

201208008A

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 

平成24年度 総括・分担報告書

研究代表者：
服部信孝

分担研究者：
齊木臣二
船山 学
井本正哉
田代 悦

平成25(2013)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 24 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 斉木 臣二
舩山 学
井本 正哉
田代 悦

平成 25(2013)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. 大黃甘草湯の PD モデルマウスへの薬効に関する研究	5
齊木 臣二	
2. MPTP モデルマウスの標準化に関する研究	7
船山 学	
3. 甘草に含まれる抗 PD 作用を持つ化合物の同定に関する研究	11
井本 正哉	
4. 甘草に含まれる抗 PD 作用を持つ化合物の細胞死への薬理作用解明	14
田代 悦	

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..... 23

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

平成 22－23 年度の研究により、128 種の漢方薬の中から 4 つの培養細胞ラインを用いた検討により大黃甘草湯・調胃承気湯がヒット漢方薬であることを突き止め、両薬剤に共通して含まれる甘草に MPP+によって誘導される細胞死を抑制する効果を持つことを明らかにした。

最終年度である平成 24 年度には、大黃甘草湯を投与したパーキンソン病（PD）モデルマウスの病理学的検討を行い、さらに甘草に含まれる活性成分を NMR を用いた構造決定により決定し、2 種の化合物

（lycopyranocoumarine, glycyrurol）を同定し、同化合物の細胞死抑制作用がオートファジーを介した傷害ミトコンドリアを除去によることを細胞レベルで解明した。以上のように、当初の目的であった「抗パーキンソン病作用を持つ化合物を、市販漢方薬から同定する」という目標を完遂することが出来た。現在 PD モデルマウスに 2 化合物を投与し、症状改善効果を評価している。

A. 研究目的

漢方薬スクリーニングにてヒットした大黃甘草湯・調胃承気湯の構成生薬である甘草に含まれる有効活性成分を構造解析を用いて同定すること、さらに甘草から抽出した有効活性成分の PD モデル細胞への細胞死抑制効果を確認すること、並びに一昨年に確認した大黃甘草湯投与マウスの脳切片を病理学的に評価し、薬効の作用機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. ヒット漢方薬の有効候補成分同定・構造解析

ヒット漢方薬①-③について、それらのアセトン抽出物を調整し、アセトン抽出物が I-III のそれぞれのスクリーニング系で活性が見られた場合、そのアセトン抽出物を各種カラムクロマトグラフィーにて分離し、活性を指標に有効活性成分を単一化合物にまで単離精製する。得られた活性化合物

は各種スペクトル解析によりその化学構造を決定する。

2. 有効活性成分の細胞死抑制効果の確認・並びに細胞死抑制の分子機構の解明

PC12D 細胞に MPP+ 0.3mM を添加し、24 時間後に様々な濃度の有効活性成分を添加し、さらに 24 時間後に細胞死抑制効果を評価した。

3. 大黃甘草湯 0.5g/kg を投与したマウスの生化学的検討

初年度にマウスへの調胃承気湯・大黃甘草湯の経口投与を行い、薬効が確認された 0.5g/kg 投与群とコントロール群との脳切片を生化学的に検討した。抗体としては抗 TH 抗体、抗 Iba1 抗体などを用いた。

