

201208004B

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22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 遠山 正彌

平成25(2013)年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告 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. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
III. 研究成果の刊行物・別刷	26

厚生労働科学研究費補助金（創薬総合推進研究研究事業）  
（総合）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

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。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および統合失調症に対する効果を分子レベルでの解析と治療薬シーズの探索を目指した。

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誘導時に分子シャペロン GRP78 発現を高めると共に CHOP の発現を抑えることにより、小胞体ストレスにおける細胞死実行因子カスパーゼ 4 の活性化を抑制し、細胞死から救済することを見出した。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。

我々はさらに抑肝散構成生薬の抽出物について、小胞体ストレスによる神経細胞死抑制効果およびbセクレターゼ活性の阻害成分の探索を行った。その結果、神経細胞死抑制効果については抑肝散の構成生薬であるセンキュウに含まれる Ferulic acid が、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見出した。bセクレターゼ活性の阻害成分については、サイコの EtOAc 抽出物とサイコ中の成分類縁体であるクロモン骨格を持つ化合物がbセクレターゼ阻害活性を示すことを明らかにした。さらに、ブクリョウ、トウキなども細胞死抑制効果を有することを見出した。この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。

認知症に伴う行動心理学的症状（BPSD）の治療には非定型抗精神病薬が効果的を示すことが知られている。また、抑肝散も BPSD に対して効果を示すことが報告されている。そこで、抑肝散に含まれる成分の中から、非定型抗精神病薬と類似した薬理作用を示す単体のアルカロイドを同定し、統合失調症に有効な新しい薬剤を開発することも目的とした。我々は抑肝散の天然アルカロイド成分の中で、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<sub>2A</sub>、2C、5-HT<sub>7</sub> 受容体にはアンタゴニストとして作用し、ドーパミン D<sub>2</sub> 受容体に対してはパーシャルアゴニストとして働くことを明らかにした。また、コリノキセイン、リンコフィリン、ヒルステイ

ン、ヒルスチン、イソコリノキセイン、イソリンコフィリンの6種類の天然アルカロイドが、イオンチャネル型セロトニン受容体の5-HT<sub>3</sub>にアンタゴニストとして働き、この6種類のアルカロイドを同時投与すると強力に5-HT<sub>3</sub>受容体を阻害することを示した。これらのアルカロイドのドーパミン受容体やセロトニン受容体への作用は非定型抗精神病薬のアリピプラゾールやオランザピンの作用に類似していた。非定型抗精神病薬が標的としているドーパミン受容体やセロトニン受容体に対して、抑肝散に含有されるこれらのアルカロイドもアンタゴニストやパーシャルアゴニストとしての作用を有することから、統合失調症の治療薬の開発にこれらのアルカロイドが役立つと考えられる。

#### 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。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これまでの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。

さらに抑肝散は認知症の予防、進行防止にも有効との結果も報告されている。そこでまず我々は、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。アルツハイマー病を含めた認知症の治療の標的としては、神経

細胞のアポトーシス抑制効果、小胞体ストレス抑制効果、アルツハイマー病において顕著化するアミロイド線維の産生抑制、アセチルコリンエステラーゼ活性の阻害などが挙げられ、精力的に治療薬開発が進められている。

以上のような背景の下、本研究では抑肝散の認知症に対する効果を分子レベルでの解析と治療薬シーズの探索を目指し、抑肝散構成生薬の抽出物について、小胞体ストレスによる神経細胞死抑制効果およびβセクレターゼ活性の阻害成分の探索を行った。

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、非定型抗精神病薬と類似した成分を含有し、統合失調症に有効な成分をも含むことを示している。

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D<sub>2</sub>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。これまでに、ガイソジジンメ

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<sub>2A</sub>、2C、5-HT<sub>7</sub> 受容体にはアンタゴニストとして、また D<sub>2</sub> 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。本研究で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た。さらに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、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についても検索した。5-HT<sub>3</sub> 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。

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した。

## B. 研究方法

### B.1 認知症研究：

抑肝散はソウジュツ、ブクリョウ、センキユウ、チョウトウコウ、トウキ、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 のセンキユウ、3g のチョウトウコウ、3g のトウキ、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。

#### B.1.1 抑肝散の小胞体ストレス誘導による神経細胞死の抑制効果

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。その結果センキユ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。そこでセンキユウから有効成分の抽出を行った。

#### B.1.2 センキユウ熱水抽出物の神経細胞死抑制効果

##### B.1.2.1 ヒト神経芽細胞腫細胞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、40000 cell/mL となるように Tissue culture 用 96-well microplate で 40 時間培養した。培養後、positive および negative control 群を除くすべての well に被検体物質を含む血清不含の DMEM 液 100  $\mu$ L を加え、90 分間インキュベートした。PBS で各 well を洗浄後、control 群を除く全ての well に 5  $\mu$ M Thapsigargin を含む血清不含の DMEM 液 100  $\mu$ L を加え、5 時間インキュベートした。各 well を PBS で洗浄後、WST-1 proliferation reagent を加え、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.1.2.2 センキユウ熱水抽出物成分の分画

センキユウ熱水抽出物 20g に BuOH 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。BuOH 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) により回収し計 100g のセンキユウ熱水抽出物から、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 MeOH に溶解し、MeOH 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、MeOH 不溶部については、MeOH 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 EtOAc と蒸留水を加え分液ロート内で激しく攪拌し静置後、EtOAc 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 MeOH に溶解し、MeOH 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、MeOH 不溶部については、MeOH 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 EtOAc と蒸留水を加え分液ロート内で激しく攪拌し、静置後、EtOAc 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 MeOH に溶解し、MeOH 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、MeOH 不溶部については、MeOH 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.1.2.3 センキュウ熱水抽出物分画のアポトーシス抑制効果

B.1.2.2 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。

#### B.1.3 抑肝散構成生薬のβセクレターゼ阻害活性探索

##### B.1.3.1 抑肝散構成生薬の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 50 g) を 500 mL の MeOH 中、80°C、3 時間加熱還流しながら MeOH 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 EtOAc-水 (200 : 200 mL) を用いて抽出し、EtOAc 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.1.3.2 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-NH<sub>2</sub>、3212-v)、positive control 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、positive control ペプチドペプチド (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。

