

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08264

研究課題名(和文)漢方薬によるレット症候群(CDKL5欠失症)治療薬の創製

研究課題名(英文)Creation of therapeutic agent for Rett syndrome (CDKL5 deficiency disorder) using Kampo medicine

研究代表者

稲津 哲也 (Inazu, Tetsuya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：00242587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抑肝散とその一味抜きの成分計7種類のエキスを作製し、神経分化を起こすP19細胞にそれらを暴露し、分化誘導の効果を検証した。抑肝散とその成分で神経分化を誘導させることができた。特に成分ではカンゾウのグリチルリチンにて、GSK3bのシグナルを介して神経分化誘導作用が増強した。さらにin vivoにて抑肝散の効果を検証した。Cdk15 KOマウスにこの生薬を3ヶ月間投与し、体重増加、明暗箱試験で明箱での移動距離の増加、恐怖条件付け試験でフリージングの増加等の結果が得られ、Cdk15 KOマウスの情動と記憶機能に対する抑肝散の修飾効果を示唆された。抑肝散はこの疾患の治療薬候補となる可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レット症候群は、精神発達遅滞、てんかん等が有する稀少疾患でかつ現在に至るまで根本的な治療法が見出されていない難病である。本疾患(特にCDKL5欠失症)に対して、治療法やその候補薬を見出すことは社会的に意義深い。本研究で、日本古来の生薬である抑肝散が、細胞レベルで神経分化機能を促進し、また個体レベルでも情動と記憶機能に対する抑肝散の修飾効果を見出した。すなわち抑肝散は、CDKL5欠失症の症状改善のための治療薬の一つになりうる可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Yokukansan (YKS) is a Japanese traditional medicine called “Kampo medicine”. YKS consists of seven kinds of crude drugs: Atractylodes Lancea Rhizome, Poria Sclerotium, Cnidium Rhizome, Uncaria Hook, Japanese Angelica Root, Bupleurum Root and Glycyrrhiza. We were able to mix, extract, and dry a total of 7 types of extracts in YKS. We found that the extracts without Bupleurum Root and Glycyrrhiza reduced the efficiency of neuronal differentiation to about half. Finally, it was found that the neuronal differentiation-inducing action of YKS is at least partially mediated by glycyrrhizin and GSK3b signaling pathway. Furthermore, we evaluated the effects of chronic treatment of YKS on Cdk15 knockout (KO) mice. YKS administration for 3 months showed increased body weight, increased exploration in the brightly lit box in the light/dark transition test, and increased freezing in the fear conditioning test, suggesting modifying effects of YKS to the emotion and memory of Cdk15 KO mice.

研究分野：分子遺伝学、分子細胞生物学

キーワード：CDKL5 抑肝散 一味抜き成分 神経分化誘導作用 Cdk15ノックアウトマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

レット症候群（特に CDKL5 欠失症）は、X 染色体異常による稀少疾患ということもあり、本疾患に対しての有効な治療薬の開発は遅れている。例えば難治性のがんには、有効な抗がん薬の開発が待たれていたが困難であったし、その他の症状軽減や根治療法のために遺伝子治療・ゲノム編集等の開発が期待されてもいた。ただその進展ははかばかしいものはなかった。そこで、日本において古来から使用されて安全性も高い生薬（抑肝散）が、cdk15 欠損神経細胞への効果を検討した例はなく、また Cdk15 ノックアウトマウスへの症状緩和を及ぼすかどうかの検討もされたことがない。そのため抑肝散が細胞・固体レベルで症状緩和に有効か、そうであればどの成分が有効であるかを検討する計画であった。そして将来において治療薬の候補の一つとなりうるかを見出すことも目的とした。

2. 研究の目的

(1) 抑肝散が、レット症候群（特に CDKL5 欠失症）に対しての治療薬となりうるか、もしなりうるならばどの含有成分が重要かという基礎的なことを検討する。抑肝散は 7 種類の生薬を含有し、多数の有効成分を含有する。そのため、抑肝散に含まれる化合物の中には神経分化に対し促進作用とまた逆に抑制効果を持つ化合物も含まれると考えられる。抑肝散の成分の中から、神経分化を促進する効果を持つ化合物を単離し、レット症候群（特に CDKL5 欠失症に対して）治療薬候補分子の同定を試みることを目的とした。