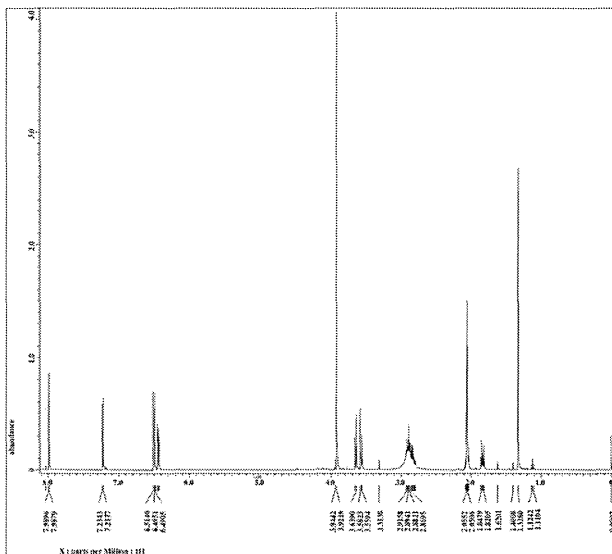
（倫理面への配慮）

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」、

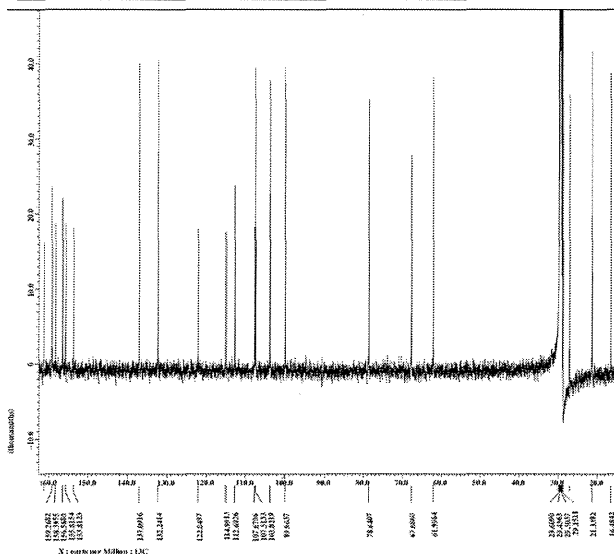
「順天堂大学医学部動物実験に関する指針」にのっとり行った。

C. 研究結果

結果 1： NMR により抗 PD 作用を持つ 2 種の化合物を同定した。



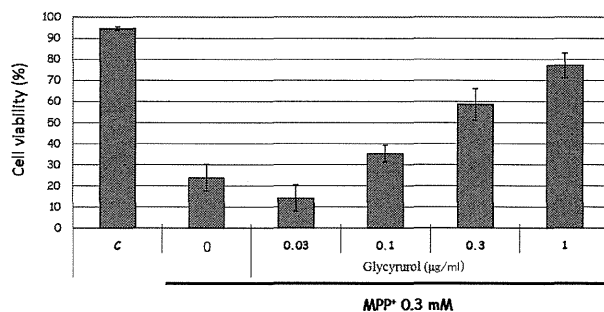
図： プロトン核磁気共鳴スペクトル



図： 炭素 13 核磁気共鳴スペクトル

結果 2： 結果 1 で同定された有効活性成分を単離し、MPP+添加型 PD モデル細胞に投与したところ、濃度依存的に細胞死を抑制した（下図）。有効活性成分の投与により、オートファジーの指標となり得る p62 および LC3-II/actin 比をウェスタンブロッティングにて検討したところ、p62 の低下、

LC3-II/actin 比の増大を認めたため、同活性成分はオートファジーを誘導すると推測された。



結果 3： MPTP 投与型パーキンソン病モデルマウスに大黃甘草湯 0.5g/kg を投与したマウスは、明らかな症状改善効果を呈したことから、生化学的な検討を行った。全脳サンプルのウェスタンブロッティングでは、明らかな TH 発現レベルの回復を認めなかった。

D. 考察

甘草中の構成成分はフラボノイド系化合物が中心であるため、有効活性成分もフラボノイド系化合物であることが予測された。しかし、licopropylcumarine および glycyrrurol は共にクマリン骨格を持つ非フラボノイド系化合物であった。ミトコンドリア膜電位保持作用を認めることから同物質の薬理作用は抗酸化作用によるものと推測していたが、実際はオートファジー誘導機能を示したことから、MPP+投与によりミトコンドリア呼吸鎖の機能が低下した異常ミトコンドリアから活性酸素の細胞質内流出を防ぐため、誘導されるオートファジーを上記 2 種の化合物が増強していると考えられた。

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。同化合物は、オートファジーを亢進させることにより薬理作用を発揮する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H, Tomiyama H, Hattori N. Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin. *Mov Disord*. 27(4):552-5 (2012)

2. Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F, Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, Hattori N, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun*. Aug 21;3:1016. doi: 10.1038/ncomms2016 (2012)

3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease. *Mov Disord*. 27(11):1413-7 (2012)

4. Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y,

Mochizuki H, Hattori N, Okano H.

Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain*. 5(1):35 (2012)

5. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 83:430-6 (2012)
6. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett*. 587(9):1316-25 (2013)

2. 学会発表

1. 舩山学、李元哲、佐竹渉、吉野浩代、富山弘幸、松浦英治、野元三治、有村公良、戸田達史、高嶋博、服部信孝。常染色体劣性遺伝性パーキンソン病家系の連鎖解析。第53回日本神経学会学術大会。(2012. 5. 25, 東京)
2. 安藤真矢、舩山学、李元哲、柏原健一、村上善勇、石津暢隆、豊田千純子、野口克彦、橋本貴司、中野直樹、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、大垣光太郎、山下力、吉野浩代、波田野琢、富山弘幸、服部信孝。日本人パーキンソン病患者における VPS35 p. D620N 変異の解析、第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ)、京都、2012. 10. 12
3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R,

Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K,
Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H,
and Hattori N. VPS35 Asp620Asn
mutation in Japanese patients with
Parkinson disease. 7th Genetics
Epidemiology of Parkinson's Disease
Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.

4. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K,
Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi
K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R,
Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K,
Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H,
and Hattori N. The Asp620Asn mutation of
VPS35 in Japanese patients with typical
Parkinson disease. ASHG 2012 Meeting,
San Francisco, U.S.A. 2012.11.08.
5. Li Y, Funayama M, Sekine T, Li L, Yoshino
H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N.
Genetic analysis of the GBA gene in
Japanese familial Parkinson's disease.
ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A.
2012.11.09.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

出願番号： 2013-091903、発明者： 服部信孝、
斉木臣二、井本正哉、藤巻貴宏、発明の名称： パ
ーキンソン病予防治療剤、出願人： 学校法人順
天堂、出願日： 2013 年 4 月 25 日

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： 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、研究分担者井本らが平成 22－23 年度に同定した大黃甘草湯・調胃承気湯の中で、0.5g/kg の投与量で薬理作用を発揮する大黃甘草湯の薬効を生化学的に検討した。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、第 15 日目に安楽死後、マウス脳を還流固定し、様々な生化学的検討を加えた。しかし、Tyrosine Hydroxylase 発現レベルは全脳的にはコントロールに比し有意な変化を認めなかった。

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、大黃甘草湯・生食群、大黃甘草湯・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 0.5 g/kg、MPTP 投与量は 20 mg/kg を使用した。

2. 生化学的検討

第 15 日目の上記各群のマウスをネンブタールにて麻酔後還流固定した。全脳を取り出し、回転式ホモジナイザーにて攪拌後蛋白を抽出し、SDS サン

プルバッファーを加え、ウェスタンブロッティングにて各種蛋白発現量を検討した。

（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： 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。

D. 考察

大黃甘草湯 0.5g/kg 投与により明確な自発運動機能の改善を認めたが、全脳サンプルではドパミン神経細胞への薬理作用を証明することはできな

かった。原因として、大脳皮質、線条体、脳幹部と解剖学的に部位を分けて検討する必要があると考えられた。

E. 結論

脳全体に対して、大黃甘草湯の薬効が作用している可能性は否定的であった。各解剖学的部位について詳細に検討する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, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update. ***J Neurol Neurosurg Psychiat*** 83:430-6 (2012)
2. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. ***FEBS Lett.*** 587(9):1316-25 (2013)

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

出願番号： 2013-091903、発明者： 服部信孝、
齊木臣二、井本正哉、藤巻貴宏、発明の名称： パーキンソン病予防治療剤、出願人： 学校法人順天堂、出願日： 2013 年 4 月 25 日

2. 実用新案登録

なし

3.その他
なし。

MPTP モデルマウスの標準化に関する研究

研究分担者： 船山 学 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、今までに汎用されてきた MPTP 添加パーキンソン病モデルマウスの病態を再評価し、分担研究者井本・田代らが同定した 2 種の甘草中の有効化合物の薬効評価の予備実験とすることを目的とする。既に平成 22－23 年度に大黃甘草湯・調胃承気湯の薬効を検討すべく MPTP 添加 PD モデルマウスに経口投与する実験を重ねてきた。しかし新規化合物 2 種については腹腔内投与が必要であること、また腹腔内投与によりいち早く血中に取り込まれた化合物が血液脳関門を通過するか否かを検討することが薬効を証明する上で重要となるため、本実験が必要となる。分担研究者は様々な条件での MPTP 添加実験を施行し、神経病理学的検討により評価対象薬物の薬効を本モデルを用いて迅速に評価できることを確認した。

