

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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 遠山正彌

平成25(2013)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	_____	4
2. 抑肝散中の $\beta$ セクレターゼ阻害成分の探索		
掛樋一晃	_____	6
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	_____	15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	_____	18

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 近畿大学東洋医学研究所客員教授

研究要旨

抑肝散は認知症、統合失調症など各種精神疾患に有効出るとの報告が蓄積されている。本年度は抑肝散構成生薬センキュウが細胞死を抑制する経路である **sumoylation** に対する促進効果を確立した。さらに抑肝散は心因性うつ病にも有効とされており、センキュウの作用かあるいは他の生薬の効能かをも検討し、センキュウではなくカンゾウ、ブクリョウ、サイコがうつ病に有効な成分を含んでいることが明らかとなった。アルツハイマー病においてアミロイド線維が沈着することで観察される老人斑の原因の一つである  $\beta$  セクレターゼ阻害活性を示す抑肝散中の成分についても探索を進め、構成生薬のうちサイコの酢酸エチル抽出分画中に高い  $\beta$  セクレターゼ阻害活性を見出した。統合失調症に対する非定型抗精神病薬の作用機序としてドーパミン D2 受容体やセロトニン受容体サブタイプに同時に作用することが知られている。そこで本研究では抑肝散中に含有される天然アルカロイド成分のドーパミン受容体やセロトニン受容体に対する影響を調べてきた。H23年度までは G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 遺伝子ファミリーに属するセロトニン受容体やドーパミン受容体に関して解析を進めてきたが、本年度は、イオンチャネル型のセロトニン受容体である 5-HT3 受容体について解析した。その結果、5-HT3 受容体に対してアンタゴニスト作用を有する抑肝散含有の天然アルカロイド成分を 6 種類同定した。その 6 種類のアルカロイドを 5-HT3A 受容体 (ホモマー) と 5-HT3ABCDE 受容体 (ヘテロマー) に対する抑制効果の違いによってさらに 3 通りに分類した。コリノキセインとリンコフィリンは 5-HT3A 受容体と 5-HT3ABCDE 受容体に対する抑制効果に、あまり差が認められなかった。一方、ヒルステインやヒルスチンは 5-HT3A 受容体と比べると 5-HT3ABCDE 受容体により強い抑制効果を示した。逆にイソコリノキセインとイソリンコフィリンは 5-HT3ABCDE 受容体よりも 5-HT3A 受容体に対して高い親和性を示した。最後に、これら 6 成分を同時投与すると、5-HT3 受容体のセロトニン応答に対して強い抑制効果が生じた。これらの複数のアルカロイド成分による相加・相乗効果によると考えられた。

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

抑肝散が認知症、統合失調症はじめ種々の精神疾患に有効であるとの臨床報告が蓄積されつつある。認知症に関してはセンキュウに含まれるフェルラ酸が小胞体ストレスによる神経細胞死機序を抑制すること、また抑肝散が細胞死を抑制する **sumoylation** を亢進し、その候補生薬がセンキュウであることを示してきた。本研究ではまずセンキュウが **sumoylation** を抑制することを確立する。次いで、抑肝散が鬱などの他の精神疾患に有効であるとの報告もあり、センキュウがこれを担うか否かを検討した。さらに認知症研究では抑肝散構成生薬サイコが

$\beta$  セクレターゼ活性を阻害することを見出してきた。本研究ではサイコのどの成分がこの役割を担うかも検討した。

一方統合失調症研究では抑肝散中に含有される天然アルカロイド成分のセロトニン受容体やドーパミン受容体に対する影響を調べてきた。H23年度までに、ガイソシジ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-HT2A、2C、5-HT7 受容体にはアンタゴニストとして、また 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を示した。本年度は、イオンチャネル型のセロトニン受容体である 5-HT3 受容

体について、電気生理学的に抑肝散中の天然アルカロイドがどのような影響を与えるかを検索した。

## B. 研究方法

センキュウが濃度依存性に sumoylation を抑制するか否か検討した。またストレスに対する効果は SGK1 発現の有無を指標とし、ストレスとしては水浸ストレスを負荷した。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。βセクレターゼアッセイは 175 μL 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 μL 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 μL) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。10 μL 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 μL) 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 μM)、ネガティブコントロールには DMSO を用いた。5-HT3 受容体は、ヘテロマーから成るイオンチャンネルで、ヒトでは 5-HT3A、5-HT3B、5-HT3C、5-HT3D、5-HT3E の 5 つのサブファミリーが存在している。ヒトの 5-HT3A、B、C、D、E のそれぞれの cDNA からキャッピングした cRNA を合成して、アフリカツメガエル卵母細胞に微量注入し、5-HT3 受容体を発現させた。2 電極膜電位固定法により、電気生理学的にアフリカツメガエル卵母細胞に発現した 5-HT3 受容体の特性を解析した。抑肝散に含まれる天然アルカロイドの各種成分をセロトニンと同時に投与することによって、5-HT3 受容体の応答に影響を与えるアルカロイドを同定した。

## C. 研究結果

抑肝散構成生薬センキュウは濃度依存性に細胞死を抑制する経路である sumoylation を促進した。一方水浸ストレスを負荷するとオリゴデンドロサイトで SGK1 発現が上昇することを我々はすでに報告している。抑肝散を前投与すると水浸ストレスを負荷しても SGK1 発現の上昇は見られない。どの構成生薬がその効果を発揮しているかを検討するとセンキュウではなくカンゾウ、ブクリョウ、サイコが水浸ストレス負荷によるオリゴデンドロサイトでの SGK1 発現の上昇を抑えた。これらの生薬の中にうつ病に有効な成分が含まれていることが示された。アルツハイマー病においてアミロイド線維が沈着することで観察される老人斑の原因の一つである βセクレターゼ阻害活性を示す抑肝散中の成分についても探索を進め、構成生薬のうちサイコの酢酸エチル抽出

