

薬用植物成分評価のためのモデルマウスの 新たな活用

第6章 薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用

熊谷彩子*¹, 竹森 洋*²

1 はじめに

漢方の薬効は古くからの経験に基づくもので、ある意味、ヒトでの効果が担保されている。低分子創薬が盛んになり、その創薬標的が重要視されているが、未だ、第一世代の低分子新薬の主構造の7割が天然物に由来することも事実である。現在、新薬の開発にはモデル動物を活用した前臨床試験が不可欠であり、ヒトでの薬効評価まで進むには、副作用等の問題検討に膨大な時間と費用を要する。漢方薬やその構成生薬においては、安全性の経験則から適応症例の拡大（ドラッグリポジショニング）であれば、大幅な時間および費用の短縮が期待されるが、どのような症例に適応可能かは、臨床現場での注意深い経験に頼るしかない。

一方、生薬成分においては、通常の抽出法（煎じ等）で分離される成分以外は、薬効に関する経験の積み重ねが少なく、特殊な方法で調整される成分は、やはり新薬と同等の前臨床試験とその後の治験が要求される。本稿においては、著者らが注目している神経保護作用のための標的キナーゼや関連因子の変異マウスを活用した生薬成分の新規薬効開拓に役立つ評価系について紹介する。

2 認知症薬と神経保護作用研究の現状

高齢化社会が進むにつれ、認知症を患う人の数が増加している。厚生労働省の調べでは、65歳以上の高齢者のうち、認知症の患者は推計15%で、2013年時点で約462万人に上ることが報告されている。認知症は、記憶障害（失語・失行・実行機能障害等の中核症状）と記憶以外の認知症病態に伴う行動異常（徘徊・攻撃的行動・介護への抵抗など）及び心理的症状（幻覚・妄想・不安・興奮・睡眠障害・抑うつなど）のような周辺症状がある。特に周辺症状は患者の日常生活動作や生活の質の低下をもたらし、患者のみならず家族や介護者の負担も大きく社会的な問

* 1 Ayako Kumagai 独医薬基盤研究所 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 特任研究員

* 2 Hiroshi Takemori 独医薬基盤研究所 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

表1 現在、臨床で使用されている認知症薬

一般名	製品名(会社名)	作用機序	効能・効果
ドネペジル	アリセプト(エーザイ)	AChE 阻害	軽度及び中等度のアルツハイマー型認知症における認知症症状の進行抑制
ガラントミン	レミニール(武田薬品/ヤンセンファーマ)	AChE 阻害	軽度及び中等度のアルツハイマー型認知症における認知症症状の進行抑制
リバスチグミン	イクセロン(ノバルティスファーマ)	AChE/BuChE 阻害	軽度及び中等度のアルツハイマー型認知症における認知症症状の進行抑制
メマンチン	メマリー(第一三共)	NMDA 受容体阻害	中等度及び重度のアルツハイマー型認知症における認知症症状の進行抑制

出典：文献17)

題となっている。認知症はアルツハイマー型認知症、脳血管性認知症、レビー小体型認知症とその他の認知症に分類される。認知機能は、海馬のアセチルコリン(ACh)の機能が重要で、認知症患者ではこの機能が低下していることからドネペジルやガラントミンなどのアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤が使用されている(表1)。またメマンチンは記憶や学習に深く関わっているNMDA(*N*-methyl-*D*-aspartate)受容体の非競合的アンタゴニストであり、アルツハイマー型認知症の治療に用いられている。NMDA受容体は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体サブタイプの一つで、グルタミン酸を受け取ると、細胞内にCa²⁺を取り入れて記憶や学習に必要な生化学的反応を起こす。細胞内の過剰なCa²⁺流入は神経細胞毒性を示す。メマンチンは過剰なCa²⁺流入を抑えることで神経細胞死を抑制している。しかし、これらの薬剤は認知症の本態を治療する薬剤ではなく対処療法として症状を緩和する薬剤として臨床で使用されている。認知症の病態解明が進められているが根本的な原因は十分に解明されておらず、また薬剤のスクリーニングに有用な評価系が確立されていないことから治療薬の開発が進んでいない。

3 神経保護シグナルに関与する新たな因子

著者らは、これまでに2種類の神経保護・障害シグナルに異常を有するモデルマウスを作成した。一方は、タンパク質リソ酸化酵素(塩誘導性キナーゼ2 [SIK2])の遺伝子欠損マウスで、もう一方は、遺伝性の歩行失調を示す小脳変性モデルマウス(Grid2)である。