A. 研究目的

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) 投与型 PD モデルマウスの表現型・病理学的変化を再評価し、現在施行している漢方薬抽出成分の有効性を確認する実験での、薬効検討に応用することを目的とする。

B. 研究方法

1. MPTP 添加プロトコール

C57BL/6J マウスをそれぞれ生理食塩水(生食)投与群、MPTP 投与群に分け、MPTP または生食を 2 時間おきに 4 回腹腔内投与した。MPTP 投与量は 15 mg/kg を使用した。

2. 自発運動検査： MPTP 最終投与第 1, 2, 3, 7 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した。

3. 生化学検査・病理組織学的検査

最終投与 2 日後と 7 日後に線条体および中脳を摘出し tyrosine hydroxylase (TH) のタンパク量をウェスタンブロット法で検討した。併せてマウス脳を還流固定後、凍結切片を作製し、病理学的検討を加えた。摘出したマウス脳より解剖学的部位を確認しながら、線条体および中脳を分画し、0.32M sucrose/20mM HEPES (pH 7.4) buffer 中でホモジナイズ後、1000xg で 10 分遠心した。上清を BCA Protein Assay Reagent をもちいて定量後、Laemmli buffer (BioRad) をもちいてサンプル化した。ウェスタンブロッティングにて各種蛋白発現量を評価した。一次抗体として anti-tyrosine hydroxylase (Calbiochem 657012)、Anti- Na^+/K^+ ATPase α -1 (Upstate 05-369)を用いた。データは LAS にて取り込み、ImageJ にて定量を行った。

MPTP はマウス脳黒質/線条体のドパミン神経細胞にドパミントランスポーター依存的に取り込まれ、毒性を発揮する。そのため、抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体を用いた免疫染色にて、ドパミン神経細胞数、形態などを評価した。

(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： MPTP 投与マウスでは、投与後 1 日
目に約 40%まで自発運動回数が減少し、第 2 日
目に約 80%まで回復し、第 3 日目では 98%まで回復
する。同実験結果は十分な再現性を持って確認さ
れた (図 1)。

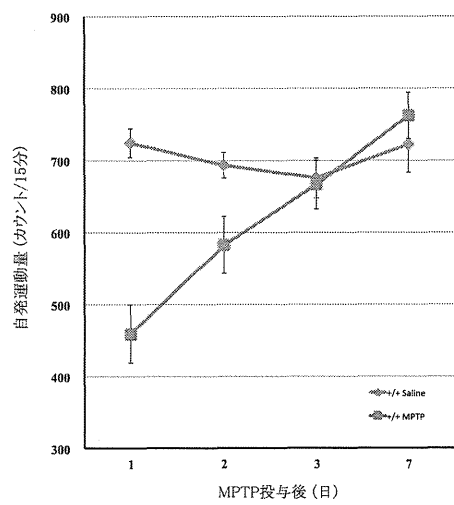


図 1. MPTP 投与マウスの自発運動量

MPTP 投群では投与後 1 日後で生食投与群に比べ
約 40%低下 ($P<0.01$)、2 日後で約 20%低下 ($P<0.05$)
したが、3 日目には生食投与群と同等の運動量に回復
した ($N=6-19$)。

結果 2： MPTP 投与マウスでは、コントロール
マウスに比べ生化学的には、線条体での TH 発現
レベルが減少していた。

黒質/線条体では著明な TH 染色の減少を認めた。
本急性 PD モデルマウスでは明らかな細胞質内封
入体を認めなかった。上記所見は再現性を持って
確認された (図 2)。

