

201208008B

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 XXXXXXXXXX 記

平成22年度～24年度 総合研究報告書

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

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・・・ 1
服部 信孝

II. 分担研究報告

1. 漢方薬のオートファジー調節効果、パーキンソン病モデルマウスでの
薬効評価研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
齊木 臣二
2. パーキンソン病モデルマウスにおけるヒット漢方薬の薬効評価に関する研究・・・・ 12
船山 学
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・・・・ 16
井本 正哉
4. PINK1-/-マウス胚性線維芽細胞を用いたスクリーニングと甘草に含まれる
活性成分に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
田代 悦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

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
研究代表者：服部信孝（順天堂大学神経学教授）

研究要旨

背景：

パーキンソン病（以下PD）は有病率が130人/10万人（発症率は50-59歳：1.7人/10,000人、70-79歳：9.3人/10,000人）と高齢者ほど有病率が増加することから、超高齢化が進む我が国では、さらなる患者人口の増大およびそれに伴う医療費・介護関連費用の増大が危惧される疾患である。現在までPD発症機序は完全には解明されておらず、治療法は内服を中心とした対症療法に留まるため、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でも広く臨床現場で使用されてきた漢方薬に着目し、抗PD作用を持つ漢方薬の同定、並びに有効活性成分の同定・単離、およびPDモデルマウスでの薬効の証明を一貫して行うべく本研究を計画・実行した。

方法・結果：

平成22年度に4種の細胞ライン（HeLa細胞、PINK1^{-/-}マウス胚性線維芽細胞(MEF)、MPP⁺添加型PC12D細胞、rotenone負荷型PC12D細胞）による128種の漢方薬ライブラリースクリーニングを行った。オートファジー調節作用を持つ漢方薬、PINK1^{-/-}MEFにて細胞分裂を活性化する漢方薬はライブラリーから見出すことはできなかった。しかしMPP⁺およびrotenone添加による細胞死を抑制するヒット漢方薬2種（大黄甘草湯・調胃承気湯）を同定することができた。同漢方薬の*in vivo*での薬効を評価するため、大黄甘草湯・調胃承気湯を後天的PDモデルマウス（腹腔内にMPTPを投与し、選択的黑質細胞死を誘導するモデル。著明な自発運動数の低下を認める）に投与し、自発運動数の改善効果を検討したところ、両漢方薬で0.2g/kgでは薬効は認めず、1g/kgにて顕著な毒性を示し、大黄甘草湯のみで0.5g/kgでのみ表現型が有意に改善することを確認した。

平成23年度には大黄甘草湯・調胃承気湯の生薬含有率が大黄:甘草を2:1であることから、両生薬比率を調節しつつ細胞死抑制効果を検討し、甘草が抗PD作用を最も強く持つことをPDモデル細胞で確認した。しかし甘草単体をPDモデルマウスに投与した場合0.2g/kg、0.5g/kgいずれにおいても症状改善効果はなくむしろ病状を増悪させたため、甘草中からの有効成分の単離が必要と考え、甘草活性成分精製を進めた。平成24年度にはNMRによる活性成分のスペクトル解析を行い、抗PD作用を持つ化合物2種を同定することが出来た。同化合物は単体でも0.1 μg/ml程度の十分な低濃度でPDモデル細胞において細胞死抑制作用を示した。

結論：

以上のように本研究の当初の目的通り、市販漢方薬からPDモデル細胞の細胞死を抑制し、ミトコンドリア機能回復効果を持つ化合物を2種類同定することに成功した。しかし同化合物の化学構造から大量合成が困難であったため、大量の甘草からの抽出を余儀なくされ、2013年6月現在後天的PDモデルマウスへの同化合物投与実験を進めている。本実験によりPDモデルマウスでの同定化合物の薬効が証明されれば、最適化試験・毒性試験を経て臨床試験に進めていきたいと考える。

研究代表者
服部信孝

分担研究者
斉木臣二、船山 学、井本正哉、田代 悦
順天堂大学脳神経内科

A. 研究目的

I. 研究の目的：

本研究では3年間の研究期間で、複数のPDモデル細胞を用いた漢方薬スクリーニングにより、オートファジー調節・ミトコンドリア機能保護による神経細胞保護効果を持つ漢方薬成分を同定し、薬効成分の結合蛋白の同定・構造解析、更に*in vivo*モデルでの薬効を証明することを目的とする。

II. 本研究の背景・必要性：

研究代表者は遺伝性PD責任遺伝子の同定・機能解析を進め(*Nature* 392:605; *Nat Genet* 25:302; *Science* 293:263)、同時にPD剖検脳のミトコンドリア機能異常、1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)を用いて開発したPDラットモデルなどを報告している(*Ann Neurol* 44:935; *Ann Neurol* 46:920; *BBRC* 341:1088)。また近年PDなどの神経変性疾患とオートファジーとの関連が注目されており(*Nature* 443:780; *Nature* 441:880)、共同研究者佐藤・斉木は同機能異常に着目し、佐藤は遺伝性PDモデル動物の樹立・機能解析に(*J Neurosci Res* 84:1350; *BBRC* 341:1088)、斉木はオートファジー機能解析に夫々習熟している(*Nat Chem Biol* 4:295; *Hum Mol Genet* 17:170)。また共同研究者井本らはMPP+を添加したPC12細胞をPDモデル細胞とするスクリーニング系を構築し、新たな候補化合物の同定に成功しており(論文準備中)、さらに研究代表者らは遺伝性PDモデル細胞(PINK1^{-/-}MEF)を樹立し、ミトコンドリア機能異常・ミトコンドリアオートファジー機能不全を証明している(論文投稿中)。現状では、上記作用点に神経細胞保護効果を持つPD治療薬は未開発である。