SIKは血中のミネラル調節を行うステロイドホルモン(アルドステロン)の合成調節に関わる候補因子として、高塩食を投与したラットの副腎から単離されたタンパク質リソ酸化酵素である。SIKは血圧調節以外にもグルココルチド合成、インスリン分泌や糖新生、筋肉修復、熱産生、脂肪合成に関与することが明らかとなっている^{1~6)}。また、SIKは細胞内のAMP濃度に応じて糖、脂質代謝を制御し飢餓シグナルとして働くAMPKファミリーに属する(図1)。

さらに線虫では、Kin-29(SIKの相同遺伝子)の破壊によって、寿命が2倍に延びることが報告されている。SIKは1~3の3つのアイソフォームが存在し、これらはcAMPシグナルで調

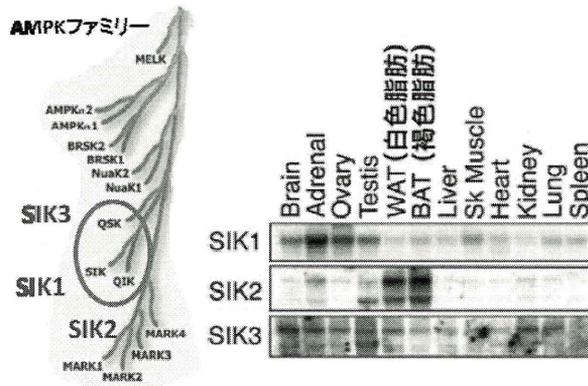


図1 SIK の分類 (左) とマウスにおける mRNA の発現分泌 (右)

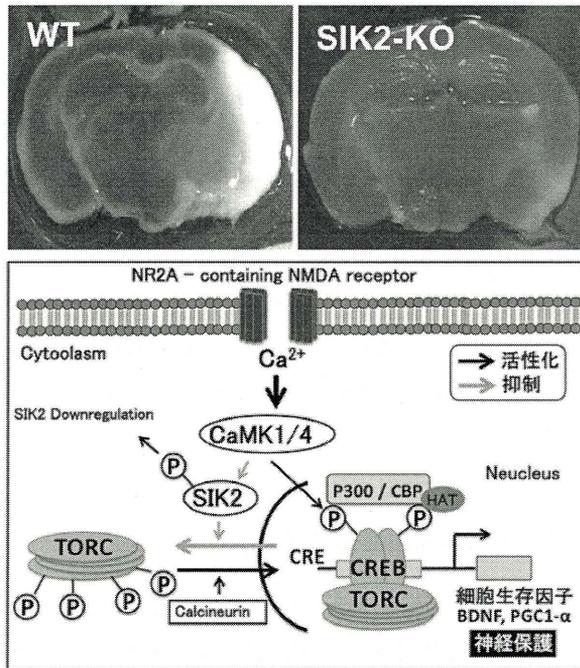


図2 SIK2-KO マウスは脳梗塞耐性(左)と SIK2 神経細胞保護機構(右) 白くなっているところは細胞が死滅している。

節されている転写因子 CREB (cAMP response element binding protein) と MEF2 (Myocyte enhancer factor-2) を制御することで、様々な生体調節を行っている。このうち SIK2 は、脂肪細胞で高発現していることから SIK2 の遺伝子欠損マウス (SIK2-KO) を作成し肥満や糖尿病との関連性について検討した。しかし、SIK2-KO は WT マウスと比べて体重や血糖値に大きな差はなかった。一方、ショウジョウバエの SIK2 をノックダウンすると、活性酸素に対するス

トレス耐性を示すことが報告されている⁷⁾。

そこで SIK2-KO マウスを用いて脳梗塞・再還流試験を実施したところ、SIK2-KO マウスは脳梗塞後の神経細胞死が起こらなかった(図2)。脳梗塞・再還流時の神経障害は過剰なグルタミン酸神経刺激に由来するもので、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が原因である。 Ca^{2+} シグナルの下流因子の1つとして、CREBが存在し、細胞の生存に重要な役割を担っている。例えば、神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor: BDNF)や抗酸化ストレス作用を発揮する転写共役因子(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha: PGC1- α)の発現を亢進することによる神経保護作用が挙げられる。

SIK2はCREBの共役因子CRTC1をリン酸化依存的に不活性化する作用があり、結果、CREBを介した神経保護作用を負に制御する⁸⁾。一方、 Ca^{2+} に依存したCREBの活性化シグナル因子はCaMK1/4であり、Calcineurinの活性化を介してCRTC1を脱リン酸化し活性化させる。その際、CaMK1/4はSIK2を失活させ、CRTC1/CREB複合体を効率良く活性化させていた。元々、SIK2が存在しないSIK2-KOマウスでは、CaMK1/4による神経保護作用が発揮され易いため、脳梗塞・再還流耐性を示したものと結論付けた。

