

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 遠山正彌

平成24(2012)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 遠山正彌	5
2. 抑肝散中の β セクレターゼ阻害成分の探索 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固定 島田昌一	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

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構成生薬の中でセンキュウ以外にブクリョウ、サイコ、トウキなども細胞死抑制効果を有することを明らかにした。さらに抑肝散は細胞死を抑制するタンパク質の **sumoylation** 亢進機能を有することが明らかとなった。また、抑肝散の統合失調症への効果としてドーパミン受容体に対するガイソシジンメチルエーテルを検討した。ガイソシジンメチルエーテルの効果は非定型抗精神病薬のアリピプラゾールと類似しており、抑肝散の一成分を元に非定型精神病薬の開発を行える可能性を見出した。

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。

タンパク質の sumoylation は癌細胞などで活性化し、細胞死に対し保護的な作用を有すると想像されている。そこで抑肝散処理における sumoylation の変化をSK-N-SH細胞で検討した。SK-N-SH細胞に抑肝散を2時間負荷、細胞を回収し40 μ g/laneで抗SUMO1抗体によるウエスタンブロットを行った。本研究では、認知症ならびに統合失調症に効果を示す抑肝散中の構成生薬であるソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコ、カンゾウ、チョウトウコウ、センキュウよりメタノールにより低分子成分を抽出後、脂溶性ならびに水溶性分画を調製し、各分画について β セクレターゼ阻害活性を測定した。

統合失調症研究：抑肝散に含まれるアルカロイドの一成分であるガイソシジンメチルエーテルがドーパミン受容体に対してどの様に作用するかを、細胞内Ca²⁺イメージング法を用いて解析した。本研究ではドーパミン受容体の中でも特に中枢神経系において主要な機能を担っているD1受容体とD2受容体について検討した。D1受容体はGs蛋白質と、D2受容体はGi蛋白質と共役するため、単純にHEK293T細胞に各タイプのドーパミン受容体を発現させただけでは、Ca²⁺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ドーパミン受容体と選択的に共役するG α 蛋白質とG α 16蛋白質との間でキ

メラ蛋白を作成することにより、全ての種類のドーパミン受容体のシグナル伝達をPI turnover系に集約し、Ca²⁺イメージング法で解析を行った。また、実験に用いるD1、D2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藤鈎のアルカロイドの一成分であるガイソジジンメチルエーテルがドーパミ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

抑肝散の構成生薬の中でサイコ、ブクリョウ、トウキも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)を小胞体ストレスとして用いた。Neuro2a細胞にTG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による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ことはすでに報告済みである。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。また昨年度までに抑肝散の構成生薬センキュウ中に含まれるFerulic acidがその任を担うことも報告済みである。

本年度はヒト神経細胞芽腫細胞Sk-N-SH細胞への小胞体ストレスに対してサイコが、マウス神経芽腫細胞でブクリョウ、トウキも小胞体ストレス負荷による神経細胞死を抑制する事を明らかにした。

抑肝散の構成生薬、センキュウ、カンゾウ、ブクリョウが細胞死に対し保護的な作用を有するSUMO化を亢進する

タンパク質のsumoylationは癌細胞などで活性化し、細胞死に対し保護的な作用を有すると想像されている。そこで抑肝散処理におけるsumoylationの変化をSK-N-SH細胞で検討したところ抑肝散投与群でSUMO化タンパク質が増加することを明らかにした。次いで抑肝散のどの構成成分がタンパク質のsumoylationを亢進するかを検討した結果、センキュウ、カンゾウ、ブクリョウは亢進効果を示した。しかも、センキュウのみが濃度依存性を示した。

抑肝散構成生薬抽出物のβセクレターゼ阻害活性

βセクレターゼ阻害活性の測定には、分子内に発蛍光団(7-methoxycoumarin)と消光団(2,4-dinitrophenyl group)を併せ持ち、βセクレターゼ活性を受け、ペプチド鎖切断により発蛍光する合成ペプチドを使用した。βセクレターゼ阻害活性は、βセクレターゼ活性を受け500 pmolの基質ペプチドから生じる蛍光光度に対し、生薬抽出物による蛍光強度減少率を阻害活性として評価した。8種類の生薬から得た24分画についてβセクレター

ゼ阻害活性を調べたところ、ソウジュツ(Atractylodes lancea)のMeOH抽出物についてわずかに蛍光強度の減少がみられたものの濃度依存性はなく、その他の生薬についても高い阻害活性を示すと考えられる生薬はなかった。また、H2O抽出物については、トウキ(Angelica acutiloba)とカンゾウ(Glycyrrhiza uralensis)において蛍光強度の減少がみられたものの高い阻害活性を示す生薬はなかった。一方、酢酸エチル分画については、サイコ(Bupleurum falcatum)は50 mg/mLの濃度45%のβセクレターゼ阻害活性が見られた。次に、サイコ酢酸エチル分画によるβセクレターゼ阻害活性の濃度依存性を調べた。βセクレターゼの阻害活性は93.4%であった。一方、サイコ酢酸エチル分画の阻害活性は500 μg/mLで71.7%であり、濃度依存的にβセクレターゼ活性を阻害した。以上の結果から、抑肝散中の構成生薬のうち、サイコ(Bupleurum falcatum)中にはβセクレターゼに対し阻害活性を示す成分が含まれ、その活性成分が脂溶性成分であると考えられた。

サイコ酢酸エチル分画のβセクレターゼ阻害活性

前項の抑肝散中の構成生薬抽出物のβセクレターゼ阻害活性のスクリーニングから、サイコ酢酸エチル抽出分画がβセクレターゼ阻害活性を示すことがわかった。そこで、サイコ酢酸エチル分画をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画し、得られた各分画についてβセクレターゼ阻害活性を調べた。PLCシリカゲルクロマトグラフィーにより移動度の異なる5つの分画が得られた。次に各分画についてβセクレターゼ阻害活性を調べたところ、分画2は全く阻害活性を示さなかった。一方、分画1、分画3~分画5についてはそれぞれ56.9%、27.1%、30.9%、51.9%の阻害活性を示した。これまでにβセクレターゼ活性を阻害する天然物中の成分としては、biflavonoid類、catechin類などの多価フェノール類が報告されているものの、サイコ酢酸エチル分画中に含まれると考えられる、Saikosaponin類やそのアグリコンであるSaikogenin、Stigmasterol、ポリアセチレン類であるSaikodiyneなどがβセクレターゼ阻害活性を示すとの報告はなく、サイコ中の成分は新規βセクレターゼ阻害活性であると考えられた。