以上の背景より我々は、漢方薬ライブラリー(株ツムラより提供予定。既に臨床現場で使用され安全性が確立済み)から神経保護作用を持つ漢方薬成分を同定し、新たな作用機序を解明し、有効な漢方薬成分の適応を拡大することを目的とし、本研究を計画した。

B. 研究方法

I. PC12D(MPP+添加)細胞を用いたスクリーニング(井本)

井本らは、PC12D細胞・SH-SY5Y細胞に神経毒MPP+またはロテノン作用させることにより細胞内に斑点形成が生じることを見出し、また斑点形成率と細胞死に強い相関があり、上記斑点が蛋白凝集体であることを確認しており、有用なPD細胞モデル系として確立している。本PDモデル細胞に株ツムラから提供された128種類の漢方薬ライブラリー(以下ライブラリー)を作用させ、MPP+により誘導される蛋白凝集体・細胞死両者を抑制するヒット漢方薬①を同定する。

II. PINK1^{-/-}MEFを用いたスクリーニング(井本・田代)

PINK1は遺伝性PDの原因遺伝子の一つでミトコンドリア機能との関連が深いとされ、樹立済みPINK1^{-/-}MEFにおける、ミトコンドリア呼吸機能低下、エネルギー産生の解糖系への高度依存・不完

全なミトファジーを我々は確認している。これを利用してミトコンドリア呼吸機能の回復・ミトファジー機能亢進作用に着目し、ライブラリーを添加しスクリーニングを行う。ガラクトース培地にて、PINK1^{-/-}MEFはコントロールMEFに比し、解糖系への依存度が高いため著明な細胞分裂速度の低下を示す。両MEFラインを同数培地に播種し、ライブラリーに含まれる漢方薬を添加したガラクトース培地にて4日間培養し細胞数の改善を評価する。有意な細胞数改善(=細胞分裂速度の改善)を示した漢方薬をヒット漢方薬②とし、それぞれのミトコンドリア機能(呼吸機能、活性酸素産生量、プロトンリーク)への影響を生細胞にて評価する。

III. HeLa細胞でのオートファジー調節効果によるスクリーニング(斉木)

HeLa細胞は培養細胞の中でオートファジー機能が高いとされる。同細胞に各漢方薬を添加し、72時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロットによりオートファジー活性(LC3-II/actin比)を算出し、優位に上昇または低下しているものをヒット漢方薬③とする。

IV. ヒット漢方薬の有効候補成分同定・構造解析(井本)

ヒット漢方薬について、それらのアセトン抽出物を調整し、アセトン抽出物がI-IV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。

V. 有効活性成分の作用機序解析(井本・田代)

IVで単離された活性化合物について、そのビオチン標識体を作成し、細胞抽出液からアビジンビーズを用いて活性化合物の結合タンパク質を回収し、TOF/MSを用いて結合蛋白の同定を行う。同定された蛋白をコードする遺伝子をクローニングし、FlagにてtagしたプラスミドDNAを作製し、培養細胞での過剰発現系にて候補成分との結合を確認することで作用機序に迫る。

VI. PDマウスモデルでの薬効確認(斉木・船山)

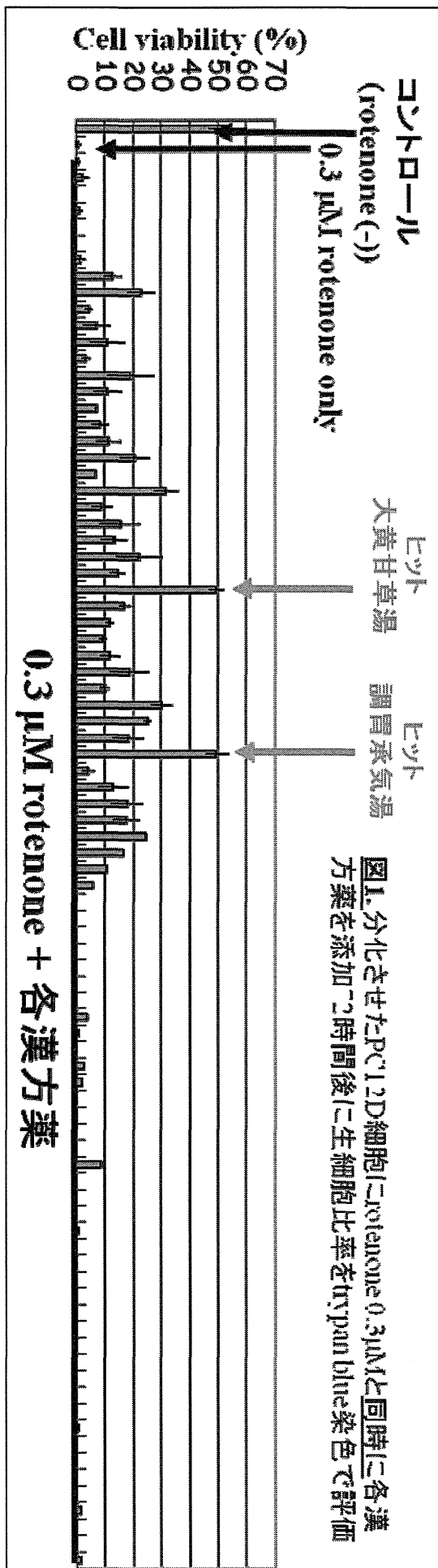
PDマウスモデル(MPTP投与による後天的モデル)に投与し、病理学的・生化学的・行動学的な評価を行う。具体的にはマウス腹腔内にMPTPを投与することによりPDモデルマウスを作製する。同モデルは自発運動機能低下を認め、黒質神経細胞の選択的脱落が見られることを確認しており、候補成分経口投与(漢方薬粉末溶解液)または腹腔内投与(有効活性成分)により同現象の改善を評価する。C57BL/6Jマウスを用いた。