分画中に高い βセクレターゼ阻害活性を見出した。統合失調症に対する非定型抗精神病薬の作用機序としてドーパミン D2 受容体やセロトニン受容体サブタイプに同時に作用することが知られている。そこで本研究では抑肝散中に含有される天然アルカロイド成分のドーパミン受容体やセロトニン受容体に対する影響を調べてきた。H23 年度までは G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 遺伝子ファミリーに属するセロトニン受容体やドーパミン受容体に関して解析を進めてきたが、本年度は、イオンチャンネル型のセロトニン受容体である 5-HT3 受容体について解析した。その結果、5-HT3 受容体に対してアンタゴニスト作用を有する抑肝散含有の天然アルカロイド成分を 6 種類同定した。その 6 種類のアルカロイドを 5-HT3A 受容体 (ホモマー) と 5-HT3ABCDE 受容体 (ヘテロマー) に対する抑制効果の違いによってさらに 3 通りに分類した。コリノキセインとリンコフィリンは 5-HT3A 受容体と 5-HT3ABCDE 受容体に対する抑制効果に、あまり差が認められなかった。一方、ヒルス테인やヒルスチンは 5-HT3A 受容体と比べると 5-HT3ABCDE 受容体により強い抑制効果を示した。逆にイソコリノキセインとイソリンコフィリンは 5-HT3ABCDE 受容体よりも 5-HT3A 受容体に対して高い親和性を示した。最後に、これら 6 成分を同時投与すると、5-HT3 受容体のセロトニン応答に対して強い抑制効果が生じた。これらの複数のアルカロイド成分による相加・相乗効果によると考えられた。

## D. 考察

抑肝散構成生薬センキュウはアルツハイマー病における神経細胞死機序である小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。しかも細胞死を抑制する sumoylation も同時に亢進する。小胞体ストレスによる細胞死カスケードに sumoylation がかわる可能性が示唆された。一方サイコが βセクレターゼ活性を阻害した事実はサイコに含まれる成分がアルツハイマー病の新しい創薬標的として浮き上がる。統合失調症に関しては抑肝散に含まれるこのアルカロイドの効果は弱い複数投与すると 5-HT3A 受容体に高い親和性を示した。このことは複数の生薬より構成される漢方薬の強みを示すものである。

## E. 結論

抑肝散の認知症に関する効果は小胞体ストレス抑制作用、sumoylation 亢進作用、βセクレターゼ活性抑制作用によることが明らかとされた。一方統合失調症に関してはこれまでの 5-HT 受容体やドーパミン受容体に対する作用に加えて 5-HT3A 受容体に

も作用することが明らかとされた。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

遠山正彌、宮田信吾：抑肝散が認知症に有効である  
証左、脳 21、15,201-206、2012

宮田信吾、遠山正彌、植田高史、鶴川眞也、島田昌一：  
統合失調症に有効な抑肝散成分の解析、  
脳 21、15,346-349. 2012

宮田信吾、遠山正彌：ストレス応答に対する抑肝散  
の効果、脳 21、15、519-524. 2012

##### 2. 学会発表

「漢方薬と神経細胞死 -抑肝散の神経機能障害へ  
の効能解析-」

宮田信吾、遠山正彌

第 34 回日本生物学的精神医学会（神戸）、シンポジ  
ウム

”漢方薬研究の最前線～基礎から臨床、臨床から基  
礎への相互「統合」研究～”

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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

厚生労働科学研究費補助金（創薬総合推進研究研究事業）  
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 近畿大学東洋医学研究所・客員教授

研究要旨

抑肝散は認知症、統合失調症など各種精神疾患に有効出るとの報告が蓄積されている。本年度は抑肝散構成生薬センキュウが細胞死を抑制する経路である sumoylation に対する促進効果を確立した。さらに抑肝散は心因性うつ病にも有効とされており、センキュウの作用かあるいは他の生薬の効能かをも検討し、センキュウではなくカンゾウ、ブクリョウ、サイコがうつ病に有効な成分を含んでいることが明らかとなった。

A. 研究目的

抑肝散が認知症、統合失調症はじめ種々の精神疾患に有効であるとの臨床報告が蓄積されつつある。認知症に関してはセンキュウに含まれるフェルラ酸が小胞体ストレスによる神経細胞死機序を抑制すること、また抑肝散が細胞死を抑制する sumoylation を亢進し、その候補生薬がセンキュウであることを示した。することをこれまで示してきた。本研究ではまずセンキュウが sumoylation を抑制することを確立する。次いで、抑肝散が鬱などの他の精神疾患に有効であるとの報告もあり、センキュウがこれを担うか否かを検討した。

B. 研究方法

培養神経芽細胞に小胞体ストレス (Thapsigargin) を負荷し、センキュウが濃度依存性に sumoylation を抑制するか否かを検討した。またストレスに対する効果は SGK1 発現の有無を指標とし、ストレスとしては水浸ストレスを負荷した。

C. 研究結果

抑肝散構成生薬センキュウは濃度依存性に細胞死を抑制する経路である sumoylation を促進した。一方水浸ストレスを負荷するとオリゴデンドロサイトで SGK1 発現が上昇することを