活性測定は 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。positive control ペプチドとして positive control ペプチドペプチド (4378-v、12.5 μM)、negative control には DMSO を用いた。

##### B.1.3.3 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。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、MeOH 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.1.3.4 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°C で保存した。

#### B.1.3.5 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°C 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.1.4 抑肝散のタンパク質 sumoylation を介した神経細胞死抑制機構

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 mg/lane で抗 SUMO1 抗体によるウェスタンブロットを行った。

#### B.2 統合失調症研究 :

抑肝散のアルカロイド成分が、脳のドーパミン受容体やセロトニン受容体の各サブタイプに対してどの様に作用するかを検討した。

##### B.2.1 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) のアッセイ

ドーパミン受容体 (D1, D2) やセロトニン受容体 (1A, 2A, 2C, 7) は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) 遺伝子スーパーファミリーに属する。これらの受容体の応答をアッセイするのに細胞内 Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いて解析した。これらの受容体はそれぞれ異なる G 蛋白と共役するため、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 $\alpha$  蛋白と G $\alpha$  16 蛋白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 G タンパク質共役型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、実験に用いるドーパミン受容体やセロトニン受容体は、RT-PCR 法により脳組織から単離した。

##### B.2.2 イオンチャネル型受容体のアッセイ

5-HT<sub>3</sub> 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-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>, 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub>, 5-HT<sub>3E</sub> の 5 つのサブファミリーが存在している。ヒトの 5-HT<sub>3A</sub>, 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-HT<sub>3</sub> 受容体を発現させた。2 電極膜電位固定法により、アフリカツメガエル卵母細胞に発現した 5-HT<sub>3</sub> 受容体の特性を電気生理学的に解析した。抑肝散に含まれるアルカロイドの各種成分をセロトニンと同時投与することによって、5-HT<sub>3</sub> 受容体のセロトニン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

##### C.1 認知症研究

##### C.1.1 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 (Figure. 1)。

### C.1.2 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、サイコも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 (Figure. 2)。

### C.1.3 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 (Figure. 3, 4, 5)。

### C.1.4 センキュウ熱水抽出物の神経細胞死抑制効果

#### C.1.4.1 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 Figure.6 に示す。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 により誘導される小胞体ストレス誘導によるアポトーシスを抑制することがわかった。

#### C.1.4.2 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 Figure.7 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 Figure. 8 に示す。2.5  $\mu$ g/mL、25  $\mu$ g/mL、250  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL では 59%、25  $\mu$ g/mL では 73%、250  $\mu$ g/mL では 75%となり、25  $\mu$ 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。

### C.1.5 センキュウ抽出物に含まれる Ferulic acid が神経細胞死抑制効果を示す

抑肝散の構成生薬センキュウ中に含まれる Ferulic acid に細胞死抑制効果の可能性が見出されたため、TG 刺激による細胞死を抑制するか



否か Ferulic acid の前処理により検討したところ、濃度依存に神経細胞死抑制効果を示した (Figure. 9)。

#### C.1.6 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が、sumoylation を介する神経細胞死抑制効果はセンキュウのみであった

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 (Figure. 2)。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 (Figure. 10)。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 (Figure. 11)。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 (Figure. 12)。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。

#### C.1.7 抑肝散構成生薬抽出物の $\beta$ セクレターゼ阻害活性

##### C.1.7.1 抑肝散構成生薬抽出物の $\beta$ セクレターゼ阻害活性

$\beta$  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、 $\beta$  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。 $\beta$  セクレターゼ阻害活性は、 $\beta$  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。8 種類の生薬から得た 24 分画について  $\beta$  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、H<sub>2</sub>O 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低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  $\mu$ g/mL の濃度で 45% の  $\beta$  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  $\beta$  セクレターゼ阻害活性の濃度依存性を調べた。結果を Figure. 13 に示す。25  $\mu$ M のポジティブコントロールペプチドを用いた場合、 $\beta$  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  $\mu$ g/mL で 1.3、25  $\mu$ g/mL で 51.9%、500  $\mu$ g/mL で 71.7% であり、濃度依存的に  $\beta$  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  $\beta$  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.1.7.2. サイコ酢酸エチル分画の $\beta$ 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  $\beta$  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を調べた。各分画の  $\beta$  セクレターゼ阻害活性を Figure. 14 に示す。 $\beta$  セクレターゼ阻害活性を調べた結果、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。

##### C.1.7.3. 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 (Figure. 15) 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 Figure. 16 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 (Figure. 17, 18) 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-carboxylic 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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  $\beta$ 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。

## C.2 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、ガイソシジンメチルエーテル (Figure. 19) が、G 蛋白共役型セロトニン受容体に影響を与えることが分かった。ガイソシジンメチルエーテルは 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き、その EC50 値は  $4.6 \mu\text{M}$  であった (Figure. 20)。5-HT2A 受容体に対しては、主にアンタゴニストとして働き、その IC50 値は  $13 \mu\text{M}$  であ

った (Figure. 21)。5-HT2C 受容体に対してはアンタゴニストとして働き、その IC50 値は  $8.5 \mu\text{M}$  であった (Figure. 21)。この 5-HT2A と 5-HT2C 受容体に対してはわずかではあるが部分アゴニストとしての活性も有していた。5-HT7 受容体に対してもアンタゴニストとして働いた (IC50 値:  $610\text{nM}$ ) (Figure. 21)。

次にガイソシジンメチルエーテルのドーパミン受容体サブタイプに対する影響を詳細に調べるため、D1、D2 受容体に対するガイソシジンメチルエーテルの影響を第三世代抗精神病薬のアリピプラゾールと比較しながら解析した。D1 受容体は Gs タンパク質と共役し、D2 受容体は Gi タンパク質と共役するので、それぞれのドーパミン受容体に機能的に共役するキメラ G タンパク質 (G16/o や G16/i3) を作成し、ドーパミン受容体と HEK293 細胞に共発現させ、カルシウムイメージング法を用いて解析した。