(2) この中から神経分化を促進する効果を持つ化合物を単離し、実際に細胞レベルや動物個体に対するレット症候群治療薬候補足りうるかを調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生薬の調整：

抑肝散は 7 種類の生薬を含有し、多数の有効成分を含有する。抑肝散に含まれるセンキュウ、チョウトウコウ、ソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコおよびカンゾウより、生薬の一味抜き（7 つの中から 1 つの生薬を抜くこと）のエキス計 7 種類をそれぞれ混合、抽出、乾燥の成分を作成し、生薬一味抜き 7 種類とした。

(2) 神経細胞に対する「抑肝散あるいはその成分」の効果検証：

胎児性がん細胞の P19 細胞を、ビタミン A 存在下で神経細胞に分化誘導して神経細胞として用いた。抑肝散あるいはその成分の効果を、神経細胞マーカーの検出（NeuN 等）を元に、判定した。またそれらの効果がある際には、作用機構解明のために、細胞内のどの分子（GSK3 β , ERK, mTOR 等）を介して作用したかを検討した。

(3) 胎児性がん細胞の P19 細胞（核型 XY）を利用して、cdk15 ノックアウト細胞作製を試みた。cdk15 遺伝子は、X 染色体上にあるために、ゲノム編集にてこの P19 細胞において cdk15 を簡便に欠損（ノックアウト）させた。

(4) 抑肝散の *in vivo* での効果を判定するために、Cdk15 KO マウスに対して治療効果を行動解析の面から検討した。Cdk15 KO マウスは、共同研究者の田中博士らが作製したマウス（末尾引用文献）を使用した。

4. 研究成果

(1) 抑肝散に含まれるセンキュウ、チョウトウコウ、ソウジュツ、ブクリョウ、トウキ、サイコおよびカンゾウより、生薬の一味抜きのエキス計7種類をそれぞれ混合、抽出、乾燥の成分を作製することができた。

(2) 生薬の一味抜きのエキスの内、カンゾウ抜きとサイコ抜きの成分にて、神経分化(NeuNのマーカー発現にて判定)の効率を半分程度に減弱させる効果を見出した。すなわち、カンゾウとサイコの中に神経分化誘導作用成分が含まれている可能性があることが判明した。さらにカンゾウの成分である(純化された)グリチルリチン使用にて、神経分化誘導作用が増強した。ただサイコサポニンの成分(a, b1, b2等)に焦点を当てて効果を検証したが、影響は見られなかった。結果として、抑肝散の神経分化誘導作用は、少なくとも一部はグリチルリチンを介して作用していることが判明した。

(3) 神経分化誘導作用のメカニズムとして、細胞内シグナル伝達経路(GSK3b, ERK, mTOR等)を中心とした作用機構を解析した。ERK, mTOR等にはほとんど影響せず、GSK3bのシグナル分子を介していることを見出した、さらに詳細な作用機構(特にシグナル伝達の面から)を明らかにする必要がある。

(4) マウスへの抑肝散服薬法の検討

成体マウスに抑肝散を1.0/kg/日~3.0/kg/日量、1日1回、1週間、経口ゾンデを用いて投与し、最終投与の1時間後に血中の抑肝散濃度をHPLC法にて測定した。その結果、投与量依存的に血中濃度が上昇することを確認した。

