

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

漢方薬スクリーニングによる新規パーキンソン病治療成分の
同定・その作用機序解明に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 佐藤 栄人
 齊木 臣二
 井本 正哉
 田代 悦

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

漢方薬スクリーニングによる新規パーキンソン病治療成分の
同定・その作用機序解明に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 佐藤 栄人
斉木 臣二
井本 正哉
田代 悦

平成 24(2012)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- 漢方薬スクリーニングによる新規パーキンソン病治療成分の同定・
その作用機序解明に関する研究 1
服部 信孝

II. 分担研究報告

1. 大黄甘草湯のPDモデルマウスへの薬効に関する研究 5
佐藤 栄人
2. 甘草のPDモデルマウスへの薬効に関する研究 8
斉木 臣二
3. 大黄甘草湯・調胃承気湯のPC12D細胞への保護効果に関する研究 10
井本 正哉
4. 神経細胞死抑制効果を持つ甘草に含まれる活性成分に関する研究 15
田代 悦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷 25

漢方薬スクリーニングによる新規パーキンソン病治療成分の同定・その作用機序解明に関する研究

研究代表者： 服部信孝 順天堂大学医学部神経学 教授

研究要旨

本研究の目的は、同定された2種のヒット漢方薬（大黄甘草湯・調胃承気湯）に含まれ、強い細胞死抑制効果を持つ甘草に含まれる単一活性成分を同定し、その構造決定・結合蛋白同定およびコード遺伝子の過剰発現・ノックダウンにより作用機序を確認・解明すること、さらに MPTP 投与 PD モデルマウスにて甘草およびその活性成分の薬効を証明することである。

現在まで PD 発症機序は完全には解明されておらず、治療法は対症療法に留まる。未曾有の高齢化が進行する我が国において、患者人口の増大する PD の根本的治療が希求されており、特に神経保護作用による PD 症状進行抑制・予防薬の開発は保健医療・介護福祉の点からもその必要性が重要視されている。我々研究グループは我が国の PD 研究をリードし、特に PD に関与するミトコンドリア機能障害・細胞死解析（ケミカルバイオロジーによる）について、細胞・マウスによる多面的な解析が可能な随一のグループである。

平成 22 年度の多面的な漢方薬ライブラリースクリーニングを完遂し、ヒット漢方薬（大黄甘草湯・調胃承気湯）を同定し、平成 23 年度には両ヒットの含有率が 2:1 であることから両生薬に着目し、甘草が有効成分として重要であることを細胞レベルで確認した。さらに活性成分精製を進め、活性成分のスペクトル解析を終了している。

in vivo では細胞死アッセイ同様、ミトコンドリア毒(MPTP)を腹腔内投与した MPTP 急性 PD モデルを用いた解析により、ヒット漢方薬の有効濃度を検討し、大黄甘草湯 1 g/kg（調胃承気湯 1 g/kg も同様）が強い毒性を持つこと、大黄甘草湯 0.5 g/kg が運動機能改善効果を持つこと、大黄甘草湯 0.2 g/kg では改善効果はないことを確認し、大黄甘草湯 0.5 g/kg が治療に相当であることを確認した。

最終平成 24 年度には、甘草に含まれる活性成分同定、構造決定・結合蛋白同定および作用機序解明を *in vitro* にて行い、さらに *in vivo* では甘草単体および活性成分の薬効を MPTP 急性 PD モデルマウス、及びミトコンドリア依存的アポトーシス誘導効果の強い MPTP 慢性 PD モデルマウスを新たに用いて甘草・活性成分の薬効を検討する。

A. 研究目的

漢方薬スクリーニングにてヒットした大黄甘草湯・調胃承気湯に含まれる甘草の活性成分同定・結合蛋白同定・構造解析を進め、更に PD マウスモ

デルでの甘草単体・活性成分の薬効を証明することを目的とする。

B. 研究方法

詳細は各分担研究者の項に譲るが *in vitro* 系にて、活性成分の検索を、*in vivo* 系にて PD モデルマウ

スにおける大黄甘草湯・調胃承気湯、及び甘草の薬効を評価した。

1. MPP+添加分化型 PC12D 細胞による細胞死抑制効果を指標とした大黄と甘草の比率と細胞死抑制効果の評価

神経毒 rotenone および MPP+を添加した PC12D 細胞の細胞死を output とし、大黄と甘草の比率と細胞死抑制効果を連続的に評価した。

2. MPP+添加分化型 PC12D 細胞による細胞死抑制効果を指標とした甘草中有効活性成分の抽出

1.同様のモデル細胞にて、甘草の有効活性成分抽出を 10g の甘草から行った。

3. MPTP 投与型 PD モデルマウスでの漢方薬の薬効評価

C57BL/6J マウスに、大黄甘草湯、調胃承気湯、甘草単体を 0.2、0.5、1 g/kg の濃度で第 1-7 日目まで連続経口投与し、第 8 日目に MPTP を腹腔内投与し、第 9、10、11、15 日目に自発運動機能を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は全て、動物愛護法・日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、
「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」にのっとり行った。