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、CK-生食群、CK-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。漢方薬の使用濃度は1g/kg、MPTP投与量は20 mg/kg。

2. 有効活性成分の薬効評価プロトコール

1同様にC57BL/6Jマウスに対して同様の4群を作製し、有効活性成分(25 µg/kg)またはH₂Oを7日間腹腔内投与し、第8日目にMPTPまたは生殖を腹腔内投与した。本実験は2013年6月現在進行中である。



3. 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。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験については順天堂大学倫理規定、日本学術振興会倫理規定、および動物愛護法に則って施行した。

C. 研究結果

I. 結果1：(株) ツムラより提供された128種類の漢方薬ライブラリーより、Rotenone添加によって引き起こされるPC12D細胞の細胞死を80%以上回復させる化合物のスクリーニングを行った。その結果、主に便秘薬として用いられ、大黃、甘草が共通生薬として含まれているNo.69（調胃承氣湯）およびNo.79（大黃甘草湯）に細胞保護効果があることを見出した（←図1）。

結果2： 次に調胃承氣湯および大黃甘草湯の細胞保護効果のさらに詳細な検討を行った。細胞毒としてRotenoneではなく、分化した神経細胞のみに取り込まれるmitochondria complex Iの阻害剤であるMPP+をもちいて、(1) トリパンプルー細胞外排出試験法による細胞死評価、(2) PI染色による細胞死評価、(3) JC-1染色によるミトコンドリア膜電位測定、を行った。

(1) トリパンプルー細胞外排出試験法による細胞死評価

分化させたPC12D細胞にMPP+ 0.3 mMと調胃承氣湯もしくは大黃甘草湯を同時添加して48時間後の細胞死をトリパンプルー細胞外排出試験法により評価した。その結果、両漢方薬はどちらも濃度依存的にMPP+によって誘導される細胞死を回復させ、それぞれのIC50値は28 μg/mlと25 μg/mlであった。

(2) PI染色による細胞死評価

分化させたPC12D細胞にMPP+ 0.3 mMと調胃承氣湯もしくは大黃甘草湯を同時添加して48時間後の細胞死をフローサイトメーターを用いたPI染色により評価した。その結果、MPP+により上昇したアポトーシスの指標であるsub G1期の割合が調胃承氣湯および大黃甘草湯の濃度依存的に減少させ、MPP+単独からコントロールのSubG1値を引いた値を100%としたときのIC50値はそれぞれ23 μg/ml、30 μg/mlであった。

(3) JC-1染色によるミトコンドリア膜電位測定

パーキンソン病の原因の一つとして、ミトコンドリアの品質管理機能の異常が報告されているため、ミトコンドリアに対する2 サンプルの影響をJC-1染色により評価した。その結果、MPP+により誘導された膜電位の低下は調胃承氣湯および大黃甘草湯の濃度依存的に抑制され、MPP+単独からコントロールのMMP値を引いた値を100%としたときのそのIC50値はそれぞれ48 μg/ml、62 μg/mlであった。

II. 結果1： PINK1^{-/-}MEF細胞は、ミトコンドリア機能異常・ミトコンドリアオートファジー機能不全を呈するパーキンソン病モデル細胞である。したがって、PINK1^{+/+}MEF細胞と比較して増殖速度や形態に差が認められた場合、PINK1^{-/-}MEF細胞の増殖速度や形態がPINK1^{+/+}MEF細胞のそれに近づくような化合物はパーキンソン病治療薬となることが期待できる。そこで増殖速

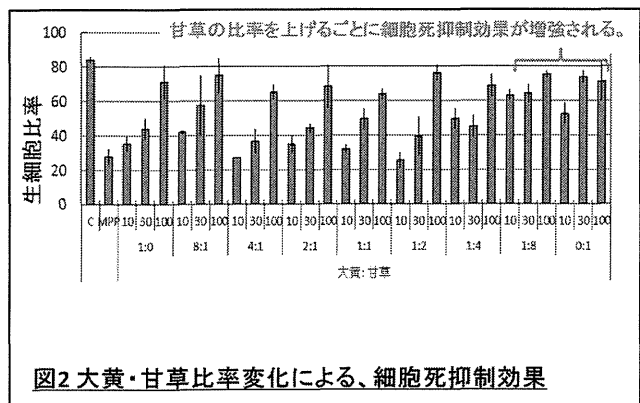
度と形態について検討した。その結果、形態については差が認められなかったが、PINK1^{-/-}MEF細胞の増殖速度はPINK1^{+/+}MEF細胞よりも遅かった。そこでPINK1^{-/-}MEF細胞の増殖速度を回復させる物質の取得を目指して漢方薬128についてスクリーニングをおこなったが、増殖速度を回復させる物質はなかった。

結果2： PINK1^{-/-}MEF細胞はミトコンドリア機能異常であるため、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤や既存の抗がん剤に対して脆弱であると期待できる。もしこの様な薬剤に対する感受性がPINK1^{+/+}MEF細胞と比べて明確な差があった場合、その差を埋める化合物はPINK1^{-/-}MEF細胞のミトコンドリア機能異常を回復させている可能性が期待できる。そこでPINK1^{-/-}MEF細胞およびPINK1^{+/+}MEF細胞にアンチマイシンAなどの様々な薬剤の感受性を検討したが、明確な差は認められなかった。したがって、薬剤感受性の差を利用したスクリーニング系の構築は断念した。

