3)。一方、水溶性成分(水層)について中性糖と遊離アミノ酸の定量を行ったところ、中性糖として水溶性成分 1 mg 当たり 0.602 mg の中性糖を含むことがわかった。また、遊離アミノ酸については水溶性成分 1 mg 当たり 0.010 mg であり、水溶性成分の主要な成分は cnidirhan AG などの多糖類であると考えられた。

脂溶性成分(ブタノール層)については、メタノール可溶成分と不溶成分に分け、酢酸エチルと水を用いて抽出し、得られた7つの分画について Fig.2 に示す収量を得た。脂溶性成分(ブタノール層)から分画された成分のうち、メタノール可溶であり、酢酸エチルと水による分配によって水層に移行する成分(S-Bu-M-W)が最も回収量が高く、12.1%であった。一方、メタノール可溶であり、酢酸エチル層に移行する成

分(S-Bu-M-Et)のうち、メタノール可溶成分(S-Bu-M-Et-M)は1.88%、水可溶成分(S-Bu-M-Et-W)は0.83%であった。

脂溶性成分(ブタノール層)から分画された成分のうち、水可溶であり酢酸エチルと水による分配により水層に移行する成分(S-Bu-W-W)の回収率は0.97%であった。一方、酢酸エチル層に移行する成分(S-Bu-W-Et)のうち、メタノール可溶成分(S-Bu-W-Et-M)は0.05%、水可溶成分(S-Bu-W-Et-W)は0.10%であった。

## C.3 センキュウ熱水抽出物分画のアポトーシス抑制効果

センキュウ熱水抽出物から得られた分画のうち、収量の高い S-Bu-M-Et-M、S-Bu-M-Et-W、S-Bu-M-W、S-W の4分画についてアポトーシス抑制効果を調べた。結果を Fig.4 に示す。前項と同様に Thapsigargin を含まない DMEM 培地を用いた場合を細胞生存率 100% とし、Thapsigargin により誘導されるアポトーシスに対する抑制効果を調べた。4 分画のうち、S-Bu-M-Et-M、S-Bu-M-Et-W、S-Bu-M-W はそれぞれ細胞生存率が 40%、69%、74% であり、抑制効果は観察されなかったが、多糖類を主成分として含むと考えられる S-W については細胞生存率が 90% へと回復した。

次に、アポトーシス抑制効果を示した分画 S-W についてその濃度依存性を評価した。結果を Fig.5 に示す。2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$ 、250  $\mu\text{g/mL}$  の3濃度についてアポトーシス抑制効果を調べて結果、2.5  $\mu\text{g/mL}$  では 59%、25  $\mu\text{g/mL}$  では 73%、250  $\mu\text{g/mL}$  では 75% となり、25  $\mu\text{g/mL}$  以上の濃度でアポトーシス抑制効果を示すことがわかった。



#### D. 考察

本研究では神経芽細胞腫 (SK-N-SH) において、小胞体 Ca 依存性 ATPase 阻害剤である Thapsigargin により誘導されるアポトーシスを指標とする *in vitro* 評価系を用いて、センキュウ中のアポトーシス抑制活性を示す有効成分の探索を行った。その結果、センキュウ熱水抽出物および抑肝散は Thapsigargin による誘導されるアポトーシスを抑制することがわかった。また、センキュウ熱水抽出物を分画し、各分画についてアポトーシス抑制活性を調べたところ、多糖類を主成分とする考えられる水溶性成分分画に、最も高いアポトーシス抑制活性が観察された。現在、センキュウ熱水抽出物によるアポトーシス抑制機構は不明であるが、Suzuki ら (Biol.Pharm.Bull,2006) がカプロン酸エステル誘導体 (Norbergenin-11-caproate) が神経芽細胞腫 IMR-32 における Tunicamycin および Thapsigargin により誘導される小胞体ストレスによる活性酸素の産生を抑え、アポトーシスを抑制することを報

告しており、センキュウ熱水抽出物についても同様の機構でアポトーシスを抑制することが考えられ、これらの点についても検討が必要と考えられる。

今年度の成果を踏まえ次年度は、最も高い活性が観察された水溶性成分分画について各種クロマトグラフィーを組み合わせさらに分画し、アポトーシス抑制活性を示す成分の特定を目指す。また、アポトーシス抑制活性を示す成分について、その作用機序の解明に関する研究にも着手していく予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hiratsuka T, Matsuzaki S, Miyata S, Kinoshita M, Kakehi K, Nishida S, Katayama T, Tohyama M.