C. 研究結果

結果 1 : 大黄と甘草の比率を変更しながら細胞死抑制効果を評価したところ、甘草比率が高いほど、細胞死抑制効果が強いことを確認した。

結果 2 : 結果 1 から、甘草に最も強い有効活性成分が含まれていると判断し、活性成分の抽出を試みたところ、有効活性成分が同定された。

結果 3 : 大黄甘草湯 0.5 g/kg にて著明な自発運動機能改善効果を確認できた。また甘草については十分な薬効を得られなかった。

D. 考察

ヒット漢方薬は、オートファジー経路では無く、アポトーシスを抑制することが確認され、さらに大黄甘草湯・調胃承気湯両方に含まれる、甘草に有効成分が含まれ、さらに同物質中の有効活性成分によって抗細胞死効果が認められることが明らかとなった。また有効成分についても現在構造決定を進めており、単一成分確定が近々実現する見込みである。

また *in vivo* では大黄甘草湯では十分な薬効が認められるものの、甘草単体では効果が認められないことから、有効活性成分吸収には大黄成分が必要である可能性が示唆された。

E. 結論

甘草中に含まれる有効活性成分 2 種は、パーキンソン病モデル細胞での細胞死を抑制する。また大黄甘草湯の 0.5 g/kg 投与にて、パーキンソン病モデルマウスの症状が大きく改善される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-87 (2011)
2. Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton

leak, but to respiratory chain defects.

Neurobiol Dis 41:111-8 (2011)

3. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N.
Genetic mutations and functions of PINK1.
Trends Pharmacol Sci 32:573-80 (2011)
4. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S,
Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F,
Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H,
Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with
synaptic membranes. *Neurobiol Dis*
43:651-62 (2011)
5. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular
pathogenesis of Parkinson disease: update.
J Neurol Neurosurg Psychiat 83:430-6
(2012)

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

大黃甘草湯の PD モデルマウスへの薬効に関する研究

研究分担者： 佐藤栄人 順天堂大学医学部神経学 准教授

研究要旨

本分担研究では、研究分担者である井本らが同定したパーキンソン病モデル細胞の細胞死を抑制し、かつミトコンドリア膜電位を回復させる効果を持つ大黃甘草湯（以下 DK）の薬効についての有効濃度を検討することを目的とする。MPTP 添加パーキンソン病モデルマウスにて証明することを目的とする。C57BL/6J マウスに、7 日間 0.2、0.5、1.0 g/kg の DK を添加するグループと、コントロールとして溶媒である水を添加するグループを作成し、第 8 日目に MPTP を添加した。運動機能の回復を、自発運動検査にて第 9、10、11、15 日目に自発運動検査を施行した。昨年同様高濃度の DK 投与は、MPP+によって誘発される自発運動機能の低下をさらに助長し、0.2 g/kg では薬効はなく、0.5 g/kg によって著明な自発運動機能の回復効果を認めた。

A. 研究目的

共同研究者井本らが、2 種類のアポトーシス抑制、ミトコンドリア膜電位回復効果を持つ大黃甘草湯の薬効・濃度依存性を、パーキンソン病モデルマウスにて確認することを目的とする。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスを用いた。

1. 漢方薬添加のプロトコール

C57BL/6J マウスをそれぞれ H₂O-生食群、H₂O-MPTP 群、DK-生食群、DK-MPTP 群に分け、薬剤または H₂O を 7 日間投与し、第 8 日目に MPTP または生食を腹腔内投与した。大黃甘草湯の使用濃度は 1 g/kg、0.5 g/kg、0.2 g/kg の 3 種類、MPTP 投与量は 20 mg/kg を使用した。

2. 自発運動検査： 第 9、10、11、15 日目にケージ内自発運動検査（赤外線モニターを用い、15 分間の運動数を自動カウント）にて自発運動量を測定。

3. 生化学検査・病理組織学的検査

脳実質の取り出しは終了しているが、2012 年 6 月に施行予定である。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て、動物愛護法・日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、 「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」にのっとり行った。

C. 研究結果

結果 1： DK（大黃甘草湯）の薬効について図 1 にデータを示す。予想に反して、1 g/kg DK の投与により MPTP の毒性が増強され、自発運動が有意に低下した（図 1）。通常第 15 日目には MPTP 添加による自発運動機能の低下は回復するが、DK 投与により回復しなかったこと。