サイコ酢酸エチル分画の成分分析

βセクレターゼ阻害活性を示すサイコ酢酸エチル分画中の成分を追跡するため、液体クロマトグラフ-エレクトロスプレー質量分析計による分析を行った。分画1についてはトータルイオンクロマトグラム上にピークは観察されなかった。一方、分画5については、トータルイオンクロマトグラム上に10

本以上のピークを与え、その殆どが Saikosaponin 類及びそのアセチル体であることがわかった。すなわち、ピーク 1 は m/z985 を示し、Saikosaponin C、H あるいは I、ピーク 2 は m/z811 を示し、Saikosaponin B3、あるいは B4、ピーク 4、5、7 は m/z779 を示し、Saikosaponin A、B1、B2、D あるいは G であると考えられた。また、ピーク 6 とピーク 8 はそれぞれ m/z822 を示し、グルコースの 2、3、4、6 位のいずれかがアセチル化された Saikosaponin A、B1、B2、D あるいは G であると考えられた。サイコ中の主要成分であるサイコサポニンについては Saikosaponin A、B2、D が標準品として入手可能であるため、 β セクレターゼ阻害活性を測定したがいずれも明らかな阻害活性を示さなかったことから、 β セクレターゼ阻害活性を示す成分は 0-acetyl-saikosaponin 類あるいはその他の成分であると考えられた。

統合失調症研究

HEK293T 細胞に D2 受容体とキメラ G 蛋白質である G16/o や G16/i3 を強制発現させ、カルシウムイメージング法でガイソシジンメチルエーテルの感受性を検討した。

その結果、ガイソシジンメチルエーテルは D2 受容体にパーシャルアゴニストとして作用した (pEC50 : 5.36 \pm 0.74、Emax:50 \pm 15%)。ガイソシジンメチルエーテルは D2 受容体のパーシャルアゴニストであることが分かったので、次にガイソシジンメチルエーテルの D2 受容体に対するパーシャルアンタゴニストとしての作用を検討した。

その結果、ガイソシジンメチルエーテルは D2 受容体に対してパーシャルアンタゴニストであることが明らかとなった。

さらに、ガイソシジンメチルエーテルの D1 受容体に対して、影響があるのかどうかを、HEK293T 細胞に D1 受容体と G α 15 蛋白質や G α 16 蛋白質を強制発現させて検討した。その結果、D1 受容体を G α 15 蛋白質や G α 16 蛋白質と共役させた系においても、D1 受容体を G α s 蛋白質と共役させた場合と同様の親和性が得られた。興味深いことに D1 受容体はドーパミンには応答するが、ガイソシジンメチルエーテルに対しては全く応答を示さなかった。

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。しかもセンキュウはタンパク質の sumoylation の亢進も引き起こした。以上の結果はセンキュウは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

導く経路を抑制するとともにタンパク質の sumoylation を亢進することにより神経細胞死を防いでいると思われる。これらの発見から、sumoylation を促進するセンキュウに含まれる因子の同定、sumoylation の標的タンパク質の解明、Ferulic acid が sumoylation を促進するかなどについての検討をさらに進めるとともにセンキュウ単独投与が認知症に有効か否かの検討が重要である。

抑肝散中の構成生薬であるソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコ、カンゾウ、チョウトウコウ、センキュウの抽出物について β セクレターゼ阻害活性のスクリーニングを行い、新規 β セクレターゼ阻害活性成分の発見を目指した。スクリーニングの結果、サイコのメタノール抽出物より分画した酢酸エチル分画に β セクレターゼ阻害活性を見出した。一方、活性を示した酢酸エチル分画中の成分分析の結果、主要な成分は Saikosaponin 類であったが、Saikosaponin A、B2、D には阻害活性がないことから、 β セクレターゼ阻害活性を示す成分は saikosaponin 類のアセチル体、Stigmasterol、ポリアセチレン類である Saikodiyne、その他の成分であると考えられた。

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G_i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G_q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G_s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て行っている。

今回の研究から、抑肝散含有アルカロイドの成分であるガイソシジンメチルエーテルはD2受容体に対してはパーシャルアゴニストとして作用し、D1受容体に対しては影響を与えなかった。

平成22年度の本研究ではガイソシジンメチルエーテルがセロトニン(5-HT)1A受容体に対してはパーシャルアゴニストとして、5-HT_{2A}、2C、5-HT₇受容体にはアンタゴニストとして作用することを示した。これらのセロトニン受容体に対するプロフィールと平成23年度に得られたドーパミン受容体に対する結果とを照らし合わせると、ガイソシジンメチルエーテルは、第3世代の非定型抗精神病薬のアリピプラゾールと類似した薬理学特性を有しており、ガイソシジンメチルエーテルをリード化合物とした新しい抗精神病薬の開発にも繋がる可能性がある。

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回避、sumoylationの亢進により神経細胞を守ることと起因することが明らかとなった。今年度の成果を踏まえ次年度は、サイコのメタノール抽出物を詳細に分画し、βセクレターゼ阻害活性を示す成分の特定を目指す。

抑肝散に含まれる天然アルカロイドの一成分であるガイソシジンメチルエーテルのドーパミン受容体に対する影響を調べた。その結果、ガイソシジンメチルエーテルはドーパミンD2受容体に対してパーシャルアゴニストとして作用することが分かった。昨年度までの研究結果と照らし合わせて考えると、ガイソシジンメチルエーテルは非定型抗精神病薬のアリピプラゾールと類似した薬理学特性を有することが分かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Shimada S.
Geissoschizine methyl ether has
third-generation antipsychotic-like actions at

the dopamine and serotonin receptors. Eur J Pharmacol. 査読有り 2011;671(1-3):79-86.