我々はすでに報告している。抑肝散を前投与すると水浸ストレスを負荷しても SGK1 発現の上昇は見られない。どの構成生薬がその効果を發揮しているかを検討するとセンキュウではなくカンゾウ、ブクリョウ、サイコが水浸ストレス負荷によるオリゴデンドロサイトでの SGK1 発現の上昇を抑えた(図1)。これらの生薬の中うつ病に有効な成分が含まれていることが示された。

D. 考察

抑肝散構成生薬センキュウはアルツハイマー病における神経細胞死機序である小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。しかも細胞死を抑制する sumoylation も同時に亢進する。小胞体ストレスによる細胞死カスケードに sumoylation がかわる可能性が示唆された。

E. 結論

抑肝散の認知症に関する効果は小胞体ストレス抑制作用、sumoylation 亢進作用を介する効果であることが明らかとなった。さらに抑肝散構成生薬のセンキュウ、それに含まれるフェルラ酸がこの効果のキーの役割を担っていることも確立された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

遠山正彌、宮田信吾：抑肝散が認知症に有効である証左、脳21、15、201-206、2012

宮田信吾、遠山正彌、植田高史、鶴川眞也、島田昌一：統合失調症に有効な抑肝散成分の解析、脳21、15、346-349. 2012

宮田信吾、遠山正彌：ストレス応答に対する抑肝散の効果、脳21、15、519-524. 2012

2. 学会発表

第 34 回日本生物学的精神医学会、神戸国際会議場 シンポジウム

” 漢方薬研究の最前線～基礎から臨床、臨床から基礎への相互「統合」研究～”

宮田信吾、遠山正彌

漢方薬と神経細胞死 -抑肝散の神経機能障害への効能解析-

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

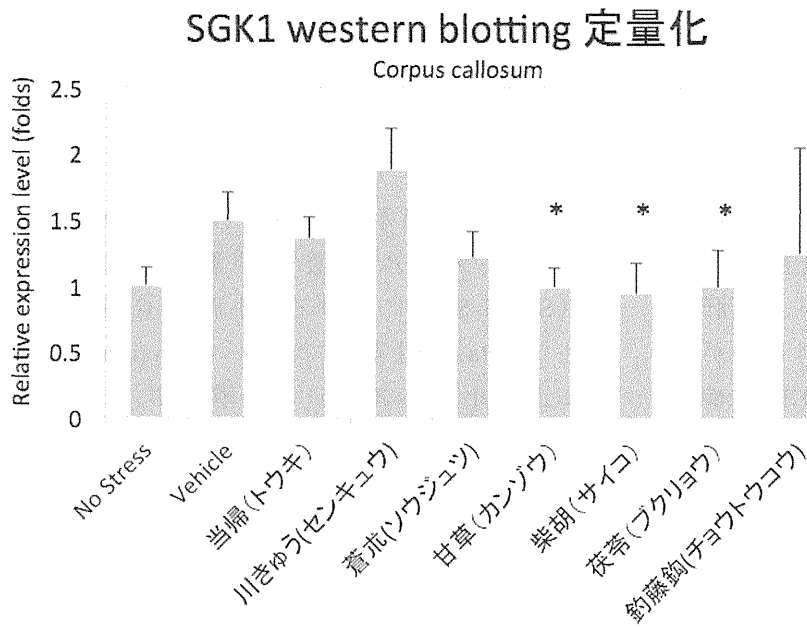
統合失調症の予防又は治療薬 (特願 2010-002364) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



(図 1) 抑肝散の各構成生薬の前投与による単回ストレス暴露時の SGK1 タンパク量

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 $\beta$ 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り、その産生原因の一つである $\beta$ 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。本年度は、前年度の研究において $\beta$ セクレターゼの阻害活性を示すことが示されたサイコについて、主要成分ならび類縁物質の $\beta$ セクレターゼ阻害活性を評価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。

我々の研究班は本研究課題においてアルツハイマー病を含めた認知症に対する抑肝散の効果について、成分レベルでの研究を進めてきた。アルツハイマー病を含めた認知症の原因は一義的でなく、細胞レベルでのストレス、その結果生じるアンフォールディングタンパク質の蓄積、それらを原因とする

アポトーシスの誘導など多岐にわたる。当然ながら、抑肝散が認知症に対し示す効果について作用点も複数存在することが考えられる。我々はその中で、抑肝散中のセンキュウ（*Cnidium officinale*）熱水抽出物ならびに主成分である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に対し抑制効果示すことを見出した。一方、アルツハイマー病においてアミロイド線維が沈着することで観察される老人斑の原因の一つである $\beta$ セクレターゼ阻害活性を示す抑肝散中の成分についても探索を進め、構成生薬のうちサイコ（*Bupleurum falcatum*）の酢酸エチル抽出分画中に高い $\beta$ セクレターゼ阻害活性を見出した。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、 $\beta$ 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。

本年度は、前年度の研究に引き続きβセクレターゼの阻害活性を示すサイコ中の成分について活性評価を行うとともに、各種クロモン誘導体のβセクレターゼ阻害活性を評価した結果について報告する。

## B. 研究方法

### B.1. 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。CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (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.2. クロモン誘導体

Chromone、Apigenin、Genkwanin、Chrysin、Naringenin、Baicalein は全て東京化成工業より購入し、無水 DMSO に溶解し -20℃ で保存した。