4 SIK2 阻害剤の簡便な *in vivo* 評価系

一方、他の表現型解析の結果、SIK2は皮膚のメラニン産生細胞(メラノサイト)で発現しており、その発現は紫外線(UV)ストレスで低下し、SIK2タンパクの減少がUV防御に作用す

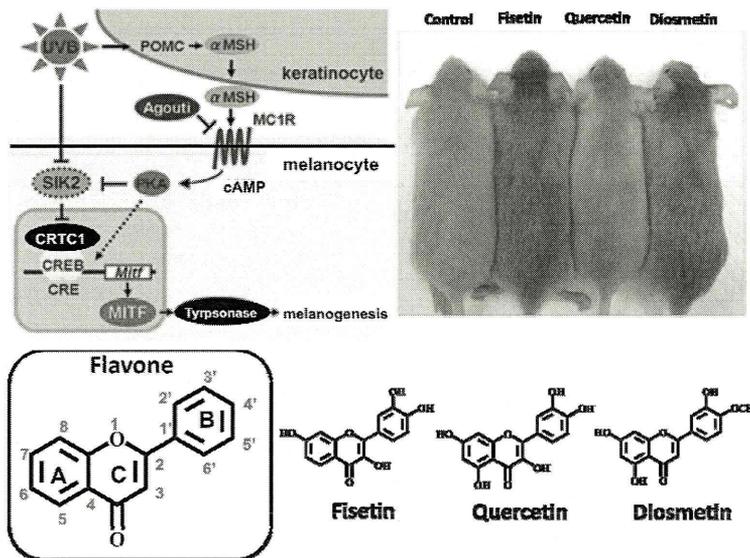


図3 SIK2によるメラニン産生制御機構(左上)。フラボノイドを摂取させたマウス(右上)。フラボノイド類の構造(下)

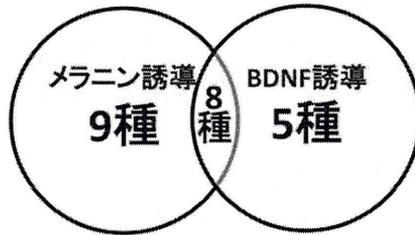


図4 メラニン合成誘導とBDNF誘導の相関図
影響が観察されたエキスの約半数がメラニンとBDNFの双方を誘導した。

表2 認知症に対する漢方薬の効果

アルツハイマー型認知症		
漢方名	構成生薬	薬効
抑肝散	釣藤鈎, 柴胡, 蒼朮, 茯苓, 当帰, 川芎, 甘草	認知症の周辺症状(不眠, 抑うつ, 妄想, 徘徊, 異常行動など)を改善
抑肝散加陳皮半夏	柴胡, 釣藤鈎, 蒼朮, 茯苓, 当帰, 川芎, 陳皮, 半夏, 甘草	認知症の周辺症状(不眠, 抑うつ, 妄想, 徘徊, 異常行動など)を改善
釣藤散	釣藤鈎, 石膏, 陳皮, 麦門冬, 半夏, 茯苓, 人參, 菊花, 防風, 甘草, 生姜	短期記憶, 徘徊多動, 睡眠障害, 幻覚等を改善
当帰芍薬散	当帰, 川芎, 芍薬, 蒼朮, 沢瀉, 茯苓	長期記憶を改善
人參養栄湯	人參, 黄耆, 当帰, 地黄, 白朮, 茯苓, 芍薬, 桂皮, 陳皮, 遠志, 五味子, 甘草	精神不安, 睡眠障害を改善
八味地黄丸	地黄, 山茱萸, 山薬, 茯苓, 沢瀉, 牡丹皮, 桂皮, 附子	認知機能, 日常生活動作を改善
加味温胆湯	半夏, 陳皮, 生姜, 竹茹, 枳実, 遠志, 酸棗仁, 茯苓, 人參, 甘草, 大棗, 地黄, 玄参	睡眠障害, 動悸などを改善
加味帰脾湯	人參, 蒼朮, 茯苓, 甘草, 生姜, 大棗, 酸棗仁, 竜眼, 遠志, 当帰, 黄耆, 木香, 柴胡, 梔子	精神不安, 睡眠障害を改善
脳血管性認知症		
漢方名	構成生薬	薬効
釣藤散	釣藤鈎, 石膏, 陳皮, 麦門冬, 半夏, 茯苓, 人參, 菊花, 防風, 甘草, 生姜	自発性, 睡眠障害, 幻覚, 妄想, 衣類の着脱などを改善。脳虚血病態で障害される中枢コリン神経系機能を賦活
黄連解毒湯	黄連, 黄芩, 黄柏, 山梔子	ストレスによる血圧上昇, 興奮性, 易怒性等を改善