Yokukansan inhibits neuronal death during ER stress by regulating the unfolded protein response. PLoS One. 2010 5(10):e13280

##### 2. 学会発表

なし

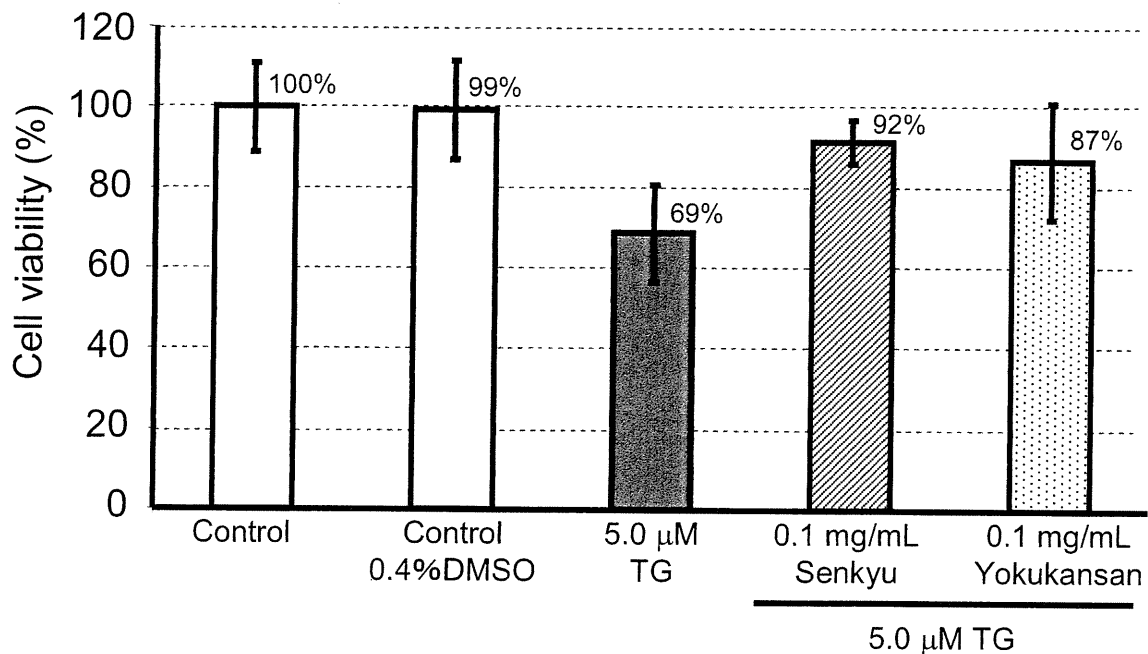