(5) KOマウスへの抑肝散投与による行動解析の検討

マウスを、①野生型マウス + 溶媒コントロール(CV群)、②Cdk15 KOマウス + 溶媒コントロール(MV群)、③Cdk15 KOマウス + 抑肝散1.0g/kg/日(ML群)、④Cdk15 KOマウス + 抑肝散3.0g/kg/日(MH群)の4群に分け、4週齢から3ヶ月間抑肝散を投与した。その後、一般健康診断・神経学的検査(体重、体温、反射、グリップ試験、ワイヤーハング試験)、明暗箱試験、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路試験、社会的相互作用(新規環境)、ポーソルト強制水泳試験、T字迷路試験、バーンズ迷路試験、パターン分離試験、恐怖条件付け試験を行った。その結果、抑肝散を3.0g/kg/日投与したKOマウス(MH群)は、MV群と比べて有意に体重が増加した。抑肝散を1.0g/kg/日投与したKOマウス(ML群)は、明暗箱試験において明箱での移動距離の有意な増加と、統計的に有意ではないものの明箱での滞在時間の増加が観察された。恐怖条件付け試験において、MH群は、対照KO(MV群)と比較して、フリージング時間が有意に増加した。

引用文献: Okuda K, Kobayashi S, Fukaya M, Watanabe A, Murakami T, Hagiwara M, Sato T, Ueno H, Ogonuki N, Komano-Inoue S, Manabe H, Yamaguchi M, Ogura A, Asahara H, Sakagami H, Mizuguchi M, Manabe T, Tanaka T. CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility

Neurobiol Dis. 2017, 106:158-170

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Atsushi Morii, Tetsuya Inazu	4. 巻 629
2. 論文標題 HDAC8 is implicated in embryoid body formation via canonical Hedgehog signaling and regulates neuronal differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 78 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuri Yoshimura, Atsushi Morii, Yuuki Fujino, Marina Nagase, Arisa Kitano, Shiho Ueno, Kyoka Takeuchi, Riko Yamashita, Tetsuya Inazu	4. 巻 23(20)
2. 論文標題 Comprehensive in silico functional prediction analysis of CDKL5 by single amino acid substitution in the catalytic domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232012281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tetsuya Kawahara, Gen Suzuki, Shoichi Mizuno, Tetsuya Inazu, Fumiyoshi Kasagi, Chie Kawahara, Yosuke Okada, Yoshiya Tanaka	4. 巻 377
2. 論文標題 Effect of active vitamin D treatment on development of type 2 diabetes: DPVD randomised controlled trial in Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ	6. 最初と最後の頁 e066222 ~ e066222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmj-2021-066222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasui Gen, Katayama Syouichi, Kubota Yukihiko, Takatsuka Hisashi, Ito Masahiro, Inazu Tetsuya	4. 巻 568
2. 論文標題 Zinc finger protein 483 (ZNF483) regulates neuronal differentiation and methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) intracellular localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Atsushi Morii, Syouichi Katayama, Tetsuya Inazu	4. 巻 43/ 7
2. 論文標題 Establishment of a simple method for inducing neuronal differentiation of P19 EC cells without embryoid body formation and analysis of the role of histone deacetylase 8 activity in this differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1096-1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00091.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Syouichi Katayama, Noriyuki Sueyoshi, Tetsuya Inazu, Isamu Kameshita	4. 巻 volume 2020
2. 論文標題 Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5): Possible cellular signaling targets and involvement in CDKL5 deficiency disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neural Plasticity	6. 最初と最後の頁 6970190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/6970190.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Makoto, Katayama Syouichi, Ikeya Yukinobu, Inazu Tetsuya	4. 巻 5
2. 論文標題 Yokukansan, a Kampo medicine, enhances the level of neuronal lineage markers in differentiated P19 embryonic carcinoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e02662 ~ e02662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2019.e02662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fahmi Muhamad, Yasui Gen, Seki Kaito, Katayama Syouichi, Kaneko-Kawano Takako, Inazu Tetsuya, Kubota Yukihiko, Ito Masahiro	4. 巻 20
2. 論文標題 In Silico Study of Rett Syndrome Treatment-Related Genes, MECP2, CDKL5, and FOXP1, by Evolutionary Classification and Disordered Region Assessment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5593 ~ 5593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 森井 篤、稲津哲也
2. 発表標題 P19細胞における神経分化過程でのhistone deacetylase 8の機能解析
3. 学会等名 日本薬学143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉村 優里、森井 篤、藤野 優希、武内 杏夏、北野 有砂、山下 莉子、上野 支帆、稲津 哲也
2. 発表標題 レット症候群原因遺伝子 CDKL5 の触媒部位内1アミノ酸置換による網羅的 in silico 機能予測解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 優里、森井 篤、藤野 優希、武内 杏夏、北野 有砂、山下 莉子、上野 支帆、稲津 哲也
2. 発表標題 レット症候群原因遺伝子 CDKL5 の触媒部位内1アミノ酸置換による網羅的 in silico 機能予測解析
3. 学会等名 国際稀少疾患シンポジウム 2022 at Ritsumeikan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武内 杏夏、鎌田雅之、稲津 哲也
2. 発表標題 CDKL5 ノックインマウスの行動解析
3. 学会等名 国際稀少疾患シンポジウム 2022 at Ritsumeikan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 優里、藤野 優希、森井 篤、武内 杏夏、北野 有砂、山下 莉子、上野 支帆、Muhamad Fahmi、伊藤 將弘、稲津 哲也
2. 発表標題 レット症候群原因遺伝子CDKL5の触媒部位内1アミノ酸置換による網羅的in silico機能予測解析と臨床報告例との相関
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会(名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuya Inazu, Makoto Fukui, Sakino Iwata, Yukinobu Ikeya, Syouichi Katayama
2. 発表標題 Yokukansan, a Japanese traditional medicine, enhances the level of neuronal lineage markers in differentiated wild and cdk15 knockout P19 embryonic carcinoma cells
3. 学会等名 CDKL5 Forum 2020(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井秀介、森井篤、片山将一、稲津哲也
2. 発表標題 Phf8ノックアウトP19胚性腫瘍細胞株を用いたPHF8の機能解析
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森井篤、片山将一、稲津哲也
2. 発表標題 HDAC8の欠損は神経分化不全を導く
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田彩生乃、片山将一、池谷幸信、稲津哲也
2. 発表標題 P19EC細胞における「一味抜き抑肝散」の神経分化への効果検討
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高原 亜邪、片山将一、河野貴子、稲津哲也、菊地武司
2. 発表標題 ドッキングシュミレーションによるCyclin-dependent kinase-like 5の基質タンパク質同定
3. 学会等名 第58回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土井秀介、森井篤、片山将一、稲津哲也
2. 発表標題 Phf8ノックアウトP19胚性腫瘍細胞株の樹立とその解析
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会 2020/12/3
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Syouichi Katayama, Tetsuya Inazu
2. 発表標題 A novel CDKL5 mutation in an atypical Rett syndrome patient and development a convenient method for detecting CDKL5 activity
3. 学会等名 CDKL5 Workshop in Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Syouichi Katayama, Makoto Fukui, Sayaka Suzuki , Yukinobu Ikeya , Tetsuya Inazu
2. 発表標題 Yokukansan, a Kampo medicine, enhances the level of neuronal lineage markers in differentiated P19 embryonic carcinoma cells
3. 学会等名 CDKL5 Workshop in Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Morii, Mako Saito, Syouichi Katayama, Tetsuya Inazu
2. 発表標題 Expression analysis of Rett syndrome-related genetic factors, e.g. CDKL5, in HDAC8 knockout P19 cells
3. 学会等名 CDKL5 Workshop in Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森井篤、片山将一、斎藤磨子、土井秀介、稲津哲也
2. 発表標題 Hdac8 KO P19細胞におけるRett症候群関連因子の発現変動とその解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南光貴裕、坂口逸紀、土井秀介、森井篤、片山将一、稲津哲也
2. 発表標題 PDGFとCDKL5はNeuro2a細胞の神経突起伸長を制御する
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森井篤、片山将一、稲津哲也
2. 発表標題 P19細胞における神経分化過程でのHDAC8の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 輝幸 (Tanaka Teruyuki) (10246647)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	片山 将一 (Katayama Syouichi) (60779049)	立命館大学・薬学部・助教 (34315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------