III. 結果1： anti-LC3抗体にて染色したHeLa細胞内のautophagosome数をカウントし、5個以上の場合にLC3陽性細胞とした(Sarkar et al. J Biol Chem, 2007の方法による。)が、有意な上昇を認める漢方薬は無かった。

結果2： Western blottingによりLC3-II/actin比を測定し、LC3/actin比が2を超える場合に陽性としたが、有意な上昇を認める漢方薬は無かった。

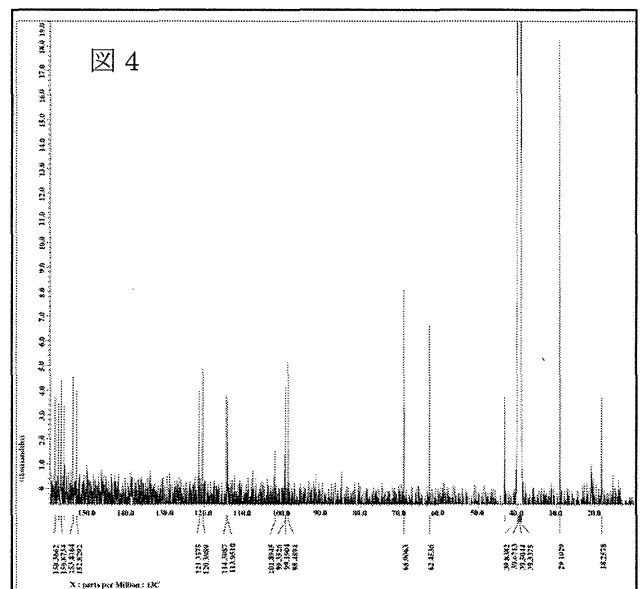
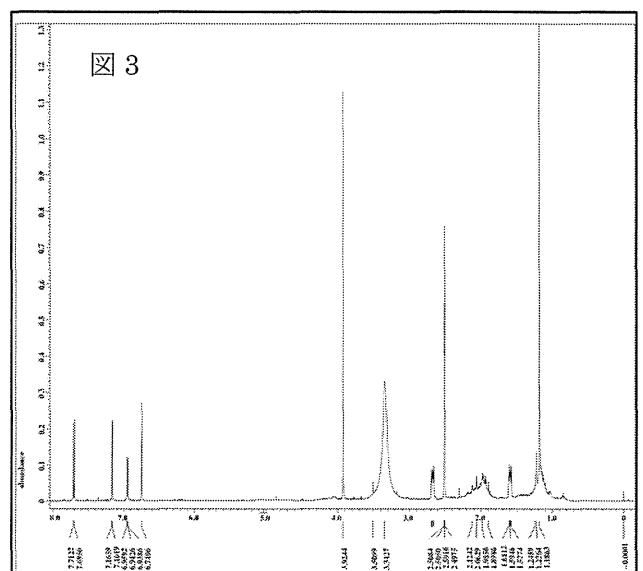
IV. 調胃承気湯と大黃甘草湯がヒットしたことから、同漢方薬には共通して大黃と甘草が2:1の割合で含まれていることに着目し(図2)、活性成分が大



黄と甘草のどちらに含まれているか検討した。その結果、大黃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。甘草粉末50gを90%エタノールで抽出後、濾過した水溶液5lをpH7.0に調整し、濾液と等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4.25 gを遠心液液分配クロマトグラフィー(センシユー科学)(溶媒系:クロロホルム:メタノール:水=5:6:4(容量比))にかけ、C3を含む一次精製物273.9 mgを得た。次に一次精製物をセファデックスLH-20カラム(GE Healthcare)を用いてメタノールで展開して二次精製物29.6 mgを得た。最後に二次精製物を高速液体クロマトグラフィーのカラム(野村化学社製)に吸着させ、40%アセトニトリルで溶出することによりglycyrrurolの純品2.4 mgを得た。同様の手法で有効

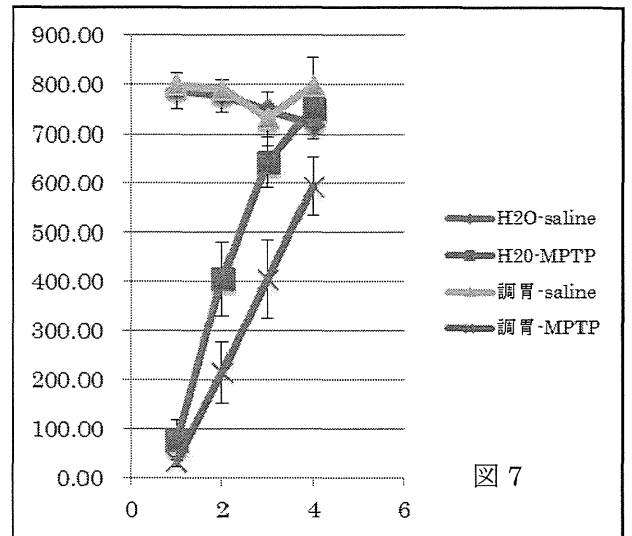
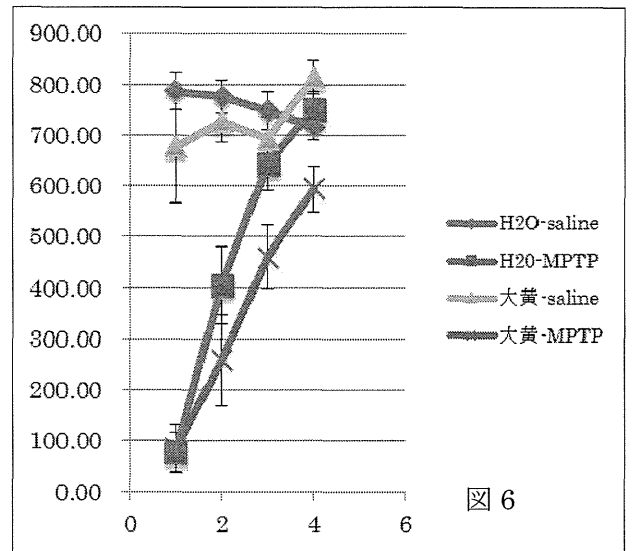
活性成分glycyrrurolも抽出した。両化合物の化学構造は種々の核磁気共鳴スペクトル、質量分析スペクトルを詳細に検討することにより決定した。