出典：文献18)

る色素であるメラニン産生の直接的な引き金になることが判明した⁹⁾。さらに、SIK2がマウスの毛根におけるメラノサイトのメラニン量を制御し、毛色を決定していることも明らかとなった(図3)。

これら表現型をまとめると、SIK2阻害作用を示す化合物は、神経保護作用とメラニン誘導(毛色を濃くする)作用を示すことを示唆する。まずは、*in vitro* キナーゼ試験で、SIK2阻害剤

をスクリーニングし、複数のフラボノイドを候補として得た。構造活性相関検討から、フラボノイドの4'-位にメトキシ基を有する化合物が培養細胞内で SIK2 を阻害することが判明した¹⁰⁾。また、Fisetin が最も有用であることが示唆されたが、Fisetin そのものは4'-位にメトキシ基を持っておらず、培養細胞における SIK2 シグナルへの影響は観察されなかった。

次に、複数のフラボノイドを、遺伝的に毛色が薄い A^y マウスに SIK2 遺伝子がヘテロ欠損状態にしたマウス (SIK2 阻害剤高感受性) に経口投与し、毛色の変化を観察した結果、4'-位にメトキシ基を有する Diosmetin が毛色を濃くした。また、Quercetin は、4'-位にメトキシ基を持っていないため効果が無いと判定した。一方、Fisetin は4'-位にメトキシ基を持っていないにも関わらず毛色を濃くした。Fisetin の矛盾を検討する目的で Fisetin を摂取したマウスの糞を回収し解析した結果、1ヶ所メトキシ化された Fisetin が検出された。そこで、4'-位にメトキシ基を有する Fisetin を合成したところ、強力な SIK2 阻害活性が観察された。実は、Fisetin 摂取はマウスの記憶亢進作用があることが報告されており¹¹⁾、ヒト記憶改善においても有望な候補であると期待される。

これらの背景の下、生薬エキスの評価をメラニン合成誘導と SIK2 シグナル下流で神経保護作用を発揮する BDNF 誘導における相関を検討した (図4)。

この様に、メラニン合成誘導活性と BDNF 誘導活性は密接に関係することから、神経保護 (認知症) に有用な化合物の初期スクリーニングには有用な評価系であると考えられる。Fisetin 同様にマウス (*in vivo*) で毛色を濃くするエキスも存在した。特筆すべき点は、今回の候補エキスは表2に挙げられる生薬とは全く一致しない点であり、これら別角度の評価系は、新たな神経保護作用機序を発揮する成分を同定できると期待される。

5 神経変性疾患モデルマウスの活用

小脳変性疾患の原因因子の1つである Grid2 (カルシウムチャネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$) はその名前と異なり、グルタミン酸やその他の誘導体をリガンドとはしない。最近、Grid2 のリガンドとして、タンパク性の Cerebellin1 が同定され^{12,13)}、異性化 Ser (D-Ser) もリガンドとして機能することが報告された¹⁴⁾。これらのリガンドは、小脳の運動記憶構築に重要である

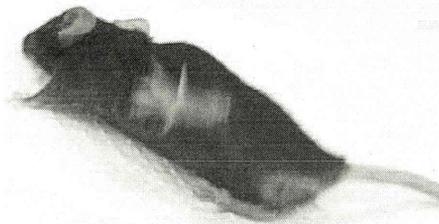


図5 後肢麻痺のため歩けない Grid2 欠損マウス

表3 Grid2 欠損マウスに対する漢方薬または生薬の反応

漢方薬または生薬名	反応
抑肝散	変化無し (挙動不審)
芍薬甘草湯	改善 (少し歩く)
葛根湯	改善 (少し歩く。足を大きく回す)
釣藤鈎	改善 (少し歩く)
阿仙薬	改善
苦参	悪化