D2 受容体に対して、第三世代抗精神病薬であるアリピプラゾールは EC50 が  $56.0\text{nM}$  で、その最大応答はドーパミンによる最大応答に比べると  $68.6 \pm 13.7\%$  で D2 パーシャルアゴニストとしての特性を示した (Figure. 22)。次に、ガイソシジンメチルエーテルの D2 受容体に対する親和性は  $4.4 \mu\text{M}$  で、その最大応答はドーパミンで惹起される最大応答に比べると  $50 \pm 15\%$  であることから、ガイソシジンメチルエーテルも D2 パーシャルアゴニストであることが分かった (Figure. 22)。一方、D1 受容体に対してガイソシジンメチルエーテルは親和性を示さなかった (Figure. 23)。

5-HT3ABCDE 受容体に対しては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、ヒルスチン、コリノキセイン、イソコリノキセインの 6 成分は、5-HT3 受容体に各々  $40 \mu\text{M}$  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-HT3 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-HT3 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-HT3A 受容体 (ホモマー) と 5-HT3ABCDE 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) ヒルステインやヒルスチンは 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

### D.1 認知症研究

本研究では抑肝散の認知症に対する効果を分子レベルでの解析と治療薬シーズの探索を目指し、抑肝散構成生薬の抽出物について、小胞体ストレスによる神経細胞死抑制効果およびβセクレターゼ活性の阻害成分の探索を行った。

その結果、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ズ 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ズ 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。

さらに、センキュウはタンパク質の sumoylation の亢進も引き起こした。この結果は、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ズ 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。

神経細胞死抑制効果についてはセンキュウの抽出物および主要成分の 1 つであるフェルラ酸にアポトーシス抑制効果があること、βセクレターゼ活性の阻害成分については、サイコの EtOAc 抽出物とサイコ中の成分類縁体であるクロモン骨格を持つ化合物がβセクレターゼ阻害活性を示すことを明らかにした。このように抑肝散がアルツハイマー型認知症を含めた認知症に対して、異なる作用点での効果を発揮することは、抑肝散の臨床実績において 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を持つという事実とも相関するものであると考えられる。また、抑肝散の構成生薬中の成分が化合物レベルにおいても、神経細胞死抑制効果やβセクレターゼ阻害活性を示すことから、治療薬開発のシーズとしても興味深く、今後の展開が期待される。

### D.2 統合失調症研究

本研究では抑肝散に含まれる成分の中から、非定型抗精神病薬と類似した薬理作用を示す単体のアルカロイドを同定することを目指しているが、非定型抗精神病薬の標的分子の多くがドーパミン受容体やセロトニン受容体である。そして、ドーパミン受容体とセロトニン受容体のサブタイプの殆どが G 蛋白質共役型受容体で、D<sub>2</sub> 受容体や 5-HT<sub>1</sub> 受容体は Gi 蛋白質と共役し細胞内の cAMP を減少させ、5-HT<sub>2</sub> 受容体は Gq 蛋白質と共役し細胞内のカルシウムを上昇させ、D<sub>1</sub> 受容体や 5-HT<sub>4~7</sub> 受容体は Gs 蛋白質と共役し細胞内の cAMP を上昇させると考えられている。そこで G16/o や G16/i3 などのキメラ G 蛋白質を各種ドーパミン受容体や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 蛋白質共役型のドーパミン受容体や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なシステムを開発した。

この方法を用いて検討した結果、ガイソシンメチルエーテルが 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に対してはパーシャルアゴニストとして、5-HT<sub>2A</sub>、2C、5-HT<sub>7</sub> 受容体にはアンタゴニストとして作用し、D<sub>2</sub> 受容体に対してはパーシャルアゴニストとして作用した。これらのセロトニン受容体とドーパミン受容体に対するプロフィールは、第 3

世代の非定型抗精神病薬のアリピプラゾールのドーパミン・セロトニンシステムスタビライザーとしての特徴と類似していた。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。

また、非定型抗精神病薬のオランザピンは D2 受容体や 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に加えて、5-HT<sub>3</sub> 受容体に対しても高い親和性を示すことから、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も解析した。

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、5-HT<sub>3</sub> 受容体に対して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よく示している。

GABAA 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、GABAA 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

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、統合失調症研究では抑肝散に含まれる成分の中から、非定型抗精神病薬と類似した薬理作用を示す単体のアルカロイドを同定し、統合失調症に有効な新しい薬剤を開発することを目

的とした。抑肝散の天然アルカロイド成分の中でも、ガイソシジンメチルエーテルは 5-HT<sub>1A</sub> 受容体に対してはパーシャルアゴニストとして、5-HT<sub>2A</sub>、2C、5-HT<sub>7</sub> 受容体にはアンタゴニストとして作用し、ドーパミン D<sub>2</sub> 受容体に対してはパーシャルアゴニストとして作用した。また、コリノキセイン、リンコフィリン、ヒルステイン、ヒルスチン、イソコリノキセイン、イソリンコフィリンの 6 種類の天然アルカロイドは、イオンチャネル型セロトニン受容体の 5-HT<sub>3</sub> にアンタゴニストとして働き、この 6 種類のアルカロイドを同時投与すると強力に 5-HT<sub>3</sub> 受容体を阻害した。これらのアルカロイドのドーパミン受容体やセロトニン受容体への薬理作用は非定型抗精神病薬のアリピプラゾールやオランザピンの薬理作用に類似していた。非定型抗精神病薬が標的としているドーパミン受容体やセロトニン受容体に対して、抑肝散に含有されるこれらのアルカロイドもアンタゴニストやパーシャルアゴニストとしての作用を有することから、統合失調症の治療薬の開発にこれらのアルカロイドが役立つと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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.* 2011; 671(1-3):79-86.

島田昌一、石田雄介、鶴川真也、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.

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

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.

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.