Fig. 1 ヒト神経芽細胞腫 (SK-N-SH) における小胞体ストレス誘導アポトーシスに対するセンキュウ熱水抽出物および抑肝散の抑制効果

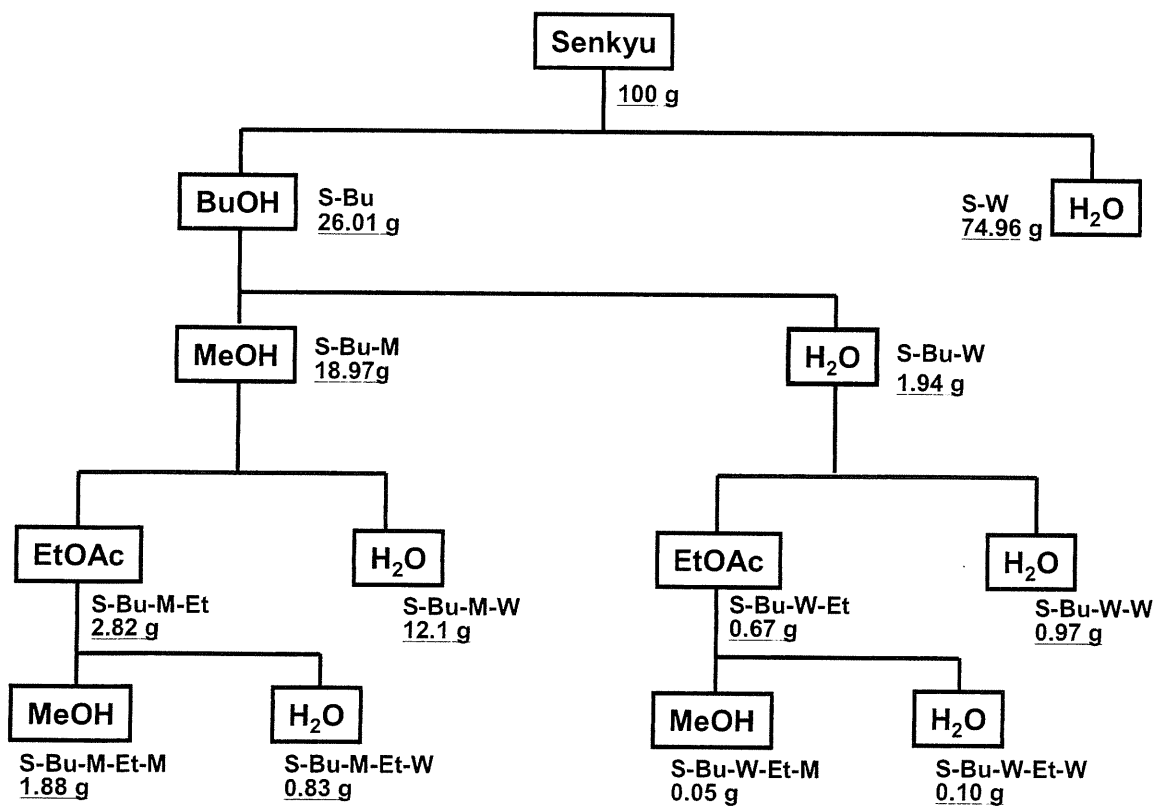


Fig. 2 センキュウ熱水抽出物の分画と収量

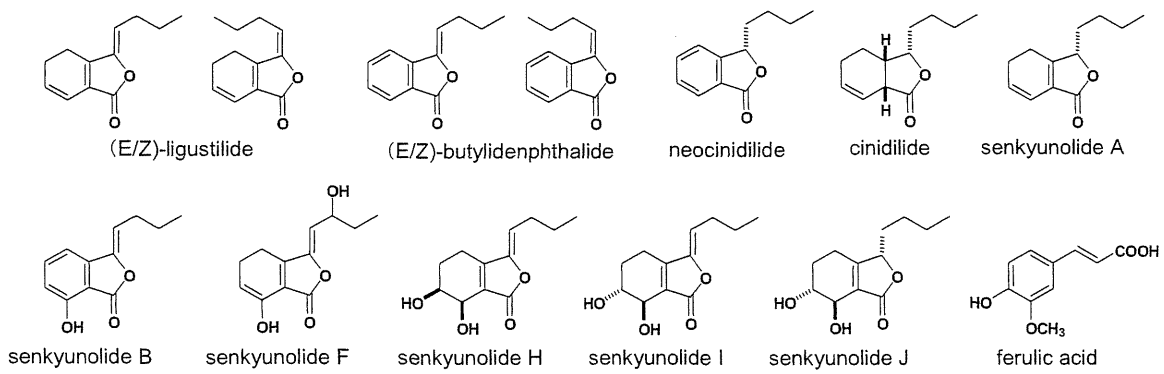


Fig. 3 センキュウ熱水抽出物脂溶性成分分画 (S-Bu) の成分

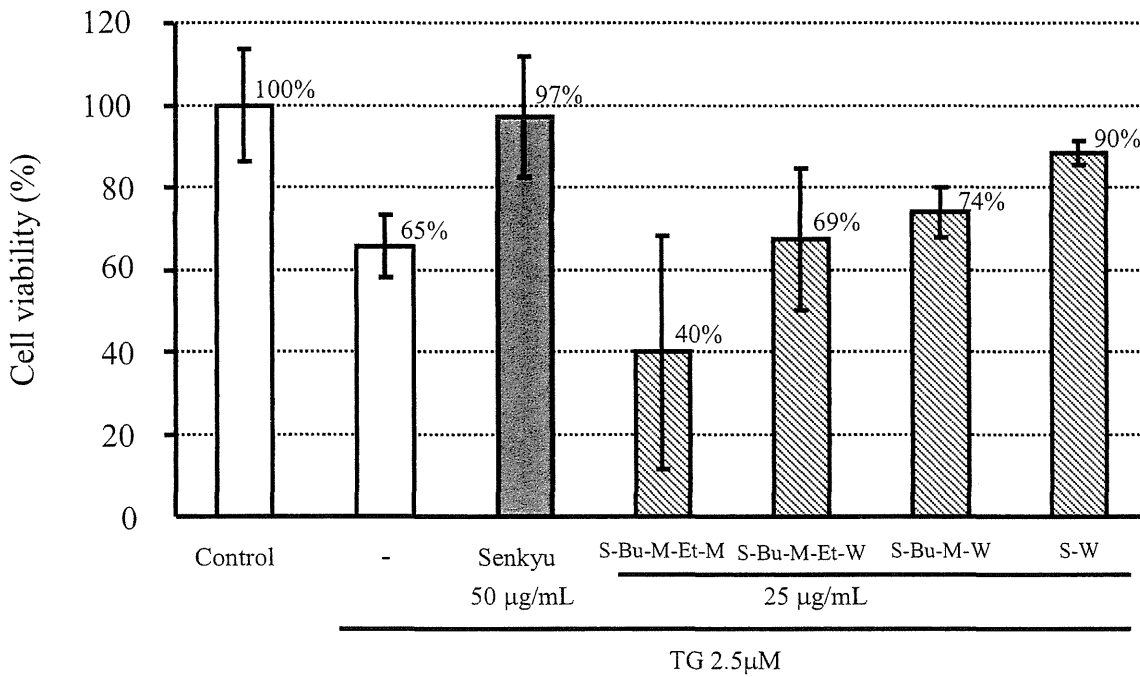