以下にglycyrrurolの物理化学的性状を示す。
 (1)外観:淡黄色油状 (2)溶解性DMSO, メタノールに可溶、水、クロロホルムに難溶。(3)Rf値(メルク社製「シリカゲル60F254」使用):0.49(展開溶媒:クロロホルム:メタノール、5:1) (4)マススペクトル(HRESI-MS):m/z 383(negative) (5)赤外部吸収スペクトル(cm⁻¹)(KBr):3454, 2966, 1719, 1633 (6)非旋光度:[α]_D²¹ -0.0158°(c 0.1, メタノール) (7)プロトン核磁気共鳴スペクトル(500MHz, DMSO-d₆):図3に示す通り (8)炭素13核磁気共鳴スペクトル(500MHz, DMSO-d₆):図4に示す通り (9)分子式:C₂₁H₂₀O₇



V. 研究方法1と同様の方法(トリパンブルー除去試験、propidium iodide (PI)試験)にて、有効活性成分の細胞死抑制作用を確認したところ、図5のように濃度依存的にMPP⁺誘発性細胞死を抑制することが確認された。

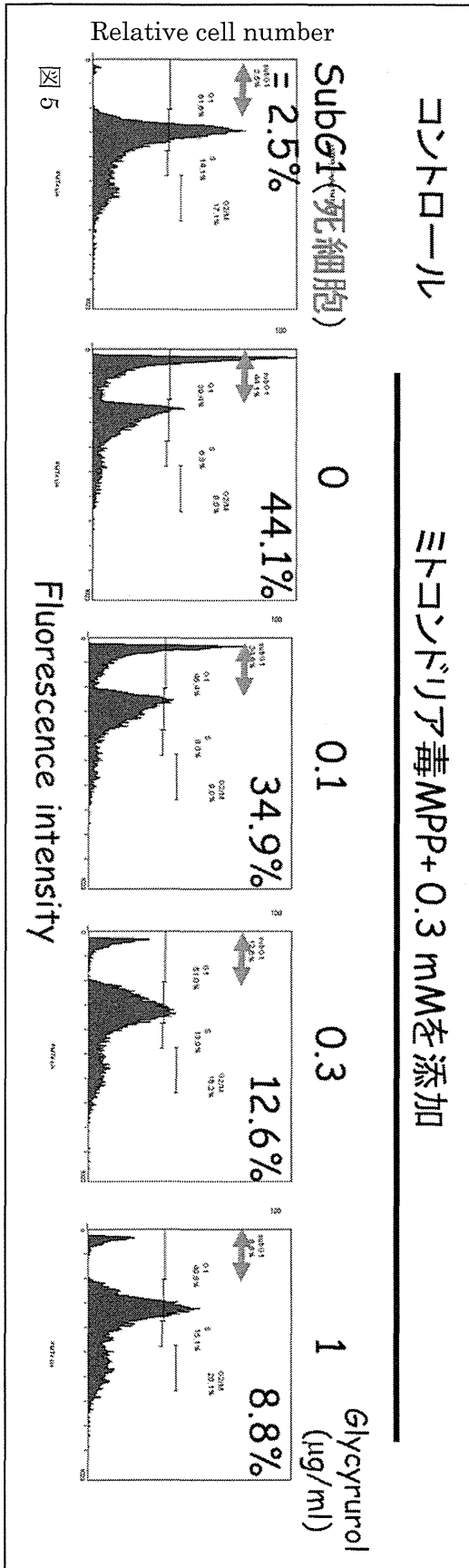
結果2：調胃承気湯の薬効について
 図7にデータを示す。大黃甘草湯、調胃承気湯でもMPTP追加による自発運動機能の低下が助長された。



D. 考察

本研究の目的は、既に市販されている漢方薬128種から抗パーキンソン病作用を持つ有効成分を抽出することであった。3系統のスクリーニングシステムを用いてヒット漢方薬を2種類同定し、両者が共に甘草を含有し、有効比率の検討から甘草の有効性を確認した。さらに甘草中に含まれ、抗パーキンソン病作用を持つ2種の化合物（残念ながら2013年3月に中国のグループより上記2種が抗凝固作用を持つ新規化合物として報告された）を同定し、低濃度でも十分に薬効を持つことを確認した。さらに同化合物の作用機序がオートファジーを活性化し、MPTP追加により生じた異常ミトコンドリア分解を促進していることを確認し、薬理作用の一端を解明した。現在、同有効成分2種を甘草から夫々3mgずつ抽出し、MPTP添加型パーキンソン病モデルマウスに投与し、薬効を確認する実験を進めている。

現在臨床にて使用されているパーキンソン病薬は全て対症療法を目的としたもののみであり、いわゆるdisease-modifying therapyを可能とする治療



VI. 結果1：大黃甘草湯の薬効について
 図6にデータを示す。予想に反して、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。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大黃甘草湯投与により回復しなかったこと。