結果 2 : 0.2 g/kg DK 投与にて、自発運動機能検査試験の結果はコントロール群に比し、変化を認めなかった。

結果 3 : 0.5 g/kg DK 投与にて、自発運動機能検査試験の結果はコントロール群に比し、有意に改善していた。

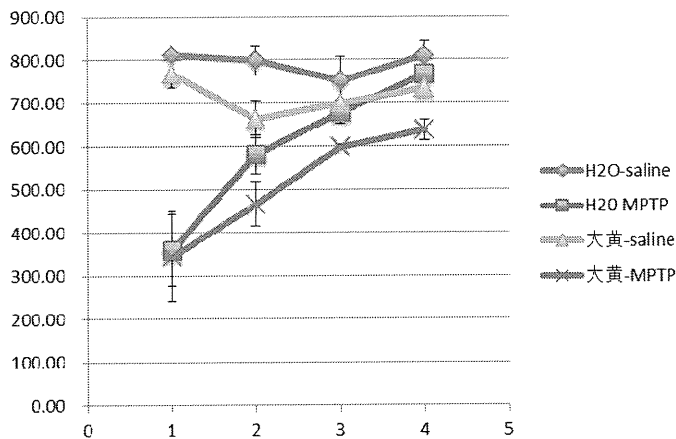


図 1. DK 1 g/kg では毒性が増す。

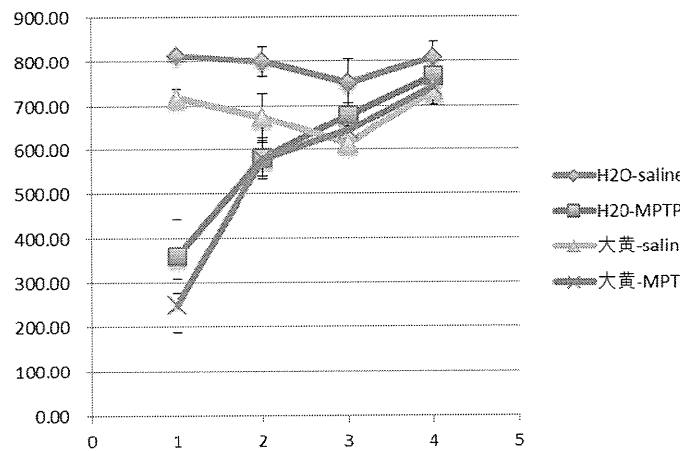


図 2. DK 0.2 g/kg では、改善効果は認めない。

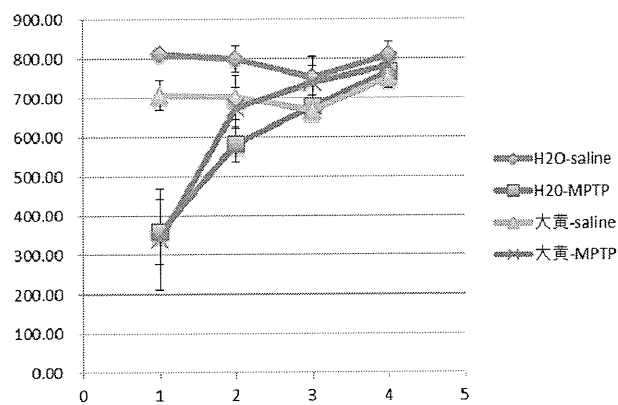


図 3. DK 0.5 g/kg にて症状改善効果あり。

D. 考察

昨年施行した MPTP 投与 PD モデルマウス実験と同様に、DK 1 g/kg では治療効果はなく、むしろ症状を増悪させた。また DK 0.2 g/kg では症状改善効果はなく、DK 0.5 g/kg は明らかな症状改善効果を認めた。以上から、選択的黒質変性に対して、DK の適切な量の投与は、治療効果が期待できると考えられた。

平成 24 年度（最終年度）は、同マウスの病理学的検討を行い、治療効果を証明する。

E. 結論

大黃甘草湯は 0.5 g/kg にて黒質神経細胞死を抑制する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-87 (2011)
- Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis* 41:111-8 (2011)

3. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N.
Genetic mutations and functions of PINK1.
Trends Pharmacol Sci 32:573-80 (2011)
4. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S,
Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F,
Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H,
Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with
synaptic membranes. *Neurobiol Dis*
43:651-62 (2011)
5. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular
pathogenesis of Parkinson disease: update.
J Neurol Neurosurg Psychiat 83:430-6
(2012)

2. 学会発表

佐藤栄人 『家族性パーキンソン病とミトコンド
リア品質管理の異常』 第52回日本神経学会学術
大会 2011年5月18日 名古屋国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

甘草の PD モデルマウスへの薬効に関する研究

研究分担者： 齊木臣二 順天堂大学医学部神経学 准教授

研究要旨

本分担研究では、研究分担者である井本らが同定した、パーキンソン病モデル細胞の細胞死を抑制し、かつミトコンドリア膜電位を回復させる効果を持つ大黃甘草湯および調胃承気湯に含まれる甘草について、パーキンソン病モデルマウスでの薬効の有効性を評価することを目的とする。C57BL/6J マウスに、7日間 甘草 0.2 g/kg（大黃甘草 0.5 g/kg 中とほぼ同量の甘草を含有）を添加するグループと、コントロールとして溶媒である水を添加するグループを作成し、第 8 日目に MPTP を添加した。運動機能の回復を、自発運動検査にて第 9、10、11、15 日目に自発運動検査を施行した。甘草単体の投与では、自発運動改善効果を認めなかった。

A. 研究目的

共同研究者井本らが、2 種類のアポトーシス抑制、ミトコンドリア膜電位回復効果を持つ甘草の薬効を、パーキンソン病モデルマウスにて確認することを目的とする。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスを用いた。

1. 甘草添加のプロトコール

C57BL/6J マウスをそれぞれ H₂O-生食群、H₂O-MPTP 群、甘草-生食群、甘草-MPTP 群に分け、薬剤または H₂O を 7 日間投与し、第 8 日目に MPTP または生食を腹腔内投与した。甘草の使用濃度は 0.2 g/kg、MPTP 投与量は 20 mg/kg を使用した。

2. 自発運動検査： 第 9、10、11、15 日目にケージ内自発運動検査（赤外線モニターを用い、15 分間の運動数を自動カウント）にて自発運動量を測定。

3. 生化学検査・病理組織学的検査

脳実質の取り出しは終了しているが、2012 年 6 月に施行予定である。

（倫理面への配慮）

動物実験は全て、動物愛護法・日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、 「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」にのっとり行った。

C. 研究結果

結果 1： 甘草の自発運動検査による薬効評価を図 1 にデータを示す。予想に反して、甘草投与により MPTP の毒性が増強され、自発運動が有意に低下した。通常第 15 日目には MPTP 添加による自発運動機能の低下は回復するが、甘草投与により回復しなかったこと。

