

201445005A

厚生労働科学研究委託費

認知症研究開発事業

神経エネルギー代謝の改善を指標とした認知症根本治療効果を発揮する
生薬エキスの網羅的評価に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 竹森 洋

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
神経エネルギー代謝の改善を指標とした認知症根本治療効果を発揮する生薬エキスの網羅的評価	1
研究代表者 竹森 洋	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. iPS細胞の培養分化誘導に関わる研究開発	8
研究分担者 古江 美保	
2. 生薬エキス調整低分子分析・構造解析	15
研究分担者 瀧野 裕之	
3. 虚血及び血管性認知症モデルマウス評価	21
研究分担者 佐々木 勉	
4. 電気生理学的解析	23
研究分担者 田端 俊英	
5. 細胞保護効果のある低分子の抽出と修飾	27
研究分担者 上里 新一	
III. 学会等発表実績	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（認知症研究開発事業）による委託業務として、独立行政法人医薬基盤研究所が実施した平成26年度「神経エネルギー代謝の改善を指標とした認知症根本治療効果を発揮する生薬エキスの網羅的評価」の成果を取りまとめたものです。

神経エネルギー代謝の改善を指標とした認知症根本治療効果を発揮する生薬エキスの網羅的評価

業務主任者 竹森 洋

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト

プロジェクトリーダー

研究要旨 認知症の原因は様々ではあるが、多くは神経細胞のエネルギー代謝不全に密接に関係しており、ATP産生の最大の場合であるミトコンドリアの機能異常を伴う。また、神経細胞内でのエネルギー代謝に加え、アストロサイトによる神経伝達物質の回収及び神経細胞への再分配や、乳酸等の供給も記憶構築に重要であると示唆されており、神経細胞外からのエネルギー源等の供給制御方法の確立が、認知症治療の新戦略になるとされている。本研究は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目し、内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系とヒトiPS細胞由来アストロサイトを用いて、漢方生薬エキスを網羅的にスクリーニングし、神経細胞内エネルギー代謝異常を改善する生薬及びその成分を同定し、老化（認知症）モデルマウス等を利用した記憶能力を評価する。

業務主任者

竹森 洋・ 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

担当責任者

古江 美保・ 独立行政法人医薬基盤研究所
難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
研究リーダー

瀧野 裕之・ 独立行政法人医薬基盤研究所
薬用植物資源研究センター 栽培研究室 室長
佐々木 勉・ 大阪大学大学院医学系研究科
神経内科学 講師

田端 俊英・ 富山大学大学院理工学研究部
神経情報工学研究室 准教授

上里 新一・ 関西大学化学生命工学部
生命・生物工学科 医薬品工学研究室 教授

A. 研究目的

高齢化社会において、認知症は未だ根本治療薬が存在しない深刻な疾病であり、神経変性及び神経シグナル伝達不全を伴う。神経シグナル伝達の不全・過剰は、ともに神経障害作用を惹起する

ことから、認知症治療薬には神経保護作用を示すこと及び正常な神経伝達シグナルは維持することが求められる。一方で、認知症の原因は様々であることから、認知症病態における多様な型の共通現象（病態発症機構）を標的とした治療薬が有効であると考えられる。

本研究では、認知症病態の共通現象である神経細胞-支持細胞（アストロサイト）間のエネルギー交換能低下による神経興奮毒性制御不全に着目し、認知症治療薬に必要な条件の双方を評価するスクリーニング系を構築し（業務主任者・担当責任者：竹森）、漢方生薬エキスライブラリー（担当責任者：瀧野）を網羅的に評価することで、認知症根本治療効果を発揮する生薬及びその成分を同定することを目標とする。なお、評価に用いる高品質細胞供給源として、ヒトiPS細胞由来アストロサイトを利用する（担当責任者：古江）。また、同定する生薬及びその成分のマウスの記憶能力に対する効果を検証する（担当責任者：佐々木・田端）。さらに、将来、製薬企業へ創薬シーズとして高機能化生薬成分を導出するために、生薬成分の有機修飾も行う（担当責任者：上里・竹森・瀧野）。

また、本研究のスクリーニングの特徴は、これまでの漢方抽出法では含有率が低かった脂溶性成分を含めた広範囲の極性化合物を含む漢方生薬エキスをスクリーニングすることにある。本研究成果の波及効果としては、同定される生薬成分の有機修飾による新薬創製も期待される。本研究は、神経細胞のエネルギー代謝を改善させる新たな創薬手法を開拓し、治療法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

神経エネルギー代謝評価には、細胞外酸素消費計 Flax analyzer (Seahorse 社) を利用してミトコンドリアでの酸素消費を指標とした。その他、ATP はルシフェラーゼ測定システム、NADH は細胞毒性 Kit を活用して、細胞質とミトコンドリア内を分けて測定した。

神経細胞は、ヒトは iPS 由来、マウスは初代培養細胞及び癌化細胞（ヒト神経芽細胞腫由来株 SK-N-SH 及びマウス Neuro2a）を利用した。神経培養培地及び B27 Supplement は、Miltenyi 社から入手した。

神経薬理薬、ピルビン酸オキシダーゼ・乳酸オキシダーゼは和光純薬から入手した。

(倫理面への配慮)

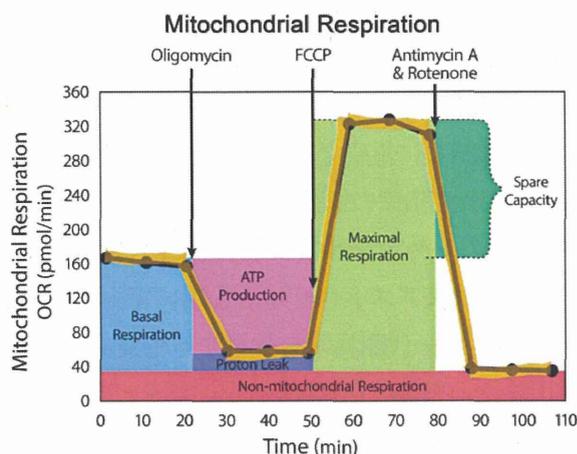
本研究はマウス及びヒト iPS 細胞由来材料を利用する。マウス実験は医薬基盤研究所動物実験委員会の承認のもとガイドラインに沿い、研修のうえ、十分に動物愛護上の問題点に配慮し研究を行っている。また、ヒト iPS 細胞の取り扱いも、医薬基盤研究所の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

まずは、神経細胞とアストロサイトの細胞内エネルギー利用度と、神経伝達物質との関係を解明することにした。細胞としては、初代マウス神経細胞、神経芽腫、初代マウスアストロサイト、アストロサイトーマの4種を利用することで、機能的な神経細胞とアストロサイトの特有な現象を導

きだすことにした。細胞内エネルギー利用度はミトコンドリアでの酸素消費量 (OCR: oxygen consumption rate) を目安とすることにした。

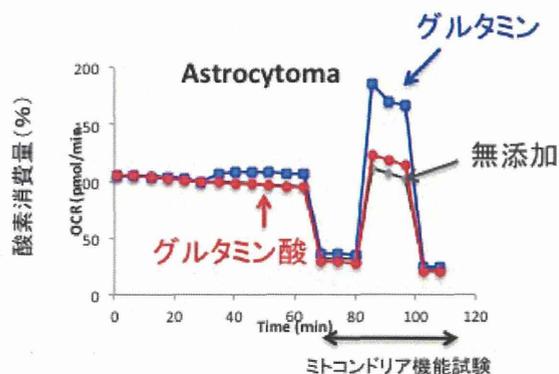
下に細胞の酸素消費量がミトコンドリアの電子伝達系に依存していることを確認するための試験 (ミトコンドリア機能試験/ストレス試験) の原理を、試薬メーカーの Home Page から引用して説明する。