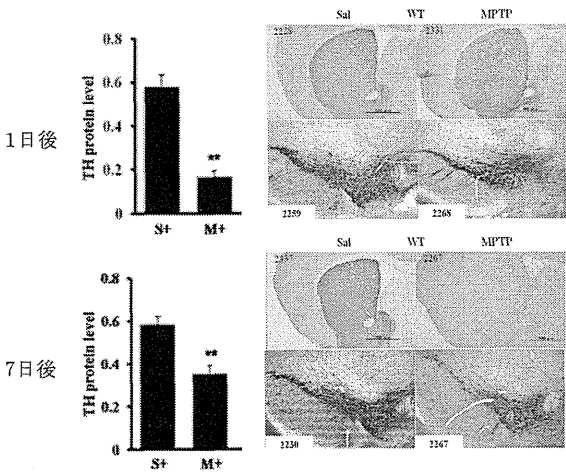


図 2. MPTP 投与後の線条体 TH のウェスタンブ
ロットおよび、線条体・黒質の免疫染色

(左) 線条体 TH のウェスタンブロット;TH の蛋白
量は Na^+/K^+ ATPase で補正し定量した。S+; 生食投与
マウス, M+; MPTP 投与マウス。 $**P<0.01$ (ANOVA
with Bonferroni post hoc test), $N=5$ 。(右) MPTP 投与
48 時間後と 7 日後の線条体の TH 免疫染色黒質の
TH/ニッスル染色。数字はマウスの個体番号。スケ
ールバーは $200\mu\text{m}$ 。Sal; 生食塩水投与マウス, MPTP;
MPTP 投与マウス。

D. 考察

MPTP 投与型マウスは高い再現性を持って、運
動障害の表現型を呈し、さらに生化学的・病理学
的にも、ドパミン神経細胞障害を定量できること
が確認された。

E. 結論

本 MPTP 添加型 PD モデルマウスは 2 種の甘草
含有化合物の薬効評価には十分に耐えうると考え
られる。

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. Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H,

- Tomiyama H, Hattori N. Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin. *Mov Disord.* 27(4):552-5 (2012)
2. Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F, Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, Hattori N, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun.* Aug 21;3:1016. doi: 10.1038/ncomms2016 (2012)
 3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease. *Mov Disord.* 27(11):1413-7 (2012)
 4. Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain.* 5(1):35 (2012)
 5. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 587(9):1316-25 (2013)
2. 学会発表
 1. 船山学、李元哲、佐竹渉、吉野浩代、富山弘幸、松浦英治、野元三治、有村公良、戸田達史、高嶋博、服部信孝. 常染色体劣性遺伝性パーキンソン病家系の連鎖解析. 第53回日本神経学会学術大会. (2012. 5. 25, 東京)
 2. 安藤真矢、船山学、李元哲、柏原健一、村上善勇、石津暢隆、豊田千純子、野口克彦、橋本貴司、中野直樹、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、大垣光太郎、山下力、吉野浩代、波田野琢、富山弘幸、服部信孝. 日本人パーキンソン病患者における VPS35 p. D620N 変異の解析、第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ)、京都、2012. 10. 12
 3. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and Hattori N. VPS35 Asp620Asn mutation in Japanese patients with Parkinson disease. 7th Genetics Epidemiology of Parkinson's Disease Annual meeting, Seoul, Korea. 2012.10.10.
 4. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Tomiyama H, and

Hattori N. The Asp620Asn mutation of VPS35 in Japanese patients with typical Parkinson disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.08.

5. Li Y, Funayama M, Sekine T, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Genetic analysis of the GBA gene in Japanese familial Parkinson's disease. ASHG 2012 Meeting, San Francisco, U.S.A. 2012.11.09.

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。

甘草に含まれる抗 PD 作用を持つ化合物の同定に関する研究

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

平成 22－23 年度の研究により、MPP+またはロテノン添加型パーキンソン病（PD）モデル細胞での細胞死に対して、甘草が PD モデル細胞での細胞死抑制効果を発揮することを明らかにした。そのため平成 24 年度は、甘草内に含まれる抗 PD 作用を持つ有効活性成分の単離を目的とし、抽出・精製・核磁気共鳴スペクトル解析などを経て、2 種の有効活性成分（licopyranocoumarine、glycyrruol）を同定することに成功した。同化合物の純品について、上記薬効を再確認し（研究分担者田代の項参照）、上記薬効について用途特許を申請している。

A. 研究目的

パーキンソン病モデル細胞の細胞死を抑制する生薬である甘草中から、有効活性成分を抽出・同定することを目的とする。

B. 研究方法

1. 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（下記図参照）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。

2. 甘草粉末からの有効活性成分抽出

甘草粉末 50g（株ツムラより購入）を 90%エタノールで抽出後、ろ過した水溶液 5 リットルを pH 7.0 に調整後、濾液と当量の酢酸エチルを加えて抽出し濃縮乾固した。得られた酢酸エチル抽出物をクロマトグラフィーにかけ、1 次精製物を得、さらにメタノールで展開して 2 次精製物を得た。それを高速液体黒のふらふいーのカラム（野村化学社製）に吸着させ、40%アセトニトリルで溶出し、純品を得た。