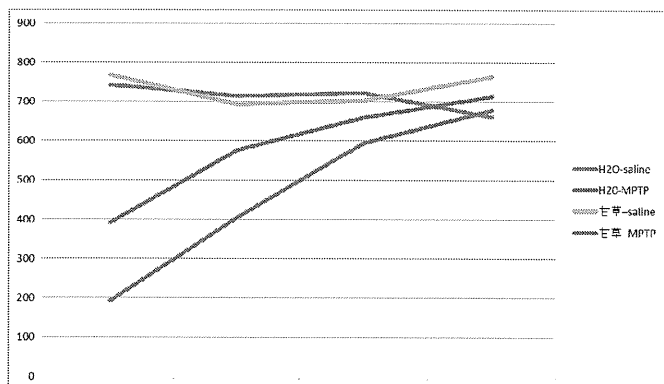


図 1. 甘草投与により、自発運動機能はコントロールに比し、改善が遅れた。

D. 考察

甘草単体での投与で PD マウスモデルにて薬効を認めなかったことから、有効濃度の検討が必要であることが考えられた。また大黃甘草湯は、大黃・甘草=2:1 で含むことから、同比率での大黃の必要性が考えられた。平成 24 年度（最終年度）は、同マウスにて様々な甘草濃度の経口投与の薬効検討を行い、さらに井本らが同定を進めている甘草の単一有効成分の投与も行い、治療効果を証明する。

E. 結論

甘草単体は高濃度で MPTP の毒性を上昇させる可能性が考えられた。薬効については慎重な投与量の調整の必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by

enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition.

Autophagy 7:176-87 (2011)

2. Amo T, Sato S, Saiki S, Wolf AM, Toyomizu M, Gautier CA, Shen J, Ohta S, Hattori N. Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. *Neurobiol Dis* 41:111-8 (2011)
3. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci* 32:573-80 (2011)
4. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiol Dis* 43:651-62 (2011)
5. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 83:430-6 (2012)

2. 学会発表

Saiki S, Sasazawa Y, Petzer YP, Kawauchi Y, Yamada D, Fujimaki T, Kobayashi H, Ishikawa KI, Kawamura M, Imamichi Y, Imoto M, Hattori N. "EFFECTS OF CAFFEINE AND CAFFEINE ANALOGUES ON AUTOPHAGY IN CULTURED CELLS" Autophagy in health and disease. 30 October - 4 November, 2011, In Ma'ale Hachamisha, Israel

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

大黄甘草湯・調胃承気湯の PC12D 細胞への保護効果に関する研究

研究分担者： 井本正哉 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 教授

研究要旨

「パーキンソン病」は、ドーパミン神経細胞の細胞死によりドーパミンが低下し運動シグナルが正常に伝わらなくなる神経変性疾患であるが、治療法はドーパミン量を維持する対症療法しか存在せず完治治療には至っていない。したがって、新たなパーキンソン病の治療薬開発が望まれている。特にパーキンソン病の症状進行の抑制・予防薬の開発は保健医療・介護福祉の点からもその必要性が重要視されている。これまでにパーキンソン病モデル細胞を用い、(株)ツムラから提供された漢方薬ライブラリーからパーキンソン病の症状を緩和する化合物のスクリーニングを行い、主に便秘薬として用いられ、大黄、甘草が共通生薬として含まれているライブラリー番号 No.69（調胃承気湯）および No.79（大黄甘草湯）に神経細胞保護効果があることを見出した。そこで今回はそれぞれのライブラリーから活性物質の単離・精製を行なった。

A. 研究目的

パーキンソン病モデルを用いた漢方薬スクリーニングによりヒットした「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」から有効成分の単離精製及び構造決定、さらに結合蛋白質の同定を行うことで、PD の作用機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

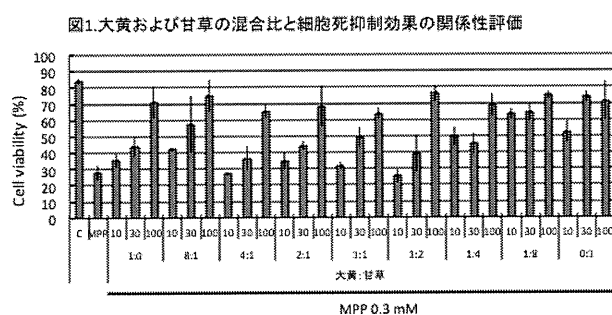
分化させた PC12D 細胞に神経毒である Rotenone もしくは MPP⁺を添加し、48 時間後に誘導される細胞死を抑制するサンプルを、トリパンプルー細胞外排出試験法により 128 の漢方薬ライブラリーからスクリーニングした。その結果、ヒットしたサンプルに対して、細胞死抑制活性を指標に、各種クロマトグラフィーを用いて活性成分の単離精製を行った。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

昨年度までに、Rotenoneにより誘導される細胞死を30%以上抑制するサンプルをヒットとし、「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」を得た。また、「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」はMPP⁺による細胞死およびミトコンドリア膜電位低下も回復させることを確認した。



本実験ではまず、「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」に共通生薬成分として含まれる大黄と甘草の混合比が両漢方薬とも2:1であることに着目し、共通生薬成分の混合比と細胞死抑制効果の関係性について評価した。その結果、甘草の含有量に比例して細胞死抑制効果が増強されることが確認出来た(図1)。そこで、甘草単体からの活性成分の抽出を試みた。