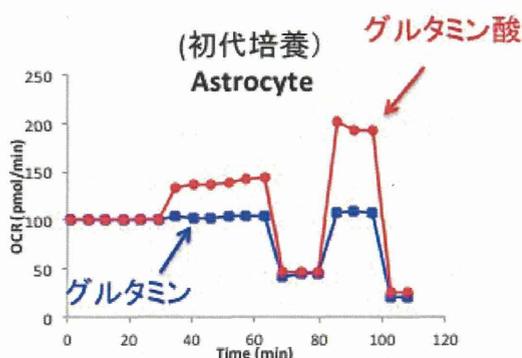
ミトコンドリアでの ATP 産生は、エネルギー代謝で合成された NADH や FADH が酸化される際に、 H^+ をミトコンドリア内膜に貯留しておく。溜められた H^+ は最終的にミトコンドリア内に戻り H_2O に変換され酸素 (O_2) 消費に繋がる。 H^+ がミトコンドリア内膜から内部へ移動するエネルギーが ATP 合成に利用される。oligomycin は H^+ がミトコンドリア内膜から内部への移動を阻害することで、 H^+ のミトコンドリア内膜貯留を高める (このとき酸素消費は抑制されている)。次に、脱共役剤 (FCCP) でミトコンドリア内膜に穴を開けた様な状態にすると、ATP 合成非依存的 (脱共役) に H^+ が内部へ移動し酸素が一気に消費される。この状態を最大酸素消費量と定義し、ミトコンドリア最大機能と解釈する。最後に、NADH や FADH の変換や電子伝達経路上流を阻害し (rotenone・antimycin)、脱共役時の酸素消費が電子伝達経路 (ミトコンドリア) に依存していることを確認する。

以上の操作で観察している酸素消費量の数値がミトコンドリアのエネルギー代謝量であることを確認でき、以後の実験及び考察に役立てる。ちなみに、メーカーが定義する、予備呼吸量 (spare

capacity) は架空の概念であり、この数値は細胞ごとに異なる（特に神経系の細胞）ため、評価ごとに解釈を議論する必要があった。

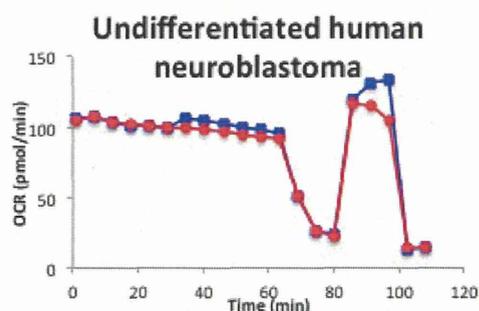


アストロサイトーマは肝臓の細胞に似ており、グルタミンの添加で酸素消費量が増えた。一方、初代アストロサイトでは、グルタミン酸が酸素消費を増加させる栄養因子であった。これは、アミノ酸の取り込み効率に依存すると予想される。

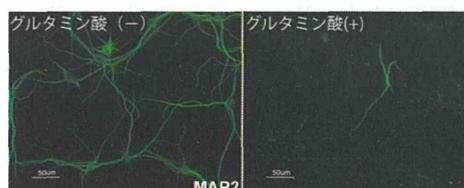
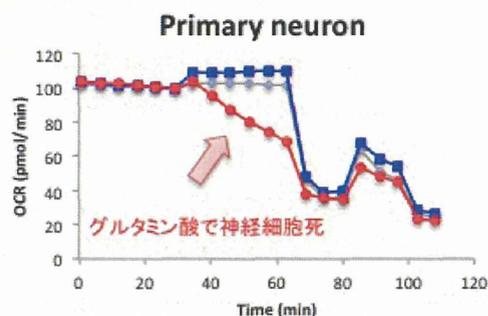


元々、アストロサイトはシナプス間での余分な神経伝達物質であるグルタミン酸の回収（クリアランス）において重要な役割を担っており、アストロサイト欠乏のシナプスは、グルタミン酸毒性に感受性が高いことと一致する。また、神経毒性を惹起するグルタミン酸トランスポーター阻害剤 (Way 213613) の存在下では、今回のグルタミン酸依存的酸素消費量の亢進が観察されないことから、酸素消費量はアストロサイトでのグルタミン酸の回収能力の評価に役立つ簡便な指標の一つであると結論した。

次に、神経芽腫と初代神経細胞を比較した。神経芽腫細胞は、アストロサイトーマと同様にグルタミン依存的に酸素消費が増加した。しかし、その増加は僅かであった。



初代神経細胞は、グルタミンで僅かながら酸素消費が亢進するが、グルタミン酸では低下した。細胞染色で確認したところ、グルタミン酸処理で細胞が死んでおり、酸素消費低下は神経細胞死によるものであった。



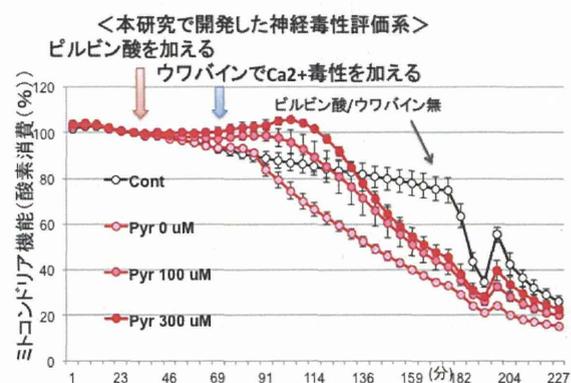
これらのことから、酸素消費量は、培養集団中の神経細胞の種類を見分けることができ、グルタミン酸毒性も経時的に評価できる点で、神経毒性評価に利用可能な一つの手法と結論した。本原理を利用すれば、ヒト iPS 細胞から神経を分化させる際に、どの程度均一な細胞集団かを事前に予測することも簡便になる（詳しくは古江の項目）。

続いて、酸素消費計を利用して、神経ミトコンドリア活性における栄養素の重要性と神経毒性との相関を検討することにした。その結果、ピルピ

ン酸が神経ミトコンドリア活性を上昇させることが明らかとなった。古くから、神経細胞へのエネルギー供給は乳酸が重要と考えられてきた。この説は、アストロサイトに蓄積されているグリコゲンが、ピルビン酸まで分解され、乳酸脱水素酵素で乳酸へと変換され神経細胞へ渡されるという説で、アストロサイト-神経-乳酸シャトル説として定着している。しかし、神経への物質輸送に関わる乳酸トランスポーターとピルビン酸トランスポーターは同一の物であり、また、一般的に細胞から分泌される乳酸：ピルビン酸比率は10：1と、ピルビン酸が圧倒的に低いため、実際に乳酸とピルビン酸のどちらが神経細胞のエネルギー源として重要かは測定できない。そこで、酸素消費量で予測すると、乳酸には神経のエネルギー代謝を改善させる作用は無かった。

次に、ピルビン酸が神経保護作用を発揮できるか否かを検討した。神経細胞は神経活動に伴ってイオンが流入し脱分極を起こす。脱分極が持続すると、 Ca^{2+} イオンの流入が増加し、 Ca^{2+} 毒性によりミトコンドリア機能が破壊される。これが、神経活動に伴う興奮毒性の発生機序の一つである。神経細胞の流入イオンをくみ出すポンプとして、 $Na^+/K^+ATPase$ が存在し、神経細胞で生産される70%のATPが、 $Na^+/K^+ATPase$ により消費されている。すなわち、神経エネルギー代謝（ミトコンドリアを含む）が低下してATP産生能が低下すると、 $Na^+/K^+ATPase$ 活性の低下による Ca^{2+} 毒性がさらにミトコンドリアを破壊し、最終的に神経障害を惹起する。このカスケードを擬似化するために、 $Na^+/K^+ATPase$ 阻害剤で強心配糖体であるウワバインを利用してミトコンドリア障害回避実験を行った。

その結果、ピルビン酸 (Pyr) は濃度依存的にウワバイン毒性を低下させ、神経細胞死までの時間を倍に延長できることが示唆された。同様な神経保護作用は、グルタミン酸毒性でも観察され、 Ca^{2+} 毒性発現に必要なグルタミン酸濃度を10倍以上上昇させる作用があった。