### B.3. Saikochromone A の合成

Saikochromone A は 2,4,6-trihydroxyacetophenone

(2,4,6-THP) を出発原料して合成した。2,4,6-THP を Ethylchlorooxacetate とピリジン中、室温で 12 時間反応後、5%NaCO<sub>3</sub>/EtOH 中 70℃ 2 時間反応させ、5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromone-2-carboxylic acid (compound 1) を得た。次に compound 1 を DMF 中 CH<sub>3</sub>I と K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> により室温で 4 時間反応し、compound 2 を得た。また、compound 1 を MeOH 中 TMS-CHN<sub>2</sub> により室温で 0.5 時間反応し compound 3 を得た。compound 2 はさらに Dry-THF 中 LiAlH<sub>4</sub> によりメチルエステルを還元し Saikochromone A (compound 4) を得た。

### B.4. 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-NH<sub>2</sub>, 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 μL 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  $\mu\text{L}$  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  $\beta$ セクレターゼ溶液 (10  $\mu\text{L}$ ) を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ) 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  $\mu\text{M}$ )、ネガティブコントロールには DMSO を用いた。

## C. 研究結果

### C.1. サイコ酢酸エチル分画の $\beta$ セクレターゼ阻害活性

前年度の研究により構成生薬抽出物の  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ セクレターゼ阻害活性について調べた。各分画の 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DMSO 溶液による  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を **Fig.1** に示す。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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ セクレターゼ阻害活性であると考えられた。一方、1,4-benzopyrone である Chromone を基本骨格として持つ種々のフラボイド類について  $\beta$ セクレターゼ阻害活性が報告されており、サイコ中の成分の一つである Saikochromone A をはじめとする Chromone (1,4-Benzopyrone) 骨格を持つ成分に  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を有する可能性が考えられた。

### C.2. 1,4-Benzopyrone 骨格を有する化合物の $\beta$ セクレターゼ阻害活性

1,4-Benzopyrone 骨格を有する化合物のうち入手可能な化合物 6 種類 (**Fig.2**) について前項と同様に  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を調べた。なお、各化合物の最終濃度は 0.005 mg/mL、0.05mg/mL、0.5mg/mL (DMSO 溶液) とした。結果を **Fig.3** に示す。アッセイの結果、1,4-Benzopyrone である Chromone が  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を示すことがわかった。一方、1,4-Benzopyrone を持つ化合物のうち 2 位にフェノール基を有する Apigenin、Genkwanin、Chrysin、Naringenin、ベンジル基を有する Baicalein は、いずれの濃度においても  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を示さなかった。

次に 2,4,6-trihydroxyacetophenone を原料して化学合成し得られた Saikochromone A を含む 4 種類の Chromone 誘導体 (**Fig.4** & **Fig.5**) について同様に  $\beta$ セクレターゼ阻害活性を調べた。その結果、5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromone-2-car

boxylic acid (compound 1)とその2位カルボキシル基のメチルエステルおよび7位のメトキシ体である compound 2 にはいずれの濃度においても顕著なβセクレターゼ阻害活性は見られなかった。一方、compound 1 の2位カルボキシル基のメチルエステル体である compound 3 は濃度依存的にβセクレターゼ阻害活性を示すことがわかった。しかしながら、サイコ中での存在が知られている Saikochromone A は0.1mg/mLの濃度においてβセクレターゼ活性を約20%しか阻害せず、compound 3 に比べ阻害活性は低かった。現在、compound 3 に相当する化合物がサイコ中に含まれるという報告はなく、サイコ抽出物中の存在について今後定量分析を含め解析する必要があると言える。

#### D. 考察

本研究では、抑肝散中の構成生薬のうち、1,4-benzopyrone である Chromone を基本骨格として持つ種々のフラボイド類ならびに Saikochromone A とその合成中間体のβセクレターゼ阻害活性について検討した。その結果、1,4-Benzopyrone である Chromone は阻害活性を示したものの、

1,4-Benzopyrone 骨格を持つ化合物のうち2位にフェノール基を有する Apigenin、Genkwanin、Chrysin、Naringenin、ベンジル基を有する Baicalein は、いずれもβセクレターゼ阻害活性を示さなかった。一方、Saikochromone A とその合成中間体については、サイコ中の存在が知られている Saikochromone A には高い阻害活性は無かったが、中間体である 5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromone-2-carboxylic acid methyl ester (compound 3) に高い阻害活性が見られた。現在、compound 3 に相当する化合物がサイコ中に含まれるという報告はなく、今後、液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS) を利用して、サイコ抽出物中の存在の有無を確認するとともに、compound 3 の類縁体化合物の評価も行い、βセクレターゼ阻害活性における構造活性相関を明らかにしていきたい。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 2. 学会発表