## 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.

「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

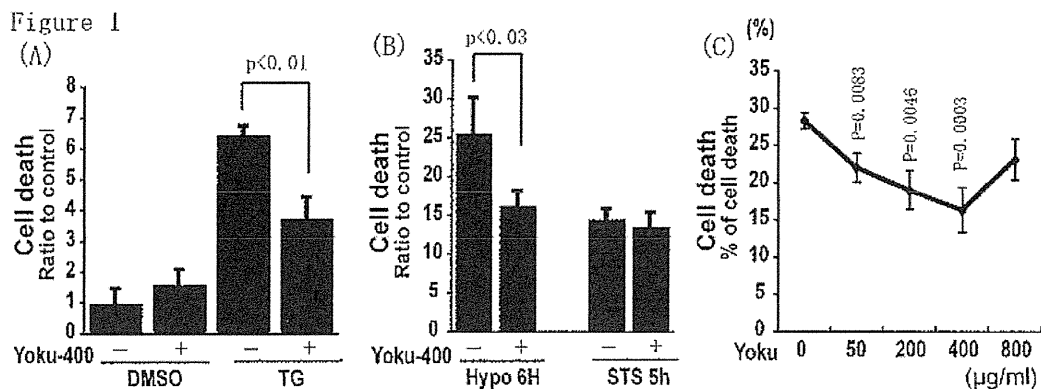


Figure 1 抑肝散は小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。(A) 小胞体ストレス (TG) 負荷により神経細胞死が起きる。抑肝散投与では細胞死が救済される (TG+Yoku-400)。(B) 低酸素刺激 (Hypo) による神経細胞死も抑肝散は救済する (Hypo6H+Yoku-400) がミトコンドリア由来の細胞死 (STS) には保護効果を示さない。(C) 抑肝散は濃度依存性に小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。

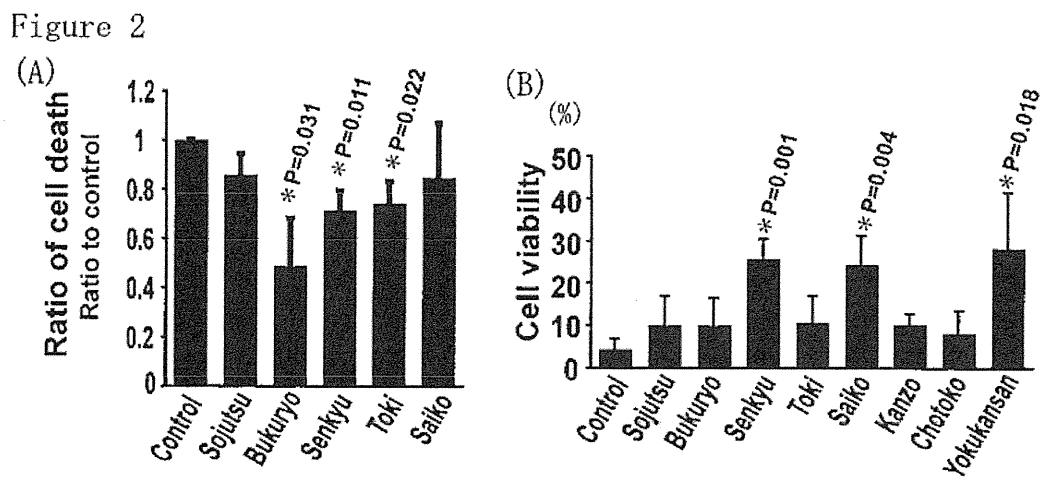


Figure 2 センキュウは小胞体ストレスによる神経細胞死に対して強い保護効果を持つ。その効果はヒト由来の神経細胞を用いたときに著明となる (B) ..A はマウス由来の神経細胞。

Figure 3

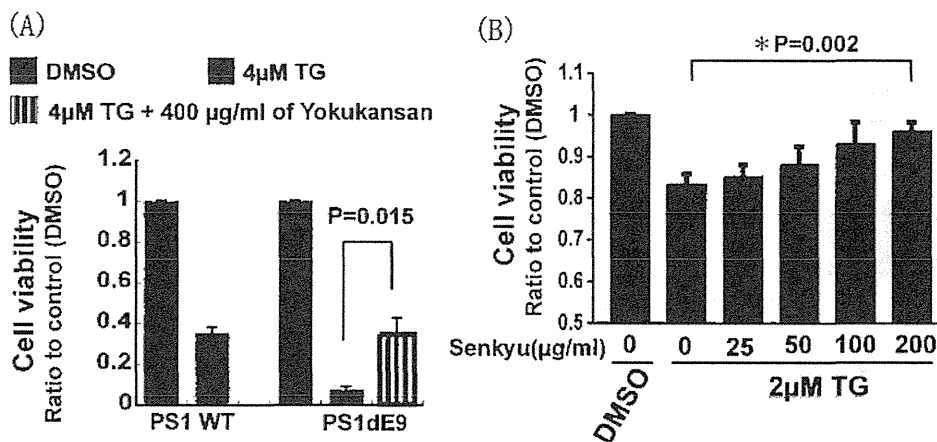


Figure 3 (A) 正常の PS1 が発現している細胞に小胞体ストレスを負荷すると神経細胞死が起きる (A; PS1WT)。変異 PS1(PS1dE9)発現細胞では小胞体ストレス誘導性の細胞死が増強される。抑肝散はこの細胞死を抑制する。(B) センキュウは濃度依存性に変異 PS1 発現細胞で惹起される小胞体ストレス依存性神経細胞死を救済する。