さらに、本測定系は、神経伝達に重要なシグナルの成熟度も予想可能であることが示唆された。例えば、Grid2 (グルタミン酸トランスポーター delta2) 欠損である (詳しくは田端の項目)。Grid2 を欠損させることが神経保護的に作用するかの結果を得たが、これは、NMDA-R 機能低下による Ca^{2+} 毒性抑制作用であった。同様な現象は、認知症関連病態治療薬メマンチンでも再現できた。一方、メマンチン存在下で神経を培養すると、正常なシナプス形成が阻害された。すなわち、メマンチンは、本研究計画の正常な神経シグナル伝達を阻害しないという前提にそぐわない薬と予想され、Grid2 機能阻害の方向性も同様に目的にはそぐわないと予想される。事実、Grid2 欠損マウスの運動記憶は殆ど構築されず、メマンチンも同様であった (詳しくは、田端の項目)。

また、塩誘導性キナーゼ SIK の欠損マウス (詳しくは佐々木の項目) も、神経シグナル伝達機能の攪乱で神経毒性への耐性変化が起こっている結果を得ている。ピルビン酸代謝が関わっているかは現在検討中である。

これらの結果から以下の作業仮説を立てた。

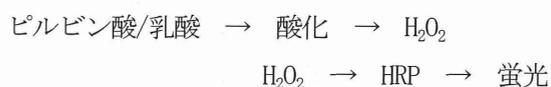
(仮説)

アストロサイトからのピルビン酸供給を高めれば、新たな神経保護効果を発揮し、認知症 (神経老化) に役立つ薬を創製できるのではないかと。

本仮説を証明するために、まずは、アストロサイトからのピルビン酸/乳酸測定系を構築し、それ

を HTS (ハイスルットスクリーニング) 対応にしていける必要がある。また、測定系から可能な限り擬陽性を外す工夫も必要である。そこで、ピルビン酸/乳酸測定を可能な限り同一系で測定できるように調整した。

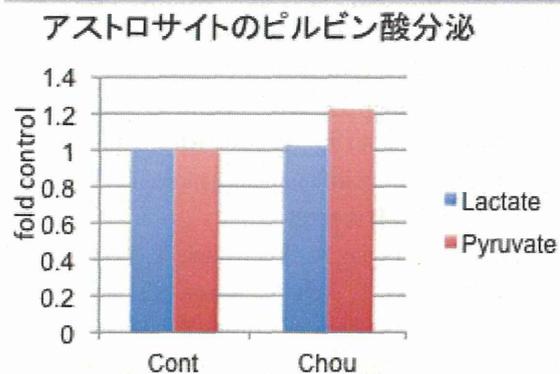
ピルビン酸と乳酸測定に、ピルビン酸酸化酵素と乳酸酸化酵素を利用して、 H_2O_2 を発生させた。次に H_2O_2 を HRP (パーオキシダゼ) で H_2O で O_2 に変換させる際に、非蛍光物質アセチルレゾルフィン を HRP 反応で蛍光物質レゾルフィンへ変換させ、変換後の蛍光で元のピルビン酸と乳酸の量とした。



この系は最初の酸化酵素に費用がかかるものの、培地中のピルビン酸と乳酸を nM レベルで測定できる高感度測定系である。また、 H_2O_2 以降の反応系が同一であるた、被験薬に蛍光物質が含まれていてもその作用が補正されるため、擬陽性が僅かである点が優れている。

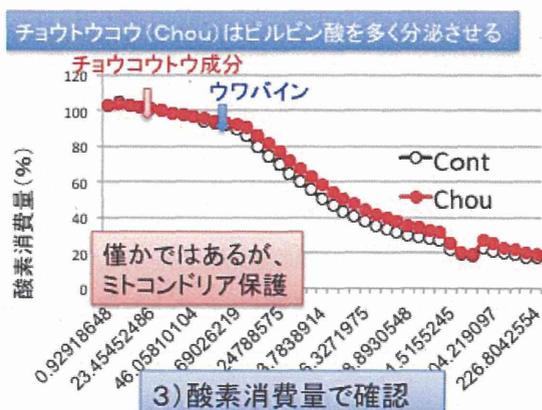
まずは、模擬スクリーニングして、認知症に効果があるとされる生薬のアルコール抽出物を試験した。

1) チョウトウコウの熱水抽出エキス



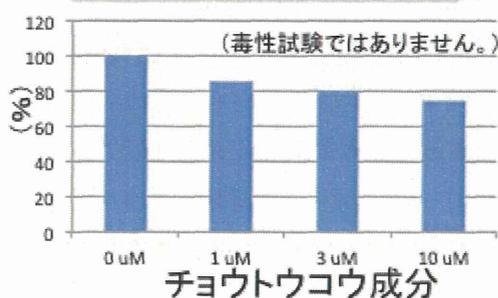
その結果、チョウトウコウ (Chou) のエキスにアストロサイトからのピルビン酸分泌促進作用があることが示唆された。次に、医薬基盤研究所の薬用植物資源研究センターの別ロットを、ATP 量を元にした神経毒性評価から、どのロットに目的

成分が多く含まれるかを予測した (詳しくは測野の項目)。測野による多項解析結果から、成分が同定でき、その成分にはミトコンドリア機能亢進活性が検出できた。



ATP と同時に、細胞毒性試験に利用される NADH を測定してみると、本成分には NADH 量を高める活性が存在していたが、その活性は毒性負荷を行わないコントロール細胞よりも高かった。乳酸脱水素酵素 LDH がピルビン酸を乳酸に変換する際に NADH を NAD に変換することから、チョウトウコウ成分は、LDH 阻害剤である可能性が示唆された。そこで、LDH 活性を測定したところ、やはり、チョウトウコウ成分は LDH 活性を 30% ほど抑制した。

4) 精製成分による LDH 阻害

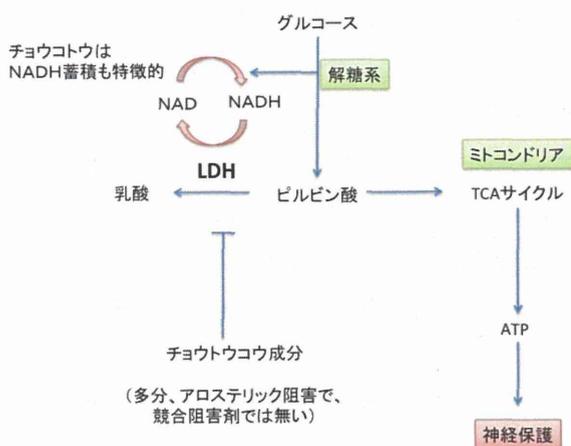


一般的に、LDH 阻害は神経障害を惹起すると考えられるが、これは、LDH 完全欠損患者でのことで、LDH の 30% 活性阻害は、ピルビン酸供給量を高める手段としては有用かもしれない。今後の解析が期待される。

その他、ピルビン酸の認知症への有用性を老化促進・脳萎縮モデルマウス SAMP10 で検証中である。

評価に1年かかるため、平成27年6月頃に結果が出る予定である。また、スクリーニングは平成27年2月時点で2000点のエキスが終了し、チョウトウエキスを超えてピルビン酸分泌を促進するエキスを20点ほど同定した。平成27年6月には、数点に絞りこみ、マウスを活用した評価に移る予定である。また、解糖系を促進する作用として、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害があげられ、複数の候補低分子を合成した(詳しくは上里の項目)。一方で、乳酸がHDAC阻害活性を有しており、ピルビン酸/乳酸比率変動に、ヒストンアセチル化を利用するとよいことも示唆された。

D. 考察



チョウトウエキス成分から予想される新たな神経保護戦略を図示した。これまで、神経チャンネルに作用する化合物やbeta-アミロイド蓄積阻害に作用する化合物/抗体などが認知症に有効と考えられたが、本研究から神経細胞のエネルギー代謝を改善させることも重要な戦略であると示唆された。今後、多くの候補をスクリーニングし、認知症の根本治療に役立つ戦略を構築したい。