なし

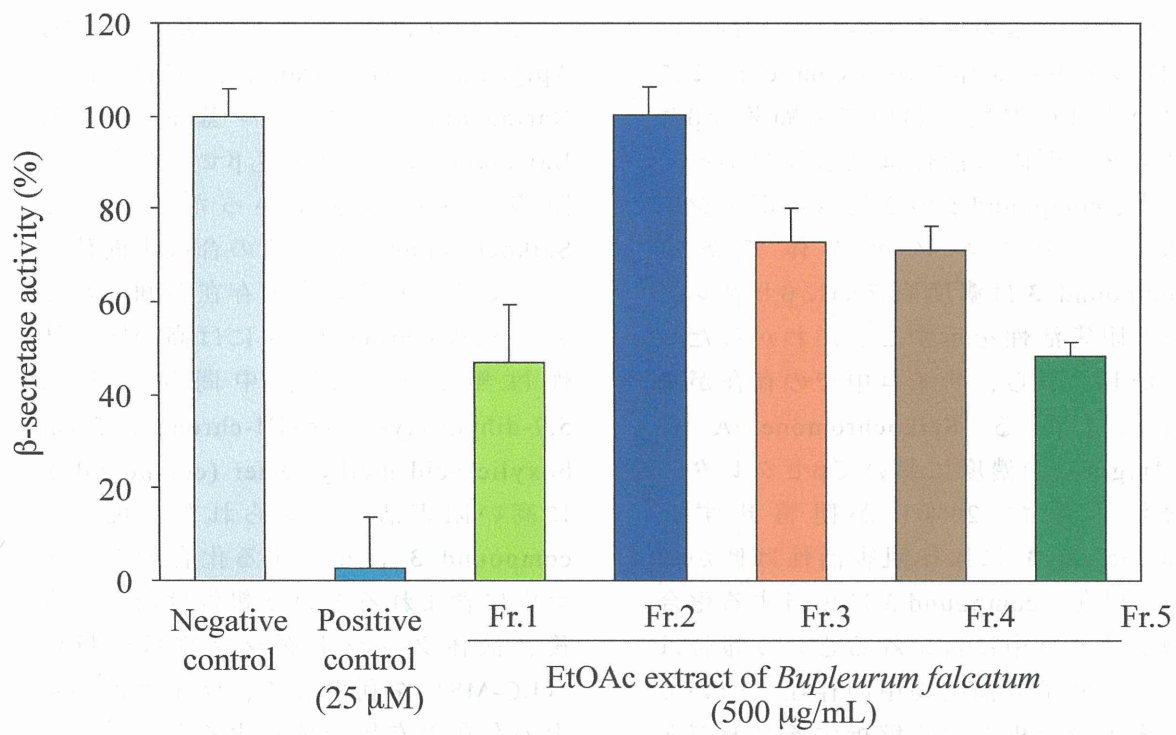
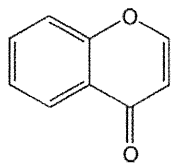
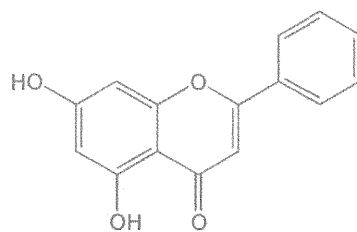


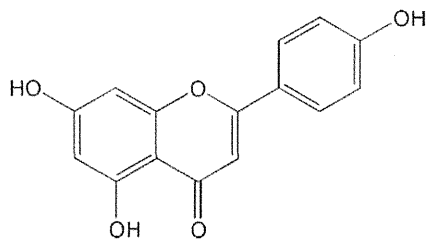
Fig. 1 Inhibitory effect of EtOAc-extracts of *Bupleurum falcatum* on β-secretase activity