薬は未だ開発されていない。本研究では、既に臨床応用されている漢方薬成分である甘草から、オートファジーを亢進させ、ミトコンドリア障害を軽減するという全く新しい作用機序を持つ化合物2種を同定することが出来た。本化合物2種が *in vivo* でも十分な作用機序を発揮する場合、最適化試験に繋がっていきたいと考えている。

E. 結論

当初の目的通り、抗パーキンソン病作用を持つ漢方薬有効成分を2種類同定することが出来た。現在 *in vivo* での薬理作用を検討しており、有効である場合は、臨床開発に向け研究を進められると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, Sou YS, Saiki S, Kawajiri S, Sato F, Kimura M, Komatsu M, Hattori N, Tanaka K. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189:211-221 (2010)
2. Kawajiri S*, Saiki S*, Sato S, Sato F, Hatano T, Eguchi H, Hattori N. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* 584:1073-9 (2010) (*Joint 1st authors)
3. 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)
4. 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)
5. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci*. 32:573-80 (2011)
6. 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)
7. Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: update. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 83:430-6 (2012)
8. Ujiie S, Hatano T, Kubo S, Imai S, Sato S, Uchihara T, Yagishita S, Hasegawa K, Kowa H, Sakai F, Hattori N. LRRK2 I2020T mutation is associated with tau pathology. *Parkinsonism Relat Disord*. 18:819-23 (2012)
9. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep*. 2:1002 (2012)
10. Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H, Tomiyama H, Hattori N. Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin. *Mov Disord*. 27:552-555 (2012)
11. 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)
12. 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)
 13. 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)
 14. 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)
- 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.知的所有権の取得状況（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：特になし

漢方薬のオートファジー調節効果、パーキンソン病モデルマウスでの薬効評価研究

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

本分担研究では平成 22 年度に 128 種の漢方薬のオートファジー誘導作用について検討した。128 種の漢方薬ライブラリーの懸濁液を培養細胞に添加し、オートファジーの活性を評価した。薬剤添加後 24、48、72 時間後のオートファジー活性をウェスタンブロッティング及び免疫細胞染色によって LC3-II、actin の発現量または LC3 陽性顆粒数をそれぞれ評価し、検討したが有意な上昇を認めるものは無かった。

さらに平成 23-24 年度には、ヒット漢方薬大黄甘草湯・調胃承気湯両者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を検討した。また C57BL/6J マウスに、7 日間 甘草 0.2 g/kg（大黄甘草 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

漢方薬のオートファジーへの作用を評価すること、および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

オートファジー調節効果検証実験

1. 漢方薬添加のプロトコール

HeLa 細胞を 24-well plate に 0.5×10^5 /well の密度で播種。128 種の既に臨床的に汎用されているそれぞれの漢方薬について、1 mg/ml の懸濁液を作製した。作用濃度を全ての漢方薬について、10 μ g/ml、30 μ g/ml、100 μ g/ml と設定し、HeLa 細胞に添加後、24、48、72 時間に下記の方法で評価した。

1-1. 免疫細胞染色

漢方薬添加後の細胞を 1X PBS にて 3 回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドを添加後 20 分間固定した。1X PBS で 3 回洗浄後、0.1% Triton X in 1X PBS に 10 分間浸し、更に 3 回 1X PBS で洗浄した。10% fetal bovine serum・1% bovine serum albumin in 1X PBS に 1 時間浸しブロッキングを完了後、1 次抗体として anti-LC3 抗体（シグマ社製、X 100）に一晩浸した後、2 次抗体として anti-rabbit AlexaFluor 488 (X 500)に 1 時間反応後、固定し観察した（Zeiss 社製 AxioVision 蛍光顕微鏡を用いた）。

1-2. Western blotting による検討

漢方薬添加後の細胞を、1X PBS で 3 回洗浄し、RIPA Buffer (50 μ l/well)を添加し 20 分間インキュベーション後、懸濁液を採取し、15 分間 15000 回転にて遠心し、上清を採取後サンプルバッファーと反応後、Western blotting のサンプルとして用いた。

C57BL/6J マウスを用いた甘草薬効評価実験

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。

（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： anti-LC3 抗体にて染色した HeLa 細胞内の autophagosome 数をカウントし、5 個以上の場合に LC3 陽性細胞とした（Sarkar et al. J Biol Chem, 2007 の方法による。）が、有意な上昇を認める漢方薬は無かった。

結果 2： Western blotting により LC3-II/actin 比を測定し、LC3/actin 比が 2 を超える場合に陽性としたが、有意な上昇を認める漢方薬は無かった。

結果 3： 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。

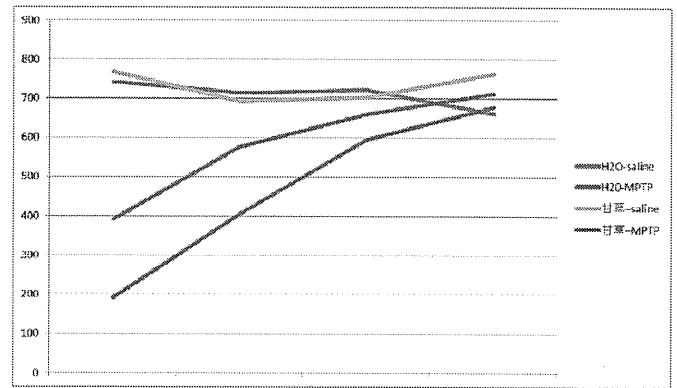


図 1. 甘草投与により、自発運動機能はコントロールに比し、改善が遅れ、毒性を発揮した。

D. 考察

他の分担研究者の検討では、分化型 PC12D 細胞にアセトン抽出後の漢方薬成分を添加すると、細胞保護効果を持つものがヒットしていることから、漢方薬には、パーキンソン病モデル細胞への細胞保護効果があると考えられるが、我々の検討から、同機序がオートファジーを介する可能性は低いと考えられた。しかし今回の検討では漢方薬の懸濁液をそのまま用いていることから、不溶性（水に対して）成分が細胞保護効果を持つ可能性も考えられた。