E. 結論

神経細胞のエネルギー代謝を改善し、神経毒性耐性を獲得させるためにピルビン酸が重要な役割を担っていることが示唆された。ピルビン酸の高感度測定計を樹立し、生薬エキスライブラリーのスクリーニングを開始した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 参考文献

- 1) Fukuchi M, Tabuchi A, Kuwana Y, Watanabe S, Inoue M, Takasaki I, Izumi H, Tanaka A, Inoue R, Mori H, Komatsu H, Takemori H, Okuno H, Bito H, Tsuda M. Neuromodulatory effect of Gs- or Gq-coupled GPCR on NMDAR selectively activates the NMDAR/Ca2+/calcineurin/CREB-regulated transcriptional coactivator 1 (CRTC1) pathway to effectively induce Bdnf expression in neurons. *J Neurosci* (2015) in press.
- 2) Lee J, Tong T, Takemori H, Jefcoate C. Stimulation of StAR expression by cAMP is controlled by inhibition of highly inducible SIK1 via CRTC2, a co-activator of CREB. *Mol Cell Endocrinol.* (2015) in press.
- 3) Popov S*, Takemori H*, Tokudome T, Mao Y, Otani K, Mochizuki N, Pires N, Pinho MJ, Franco-Cereceda A, Torielli L, Ferrandi M, Hamsten A, Eriksson P, Bertorello AM, Brion L. (* equally contributed) Lack of SIK2 prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake *PLoS ONE* (2014) 9:e95771
- 4) Sontag JM, Sontag E, Tesone-Coelho C, Takemori H, Zwiller J, Dierrich JB. Cocaine Regulates the Salt-Inducible Kinase (SIK1) by Inducing Protein Phosphatase-2A Expression in Rat Brain. *J Drug Alcohol Res* (2014) 3: ID 235854.

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice. *Immunology* (2015) in press
- 2) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes* (2014) 5: 1095-1114.
- 3) 熊谷彩子, 竹森 洋. 薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用 薬用植物・生薬の開発と今後の展望 ~資源確保、品質評価、製品開発

シーエムシー出版 川原信夫編集 (2014)
pp114-120

2. 学会発表

1) 佐野坂 真人、伊東 裕美、藤本 穰、大河原
知治、仲 哲治、竹森 洋

塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリー欠損マウスの
LPS 感受性に関する研究

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

2) 黒井 梓、伊東祐美、淵野裕之、山原 年、
川原信夫、竹森 洋

フラビ成分 Pterosisin B の皮膚炎症疾患への応用

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

3) 賀川 舞、杉村康司、飯田 修、淵野裕之、黒
井 梓、熊谷彩子、山原 年、川原信夫、竹森 洋

メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的
解析

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

4) 熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤
一郎、佐々木 勉、田端 俊英、竹森 洋

GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい
調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

5) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、淵野裕之、
川原信夫、竹森 洋

肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3
の重要性について

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

1. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 特願 2014-234698 「メラニン生成抑制剤、化粧
料、医薬組成物、及びメラニン生成抑制剤の製造
方法」 竹森 洋、熊谷彩子、賀川舞、伊東祐美、

川原信夫、淵野裕之、杉村康司、黒井梓 (独立
行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館)
国内

2) 特願 2014-130876 「プテロシン誘導体を含む軟
骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」 妻木
範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫 (国立大
学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所)
(国内優先権主張)、米国

3. 実用新案

該当せず

4. その他

iPS 細胞の培養分化誘導に関わる研究開発

担当責任者 古江 美保

独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 研究リーダー

研究要旨 近年、国内外でヒトiPS細胞を利用した創薬研究への応用が期待されているが、安定した品質を持つヒトiPS細胞由来アストロサイトおよび神経を安定供給するには至っていない。我々は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目した内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系にヒトiPS細胞由来アストロサイトを応用することを目的として、ヒトiPS細胞由来のアストロサイト及び神経細胞への安定な分化誘導法に関わる研究を推進している。本年度は、ヒトiPS細胞からアストロサイト及び神経細胞への分化誘導法について検討するとともに、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について検討を進めた。

A. 研究目的

認知症の原因は様々ではあるが、多くは神経細胞のエネルギー代謝不全に密接に関係しており、ATP 産生の最大場であるミトコンドリアの機能異常を伴う。また、神経細胞内でのエネルギー代謝に加え、リポタンパク ApoE4 多型が認知症と高い相関を示すこと、アストロサイトによる神経伝達物質の回収及び神経細胞への再分配や、乳酸等の供給も記憶構築に重要であると示唆されており、神経細胞外からのエネルギー源等の供給制御方法の確立が、認知症治療の新戦略になるとされている。

本研究は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目し、内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系を用いて、漢方生薬エキスを網羅的にスクリーニングし、神経細胞内エネルギー代謝異常を改善する生薬及びその成分を同定し、及び老化（認知症）モデルマウスを利用した記憶能力を評価することを目標とする。

我々は、神経細胞エネルギー代謝制御に着目した内因性グルタミン酸による神経興奮毒性との相関を評価する新たなスクリーニング系にヒト iPS 細胞由来アストロサイトを応用することを目的と

して、ヒト iPS 細胞由来のアストロサイト及び神経細胞への安定的な分化誘導法に関わる研究開発を進めている。国内外でヒト iPS 細胞を利用した創薬研究への応用が期待されているものの、安定した品質を持つヒト iPS 細胞由来アストロサイトや神経を安定供給するには未だ至っていない。ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイトや神経細胞の機能や品質を評価する方法も未だ確立されていないのもその理由のひとつである。そこで、我々は、ヒト iPS 細胞からアストロサイトや神経への誘導方法について検討するとともに、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について、従来の細胞の遺伝子発現評価に加えて、酸素消費量による評価方法の検討をおこなった。

B. 研究方法

免疫染色及び形態評価による誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価法の開発には、ヒト iPS 細胞 Tic (JCRB 細胞バンク JCRB1331) から誘導した神経幹細胞及び神経細胞を用いた。免疫染色及び形態評価の比較対象として、ヒトアストロサイトマ KINGS1 (JCRB 細胞バンク IF050435) を用いた。各種細胞を培養し、既知の神経幹細胞

マーカー、神経マーカー、及びアストロサイトマーカーの発現について蛍光免疫染色で検討した。既設の蛍光顕微鏡システム（ニコン Ti 蛍光顕微鏡）の改良を行い、画像取得・解析に用いた。

ISX-9 は Cayman 社から購入した。その他の酸素消費量の検討は竹森の項目を参照。

（倫理面への配慮）

当該研究は、独立行政法人医薬基盤研究所の定める倫理規定に従って計画、遂行した。ヒト iPS 細胞 Tic (JCRB1331) は、既知の細胞より樹立された iPS 細胞であり、独立行政法人医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクより所定の手続きを経て入手した。将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、且つ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう努め、一般公開や学会発表などにおいて国民に説明を行った。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞からアストロサイトや神経への誘導方法の評価を行うために、まず、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について検討した。分化誘導した細胞の神経マーカー/アストロサイトマーカー遺伝子発現を細胞の免疫染色によって網羅的に評価する方法の構築をおこなった。今回は、ヒト iPS 細胞から神経幹細胞を経て神経細胞やアストロサイトを含むグリア細胞へと 2 次元培養にて分化誘導する実験を実施し、誘導中の各過程で固定し、蛍光免疫染色を行い、蛍光顕微鏡システムによる蛍光画像取得及び解析を行った（図 1）。ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞とさらに誘導を進めた幼若神経細胞では、大脳皮質神経幹細胞マーカーである PAX6、神経幹細胞およびグリア細胞マーカー Nestin、神経マーカー Tuj1、MAP2 の発現が異なることが確認された。