2. 学会発表

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

これまでに我々は抑肝散はその構成生薬であるセンキュウに含まれる **Ferulic acid** は小胞体ストレス負荷による神経細胞死を抑制することにより認知症に有効であることを示した。本研究ではセンキュウ以外にブクリョウ、サイコ、トウキなども細胞死抑制効果を有することを示した。さらに抑肝散は細胞死を抑制するタンパク質の **sumoylation** 亢進機能を有することが明らかとなった。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

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。

認知症研究は本研究の第一の柱であり抑肝散がなぜアルツハイマー病〔AD〕に有効成分を科学的に解明し、有効成分を単離することにあつた。種々検討の結果、我々は平成22年度に抑肝散AD神経細胞死保護機能の分子機序を解明し、その任を担う成分が抑肝散構成生薬センキュウに含まれる **ferulic acid** であることを明らかとした〔Hiratsuka et al., Plos one,2010,5(10):e13280〕。平成23年度にはセンキュウ以外にもブクリョウ、トウキ、サイコなどが細胞死保護効果を有することを見出し、現在その有効成分の同定を行っている。さらに平成23年度には抑肝散が小胞体ストレスに対する **unfolded protein response** を強化する経路により細胞死を救済するだけでなくタンパク質の **sumoylation** を介しても抑肝散は小胞体ストレスからの細胞死を救済することを見出した。

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。

タンパク質のsumoylationは癌細胞などで活性化し、細胞死に対し保護的な作用を有すると想像されている。そこで抑肝散処理におけるsumoylationの変化をSK-N-SH細胞で検討した。SK-N-SH細胞に抑肝散を2時間負荷、細胞を回収し40 μ g/laneで抗SUMO1抗体によるウェスタンブロットを行った。

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ことはすでに報告済みである。また昨年度までに抑肝散の構成生薬センキュウ中に含まれるFerulic acidがその任を担うことも報告済みである。本年度はヒト神経細胞芽腫細胞ではサイコが、マウス神経芽腫細胞でブクリョウ、トウキも小胞体ストレス負荷による神経細胞死を抑制する(図1)。現在これらに含まれるどの因子が細胞死を抑制するのか検討中である。

一方タンパク質のsumoylationは癌細胞などで活性化し、細胞死に対し保護的な作用を有すると想像されている。そこで抑肝散処理におけるsumoylationの変化をSK-N-SH細胞で検討したところ抑肝散投与群でSUMO化タンパク質の増強が見られた(図2)。

次いで抑肝散のどの構成成分がタンパク質のsumoylationを亢進するかを検討した結果、センキュウ、カンゾウ、ブクリョウは亢進効果を示した(図3)。しかも、n数は2と少ないがセンキュウのみが濃度依存性を示した(図4)。従って、今後はセンキュウに絞って研究を進めることとした。

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。しかもセンキュウはタンパク質のsumoylationの亢進も引き起こした。以上の結果はセンキュウは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経路を抑制するとともにタンパク質のsumoylationを亢進することにより神経細胞死を防いでいると思われる。今後は、sumoylationを促進するセンキュウに含まれる因子の同定、sumoylationの標的タンパク質の解明、Ferulic acidがsumoylationを促進するかなどについての検討を進めるとともにセンキュウ単独投与が認知症に有効か否かの見当も行いたい。

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回避、sumoylationの亢進に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

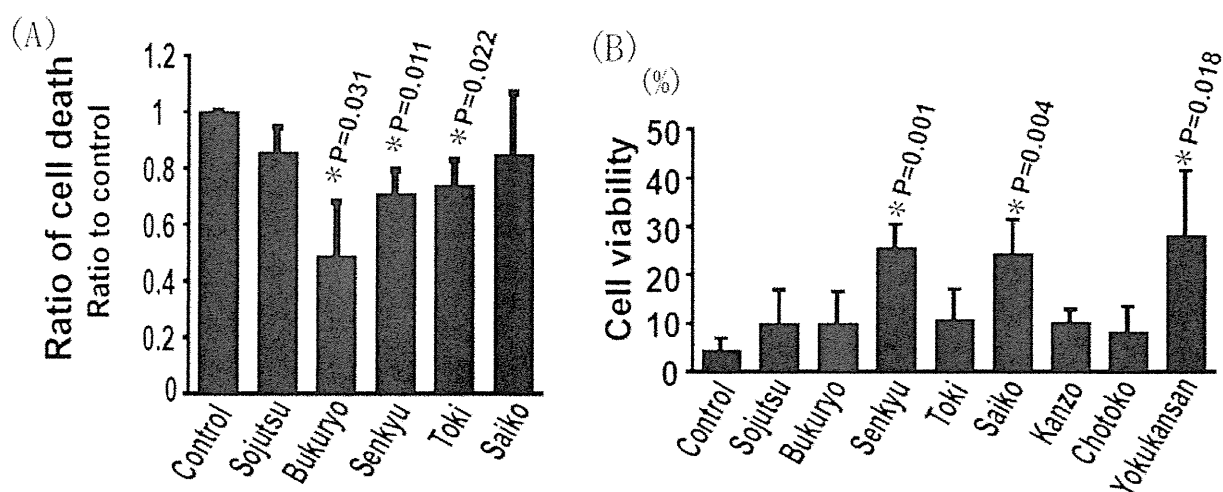
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
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



マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2A 細胞

ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞

Figure 1 ヒト、マウス由来の神経細胞の両者において抑肝散構成生薬センキュウが小胞体ストレス負荷による神経細胞死を抑制する (A) Neuro2A 細胞を用いた細胞死の検討。小胞体ストレス (TG) 負荷により引き起こされる神経細胞死がブクリョウ、センキュウ、トウキの前処理で細胞死が救済される。(B) SK-N-SH 細胞を用いた生存活性の検討。小胞体ストレス (TG) 負荷時の細胞生存活性は抑肝散前処理により上昇するが、これは、その構成生薬センキュウとサイコの前処理でも観察された。