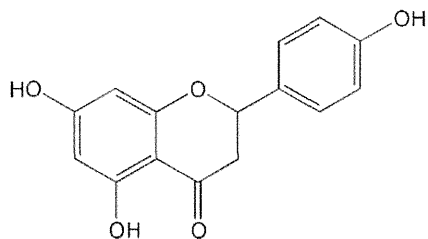
Chromone



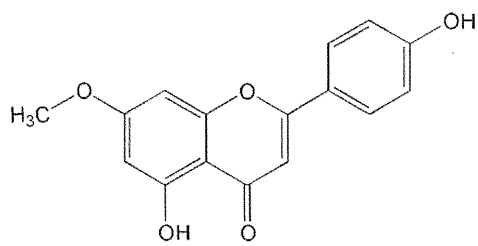
Chrysin



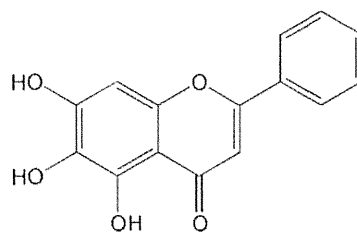
Apigenin



Naringenin



Genkwanin



Baicalein

Fig.2 Structures of chromone and chromone-related compounds

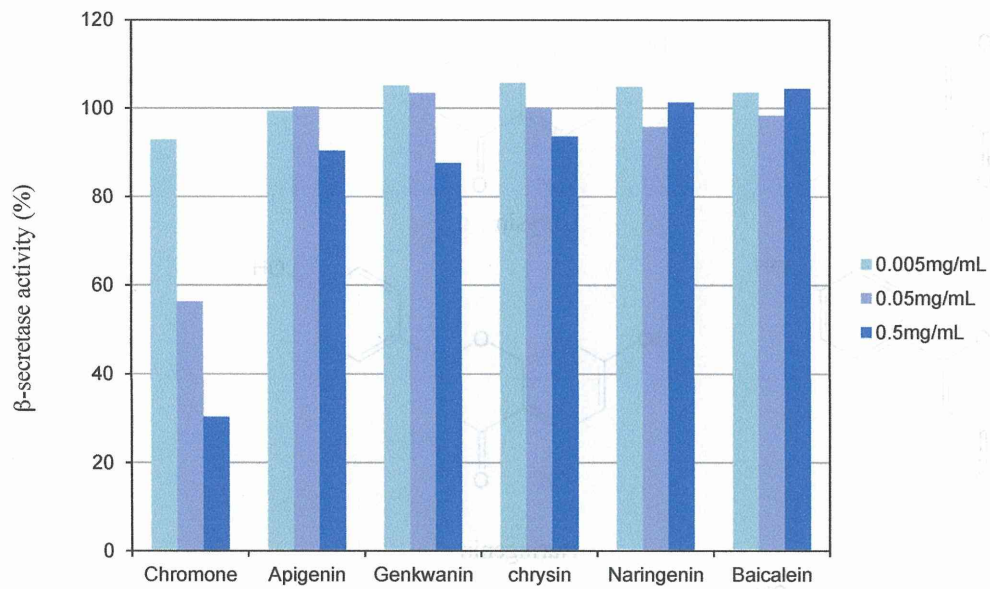


Fig.3 Inhibitory effects of chromone and chromone-related compounds

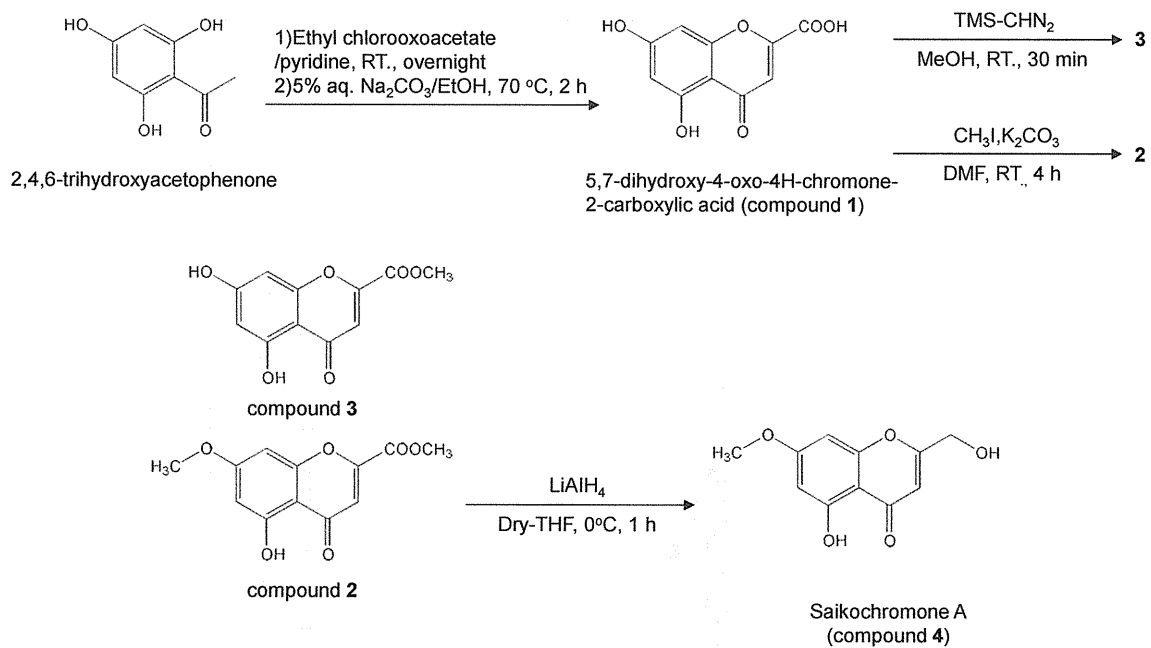


Fig.4 Scheme of chemical synthesis of Saikochromone A

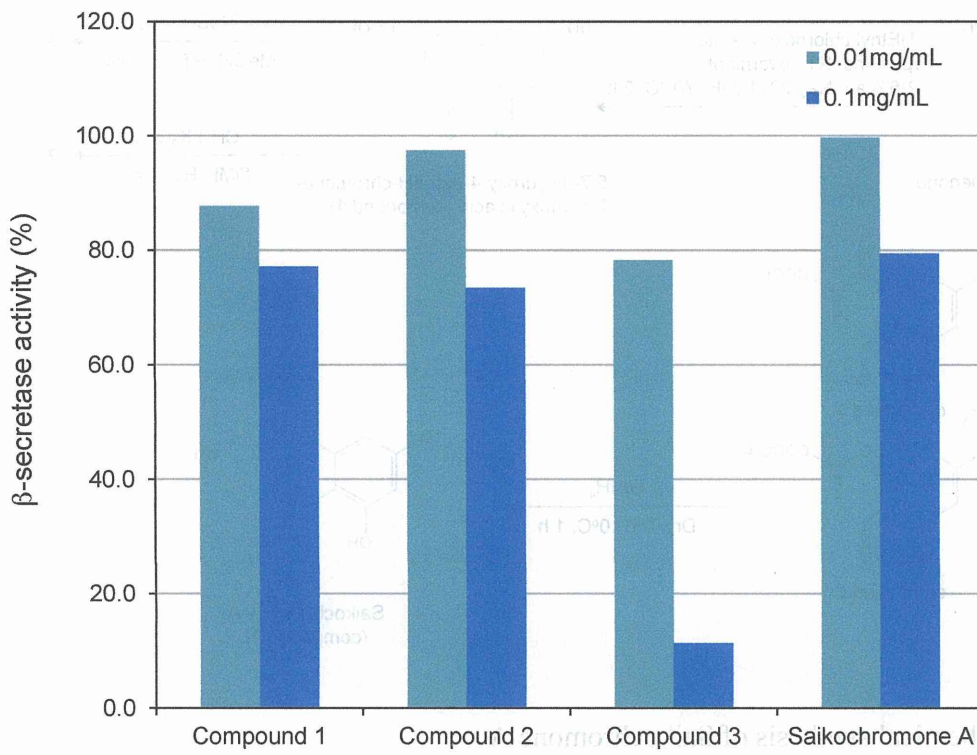


Fig.5 Inhibitory effects of Saikochromone A and related -compounds



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

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

研究分担者 島田 昌一 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

統合失調症に対する非定型抗精神病薬の作用機序としてドーパミンD2受容体やセロトニン受容体サブタイプに同時に作用することが知られている。そこで本研究では抑肝散中に含有される天然アルカロイド成分のドーパミン受容体やセロトニン受容体に対する影響を調べてきた。H23年度まではG蛋白質共役型受容体（GPCR）遺伝子ファミリーに属するセロトニン受容体やドーパミン受容体に関して解析を進めてきたが、本年度は、イオンチャネル型のセロトニン受容体である5-HT3受容体について解析した。その結果、5-HT3受容体に対してアンタゴニスト作用を有する抑肝散含有の天然アルカロイド成分を6種類同定した。その6種類のアルカロイドを5-HT3A受容体（ホモマー）と5-HT3ABCDE受容体（ヘテロマー）に対する抑制効果の違いによってさらに3通りに分類した。コリノキセインとリンコフィリンは5-HT3A受容体と5-HT3ABCDE受容体に対する抑制効果に、あまり差が認められなかった。一方、ヒルスチンやヒルスチンは5-HT3A受容体と比べると5-HT3ABCDE受容体により強い抑制効果を示した。逆にイソコリノキセインとイソリンコフィリンは5-HT3ABCDE受容体よりも5-HT3A受容体に対して高い親和性を示した。最後に、これら6成分を同時投与すると、5-HT3受容体のセロトニン応答に対して強い抑制効果が生じた。これらの複数のアルカロイド成分による相加・相乗効果によると考えられた。

A. 研究目的