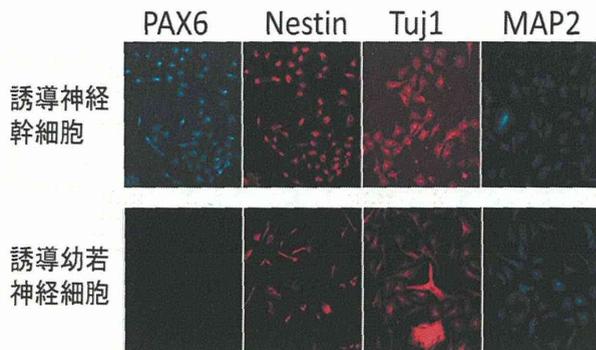


図 1：誘導神経細胞の評価

ヒト iPS 細胞 Tic から分化誘導した誘導神経幹細胞集団（上）及び誘導幼若神経細胞集団（下）の蛍光免疫染色による評価例。各種神経細胞マーカーの発現を指標とし、誘導効率を判定した。

ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイトの情報は誘導神経細胞に比べて少なく、分化誘導評価の比較対象（コントロール）とする細胞が必要なため、ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の培養を行った。誘導アストロサイトの評価を行うにあたり、アストロサイトマーカー遺伝子の発現についてヒトアストロサイトーマ KINGS1 を用いて検討した。

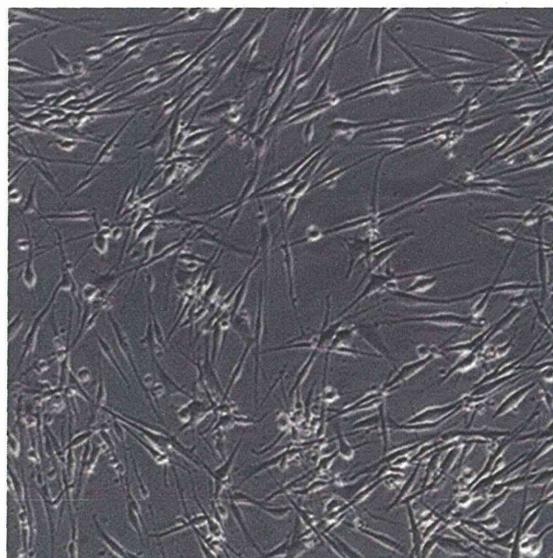


図 2：ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の位相差顕微鏡像 培養は比較的容易であるため、コントロール細胞としても有用である。

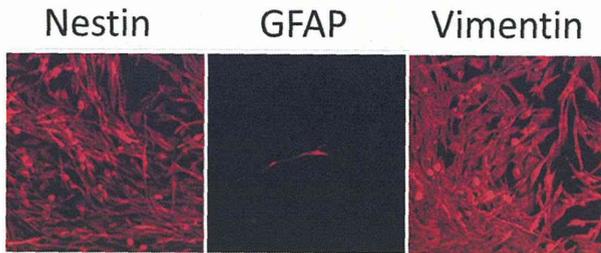


図3: ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の評価例

ヒトアストロサイトーマ KINGS1 の各種アストロサイトマーカーの発現を蛍光免疫染色評価した。

このアストロサイトーマ KINGS1 の細胞株は、均一な細胞集団ではないことが、今回の検討で明らかとなった。JCRB 細胞バンクの細胞情報としては、アストロサイトのマーカーでもある GFAP 陽性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性の細胞集団とうたわれていたが、実際に培養し、免疫染色で判定してみると、そのほとんどが GFAP 陰性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性の細胞集団であり、一部が GFAP 陽性、Nestin 陽性、Vimentin 陽性であることが確認された (図3)。しかしながら、アストロサイトーマ KINGS1 は培養も比較的容易なことから、免疫染色による評価のコントロール細胞としては非常に有用であり、今後の検討にも使用可能であることが示された。

さらに、酸素消費量を利用し、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を評価可能か否かを検討した。今回は、神経細胞を確実に得るために、マウスの初代培養細胞を利用した。未分化神経細胞からの神経細胞とアストロサイトの分垂割合の変化には、神経細胞分化関連因子の転写を調節する MEF2 とその抑制因子である Class2-HDAC の活性を変動させることで確認した。

MEF2 の抑制が神経細胞の分化及び成熟を阻害することは報告されているが、MEF2 の抑制がアストロサイトへの分化を促進するかは不明である。一方、アストロサイトは cAMP で分化誘導され、

cAMP は Class2-HDAC の活性化を介して MEF2 を抑制することが明らかにされている。そこで、今回は、MEF2 活性の制御剤として、cAMP と ISX-9 を初代神経細胞の分化段階で処理し、成熟神経細胞集団内の細胞割合と酸素消費量を検討した。

その結果、ISX-9 は神経細胞割合を高め、cAMP はアストロサイトの割合を高めることが確認できた。

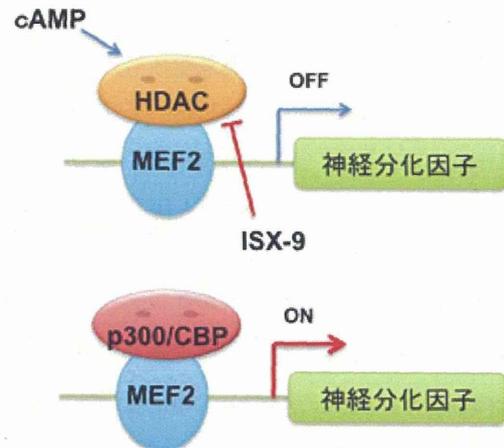


図4: 転写因子 MEF2 による神経細胞分化促進。MEF2 活性は Class2-HDAC により抑制されており、cAMP はその抑制を増強させる。一方、最近同定された低分子化合物 ISX-9 は、Class2-HDAC を阻害することで、MEF2 活性を上昇させ、神経細胞分化を促進させる。

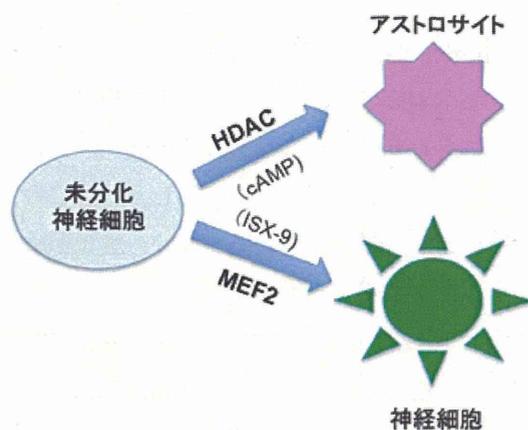


図5: Class2-HDAC/MEF2 による神経分化の方向性制御の作業仮説。

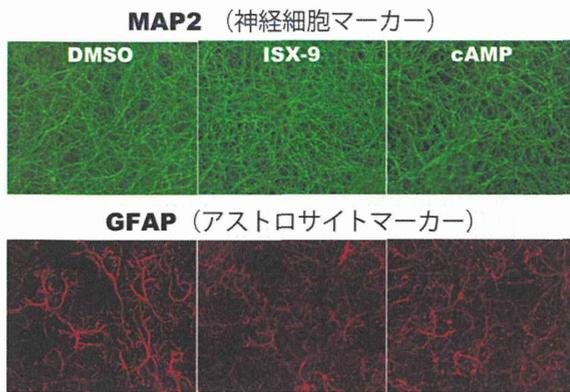


図 6： ISX-9 と cAMP による神経細胞集団の分化割合変動。

このように、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を得ることができたので、それぞれの集団を酸素消費量で確認した。竹森の項目で確認されているように、神経細胞とアストロサイトではグルタミン酸添加後の酸素消費量変動が逆に反応することを利用して確認することにした。

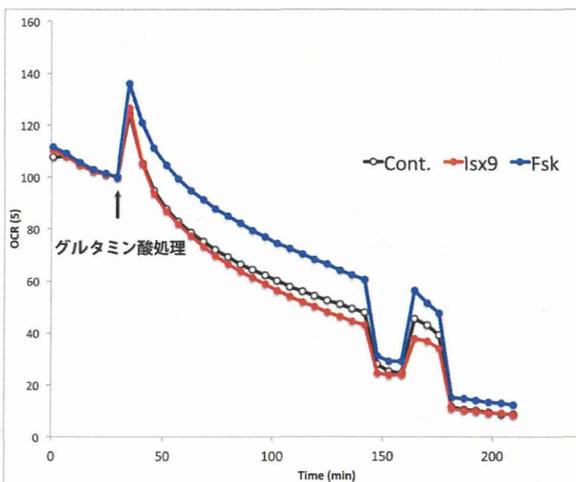


図 7： 神経細胞とアストロサイトの割合の異なる集団の酸素消費量変化。神経細胞の多い ISX-9 処理群は、グルタミン酸に対する感受性が亢進しており、神経細胞死が高まっていた。反対に、アストロサイトの多い細胞集団では、神経保護に作用した。