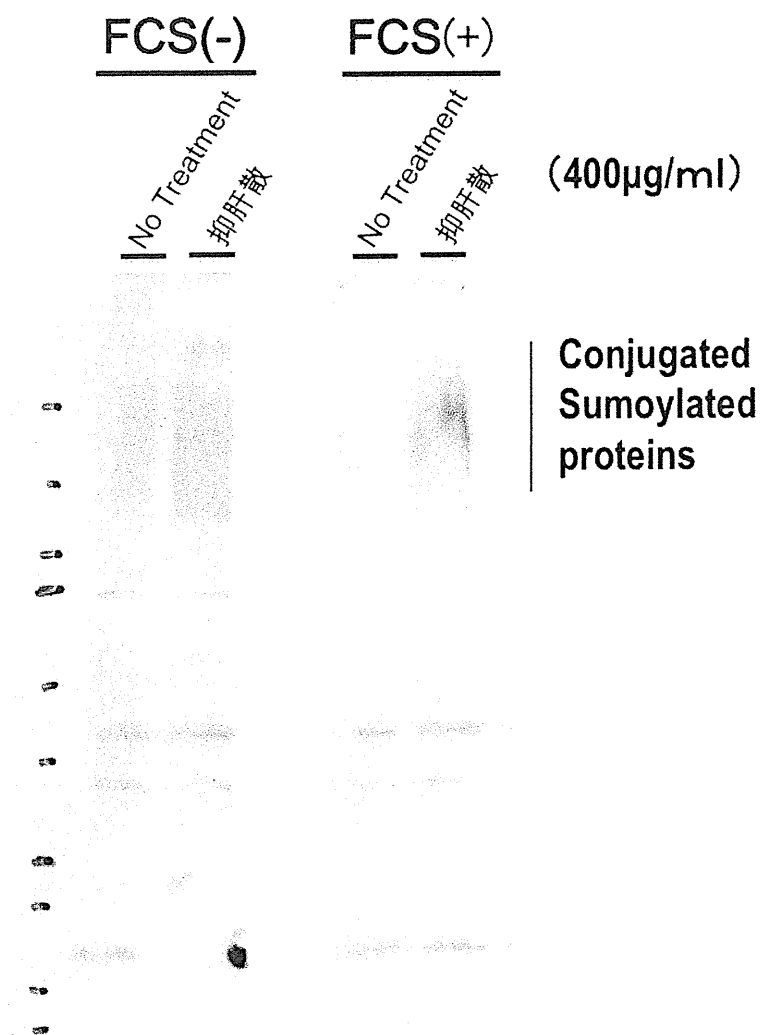


Figure 2 抑肝散処理による SUMO 化の促進効果。血清の有無にかかわらず抑肝散処理により蛋白質の SUMO 化が促進された。SK-N-SH 細胞を使用。

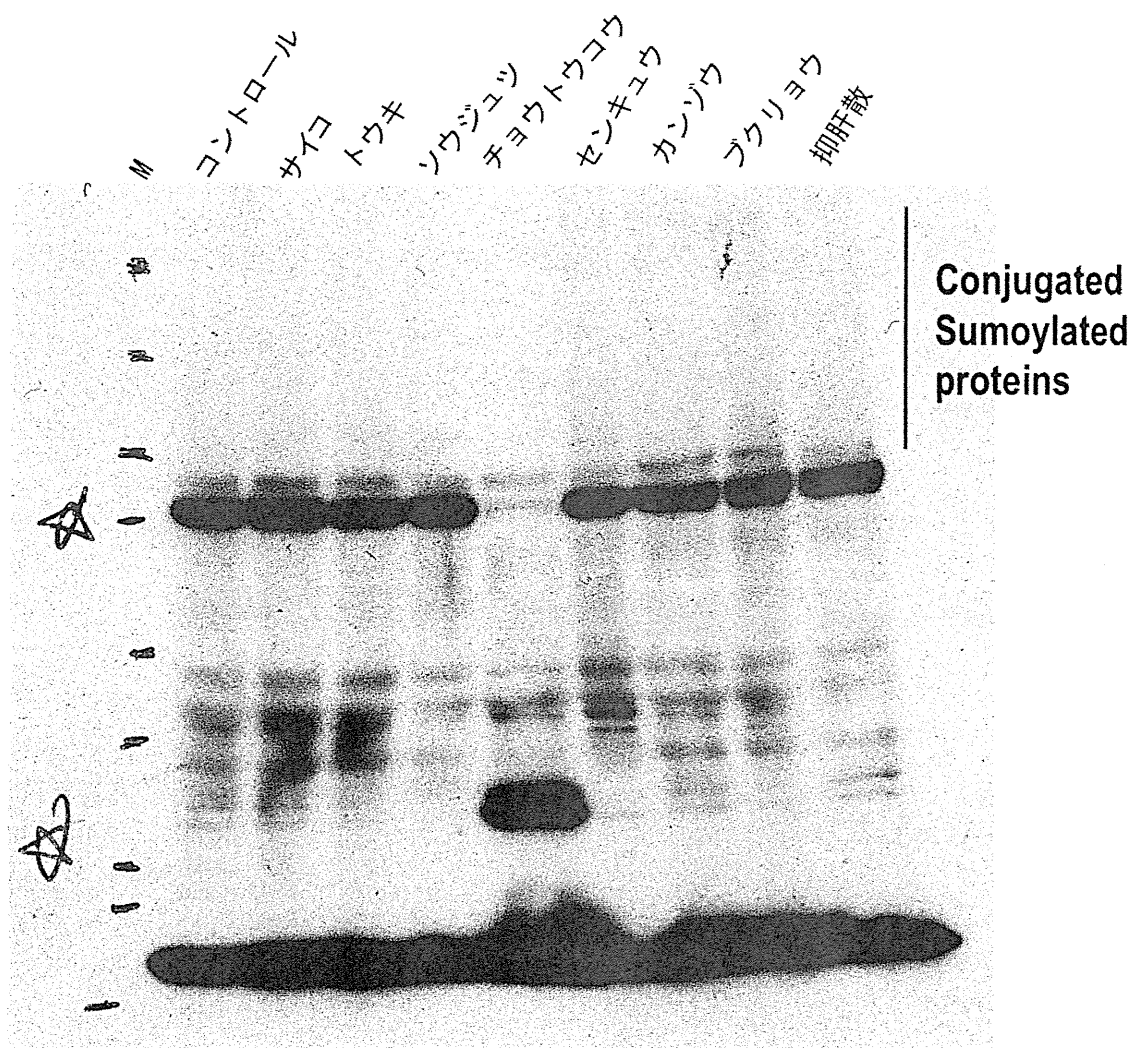


Figure 3 抑肝散の各構成生薬の処理による SUMO 化の促進効果。センキユウ、カンゾウ、ブクリョウの処理により蛋白質の SUMO 化が促進された。SK-N-SH 細胞を使用。