甘草10 g(粉末)を90%エタノールにより抽出後、さらに酢酸エチルにより約1 gの抽出物を得た。このうち600 mgからパーキンソン病モデルを用いた細胞死抑制活性を指標に、各種クロマトグラフィーを用いて活性成分の単離精製を行った。その結果、IC₅₀(MPP⁺による細胞死を50%阻害する濃度)が0.1・g/mlよりも強く、LC/MS分析において246 nm, 347 nmに極大吸収を示す活性成分0.1 mgを得た(図2,3,4)。

図2.甘草成分からの活性成分の単離精製

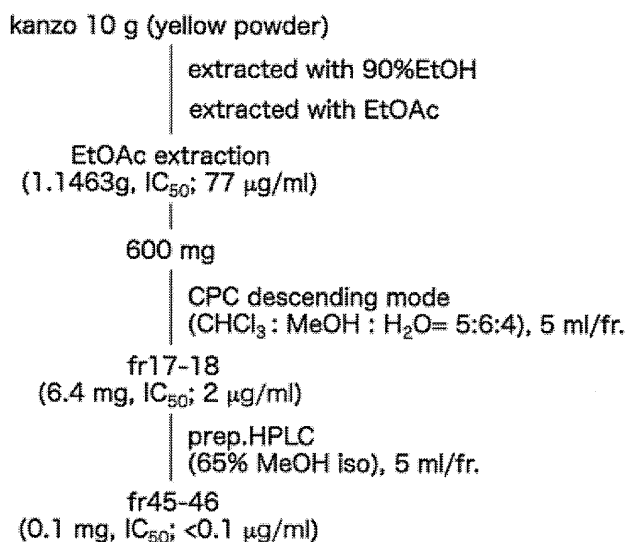


図3.活性成分の細胞死抑制効果

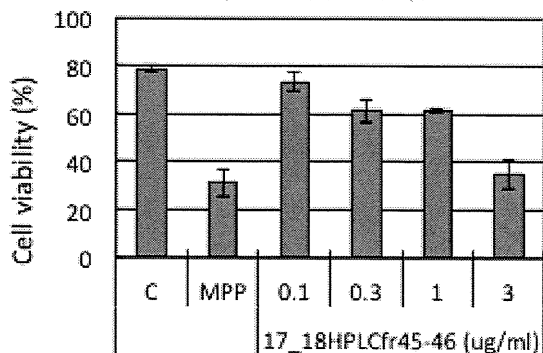
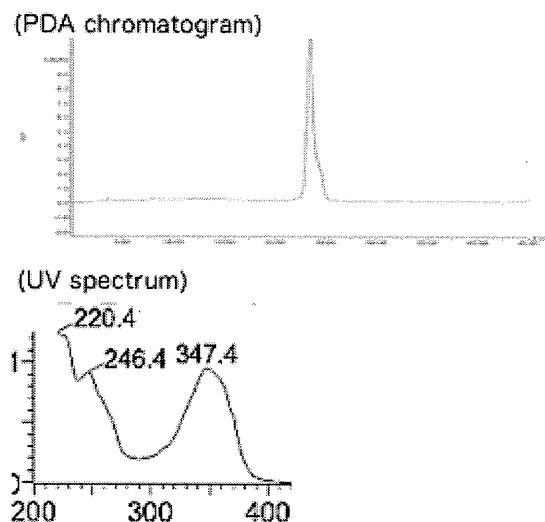


図4.活性成分のLC/MSの分析結果



D. 考察

パーキンソン病はドーパミン産生細胞に細胞死が誘導される

ことで、ドーパミン量が低下し運動シグナルが正常に伝わらなくなり運動障害を引き起こす神経変性疾患である。パーキンソン病の発症機序は未解明な部分が多く、治療法は対症療法に留まっている。今回、進行予防・抑制効果を示す新たなパーキンソン病治療薬の取得を目的に漢方薬ライブラリーよりスクリーニングを行った結果、「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」の抽出物に細胞保護効果があることを見出した。そして「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」の抽出物は単剤では細胞生存には影響を与えず、rotenoneおよびMPP⁺により誘導された細胞死およびミトコンドリア膜電位の消失を回復させた。ミトコンドリア機能障害は孤発性パーキンソン病の要因の一つであり、パーキンソン病原因遺伝子の多くがミトコンドリア機能に関わっているため、「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」がパーキンソン病治療薬もしくは病態

解明のバイオプローブのシーズとなることへの期待は大きい。今後は「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」に含まれる活性成分同定・作用機能解明を行いたいと考えている。

D. 考察

「調胃承気湯」および「大黄甘草湯」における主な適応症は便秘であり、パーキンソン病治療効果としての報告はない。また、生薬成分である甘草はL-ドーパの副作用軽減のために併用されることがあるが、甘草そのものの治療効果は報告されておらず、本研究における新規性といえる。また、甘草に含まれる活性成分はcell baseでのパーキンソン病モデルにおいて至適濃度0.1 μ g/mlよりも強いことから、その有効性は期待出来る。

E. 結論

PC12D細胞を用いたパーキンソン病モデルでヒットした調胃承気湯と大黄甘草湯の共通生薬成分である「甘草」から活性成分の単離精製を行い、甘草の1-ブタノール抽出物をパーキンソン病モデルの活性を指標に、各種クロマトグラフィーによって活性成分の単離精製した。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Kobayashi, H. Harada, M. Nakamura, Y. Futamura, A. Ito, M. Yoshida, S. Iemura, K. Shin-ya, T. Doi, T. Takahashi, T. Natsume, M. Imoto and Y. Sakakibara. Comprehensive Predictions of Target Proteins Based on Protein-Chemical Interaction Using Virtual Screening and