Figure 4

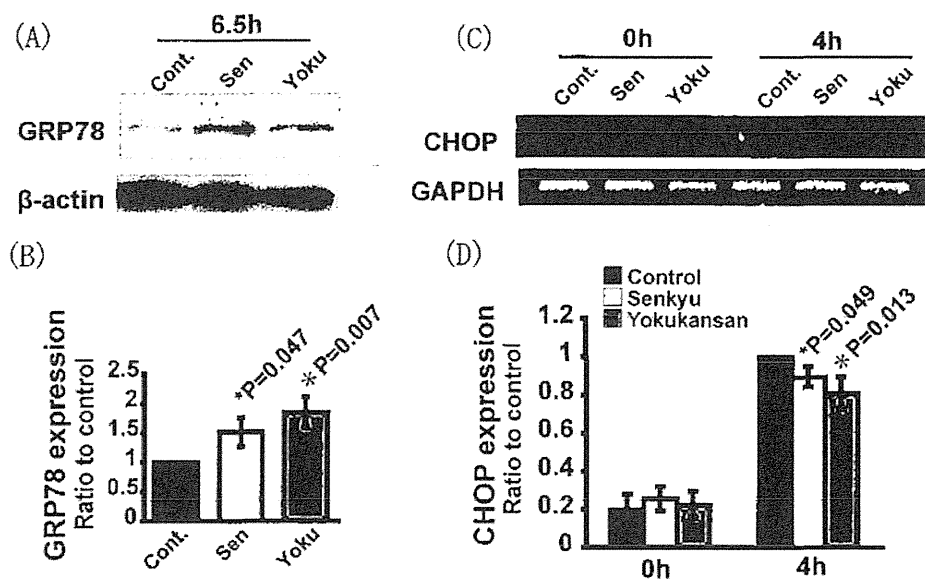


Figure 4 (A, B) センキュウ (Sen) と抑肝散『Yoku』は小胞体ストレスを負荷された神経細胞で正常に比して GRP78 発現を増強する。(C,D) センキュウと抑肝散は同じ細胞で CHOP 発現を低下させる。

Figure 5

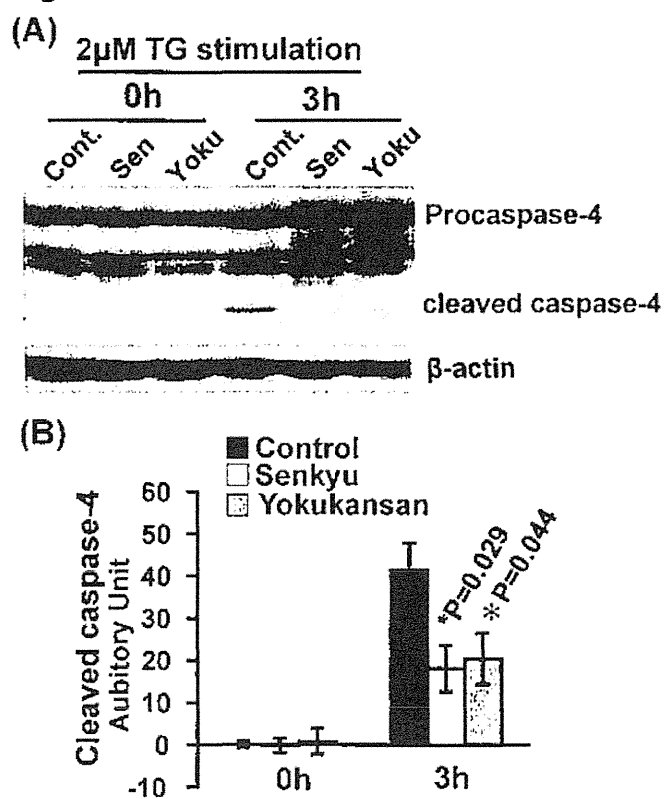
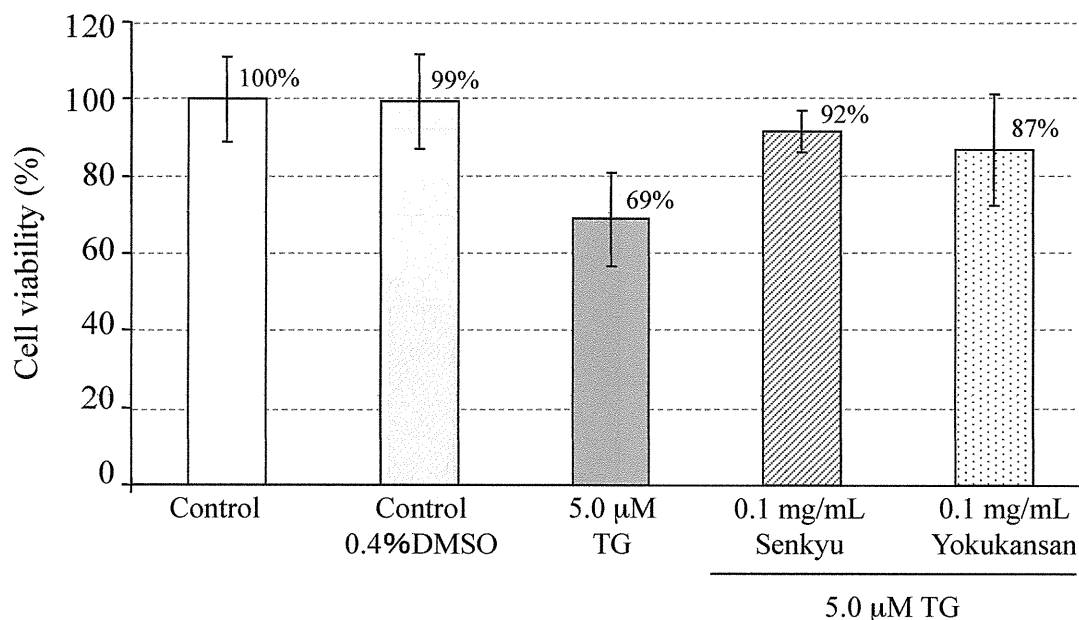