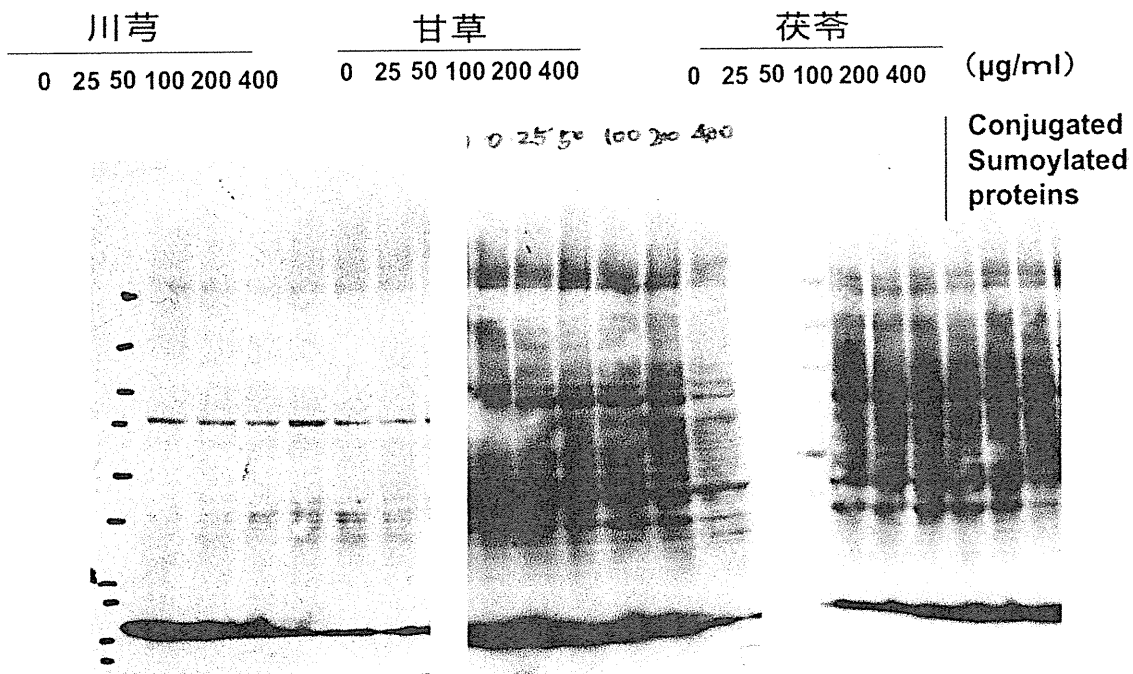


Figure 4 センキュウ、カンゾウ、ブクリョウによる SUMO 化の促進効果を濃度依存的に検討した。センキュウのみが濃度依存的に SUMO 化の促進効果を示した。SK-N-SH 細胞を使用。

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 β セクレターゼ阻害成分の探索

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。アルツハイマー病は脳内にアミロイド β ペプチドからなるアミロイド線維が沈着してできる老人斑を広範に認められる神経変性疾患であり、その産生原因の一つである β セクレターゼの阻害剤の開発はアルツハイマー病治療薬に繋がる可能性を秘めている。本研究では、認知症ならびに統合失調症に効果を示す漢方処方である抑肝散中の構成生薬抽出物について β セクレターゼ阻害活性をスクリーニングした結果について報告する。

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。このような背景の下、我々は抑肝散中のセンキュウの熱水抽出物ならびにフェルラ酸が神経芽細胞腫（SK-N-SH）における、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誘導アポトーシス抑制効果を示すことを見出してきた。

一方、アルツハイマー病は脳内にアミロイドβペプチドからなるアミロイド線維が沈着してできる老人斑を広範に認められる神経変性疾患であることが知られており、その産生原因の一つであるβセクレターゼ阻害剤の開発はアルツハイマー病治療薬に繋がる可能性を秘めている。現在、アルツハイマー病治療薬としてはアセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジル、NMDA受容体拮抗薬であるメマンチンなどが知られているが、βセクレターゼ阻害剤はアルツハイマー病治療の新たな選択肢として期待されている。

本研究では、認知症ならびに統合失調症に効果を示す抑肝散中の構成生薬であるソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコ、カンゾウ、チョウトウコウ、センキュウよりメタノールにより低分子成分を抽出後、脂溶性ならびに水溶性分画を調製し、各分画についてβセクレターゼ阻害活性を測定した結果について報告する。

B. 研究方法

B.1. メタノール抽出物の調製

8種類の生薬（*Cnidium officinale*、*Poria cocos*、*Bupleurum falcatum*、*Atractylodes lancea*、*Uncaria sinensis*、*Uncaria rhynchophylla*、*Angelica acutiloba*、*Glycyrrhiza uralensis*、約50g）を500 mLのメタノール中、80℃、3時間加熱還流しながらメタノール抽出物を回収した。各生薬からの抽出量および収率は以下の通りである。
Cnidium officinale : 15.15g (29.46%)、*Poria cocos* : 0.84g (1.6%)、*Bupleurum falcatum* : 16.73g (31.03%)、*Atractylodes lancea* : 15.62g (30.93%)、*Uncaria*

sinensis : 6.22g (12.44%)、*Uncaria rhynchophylla* : 9.67 g (19.24%)、*Angelica acutiloba* : 21.87g (43.47%)、*Glycyrrhiza uralensis* : 18.27g (33.49%)。次に各メタノール抽出物を酢酸エチル-水 (200 : 200 mL) を用いて抽出し、酢酸エチル層と水層を濃縮乾固した。各生薬からの抽出量および収率は以下の通りである。
Cnidium officinale : EtOAc分画 0.78g (2.26%) / 水分画 9.19g (26.67%)、*Poria cocos* : EtOAc分画 0.11g (0.47%) / 水分画 0.27g (1.13%)、*Bupleurum falcatum* : EtOAc分画 1.89g (4.99%) / 水分画 9.85g (26.05%)、*Atractylodes lancea* : EtOAc分画 4.06g (11.93%) / 水分画 6.47g (19.00%)、*Uncaria sinensis* : EtOAc分画 0.93g (3.60%) / 水分画 2.14g (8.29%)、*Uncaria rhynchophylla* : EtOAc分画 1.68g (4.85%) / 水分画 4.94g (14.26%)、*Angelica acutiloba* : EtOAc分画 0.93g (3.39%) / 水分画 10.93g (40.08%)、*Glycyrrhiza uralensis* : EtOAc分画 3.26g (8.24%) / 水分画 9.99g (25.25%)。

B.2. βセクレターゼ阻害活性の測定

βセクレターゼ (S-4195) はSIGMAより購入した。βセクレターゼの基質ペプチド (MOCac-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-Lys(Dnp)-Arg-Arg-NH₂, 3212-v)、ポジティブコントロールペプチド (Lys-Thr-Glu-Glu-Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Sta-Val-Ala-Glu-Phe, 4378-v) はペプチド研究所より購入した。βセクレターゼは0.1% TritonX-100を含む20 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で50倍希釈し使用した。基質ペプチド(3212-v)は1 mMの濃度となるようにDMSOで溶解し、

使用直前に、0.1% TritonX-100 を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) で 50 倍希釈し使用した。また、ポジティブコントロールペプチド (4378-v) は 1 mM の濃度となるように DMSO で溶解し使用した。全ての使用は DMSO に溶解し実験に用いた。