予想どおり、ISX-9 処理群はグルタミン酸感受性が亢進しており、細胞死が増加する事で、酸素

消費量低下が促進していた。反対に、cAMP 処理群では、アストロサイトによるグルタミン酸利用が亢進するため、酸素消費量が高く推移し、その後のミトコンドリア機能試験でも神経保護作用を發揮した。これらのことは、アストロサイトの興奮毒性に対する重要性を示唆するものである。

D. 考察

誘導アストロサイトと誘導神経細胞を免疫染色により評価できる可能性が示された。現在、さらにスループット性を増し、正確且つ迅速に誘導細胞の評価を行うために、蛍光顕微鏡装置システムの改良を進めている。また、免疫染色では各種マーカー遺伝子の細胞ごとの発現量を細胞形態や細胞密度などと合わせて視覚的に評価できるというメリットがあるが、一度に評価できるのは、数種～十数種のマーカーのみであり、それ以上に多くの遺伝子について調べるには、コストと時間が問題となってくる。そこで、定量的 RT-PCR アレイ (網羅的 mRNA 発現) 解析などと組み合わせてより多くの情報をスピーディーに得られる実験系の構築も視野に入れている。

また、神経細胞とアストロサイトの割合が異なる集団を酸素消費量と興奮毒性で評価することが可能性であることが示唆された。また、アストロサイトの神経保護作用を簡便に再確認できた。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から誘導したアストロサイト及び神経細胞の品質を迅速に且つ正確に評価することは、誘導アストロサイトと誘導神経細胞が薬物スクリーニングに応用可能な、機能するものであるかどうかを評価する上でも、各々の誘導法が安定かどうかを評価する上でも、非常に重要である。

本研究では、誘導アストロサイト及び誘導神経細胞の評価方法について、従来の細胞のマーカー

遺伝子発現評価に加えて、酸素消費量による評価方法を検討し、神経細胞とアストロサイトの存在割合や機能を簡便に確認する基本的な実験系を策定した。引き続き、これらの実験系を改良し、実用可能な評価系の構築を推進する。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y and **Furue MK**, Development of a monitoring method for non-labeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis. *STEM CELLS Translational Medicine* (in press)
- 2) Andrews P, Baker D, Benvenisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, **Furue MK**, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K, Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, and Zhou Q. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Regen Med.* (2015) (2 Suppl): 1-44. DOI: 10.2217/rme.14.93.

- 3) Ozawa M, Ozawa Y, Iemura M, Kohara A, Yanagihara K, **Furue MK**, A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells. *Protocol Exchange* (2014) DOI:10.1038/protex.2014.012
- 4) Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Ohnuma Y, Chan T, Michiue T, **Furue MK**, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *SCIENTIFIC REPORTS* (2014) 4, 4646 DOI: 10.1038/srep04646
- 5) Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, **Furue MK**, Mizuguchi H. HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One* (2014) 9, e90791 DOI: 10.1371/journal.pone.0090791. eCollection 2014.

著書

- 1) **古江-楠田美保** (2014) 第15章 ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション 第三部 **新たな創薬のための革新的技術開発** 南山堂 P105-112
- 2) 菅三佳、**古江-楠田 美保** (2014) ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題 *生物工学会誌* 第92巻9号 P487-490

2. 学会発表

国内学会：一般講演

- 1) 加藤竜司、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江・楠田美保** コロニー形態情報を用いた iPS 細胞株の特性解析

第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ
横浜 (神奈川県) 2015 年 3 月 19 日-21 日

- 2) 加藤竜司、吉田啓、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江-楠田美保** 細胞形態情報を用いた iPS 細胞培養手技の定量化 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 3) 太刀川彩保子、菅三佳、**古江-楠田美保**、大沼清、二次元イメージングサイトメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 第 14 回再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 4) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江-楠田美保**、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム 品質評価法の開発 第 66 回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014 年 9 月 9 日-11 日

国内学会：シンポジウム・ワークショップなど

- 5) 吉田啓、長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、蟹江慧、加藤竜司 コロニートラッキングを応用した iPS 品質 状態のモニタリング 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京)2015 年 1 月 13 日
- 6) 太刀川彩保子、藤木彩香、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、**古江-楠田美保**、浅島誠、大沼清、2 価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京)2015 年 1 月 13 日
- 7) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、加藤竜司 iPS 細胞培養手技標準化のた

めの形態評価 モデル 細胞アッセイ研究会
東京大学生産技術研究所コンベンションホ
ール (東京) 2015 年 1 月 13 日

招待講演

- 8) **古江-楠田美保** 再生医療に果たす工学の役割 ―ヒト多能性細胞の培養において求められるマテリアル― 第 64 回日本歯科理工学学会 アステールプラザ (広島) 2014 年 10 月 4 日-5 日
- 9) **古江-楠田美保** ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 第 41 回日本毒性学会学術年会 神戸コンベンションセンター (兵庫) 2014 年 7 月 2 日-4 日

学会座長

- 10) 柳原佳奈 Recent developments of Stem Cell Applications-leaders in industrialization JAACT2014 国際会議北九州大会 北九州国際会議場 (福岡) 2014 年 11 月 11 日-14 日
- 11) **古江-楠田美保** 再生医療に求められる細胞培養 第 14 回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015 年 3 月 19 日-21 日
- 12) **古江-楠田美保** 臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の品質管理 iPS 細胞ビジネス協議会 京都市リサーチパーク (京都) 2014 年 11 月 26 日

国際学会：一般講演

- 13) Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, **Furue MK.** *Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm* International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2014.6.18-21 Vancouver, Canada
- 14) Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, **Furue MK.** Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by

live cell imaging. ISSCR 12th Annual
Meeting 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

伊 宏昭、古江 美保、菅 三佳、志賀 正武

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許出願

PCT/JP2014/08221 判定装置、観察システム、
観察方法、そのプログラム、細胞の製造方法、お
よび細胞 株式会社ニコン 清田 泰次郎、紀

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし

生薬エキス調整低分子分析・構造解析

担当責任者 瀧野 裕之

独立行政法人医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター 栽培研究室 室長

研究要旨 薬用植物スクリーニングを行うための植物エキ斯拉イブラリーの構築を行った。本研究事業に対してはシダ植物を中心に多くの植物を採取し、それらのメタノール抽出エキスを作成し、DMSO溶液でのライブラリーを構築した。最終的にそれらライブラリーのアッセイプレートへの自動分注を行うための分注プログラムを作成し、アッセイプレートでの分注態勢を整え、今年度は4413種類の植物エキスについて本研究事業へのアッセイプレートでの供出を行った。生薬チョウトウコウからATP産生に影響を与える化合物として2種の化合物を特定するに至った。

A. 研究目的

高齢化社会において、認知症は未だ根本治療薬が存在しない深刻な疾病である。神経シグナル伝達の不全・過剰は、ともに神経障害作用を惹起することから、認知症治療薬には、神経保護作用を示すこと及び正常な神経伝達シグナル（神経発生を含む）を障害しないことが求められる。本研究では、正常な神経伝達シグナルを阻害することなく、認知症の最終病態である神経細胞死を、神経エネルギー代謝を制御することで回避させる技術開発を行うことを目的とする。