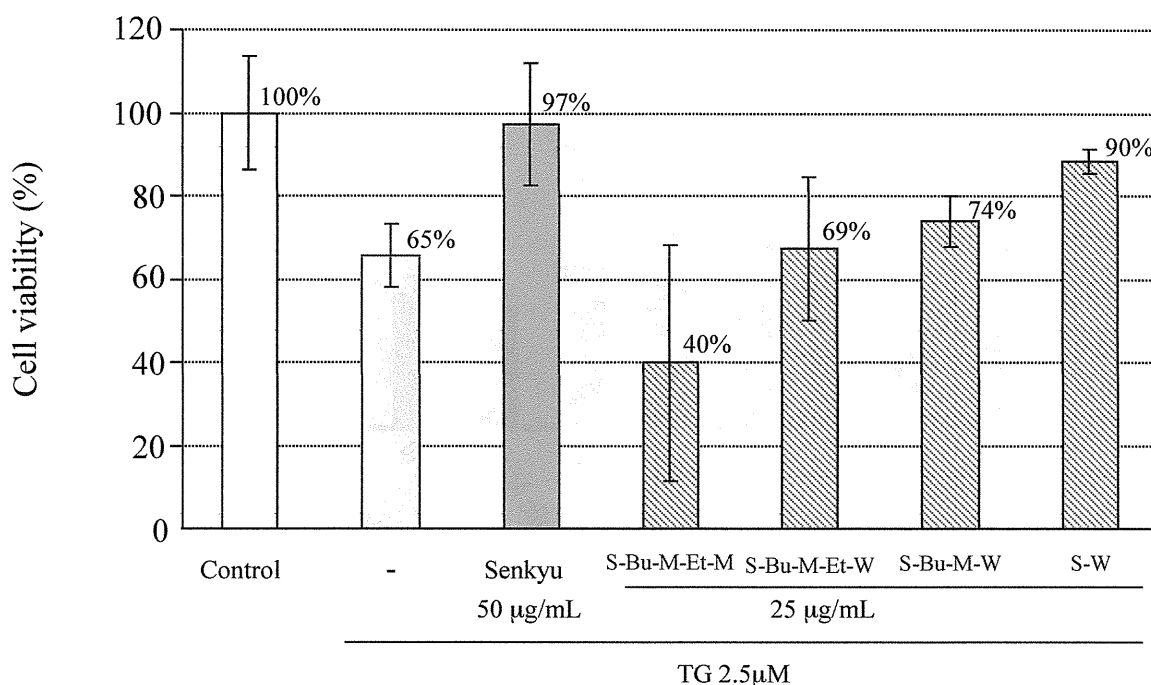
Figure 5 (A,B) センキュウ及び抑肝散はカスパーズ4の活性化を阻害する。





Cell: SK-N-SH (4000 cell/well); pre-culture: 40 hr; pre-incubate: 1.5 hr; TG stimulation: 5 hr; WST-1 assay: 3 hr; n=10

Figure 6. Inhibitory effect of senkyu- and yokukansan-extracts on ER-stress induced apoptosis



Cell: SK-N-SH (4000 cell/well); pre-culture: 40 hr; pre-incubate: 1.5 hr; TG stimulation: 5 hr; WST-1 assay: 3 hr; n=12