Experimental Verifications. *BMC Chemical Biology*, in press (2012)

2. Y. Sasazawa, S. Kanagaki, E. Tashiro, T. Nogawa, M. Muroi, Y. Kondoh, H. Osada, M. Imoto. Xanthohumol Impairs Autophagosome Maturation through Direct Inhibition of Valosin-Containing Protein. *ACS Chemical Biology*, in press (2012)
3. K. Yamamoto, M. Makino, Ramida Watanapokasin, E. Tashiro and M. Imoto. Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation on the cell surface. *J. Antibiot.* in press (2012)
4. E. Tashiro and M. Imoto. Target identification of bioactive compounds. *Bioorg. & Med. Chem.* 20: 1910-1921 (2012)
5. K. Yamamoto, E. Tashiro, K. Motohashi, H. Seto and M. Imoto. Napyradiomycin A1, an inhibitor of mitochondrial complexes I and II. *J. Antibiot.* in press (2012)
6. H. Kobayashi, Y. Ogura, M. Sawada, R. Nakayama, K. Takano, Y. Minato, Y. Takemoto, E. Tashiro, H. Watanabe & M. Imoto. Involvement of 14-3-3 proteins in the second EGF-induced wave of Rac1 activation in the process of cell migration. *J. Biol. Chem.* 286: 39259-39268 (2011)
7. Y. Yamada, E. Tashiro, S. Taketani, M. Imoto and T. Kataoka. Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines. *J. Antibiot.* 64: 361-366 (2011)
8. T. Kawamura, K. Matsubara, H. Otaka, E. Tashiro, K. Shindo, R. C. Yanagita, K. Irie, and M. Imoto. Generation of "Unnatural Natural Product" library and identification

- of a small molecule inhibitor of XIAP. *Bioorg. & Med. Chem.* 19: 4377-4385 (2011)
9. M. Sawada, S. Kubo, K. Matsumura, Y. Takemoto, H. Kobayashi, E. Tashiro, T. Kitahara, H. Watanabe and M. Imoto. Synthesis and anti-migrative evaluation of moverastin derivatives. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 21: 1385-1389 (2011)
 10. K. Yamamoto, E. Tashiro and M. Imoto. Quinotrierix Inhibits ER Stress-induced XBP1 mRNA Splicing through Inhibition of Protein Synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 284-288 (2011)
 11. M. Kitagawa, M. Misawa, S. Ogawa, E. Tashiro and M. Imoto. A New Convenient Cell-based Screening Method for Small Molecule Glycolytic Inhibitors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 367-369 (2011)
 12. S. Saiki, Y. Sasazawa, Y. Imamichi, S. Kawajiri, T. Fujimaki, I. Tanida, H. Kobayashi, F. Sato, S. Sato, K. Ishikawa, M. Imoto and N. Hattori : Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7: 42-53 (2011)
2. 学会発表
- 1) 新規 MEK1/2 阻害剤、SMK-17 の抗腫瘍活性 木我真基、中山綾子、笹澤有紀子、田代悦、井本正哉、他 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会 5月24日@東京
 - 2) 新規アンドロゲンアンタゴニストの探索と薬理活性評価 藤巻貴宏、鳥居健太郎、河村達郎、小林大貴、田代悦、井本正哉 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会 5月25日@東京
 - 3) MET 誘導物質の探索 邊見静香、小林大貴、田代悦、井本正哉 第15回日本がん分子標的治療学会学術集会 6月23日@東京
 - 4) EGF 刺激によるがん細胞遊走における CysLT1 シグナリングの関与 間木重行、佐伯雄也、田代悦、井本正哉 第15回日本がん分子標的治療学会学術集会 6月24日@東京
 - 5) Metabolomic identification of the target of the filopodia protrusion inhibitor glucopiericidin A 井本正哉 International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (国際微生物学連合 2011 会議) 9月7日@札幌
 - 6) CysLT1 シグナルにおける EGF 依存的 Rac1 活性化機構の解析 中山諒二、秋田貴博、小林大貴、田代悦、井本正哉 第84回日本生化学会大会 9月24日@京都
 - 7) ケミカルシステムバイオロジーを用いた個別がん細胞の遊走制御機構解析 間木重行、田代悦、井本正哉 第70回日本癌学会学術総会 10月3日@名古屋
 - 8) 新規 MEK1/2 阻害剤 SMK-17 による抗腫瘍活性 木我真基、中山綾子、笹澤有紀子、田代悦、岩垂勇人、井本正哉 第70回日本癌学会学術総会 10月3日@名古屋
 - 9) Studies on the signaling pathway for cancer cell migration based on chemical genomic approach. Shigeyuki Magi, Etsu Tashiro, Masaya Imoto, AACR-NCI-International Conference. Nov. 14@ San Francisco
 - 10) Xanthohumol の autophagy 制御機構解析 金墻周平、笹澤有紀子、田代悦、野川俊彦、室井誠、近藤恭光、長田裕之、井本正哉 日本農芸化学会 2012 年度大会 3月23日@京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録