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

漢方薬そのものではオートファジーを有意に誘導するものは認められなかった。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 Psychiat* 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

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

パーキンソン病モデルマウスにおけるヒット漢方薬の薬効評価に関する研究

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

本分担研究の目的は、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漢方薬2種（調胃承気湯・大黄甘草湯）のパーキンソン病モデルマウスでの薬効を評価し、さらに同マウスモデルを用いて大黄甘草湯の薬効についての有効濃度を検討することである。

MPTP 添加パーキンソン病モデルマウスとして C57BL/6J マウスに、7日間 0.2、0.5、1.0 g/kg の調胃承気湯および大黄甘草湯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。高濃度の大黄甘草湯投与は、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黄甘草湯の薬効・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、大黄甘草湯-生食群、大黄甘草湯-MPTP 群、調胃承気湯-生食群、調胃承気湯-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。大黄甘草湯・調胃承気湯の使用濃度は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。

（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 大黄甘草湯の投与により 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、大黄甘草湯投与により回復しなかったこと。

結果 2 : 0.2 g/kg 大黄甘草湯投与にて、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 大黄甘草湯投与にて、自発運動機能検査試験の結果はコントロール群に比し、有意に改善した。

結果 4 : 調胃承気湯の薬効について

図 4 にデータを示す。大黄甘草湯同様、調胃承気湯でも MPTP 追加による自発運動機能の低下が助長された。

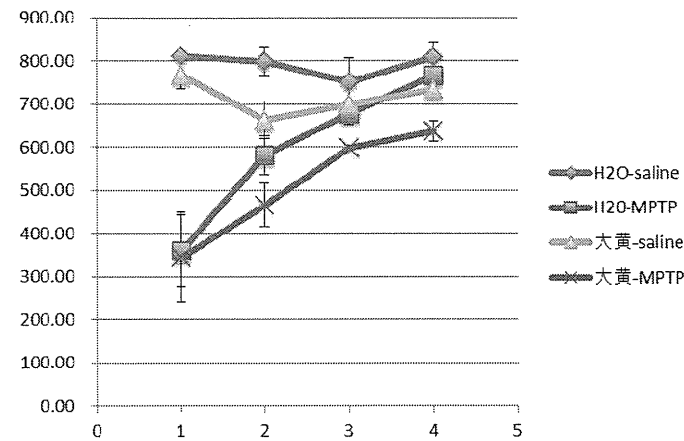


図 1. DK 1 g/kg では毒性が増す。

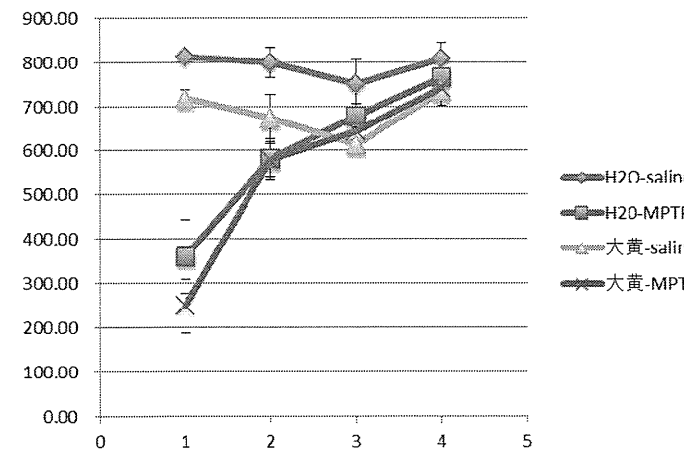


図 2. DK 0.2 g/kg では、改善効果は認めない。

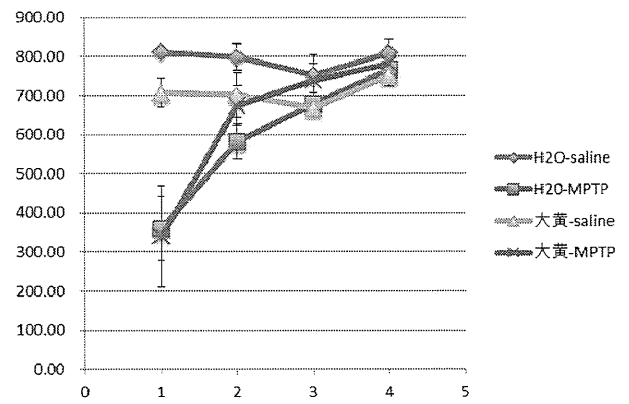


図 3. DK 0.5 g/kg にて症状改善効果あり。

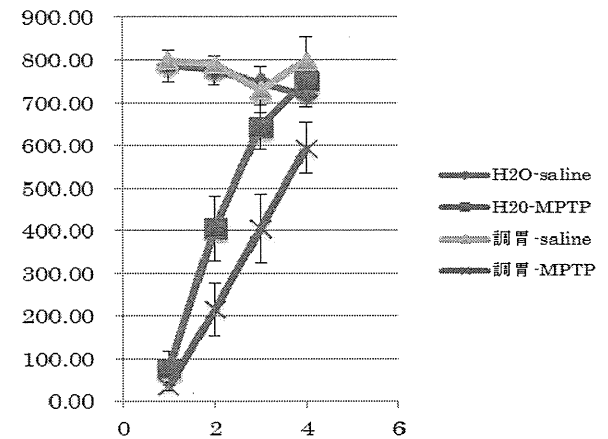


図 4. 調胃承気湯 1g/kg 投与にて毒性が増す。

D. 考察

MPTP 投与 PD モデルマウス実験と同様に、大黄甘草湯・調胃承気湯 1 g/kg では治療効果はなく、むしろ症状を増悪させた。また大黄甘草湯 0.2 g/kg では症状改善効果はなく、大黄甘草湯 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、大黄甘草湯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。