Figure 7. Inhibitory effect of senkyu-extracts on ER-stress induced apoptosis

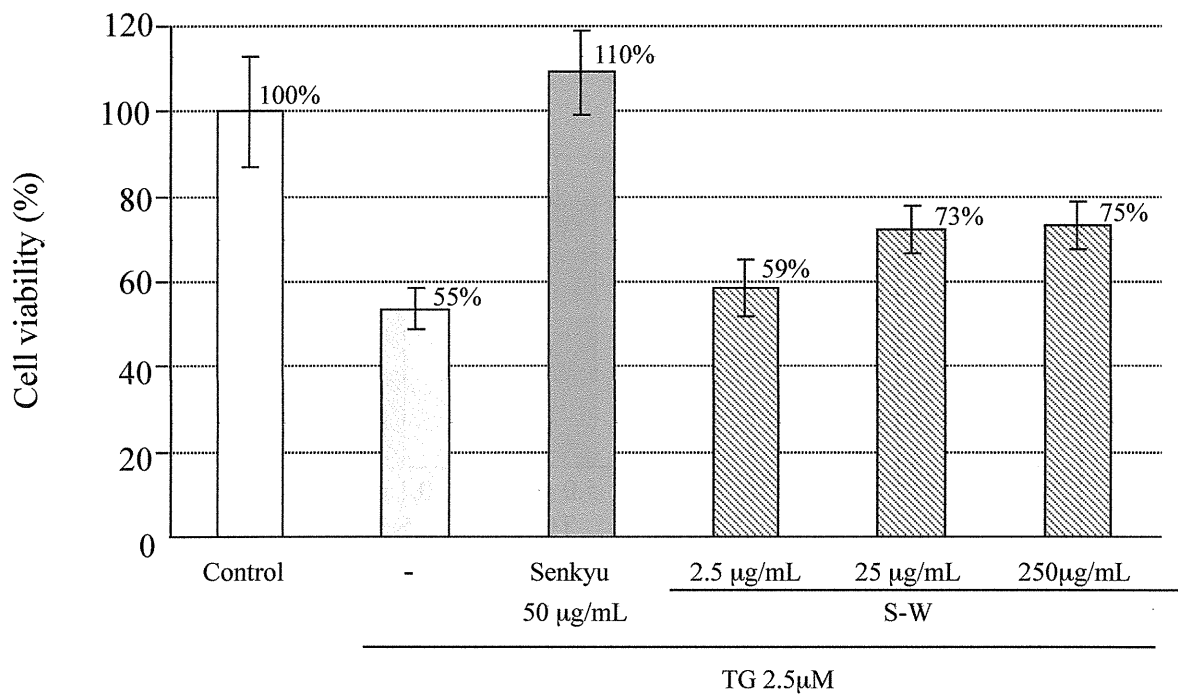


Figure.8 Inhibitory effect of senkyu-extracts on ER-stress induced apoptosis

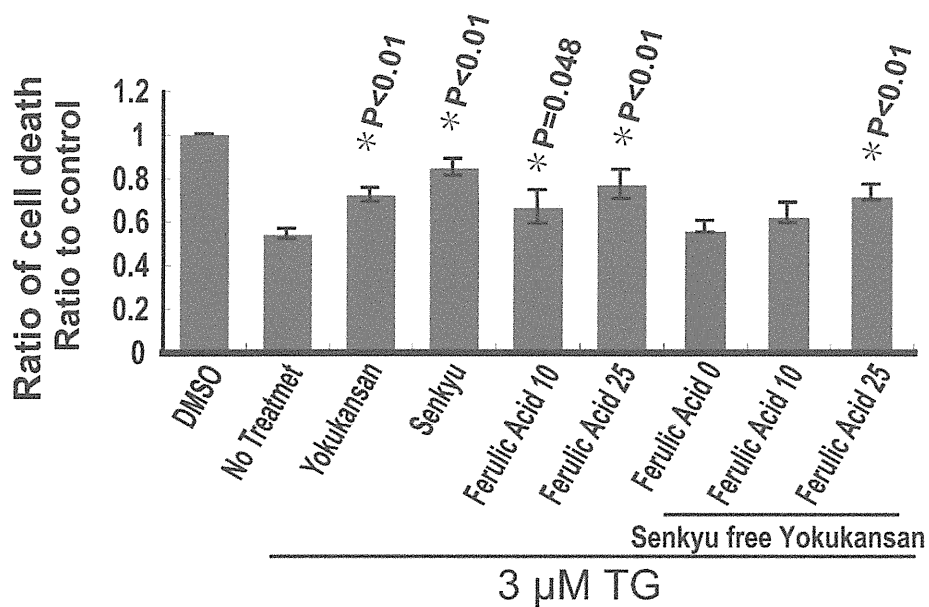


Figure 9 センキユウに含まれる Ferulic acid が小胞体ストレスによる神経細胞死を抑制する。

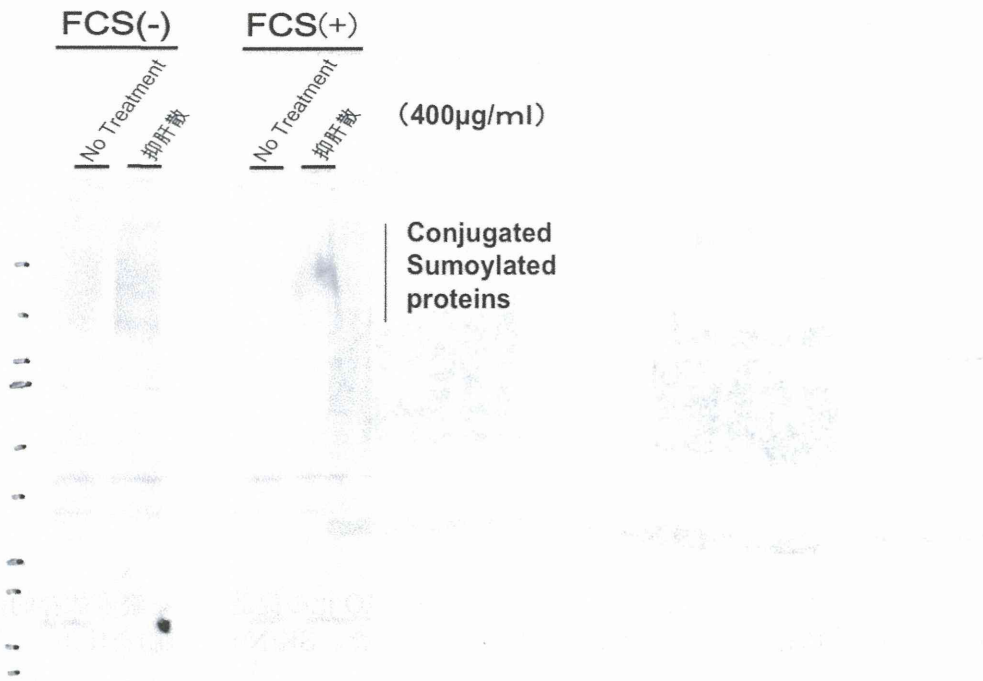


Figure 10 抑肝散処理による SUMO 化の促進効果。血清の有無にかかわらず抑肝散処理により蛋白質の SUMO 化が促進された。SK-N-SH 細胞を使用。

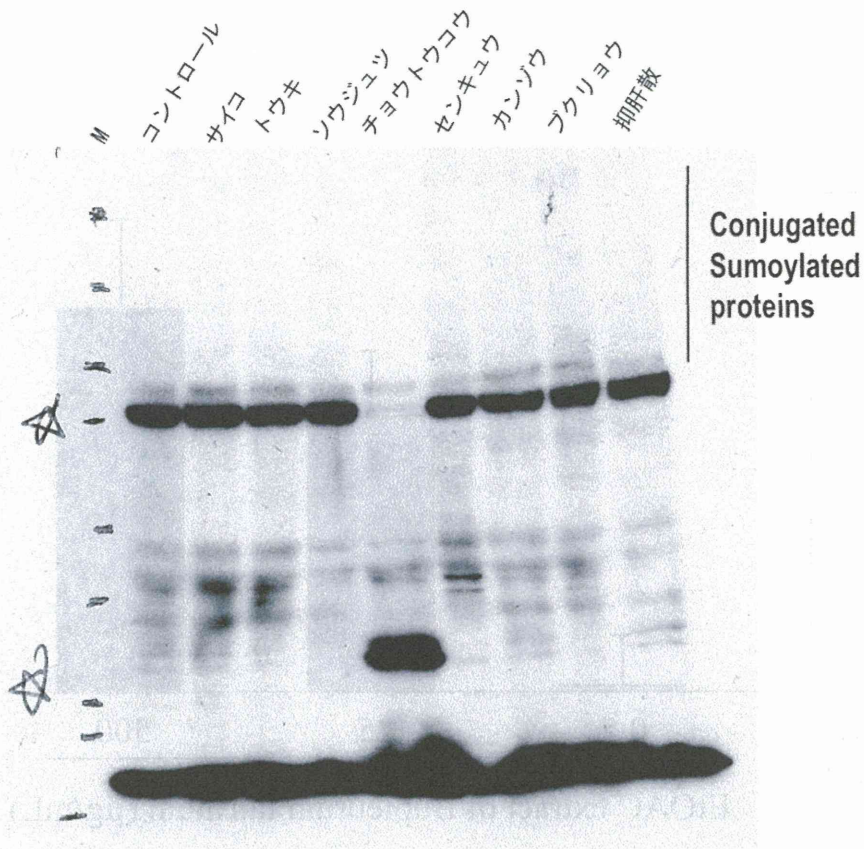


Figure 11 抑肝散の各構成生薬の処理による SUMO 化の促進効果。センキュウ、カンゾウ、ブクリョウの処理により蛋白質の SUMO 化が促進された。SK-N-SH 細胞を使用。