なし

なし。

3.その他

神経細胞死抑制効果を持つ甘草に含まれる活性成分に関する研究

研究分担者： 田代悦 慶應義塾大学理工学部生命情報学科 専任講師

研究要旨

漢方薬ライブラリーからパーキンソン病発症進行の抑制・予防薬を取得することを目的に、遺伝性パーキンソン病モデル細胞（PINK1^{-/-} MEF）が漢方薬ライブラリーからのスクリーニングに応用できるかを評価した結果、PINK1^{-/-}MEF 細胞を漢方薬ライブラリーからのスクリーニングに応用することが出来ないことを昨年度の本分担研究において報告した。そこで本年度においては、PC12D 細胞を用いたパーキンソン病モデルに於いて、既に神経細胞保護活性を見出している漢方薬ライブラリー((株)ツムラより提供)番号 No.69(調胃承気湯)と No.79(大黄甘草)について、活性成分の単離・精製を行った。

A. 研究目的

PC12D 細胞を用いたパーキンソン病モデルに於いて、既に神経細胞保護活性を見出している漢方薬ライブラリー((株)ツムラより提供)番号 No.69(調胃承気湯)と No.79(大黄甘草)について、活性成分の単離・精製を行った。

細胞死は Trypan Blue 細胞外排出試験と、細胞核を PI で染色した後に断片化した DNA (subG1 期)をフローサイトメーターによって評価した。

(倫理面への配慮)
特記すべきことなし。

B. 研究方法

本研究ではパーキンソン病モデル細胞として、MPP+を添加したラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12D 細胞を用いた。

1. PC12D 細胞を用いたパーキンソン病モデル

NGFによって分化させたラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞に神経毒である 0.3 mM の MPP+もしくは 0.3 μM のロテノンを追加して 48 時間培養すると、細胞死が誘導される。これをパーキンソン病モデルとした。

2. 細胞死評価

C. 研究結果

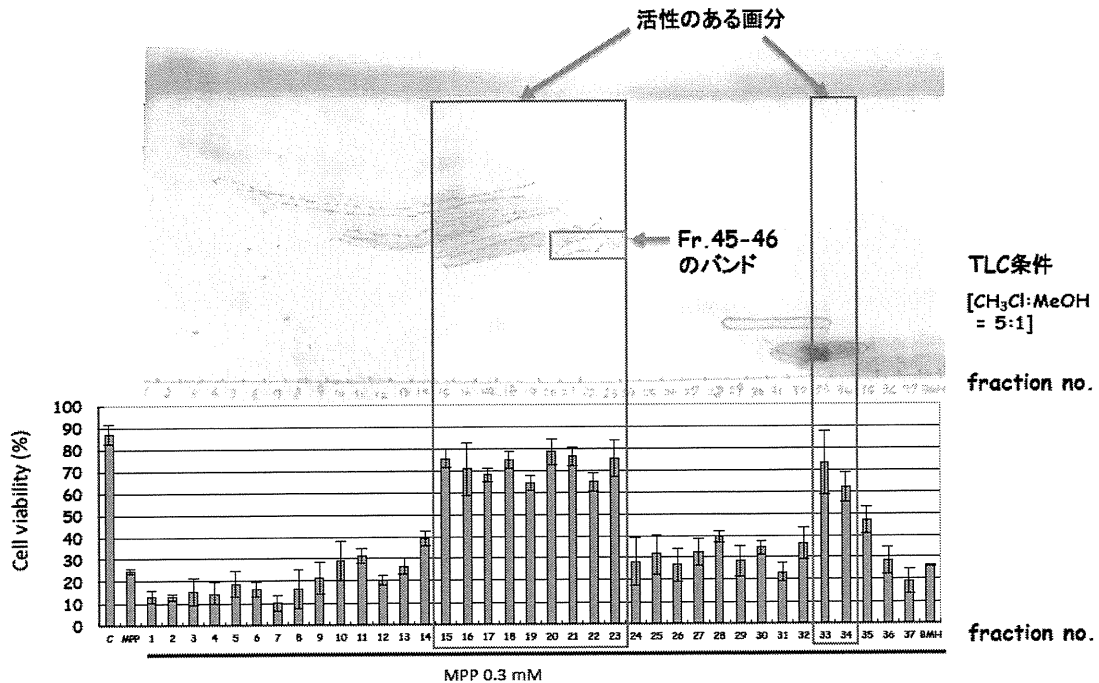
昨年度までに、NGFによって分化させた PC12D 細胞に神経毒であるロテノンもしくは MPP+を追加したときの細胞死を 30%以上抑制するサンプルとして、(株)ツムラより提供されたライブラリー番号 No.69(調胃承気湯)と No.79(大黄甘草)がヒットしたことを報告している（研究分担者・井本正哉）。この2サンプルには共通して大黄と甘草が2:1の割合で含まれていることに着目し、活性成分が大黄と甘草のどちらに含まれているか検討した。その結果、大黄にも神経細胞保護作用を示す化合物があるものの、甘草により活性の強い化合物が含まれていることが解った。そこで、甘草から活性成

分の抽出を試みた。上述の PC12D 細胞を用いた MPP+による細胞死抑制活性を指標に、各種クロマ

E. 結論

PC12D 細胞を用いたパーキンソン病モデルに於

図1 活性成分の細胞死抑制活性



トグラフィーを用いて活性成分の単離・精製を進めた結果、二つの活性フラクションを得ることに成功した(図 1)。一つの活性成分(Fr.45-46)については既に単離精製を終了しており構造解析中であるが、LC/MS 分析に於いて 246 nm と 347 nm に極大吸収を示すことが明らかにされた(研究分担者・井本正哉)。さらにそれ以外の活性画分については Fr.45-46 とは異なった化合物が活性を示していることから、現在、その活性物質の単離・精製を行っているところである。