ことが示されている。

Grid2 欠損マウスの特徴は、後肢麻痺と転倒であるが、著者らは、偶然、Grid2 の新たな欠損を有する自然発生の神経変性疾患マウス系統の樹立に成功した (図5)。この系統の責任遺伝子が Grid2 と判明する以前に、変異マウスが麻酔薬への感受性が高まっていることが示唆されたため、関連するグルタミン酸もしくは GABA 受容体に対する薬理剤を投与したところ、認知症周辺病態薬メマンチンの麻酔効果に対して高感受性を示すことが判明した。

一方で、Grid2 の恒常的活性化マウスの小脳細胞は死滅しており、これは、Grid2 を介した、過剰な Ca^{2+}/Na^{+} の流入が原因とされている¹⁵⁾。運動記憶に関しては議論が残るものの、Grid2 を阻害することも神経保護もしくは、認知症周辺病態改善には役立つ可能性を示唆するものである。

Grid2 欠損マウスに漢方薬や生薬粉末を経口摂取させたところ、一部の漢方薬及び生薬に対して反応を示した (表3)。Grid2 欠損マウスは NMDA 受容体を阻害する化合物を瞬時に評価できる有用なモデルマウスであるといえる。また、マウスは苦い食べ物も嫌がることなく摂取することから、漢方薬やその構成生薬の新たな有効成分の発見に適していると考えられる。

苦参は、副作用としてめまいを起こすことが知られており、NMDA 受容体を阻害すると考えられる。抑肝散は、Grid2 欠損マウスの後肢麻痺に影響を与えないが、首振り動作が増した。この影響は WT マウスでは観察されないため、やはり NMDA 受容体の修飾作用が予想され、既に報告されている抑肝散の NMDA 受容体阻害作用¹⁶⁾と一致する結果であると予想している。しかし、その構成生薬である釣藤鈎は、後肢麻痺の改善が観察されたが、首振り動作は観察されない。

6 まとめ

最近の創薬標的を中心とした低分子化合物の評価は、有用化合物の選択には強い力を発揮する。一方で、*in vivo* での効果が弱いなど、化合物の最適化には必ずしも万能とはいえない。創薬標的に関与する高感度表現型を駆使することで、利用するモデル動物の数を減らしても有用低分子候補を含む *in vivo* 評価系が構築できれば、創薬初期での化合物の最適化に繋がると期待で

きる。幸い、マウスは苦い食餌でも摂取するため、漢方薬をはじめとする薬用植物を試験するには有用である。今後は、複数の遺伝子異常を組み合わせることで、創薬標的に関与するシグナル伝達をいかに *in vivo* で高感度化するかが課題であるとともに、病態可視化モデルマウスとの組み合わせで、効果判定を数値化することも必要である。

謝辞

SIK2 マウスは(株)プロテインエクスプレス社からの導入である。Grid2 マウスの樹立は、医薬基盤研究所・小浦美奈子先生、松田潤一郎先生に御協力頂いた。生薬エキスは医薬基盤研究所・瀧野裕之先生、杉村康司先生、川原信夫先生から御提供頂いた。本研究の一部は、日本学術振興会の基盤研究、厚生労働省委託研究費認知症研究開発事業によるものである。

文 献

- 1) Z. Wang *et al.*, *FEBS Lett.*, **453**, 135 (1999)
- 2) N. Horike *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 18440 (2003)
- 3) R. Screatton *et al.*, *Cell*, **119**, 61 (2004)
- 4) R. Berdeaux *et al.*, *Nat. Med.*, **13**, 597 (2007)
- 5) M. Skostrom *et al.*, *PNAS*, **104**, 16922 (2007)
- 6) M. Muraoka *et al.*, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E1430 (2009)
- 7) B. Wang *et al.*, *Cell Metab.*, **7**, 434 (2008)
- 8) T. Sasaki *et al.*, *Neuron*, **69**, 106 (2011)
- 9) N. Horike *et al.*, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **23**, 809 (2010)
- 10) A. Kumagai *et al.*, *PLoS One*, **6**, e26148 (2011)
- 11) P. Maher *et al.*, *PNAS*, **103**, 16568 (2006)
- 12) K. Matsuda *et al.*, *Science*, **328**, 363 (2010)
- 13) K. Matsuda *et al.*, *Cerebellum*, **11**, 78 (2012)
- 14) W. Kakegawa *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **14**, 603 (2011)
- 15) R. Laloned *et al.*, *Brain Res.*, **1140**, 51 (2007)
- 16) Z. Kawakami *et al.*, *Cell Mol. Neurobiol.*, **31**, 1203 (2011)
- 17) 中村祐, 精神経誌, **114** (3), (2012)
- 18) www.sawarabi.or.jp/common/file/about/ayumi/1985.pdf