（倫理面への配慮）

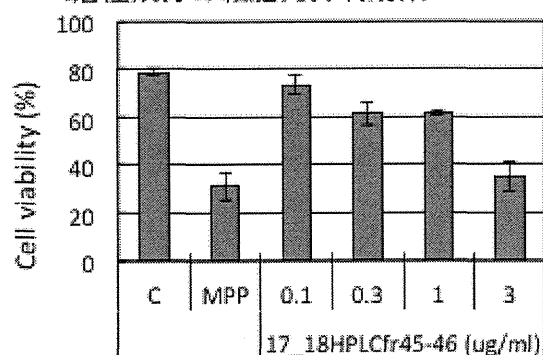
特記すべきことなし。

C. 研究結果

結果 1.

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

図 1. 活性成分の細胞死抑制効果



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 µg/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。

結果 2. 上記過程より lycopyranocoumarin および glycyrrurol の純品を得ることが出来、核磁気共鳴スペクトラムを用いて、化学構造を解明した（下図参照）

D. 考察

他の分担研究者（田代）による実験により、2種の有効活性成分が、抗PD作用を持つことが再確認されたことから、本2種の化合物の有効性が確認された。現在PDモデルマウスにて薬効を評価している。

E. 結論

甘草中から、有効活性成分 2 種を同定することが出来た。同薬剤は既に臨床で広く使用されている甘草中に含まれる成分であり、安全性もある程度担保されることから、将来的な臨床応用が期待される。

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. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77:729-735 (2013)

2. Magi S, Shitara T, Takemoto Y, Sawada M, Kitagawa M, Tashiro E, Takahashi Y, Imoto M. Novel derivatives of aclacinomycin A block cancer cell migration through inhibition of farnesyl transferase. *J Antibiot (Tokyo)* 66:165-170 (2013)
3. Magi S, Tashiro E, Imoto M. A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells. *Sci Rep* 2: 823 (2012)
4. Kobayashi H, Harada H, Nakamura M, Futamura Y, Ito A, Yoshida M, Iemura S, Shin-Ya K, Doi T, Takahashi T, Natsume T, Imoto M, Sakakibara Y. Comprehensive predictions of target proteins based on protein-chemical interaction using virtual screening and experimental verifications. *BMC Chem Biol*. 12:2 (2012)
5. Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chem Biol*. 7:892 (2012)
6. Yamamoto K, Makino M, Watanapokasin R, Tashiro E, Imoto M. Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation on the cell surface. *J Antibiot (Tokyo)*. 65:295-300 (2012)

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

出願番号： 2013-091903、発明者： 服部信孝、
斉木臣二、井本正哉、藤巻貴宏、発明の名称： パーキンソン病予防治療剤、出願人： 学校法人順天堂、出願日： 2013 年 4 月 25 日

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし。

甘草に含まれる抗 PD 作用を持つ化合物の細胞死への薬理作用解明

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

平成 22-23 年度に甘草の抗 PD 作用を明らかにしたため、本年度に研究分担者井本は甘草からの有効活性成分の単離を図るべく、精製・活性評価および核磁気共鳴スペクトラム解析により、2 種の有効活性成分（licopyranocoumarin、glycyrurol）を同定した。そのため本年度田代は、同活性成分のパーキンソン病モデル細胞への細胞死抑制効果の再確認、並びに同有効成分の有効性並びに有効濃度の決定を行うべく実験を行った。MPP+添加型 PD モデル細胞においては、glycyrurol は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ にて細胞死抑制効果を発揮し（約 25%の抑制効果）、1 $\mu\text{g/ml}$ では 80%の抑制効果を示すなど、低濃度で十分な薬理作用を呈することを確認し、本化合物が将来的に有望なパーキンソン病治療薬になり得ることを証明した。

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(大黃甘草)について、活性成分の単離・精製を行った。

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 のロテノンを添加して 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、2 種の化合物を添加し有効性を下記の細胞死検討にて評価した。