20世紀には多くの医薬品開発において天然物を創薬資源として用いてきた歴史があるが、近年のゲノム創薬の台頭により下火になってきた感があったが、最近になり combinatorial chemistry や High-through put screening) HTS において主体となっていた合成化合物の骨格の限界が指摘されるなど、奇異な骨格を有する天然有機化合物に回帰する傾向がみられるようになった。現在国内にはそのような理由もあり、いくつかの研究機関において天然有機化合物ライブラリーが構築されるようになってきた。コック内に存在する天然物ライブラリーにおいて微生物抽出エキスを元にしたライブラリーは存在するが植物抽出エキスを元にしたライブ

ラリーは存在しない。その理由として、このような植物エキ斯拉イブラリーを構築するためには、厳格な植物同定が必要であり、被子、裸子などの高等植物とは異なり羊歯、地衣類などの下等植物の場合、花がないために同定には極めて高度な知識を要するため、容易には手掛けられないのである。本分担研究においてはそのような創薬現場の現状を鑑み、本研究課題に直結した植物エキ斯拉イブラリーの構築において、比較的奇異な骨格を有する二次代謝産物を生成するシダ類を重点的に収集し、エキス作成を行うこととした



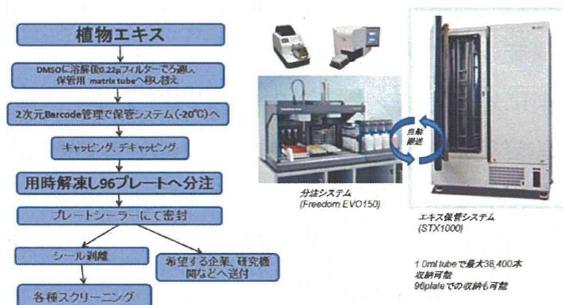
B. 研究方法

独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターには国内に3つの研究部(種子島、北海道、筑波)を有している。それぞれの拠点においてはそ

の地域特有の気候に合った植物資源の栽培・保存が行われている。北海道研究部においては北方系植物、例えばモッコウ、センキュウ、ホッカイトウキ、ゲンチアナなど冷涼な気候を好む植物を栽培・保存しており、特に近年文字文化を有しないアイヌ民族が歴史的に薬用として利用していた薬用植物の収集を行っている。また種子島研究部においてはウコン類、インドジャボクなどの熱帯・亜熱帯植物の栽培・保存を行っているほか、近年はソロモン諸島と契約を結び、多くの貴重なソロモン諸島産植物資源の導入を図っている。筑波研究部においては、標本園・温室においてミシマサイコ、オケラ、オウゴン、ハトムギ、ヤクモソウ、カンゾウなど多くの薬用植物の栽培を行っている。これらの多くの植物資源（創薬資源）をスクリーニング用試料として供した。また、各研究部において毎年行っている種子交換業務における植物調査でも近隣の野生植物を採取し今回のスクリーニング用試料とした。さらに筑波研究部においては生薬の市場流通品のコレクションを保有しているため、例えば同じ生薬名であっても産地や調製法や等級の異なる多くの生薬を保管しているため、これらについてもスクリーニング用試料として用いることが可能となる。また植物の特性としては、産地や採取時期により成分含量が異なるために、野生植物の採取の際には、採取場所（GPSを記録）、採種日の記録を行っている。さらに、例えば葉、樹皮、花など部位により成分が全く異なってくるために、極力さまざまな部位に分離することを行っている。

保存、あるいは採取した植物は各部位に分け、乾燥し、粉碎を行う。粉碎後はメタノールで熱時抽出を行う。メタノールは極性有機溶媒であるが、その抽出溶媒の性質として、低極性から高極性に至るまで広い極性成分の抽出を行うことが可能であるためである。メタノールで抽出後、濾過を行いそのろ液はエバポレーターにて濃縮乾固させ最終的な抽出エキスを作成する。作成したエキスには管理番号が付与され（MPSC 番号）、一定濃度になるようにDMSOに溶解される。その後滅菌フィルターを通し、底に二次元バーコードの付いた保存用チューブに

入れ-20℃の保管庫に保存される。必要に応じて保管庫から取り出され解凍されたのちにデキャップを行い96穴アッセイプレートに指定したマップに従って分注され、シーラーでシーリングされ、そのアッセイプレートも保管庫に保管されて要事に取り出される。上記の二次元チューブの保管庫取出しからの一連の作業は自動分注機により行われる。



植物エキスからスクリーニング前段階まで

また、代謝疾患関連タンパク P での細胞内 ATP 産生に影響を与える化合物の探索において、脳神経保護作用を有する創薬の評価法の開発を行っているが、ミトコンドリアのエネルギー代謝に影響を与える化合物として、今回データベース用モデル生薬のチョウトウコウに ATP 産生における Glutamate (神経興奮毒性) 耐性活性が見いだされた。そこで、チョウトウコウに含まれるこれらの活性を示す化合物を、モデル試料生薬の熱水抽出エキスを用いた多変量解析手法を用い推定し、最終的に化合物を単離し化学構造の解明を行った。

多変量解析は、チョウトウコウ熱水抽出エキスの LC/MS データ (ThermoFischer Scientific 社製 Orbitrap MS : イオン源 ESI) とそれらエキスの活性値データを変数とし SIMCA P+ ver. 12 (Umetrics 社製) を用いて多変量解析を行った。LC/MS データは SIEVE を用いてアライメントを行った。

分析条件

セミ分取 HPLC

Shimadzu 10AD vp システム

column: Waters Bridge Prep Phenyl 10x250mm

solvent: 0.1%TFA/H2O-30%AcCN gradient

分取 LC/MS

Waters 2545 送液ポンプに MS 検出器 SQD2 を連結

Column: Cosmosil C18 MS-11, 4.6x250mm

Solvent: 0.1%AcOH/H2O- 100% AcCN gradient

分析 LC/MS

ThermoFischer Scientific Orbitrap MS

イオン源: ESI (positive, negative)

Column: Phenomenex Kinetex 1.7u C18 100A (50x2.1mm)

ColumnTemp. 25.0 ° C

Solvent: 0.1%FA/H2O - 100%AcCN gradient

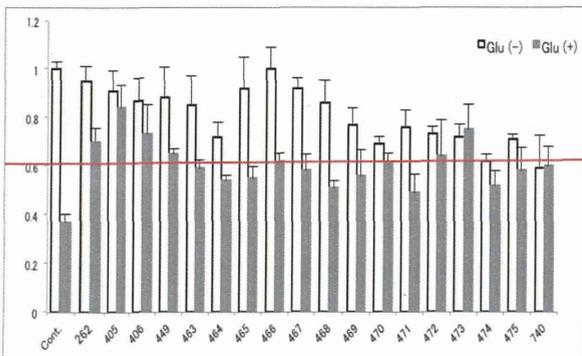
Flow rate: 0.2 ml/min

(倫理面への配慮)

該当せず

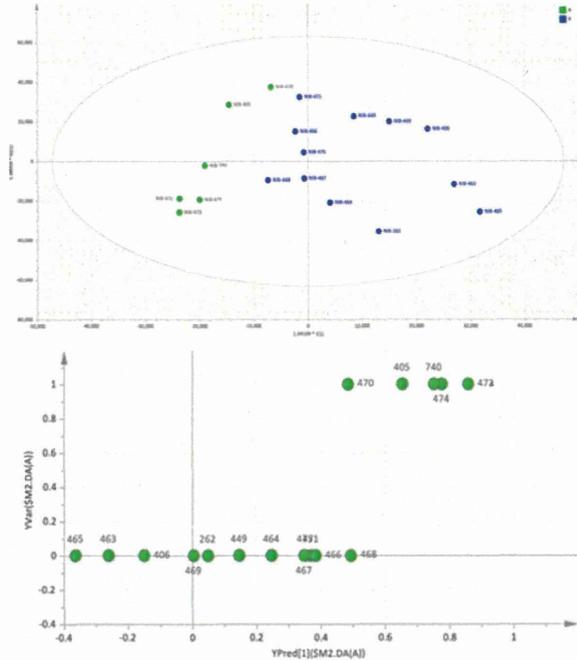
C. 研究結果

平成 26 年度は各研究部より送付された多くの野生植物を中心に抽出を行った。また北海道研究部内の樹木園、アイヌ園などの保存系統植物、種子島研究部より提供されたソロモン諸島産植物も抽出を積極的に行った。野生植物においては、本研究課題を意識し、特異的な骨格を有する二次代謝物を生合成するシダ植物を積極的に採取した。現在までのところ、5982 種類のエキス作成を終了し、分譲態勢の構築を行った。最終的に今年度は 4413 種類のエキスの 96 穴アッセイプレートへの分注を終了し、本研究課題での供出を行った。