抑肝散が認知症に伴う行動心理学的症状（BPSD）の治療に対して効果を示すことが報告されている。一方、BPSDの治療には非定型抗精神病薬が効果的であることが知られている。これらの観点から考えると、抑肝散の中に非定型抗精神病薬と類似した成分が含有されている可能性がある。統合失調症に対する非定型抗精神病薬の作用機序としてドーパミンD2受容体以外にも多種類のセロトニン受容体サブタイプに同時に作用することが知られている。そこで本研究では抑肝散中に含有される天然アルカロイド成分のセロトニン受容体やドーパミン受容体に対する影響を調べてきた。H23年度までに、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-HT2A、2C、5-HT7受容体にはアンタゴニストとして、また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を示した。H23年度まではセロトニン受容体やドーパミン受容体の中でもG蛋白質共役型受容体（GPCR）に属するタイプの受容体を対象に、キメラG蛋白質を用いたカルシウムイメージング法によって解析を進めてきたが本年度は、イオンチャネル型のセロトニ

ン受容体である5-HT3受容体について、電気生理学的に抑肝散中の天然アルカロイドがどのような影響を与えるかを検索した。5-HT3受容体はモノアミン受容体の中でも唯一のイオンチャネル型受容体であり、非定型抗精神病薬のオランザピンが高い親和性を有している。

B. 研究方法

5-HT3受容体は、ヘテロマーから成るイオンチャネルで、ヒトでは5-HT3A、5-HT3B、5-HT3C、5-HT3D、5-HT3Eの5つのサブファミリーが存在している。ヒトの5-HT3A、B、C、D、EのそれぞれのcDNAからキャッピングしたcRNAを合成して、アフリカツメガエル卵母細胞に微量注入し、5-HT3受容体を発現させた。2電極膜電位固定法により、電気生理学的にアフリカツメガエル卵母細胞に発現した5-HT3受容体の特性を解析した。抑肝散に含まれる天然アルカロイドの各種成分をセロトニンと同時に投与することによって、5-HT3受容体の応答に影響を与えるアルカロイドを同定した。

C. 研究結果

5-HT3ABCDE受容体に対してアンタゴニスト作用を有する抑肝散含有の天然アルカロイド成分を複数見いだした。リンコフィリン、イソリンコフィ

リン、ヒルスチン、ヒルス테인、コリノキセイン、イソコリノキセインの6成分は、5-HT<sub>3</sub>受容体に各々40 μM ずつ単独投与するとセロトニン応答に対して10~50%の抑制効果があった。さらにこれらの6成分を同時投与すると、5-HT<sub>3</sub>受容体のセロトニンに対する応答はほぼ完全に阻害された。

次に5-HT<sub>3</sub>受容体のサブユニットの違いによる抑肝散アルカロイドの感受性の違いについて検討した。5-HT<sub>3A</sub>受容体(ホモマー)と5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体(ヘテロマー)に対する抑肝散含有アルカロイドの抑制効果の差異は、大きく分けると3通りの特徴に分類することができた。

1) コリノキセインとリンコフィリンの5-HT<sub>3A</sub>受容体と5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体に対する抑制効果には、あまり差が認められなかった。

2) ヒルス테인やヒルスチンは5-HT<sub>3A</sub>受容体と比べると5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体の方により強い抑制効果を示した。

3) イソコリノキセインとイソリンコフィリンは逆に5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体よりも5-HT<sub>3A</sub>受容体に対して高い親和性を示すが、この二つのアルカロイドは部分アンタゴニストとして5-HT<sub>3A</sub>受容体に働いた。