D. 考察

甘草に含まれる活性成分の単離精製をおこなった結果、2つの活性成分を得ることに成功した。両成分とも、単独では細胞毒性をほぼ示さなく、さらに 0.1 mg/ml の濃度で MPP+による細胞死をほぼ完全に抑制することから、その有効性が期待できる。

いて、調胃承気湯と大黄甘草に共通に含まれる甘草に神経細胞保護作用があることを見出し、甘草に含まれる活性成分の単離・精製を行った結果、2つの活性成分の存在がわかった。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yamamoto, M. Makino, R. Watanapokasin, E. Tashiro & M. Imoto Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation on the cell surface *Journal of Antibiotics*, in press
2. Y. Sasazawa, S. Kanagaki, E. Tashiro, T. Nogawa, M. Muroi, Y. Kondoh, H. Osada & M. Imoto Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chemical Biology*, in press

3. K. Yamamoto, E. Tashiro, K. Motohashi, H. Seto & M. Imoto Napyradiomycin A1, an inhibitor of mitochondrial complexes I and II. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 65(4), pp. 211-214 (2012)
 4. M. Kiga, F. Tanzawa, S. Iwasaki, F. Inaba, K. Fujiwara, H. Iwadare, T. Echigo, Y. Nakamura, T. Shibata, K. Suzuki, I. Yasumatsu, A. Nakayama, Y. Sasazawa, E. Tashiro, M. Imoto & S. Kurakata Antitumor effects of novel highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17. *Anti-cancer drugs*, Vol. 23(1), pp. 119-130 (2012)
 5. E. Tashiro & M. Imoto Target identification of bioactive compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 20(6), pp. 1910-1921 (2012)
 6. H. Kobayashi, Y. Ogura, M. Sawada, R. Nakayama, K. Takano, Y. Minato, Y. Takemoto, E. Tashiro, H. Watanabe & M. Imoto Involvement of 14-3-3 proteins in the second epidermal growth factor-induced wave of Rac1 activation in the process of cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286(45), pp. 39259-39268 (2011)
 7. Y. Yamada, E. Tashiro, S. Taketani, M. Imoto & T. Kataoka Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 64(5), pp. 361-366 (2011)
2. 学会発表
- 1) イノスタマイシンによる FGF 受容体-1 ゴルジ体蓄積機構の解析
田代悦、張嘉峯、井本正哉 日本ケミカルバイオロジー学会 2011年5月24日(火)@東京
 - 2) 新規 MEK1/2 阻害剤、SMK-17 の抗腫瘍活性
木我真基、丹澤文恵、岩崎志保、稲葉誌、藤原康策、岩垂勇人、越後友希、中村勇二、柴田智之、鈴木佳奈恵、安松勲、中山綾子、笹澤有紀子、田代悦、井本正哉、蔵方慎一 日本ケミカルバイオロジー学会 2011年5月24日(火)@東京
 - 3) 新規アンドロゲンアンタゴニストの探索と薬理活性評価
藤巻貴宏、鳥居健太郎、河村達郎、小林大貴、田代悦、井本正哉 日本ケミカルバイオロジー学会 2011年5月24日(火)@東京
 - 4) EGF 刺激によるがん細胞遊走における CysLT1 シグナリングの関与
小林大貴、田代悦、井本正哉 日本がん分子標的治療学会 2011年6月24日(金)@東京
 - 5) MET 誘導物質の探索
邊見静香、小林大貴、田代悦、井本正哉 日本がん分子標的治療学会 2011年6月23日(金)@東京
 - 6) Analysis of Machinery for Endoplasmic Reticulum Stress Response Induced by Small Molecular Compounds
Satoko Shinjo, Etsu Tashiro, and Masaya Imoto
5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2011年8月22日(月)@カナダ・ケベック
 - 7) Quinotriexin Inhibited Endoplasmic Reticulum Stress-Induced X-box Binding Protein 1 mRNA Splicing through Inhibition of Protein Synthesis
Kohta Yamamoto, Etsu Tashiro, and Masaya Imoto
5th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine 2011年8月22日(月)@カナダ・ケベック
 - 8) Antitumor effects of highly hydrophilic and non-ATP-competitive MEK1/2 inhibitor, SMK-17
木我真基、中山綾子、笹澤有紀子、田代悦、岩垂勇人、井本正哉 日本癌学会 2011年10月3日(月)@名古屋
 - 9) Studies on the regulatory mechanism for cell migration in tumor cells based on chemical systems biology
間木重行、田代悦、井本正哉 日本癌学会 2011年10月4日(火)@名古屋
 - 10) Involvement of 14-3-3 proteins in the second epidermal growth factor-induced wave of Rac1 activation in the process of cell migration.
Masaya Imoto, Hiroki Kobayashi, Masato Sawada, Yasushi Takemoto, Yusuke Minato, and Etsu Tashiro 日本分子生物学会 2011年12月15日(木)@横浜
 - 11) Xanthohumol の autophagy 制御機構解析
金墻周平、笹澤有紀子、田代悦、野川俊彦、室井誠、近藤恭光、長田裕之、井本正哉 日本農芸化学会 2012年3月23日(金)@京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。