アッセイは 175 μ L の 0.1 % TritonX-100 を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) に試料の DMSO 溶液 5 μ L を加え、ボルテックスミキサーにより混合し、50 倍希釈した β セクレターゼ溶液 (10 μ L) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。10 μ L の基質ペプチド (3212-v) を加えよく混和後、37°C で 60 分間酵素反応を行った。1 時間後、2.5 mM の酢酸ナトリウム溶液 (200 μ L) を加えて反応を止め、励起波長 328 nm、蛍光波長 393 nm の蛍光強度を測定した。ポジティブコントロールとしてポジティブコントロールペプチド (4378-v、12.5 μ M)、ネガティブコントロールには DMSO を用いた。

B.3. サイコ (*Bupleurum falcatum*) 酢酸エチル抽出物の分画

サイコの熱水抽出物は PLC シリカゲルプレート (Silica gel 60F254、2 mm、20 x 20cm) を用いて分画した。サイコ酢酸エチル抽出物 (約 350 mg) を PLC シリカゲルプレートの下端 2 cm の位置にスポットした。CHCl₃:MeOH:H₂O (10:3:1) を展開溶媒としてシリカゲルクロマトグラフィーを行った。展開後、UV ランプを用いてシリカゲルプレート上の試料を可視化し、移動度の異なる 5 つのバンド部分のシリカゲルを剥ぎ取り、メタノールにより分離さ

れた成分を回収し 5 つの分画を得た。抽出量および収率は以下の通りである。分画 1 : 59.4 mg (17.03%)、分画 2 : 49.6g (14.22%)、分画 3 : 19.3g (5.53%)、分画 4 : 22.3g (6.39%)、分画 5 : 30.3g (8.60%)。

B.4 サイコ酢酸エチル分画の液体クロマトグラフ-エレクトロスプレー質量分析計による分析

装置には Agilent 6130 Quadruple LC/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 0.26 mL/min、カラム温度は 40 °C とした。検出は紫外外部吸収検出 (254 nm) により行った。移動相の溶液 A には 10%アセトニトリル/H₂O、溶液 B には 90%アセトニトリル/H₂O を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 10 分間で溶出液 B を 10 % から 30% 上昇させ、溶出液 B が 20 分に 50 %、30 分に 65 %、その後 10 分間で 95% となるようにグラジエント溶出した。サイコ酢酸エチル分画から得られた 5 分画は DMSO 溶液とし、試料溶液 5 μ L を分析に使用した。質量分析はスプレー電圧 2.5kV、スプレー温度 200 °C としてネガティブイオンモード、質量範囲は m/z100~1000 により測定した。

C. 研究結果

C.1 抑肝散構成生薬抽出物の β セクレターゼ阻害活性

β セクレターゼ阻害活性の測定には、分子内に発蛍光団 (7-methoxycoumarin) と消光団 (2,4-dinitrophenyl group) を併せ持ち、 β セクレターゼ活性を受け、ペプチド

鎖切断により発蛍光する合成ペプチドを使用した。 β セクレターゼ阻害活性は、 β セクレターゼ活性を受け 500 pmol の基質ペプチドから生じる蛍光強度に対し、生薬抽出物による蛍光強度減少率を阻害活性として評価した。抑肝散構成生薬抽出物の β セクレターゼ阻害活性測定の結果を **Table 1** に示す。8 種類の生薬から得た 24 分画について β セクレターゼ阻害活性を調べたところ、ソウジュツ (*Atractylodes lancea*) の MeOH 抽出物についてわずかに蛍光強度の減少がみられたものの濃度依存性はなく、その他の生薬についても高い阻害活性を示すと考えられる生薬はなかった。また、H₂O 抽出物については、トウキ (*Angelica acutiloba*) とカンゾウ (*Glycyrrhiza uralensis*) において蛍光強度の減少がみられたものの高い阻害活性を示す生薬はなかった。一方、酢酸エチル分画については、サイコ (*Bupleurum falcatum*) は 50 mg/mL の濃度 45% の β セクレターゼ阻害活性が見られた。次に、サイコ酢酸エチル分画による β セクレターゼ阻害活性の濃度依存性を調べた。結果を **Fig.1** に示す。25 μ M のポジティブコントロールペプチドを用いた場合、 β セクレターゼの阻害活性は 93.4%であった。一方、サイコ酢酸エチル分画の阻害活性は 0.5 μ g/mL で 1.3、25 μ g/mL で 51.9%、500 μ g/mL で 71.7%であり、濃度依存的に β セクレターゼ活性を阻害した。以上の結果から、抑肝散中の構成生薬のうち、サイコ (*Bupleurum falcatum*) 中には β セクレターゼに対し阻害活性を示す成分が含まれ、その活性成分が脂溶性成分であると考えられた。

C.2 サイコ酢酸エチル分画の β セクレターゼ阻害活性

前項の抑肝散中の構成生薬抽出物の β セクレターゼ阻害活性のスクリーニングから、サイコ酢酸エチル抽出分画が β セクレターゼ阻害活性を示すことがわかった。そこで、サイコ酢酸エチル分画をシリカゲルクロマトグラフィーにより分画し、得られた各分画について β セクレターゼ阻害活性を調べた。PLCシリカゲルクロマトグラフィーによる分画結果を **Fig.2** に、各分画の β セクレターゼ阻害活性を **Fig.3** に示す。**Fig.2** に示すように PLCシリカゲルクロマトグラフィーにより移動度の異なる 5 つの分画が得られた。次に各分画について β セクレターゼ阻害活性を調べたところ、分画 2 は全く阻害活性を示さなかった。一方、分画 1、分画 3 ~ 分画 5 についてはそれぞれ 56.9%、27.1%、30.9%、51.9%の阻害活性を示した。これまでに β セクレターゼ活性を阻害する天然物中の成分としては、biflavonoid 類、catechin 類などの多価フェノール類が報告されているものの、サイコ酢酸エチル分画中に含まれると考えられる、Saikosaponin 類やそのアグリコンである Saikogenin、Stigmasterol、ポリアセチレン類である Saikodiyne などが β セクレターゼ阻害活性を示すとの報告はなく、サイコ中の成分は新規 β セクレターゼ阻害活性であると考えられた。