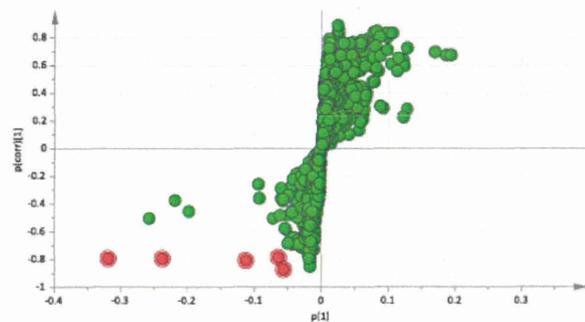
差が小さいグループと大きいグループをそれぞれ A、B とした判別分析 (白: 神経細胞毒性無し、灰色: 神経細胞毒性有り)

また生薬チョウトウコウの ATP 産生に影響を与える化合物の探索においては、Glutamate (神経興奮毒性) を入れた場合と入れていない場合で差が小さいグループと大きいグループをそれぞれ A、B とした判別分析 (OPLS-DA) を行った。

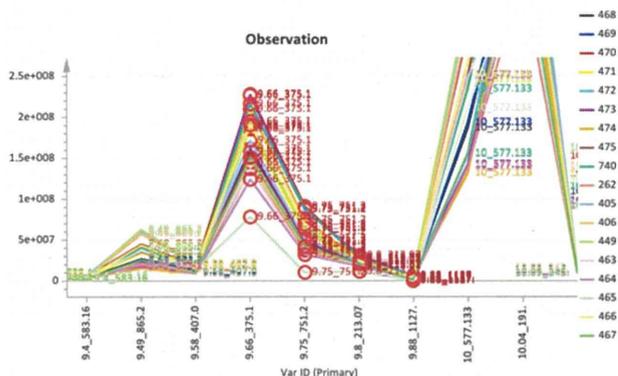


判別分析 OPLS-DA スコアプロット (negative

その場合のローディング S-plot において、マーカー化合物、すなわち A、B を判別していると考えられる部分の LC/MS における保持時間と m/z の組み合わせから 2 つの化合物が活性化合物と推定された。

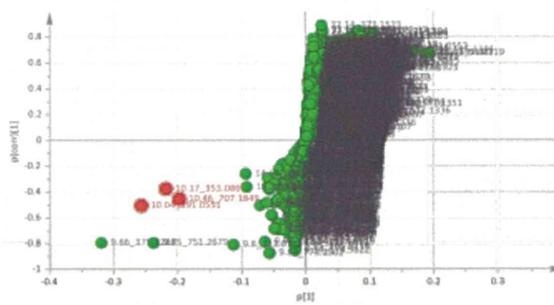


ローディング S-plot

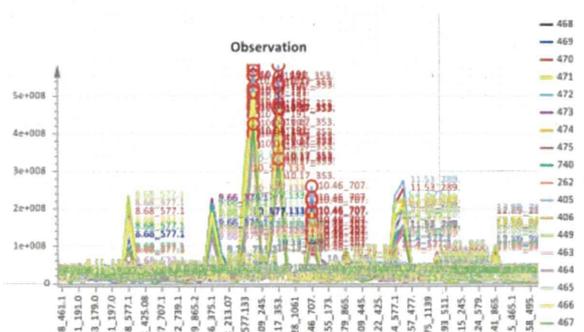


赤丸に該当する r. t. -m/z

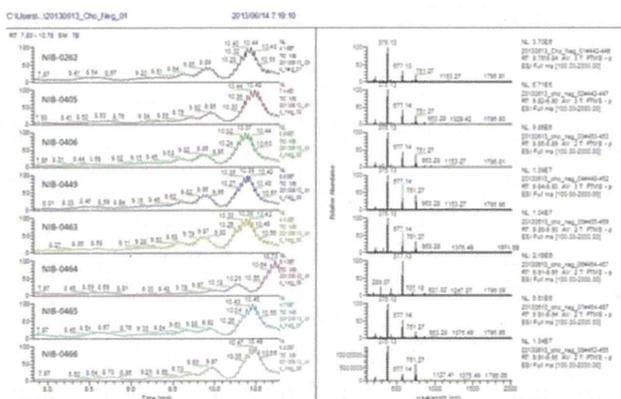
第1候補化合物としては保持時間 9.66 min 付近でありその精密質量分析結果から m/z 375.12924、分子式 C₁₆H₂₃O₁₀ (negative mode) と推定されたことから monotерpen の配糖体と推定された。第2候補化合物としては、保持時間 10 min における m/z 707, 353, 191 の化合物で、それらは同一化合物のフラグメントと推定された。そのフラグメントと MS/MS 解析の結果、第2候補化合物はクロロゲン酸と推定された。



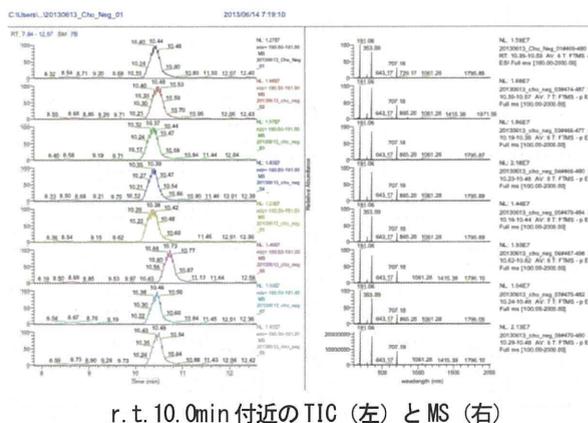
第2候補化合物の推定



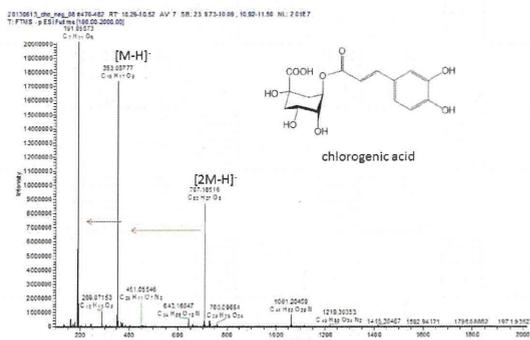
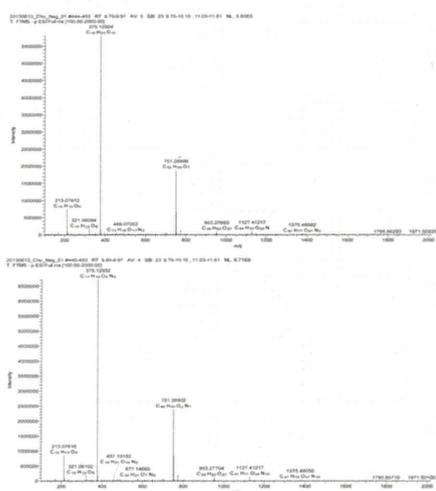
第2候補化合物の推定: r. t. 10.04_m/z191m,
r. t. 10.17_m/z353, r. t. 10.46_m/z707



第1候補化合物 r. t. 9.66min 付近の TIC (左) と相当する MS (右) (negative mode)



r. t. 10.0min 付近の TIC (左) と MS (右)



クロロゲン酸と推定 (m/z 353)

第1候補化合物については、チョウトウコウ熱水抽出エキスからの精製分離を行った。すなわち、チョウトウコウ (当所管理番号 NIB-0405) 熱水抽出エキス 0.5 g を水 100 ml に懸濁して

精密質量分析結果 (上: N 数を制限、下: N 数を max10 に設定) (negative mode)