2. 細胞死評価

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。

C. 研究結果

次ページ図のように、MPP+を 0.3mM で添加した PC12D 細胞に各濃度の Glycyrurol を添加したところ、SubG1 ピークに属する（細胞死を呈している）細胞数の著明な現象を認めた。最少有効濃度は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

D. 考察

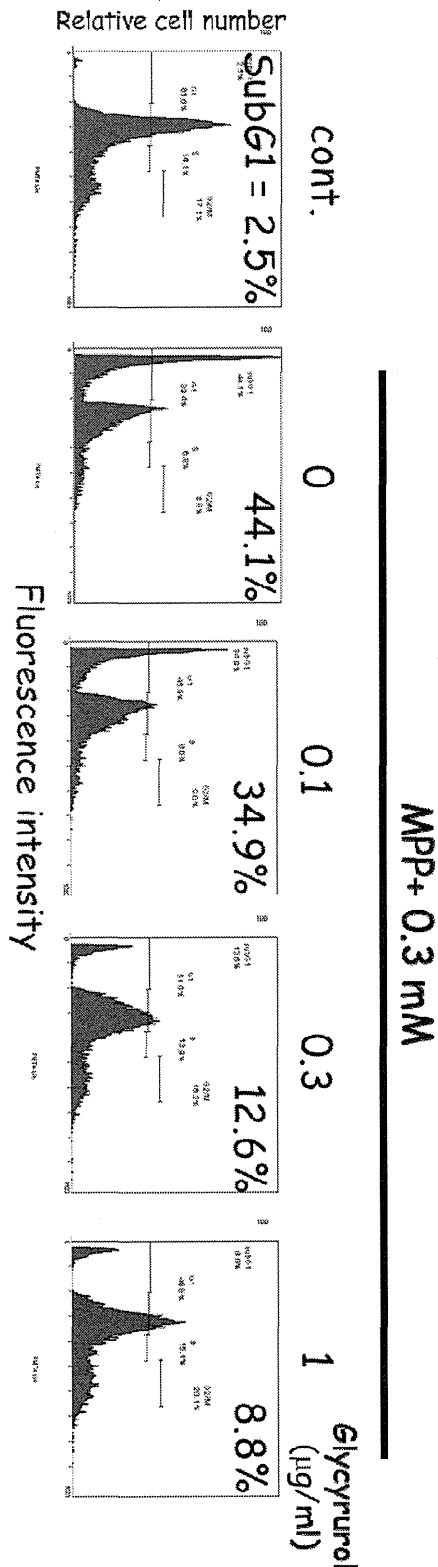
本研究によって同定した 2 種の化合物は、その抽出・同定の過程においても活性を失うことが無かったが、今回の実験によって夫々が著明な細胞死抑制効果を発揮したことからさらにその有用性が確認されたと考える。現在、研究分担者 斉木臣二・船山学らが同化合物の薬効を PD モデルマウスにて検証している。

E. 結論

甘草抽出有効活性成分 2 種は、細胞レベルでの強い抗 PD 作用を持つ。

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. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77:729-735 (2013)
2. Magi S, Shitara T, Takemoto Y, Sawada M, Kitagawa M, Tashiro E, Takahashi Y, Imoto M. Novel derivatives of aclacinomycin A block cancer cell migration through inhibition of farnesyl transferase. *J Antibiot (Tokyo)* 66:165-170 (2013)
3. Magi S, Tashiro E, Imoto M. A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells. *Sci Rep* 2: 823 (2012)
4. Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol impairs autophagosome maturation through direct inhibition of valosin-containing protein. *ACS Chem Biol.* 7:892 (2012)
5. Yamamoto K, Makino M, Watanapokasin R, Tashiro E, Imoto M. Inostamycin enhanced TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation on the cell surface. *J Antibiot (Tokyo).* 65:295-300 (2012)

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表（服部 信孝）

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
Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H, Tomiyama H, Hattori N.	Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin.	Mov Disord.	27	552-555	2012
Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F, Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, Hattori N, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N.	PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.	Nat Commun.	21	1016	2012
Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N.	VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease.	Mov Disord.	27	1413-1417	2012
Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H.	Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue.	Mol Brain.	5	35	2012
Saiki S, Sato S, Hattori N.	Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update.	J Neurol Neurosurg Psychiat	83	430-6	2012
Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R.	ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons.	FEBS Lett	587	1316-1325	2013