C.3 サイコ酢酸エチル分画の成分分析

β セクレターゼ阻害活性を示すサイコ酢酸エチル分画中の成分を追跡するため、液体クロマトグラフ-エレクトロ

スプレー質量分析計による分析を行った。5つの分画のうち50%以上の阻害活性を示した分画1と分画5の分析結果について Fig.4 に示す。分画1についてはトータルイオンクロマトグラム上にピークは観察されなかった。分画1は脂溶性の高い成分を含むため、C18逆相カラムを用いた分析条件では保持が強く、アセトニトリルを用いた溶出条件では分析時間内に溶出できなかったことが考えられる。一方、分画5については、トータルイオンクロマトグラム上に10本以上のピークを与え、その殆どが Saikosaponin 類及びそのアセチル体であることがわかった (Table 2)。すなわち、ピーク1は m/z985 を示し、Saikosaponin C、H あるいは I、ピーク2は m/z811 を示し、Saikosaponin B3、あるいは B4、ピーク4、5、7は m/z779 を示し、Saikosaponin A、B1、B2、D あるいは G であると考えられた。また、ピーク6とピーク8はそれぞれ m/z822 を示し、グルコースの2、3、4、6位のいずれかがアセチル化された Saikosaponin A、B1、B2、D あるいは G であると考えられた。サイコ中の主要成分であるサイコサポニンについては Saikosaponin A、B2、D が標準品として入手可能であるため、 β セクレターゼ阻害活性を測定したがいずれも明らかな阻害活性を示さなかったことから、 β セクレターゼ阻害活性を示す成分は O-acetyl-saikosaponin 類あるいはその

他の成分であると考えられた。

D. 考察

本研究では、抑肝散中の構成生薬であるソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコ、カンゾウ、チョウトウコウ、センキュウの抽出物について β セクレターゼ阻害活性のスクリーニングを行い、新規 β セクレターゼ阻害活性成分の発見を目指した。スクリーニングの結果、サイコのメタノール抽出物より分画した酢酸エチル分画に β セクレターゼ阻害活性を見出した。一方、活性を示した酢酸エチル分画中の成分分析の結果、主要な成分は Saikosaponin 類であったが、Saikosaponin A、B2、D には阻害活性がないことから、 β セクレターゼ阻害活性を示す成分は saikosaponin 類のアセチル体、Stigmasterol、ポリアセチレン類である Saikodiyne、その他の成分であると考えられた。

今年度の成果を踏まえ次年度は、サイコのメタノール抽出物を詳細に分画し、 β セクレターゼ阻害活性を示す成分の特定を目指していく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