E. 結論

大黄甘草湯は 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

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

大黃甘草湯・調胃承氣湯の 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、ドパミン神経細胞の細胞死によりド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、治療法はドパミン量を維持する対症療法しか存在せず根治治療には至っていないため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。平成 22 年度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 PD モデル細胞の細胞死抑制作用に着目してスクリーニングを行い、主に便秘薬として用いられ、大黃、甘草が共通生薬として含まれている調胃承氣湯および大黃甘草湯に神経細胞保護効果があることを見出した。平成 23、24 年度は甘草が有効生薬であることを確認し、その有効活性成分の単離を行い、2 種の新たな化合物を構造活性を介して同定した。同化合物は単体でも十分な抗 PD 作用を有した。

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を行い、ヒット漢方薬を同定するとともに、ヒットした調胃承氣湯および大黃甘草湯から有効成分の単離精製及び構造決定を行い、治療薬シーズとしての有効性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

本研究では主に、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12D 細胞を用いた。以下にそれぞれの実験の詳細を述べる。

1. スクリーニング法

ショウジョウバエ、ラット、サルなどを用いた動物モデルにおいて、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤である Rotenone を投与するとパーキンソン病と類似した病理状態を引き起こすことが知られて

いる。そこで PC12D 細胞に 0.3 μM の Rotenone を添加することで誘導される細胞死を 80% 回復させるサンプルをヒットサンプルとし、そのような活性を示す物質を漢方薬ライブラリーより探索した。

2. 細胞死評価

細胞死は Trypan 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。

3. ミトコンドリア膜電位測定

ミトコンドリア膜選択的に取り込まれるカチオン性蛍光試薬 JC-1 を用い、フローサイトメーターによって検出した。ミトコンドリア膜が手法により評価した。ミトコンドリア膜電位が正常な生細胞に取り込まれると JC-1 は内膜状で凝集し、Ar レーザーによる励起で赤色蛍光を発する。一方で

膜電位が低下した細胞に取り込まれた場合、JC-1は凝集せずに緑色蛍光を発する。

4. 活性成分の構造解析・同定

スクリーニングからヒットした調胃承気湯・大黃甘草湯の共通成分である甘草に対して、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

結果1： (株) ツムラより提供された128種類の漢方薬ライブラリーより、Rotenone添加によって引き起こされるPC12D細胞の細胞死を80%以上回復させる化合物のスクリーニングを行った。その結果、主に便秘薬として用いられ、大黃、甘草が共通生薬として含まれているNo.69 (調胃承気湯) およびNo.79 (大黃甘草湯)に細胞保護効果があることを見出した。

結果2： 次にNo.69 (調胃承気湯) およびNo.79 (大黃甘草湯)の細胞保護効果のさらに詳細な検討を行った。細胞毒としてRotenoneではなく、分化した神経細胞にのみに取り込まれるmitochondria complex Iの阻害剤であるMPP+をもちいて、(1) トリパンプルー細胞外排出試験法による細胞死評価、(2) PI染色による細胞死評価、(3) JC-1染色によるミトコンドリア膜電位測定を行った。

(1) トリパンプルー細胞外排出試験法による細胞死評価

分化させたPC12D細胞にMPP+ 0.3 mMとNo.69 (調胃承気湯)もしくはNo.79 (大黃甘草湯)を

同時添加して48時間後の細胞死をトリパンプルー細胞外排出試験法により評価した。その結果、No.69とNo.79はどちらも濃度依存的にMPP+によって誘導される細胞死を回復させ、それぞれのIC50値は28 µg/mlと25 µg/mlであった。

(2) PI染色による細胞死評価

分化させたPC12D細胞にMPP+ 0.3 mMとNo.69 (調胃承気湯)もしくはNo.79 (大黃甘草湯)を同時添加して48時間後の細胞死をフローサイトメーターを用いたPI染色により評価した。その結果、MPP+により上昇したアポトーシスの指標であるsub G1期の割合がNo.69 (調胃承気湯)およびNo.79 (大黃甘草湯)の濃度依存的に減少させ、MPP+単独からコントロールのSubG1値を引いた値を100%としたときのIC50値はそれぞれ23 µg/ml、30 µg/mlであった。

(3) JC-1染色によるミトコンドリア膜電位測定
パーキンソン病の原因の一つとして、ミトコンドリアの品質管理機能の異常が報告されているため、ミトコンドリアに対する2サンプルの影響をJC-1染色により評価した。その結果、MPP+により誘導された膜電位の低下はNo.69 (調胃承気湯)およびNo.79 (大黃甘草湯)の濃度依存的に抑制され、MPP+単独からコントロールのMMP値を引いた値を100%としたときのそのIC50値はそれぞれ48 µg/ml、62 µg/mlであった。

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「大黃甘草湯」を得た。また、「調胃承気湯」および「大黃甘草湯」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。