#### D. 考察

非定型抗精神病薬のオランザピンはD<sub>2</sub>受容体や5-HT<sub>2A</sub>受容体に加えて5-HT<sub>3</sub>受容体に高い親和性を示す。本年度は抑肝散の天然アルカロイド成分の5-HT<sub>3</sub>受容体に対する影響を解析した。

漢方薬は西洋医学の薬とは異なる薬効を示すことがあるが、その理由として生薬中に含まれる複数の成分による相加・相乗効果によると考えられている。今回の結果で、5-HT<sub>3</sub>受容体に対して、抑肝散に含まれるアルカロイドの一成分ずつでは効果は弱い、複数の成分が同時に作用すると、強い抑制効果が得られることが分かった。この結果は、複数の成分で薬効を示す漢方薬の特徴を示すものである。

GABA<sub>A</sub>受容体も、5-HT<sub>3</sub>受容体と同じCysループイオンチャネル遺伝子ファミリーに属しているが、GABA<sub>A</sub>受容体では、ベンゾジアゼピンやアルコールなどが、異なるサブユニットに作用することが知られている。今回の研究では5-HT<sub>3A</sub>受容体のホモマーと5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体ヘテロマーを比較したが、抑肝散に含有される各種アルカロイドは、5-HT<sub>3</sub>イオンチャネル型受容体の異なるサブユニットに対し、それぞれ異なる機序で作用しているものと考えられた。

最近、マウスやラットを用いた行動実験で5-HT<sub>3</sub>受容体の阻害剤が、ハロペリドールで誘発される錐体外路症状を改善したという報告がある(Ohno et al. Neuropharmacology, 2011, 60:201-)。抑肝散の副作用が少ない理由として、5-HT<sub>3</sub>受容体の阻害作用が関与しているかもしれない。

#### E. 結論

イオンチャネル型のセロトニン受容体である5-HT<sub>3</sub>受容体について抑肝散に含まれるアルカロイドの影響を調べた。その結果、5-HT<sub>3</sub>受容体に対してアンタゴニスト作用を有する抑肝散含有天然アルカロイド成分を6種類同定した。その6種類のアルカロイドを5-HT<sub>3A</sub>受容体(ホモマー)と5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体(ヘテロマー)に対する抑制効果の違いによってさらに3通りに分類した。コリノキセインとリンコフィリンは5-HT<sub>3A</sub>受容体と5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体に対する抑制効果に、あまり差が認められなかった。一方、ヒルス테인やヒルスチンは5-HT<sub>3A</sub>受容体と比べると5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体により強い抑制効果を示した。逆にイソコリノキセインとイソリンコフィリンは5-HT<sub>3ABCDE</sub>受容体よりも5-HT<sub>3A</sub>受容体に対して高い親和性を示し、この二つのアルカロイドは部分アンタゴニストとして5-HT<sub>3A</sub>受容体に働いた。最後に、これら6成分を同時投与すると、5-HT<sub>3</sub>受容体のセロトニン応答に対して強い抑制効果が生じた。これらの複数のアルカロイド成分による相加・相乗効果によると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

総説

宮田信吾、遠山正彌、植田高史、鶴川眞也、島田昌一

統合失調症に有効な抑肝散成分の解析、脳21、15:346-349、2012.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
遠山正彌、宮田信吾	抑肝散が認知症に有効である証左	脳21	15(2)	201-206	2012
宮田信吾、遠山正彌、植田高史、鶴川真也、島田昌一	統合失調症に有効な抑肝散成分の解析	脳21	15(3)	346-349	2012
宮田信吾、遠山正彌	ストレス応答に対する抑肝散の効果	脳21	15(4)	346-349	2012

# 「抑肝散が認知症に有効である」 ことを支持する科学的証左

とおやままさや みやたしんご  
遠山正彌, 宮田信吾

近畿大学東洋医学研究所 (〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-21)

## SUMMARY

アルツハイマー病における神経細胞死は小胞体ストレスに対する応答が悪いためである。抑肝散は小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。従って、抑肝散はアルツハイマー病による神経細胞死の予防、進行の抑制に効果を発揮する予防薬、治療薬である。

## はじめに

高齢化に従い認知症の患者は急増している。コリンエステラーゼやNMDA受容体の阻害剤などがその治療薬として開発されているがその効果はおせじにも効果的とはいえない。一方漢方薬である抑肝散が認知症に有効であるという報告は相次いでいる。果たして、本当に有効なのだろうか？もし有効とすればその科学的裏づけは？本稿では抑肝散が認知症に有効であるという科学的証左を提供する<sup>1)</sup>。

我々はアルツハイマー病における神経細胞死は小胞体内に過剰蓄積した不良タンパク質を感知し、その処理にあたる小胞体センサーの異常であることが原因を明らかとしてきた(図1)<sup>2,3)</sup>。もし抑肝散が認知症に有効だとすれば抑肝散は小胞体ストレスによる神経細胞死を防御するはずである。

## I. 抑肝散は小胞体ストレスによる神経細胞死を防御する

先に報告したように培養神経細胞 (Neuro2a, N2a) に小胞体ストレス [Thapsigardin (TG) や低酸素刺激 (Hypo)] を加えると神経細胞死を引き起こす (図2 A, B)。培地に抑肝散を加えると小胞体ストレスによる神経細胞死が救済される。しかしながら非小胞体

## KEY WORDS

抑肝散  
アルツハイマー病  
神経細胞死  
治療薬