なし

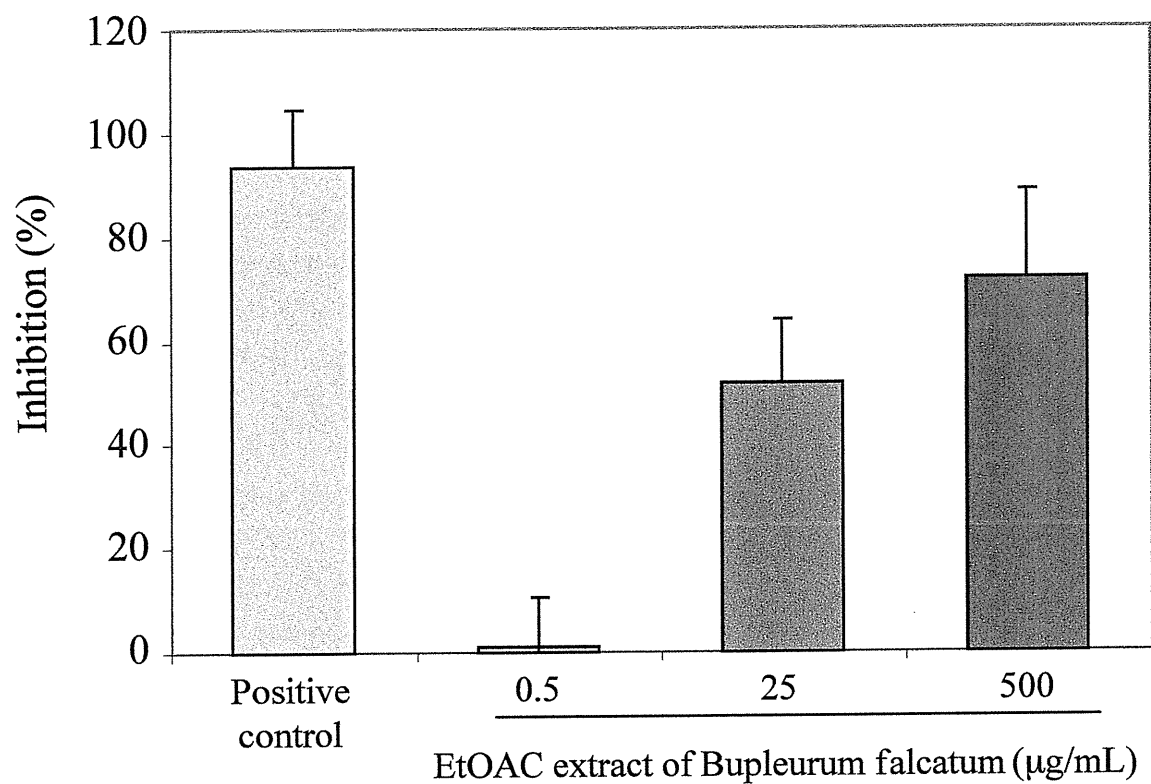


Fig.1 サイコ酢酸エチル抽出分画のβセクレターゼ阻害活性

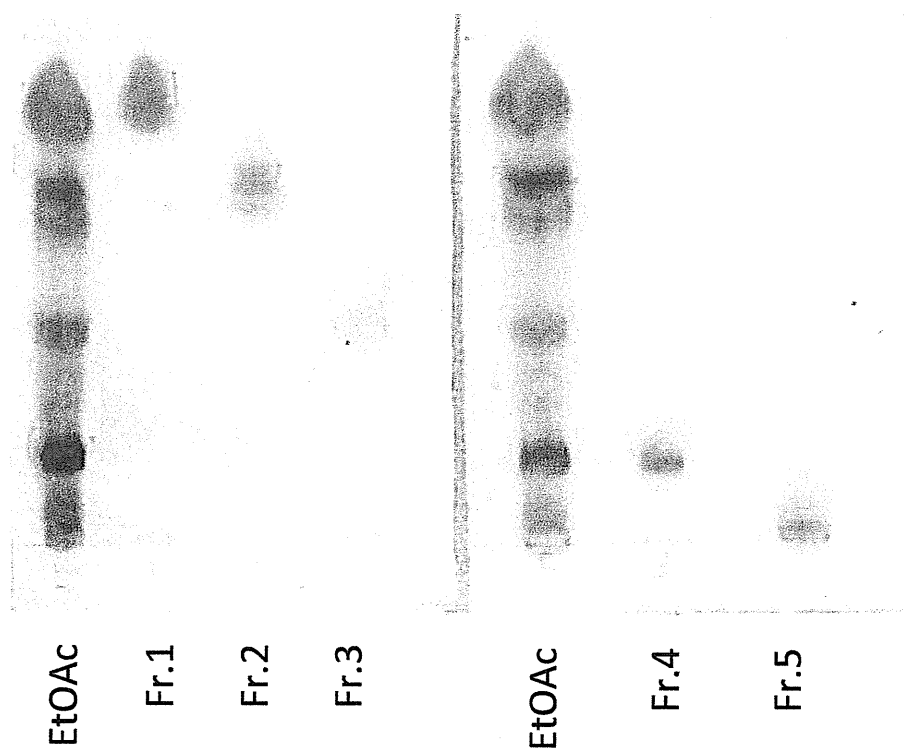


Fig.2 シリカゲルクロマトグラフィーにより分画された酢酸エチル分画の TLC による確認

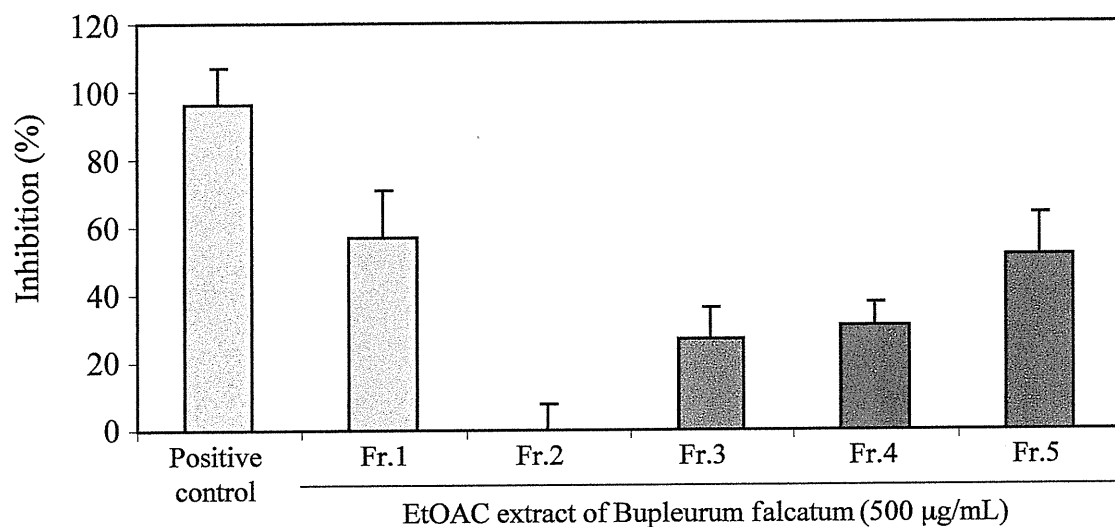


Fig.3 シリカゲルクロマトグラフィーにより分画された酢酸エチル分画のβセクレターゼ阻害活性

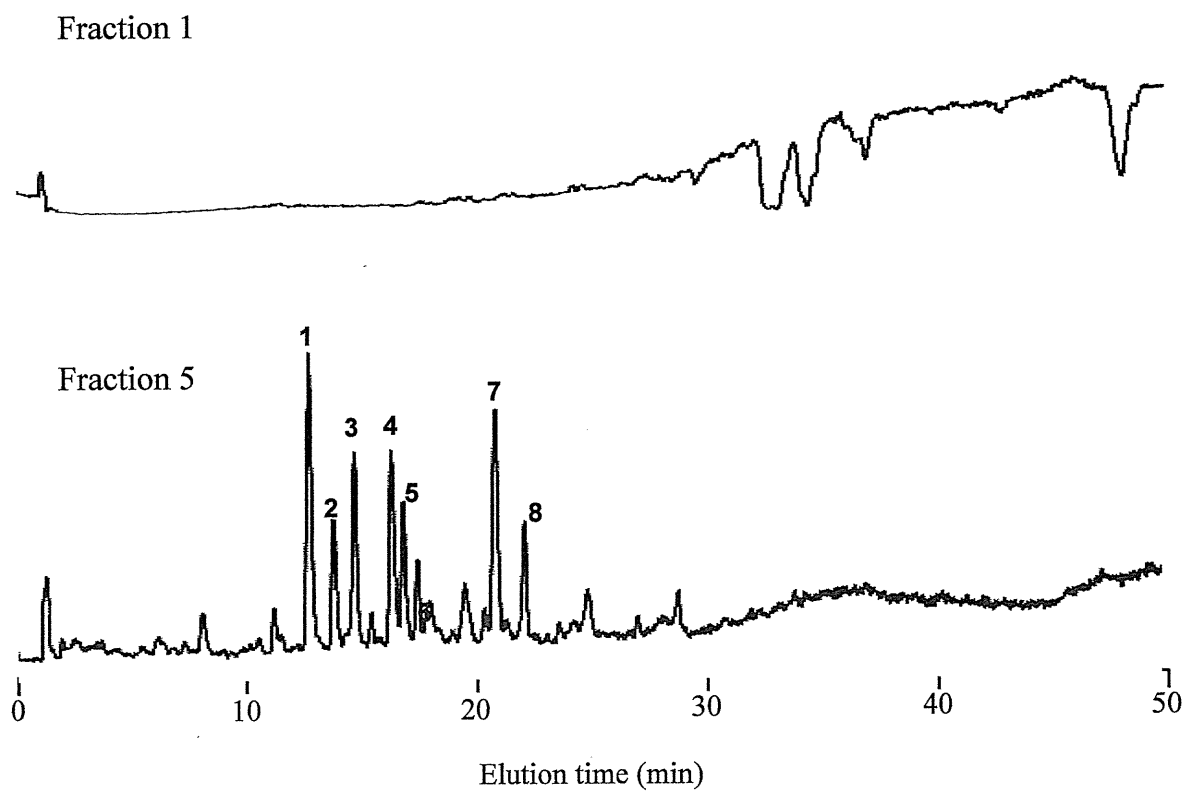


Fig.4 液体クロマトグラフ-エレクトロスプレー質量分析計による酢酸エチ