Fig. 4 ヒト神経芽細胞腫 (SK-N-SH) における小胞体ストレス誘導アポトーシスに対するセンキュウ熱水抽出物分画 (4分画) の抑制効果

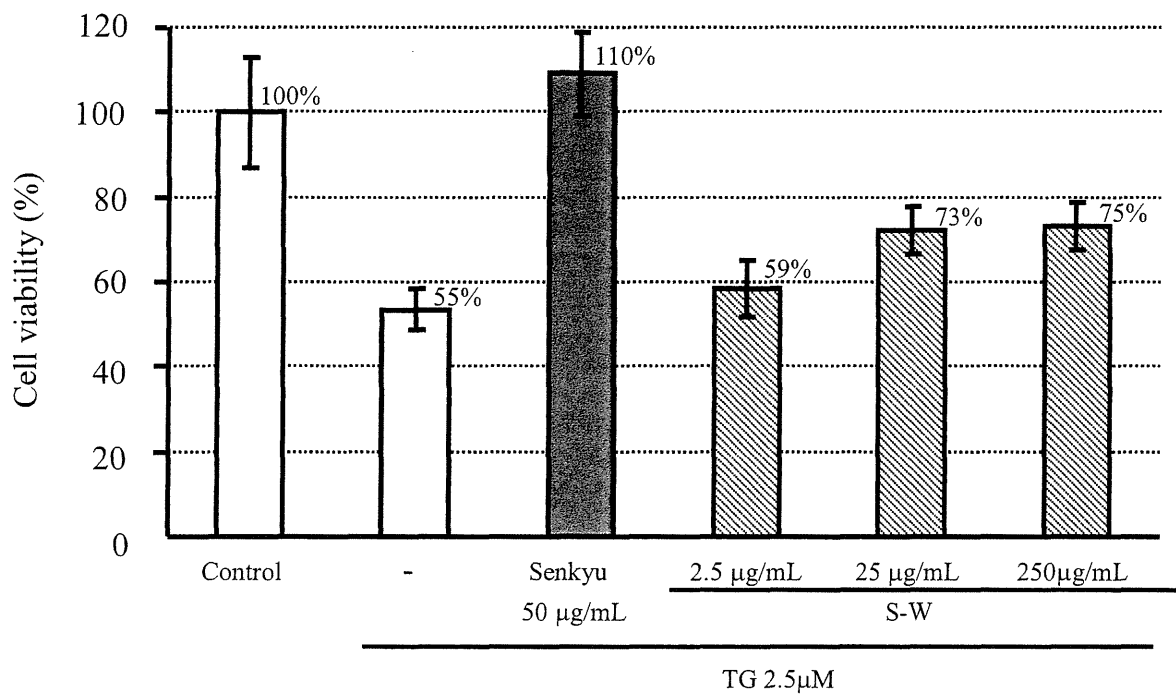


Fig. 5 ヒト神経芽細胞腫 (SK-N-SH) における小胞体ストレス誘導アポトーシスに対するセンキユウ熱水抽出物水溶性分画 (S-W) の抑制効果と単一成分固定