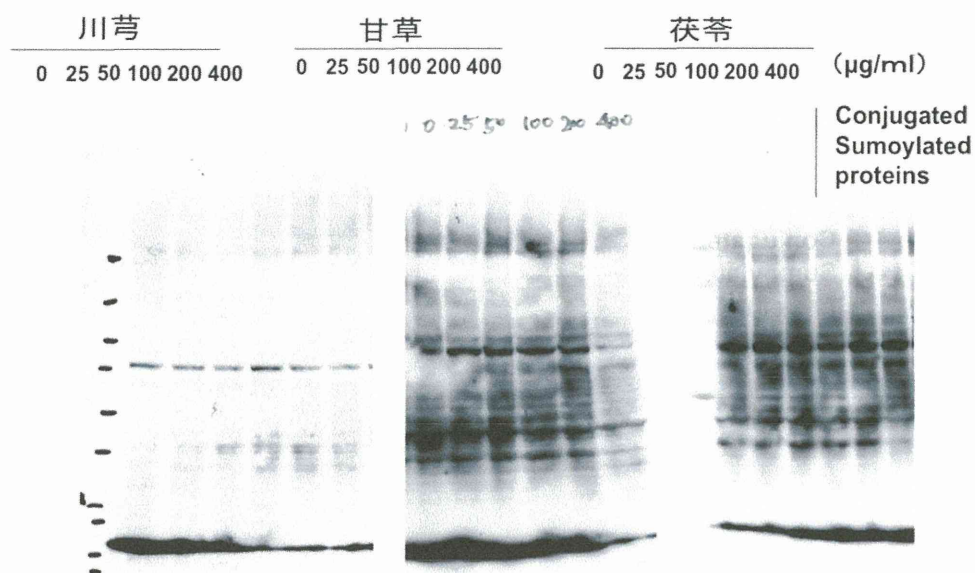


Figure 12 センキュウ、カンゾウ、ブクリョウによる SUMO 化の促進効果を濃度依存的に検討した。センキュウのみが濃度依存的に SUMO 化の促進効果を示した。SK-N-SH 細胞を使用。

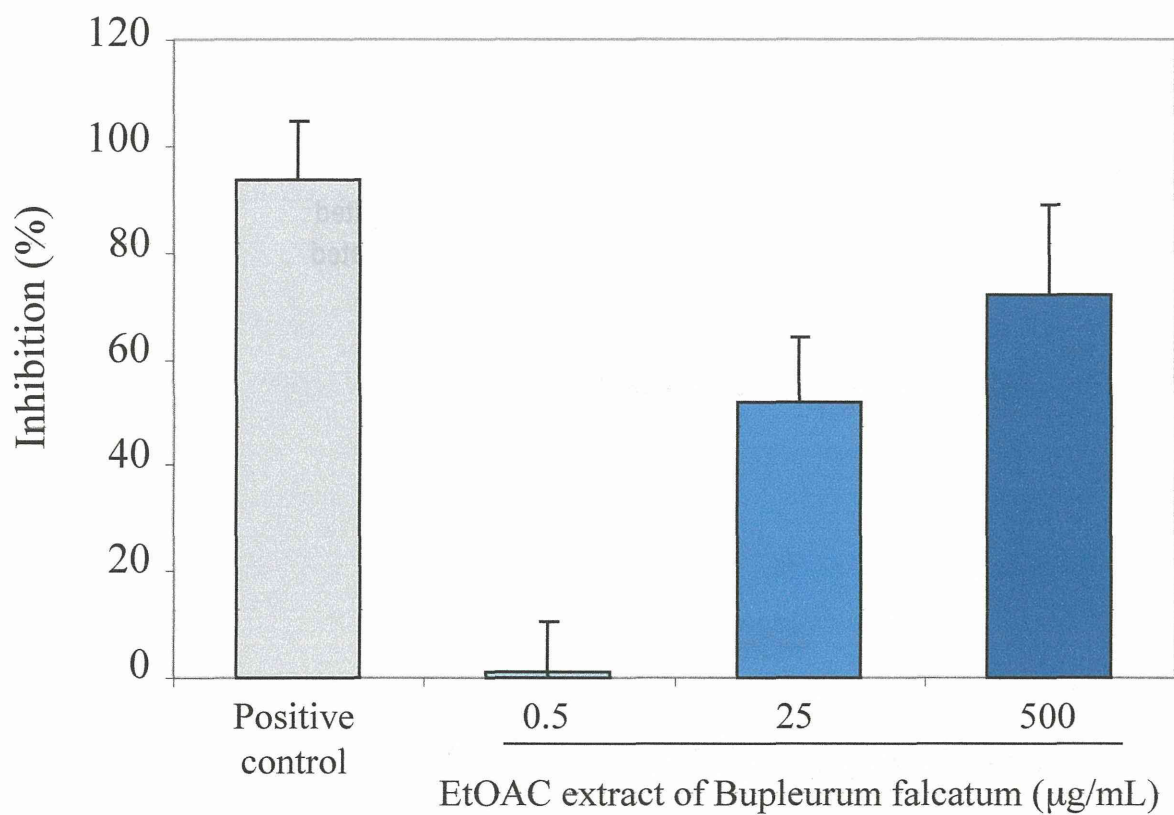


Figure. 13 Inhibitory effects of EtOAc-extract of *Bupleurum falcatum* on  $\beta$ -secretase