

機関番号：33101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790478

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症の治療を目的とした漢方方剤および生薬の検索とその作用機序の解析

研究課題名（英文） Searching for therapeutical agents of ALS from Natural resources.

研究代表者

関谷 倫子（MICHIKO SEKIYA）

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40367412

研究成果の概要（和文）：漢方方剤である温脾湯の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する効果を検討した。温脾湯には生体の酸化ストレス状態を改善し、病気の進行を抑制する効果が示されているが、ALSモデルマウスを用いた実験でも、温脾湯は酸化ストレスを緩和しALSの発症、運動機能の低下を遅延させるという結果が得られた。またこの効果は、温脾湯がグリア細胞の活性化を抑制したことに起因すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of a Chinese prescription, Wen-Pi-Tang, on the ALS model mouse SOD1^{G93A}. Although the oral administration of Wen-Pi-Tang extract to SOD1^{G93A} mice had no significant effect on body weight loss and survival time, Wen-Pi-Tang delayed disease onset. The administration of Wen-Pi-Tang was thought to delay disease onset by inhibiting glial cell activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学，筋萎縮性側索硬化症，漢方方剤，温脾湯，生薬

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンの変性・脱落によって四肢の麻痺、呼吸筋の麻痺が起こり、死に至る神経変性疾患である。有病率は10万人に2～7人で、未だにその発症原因・発症メカニズムははっきりしておらず、有効な治療法も確立されていない難病である。ALSの多くは、家族歴をもたない孤発性であり、その内的・外的要因が研究されているが未だに原因は不明である。一方の家族性ALSは、ある程度その原因遺伝

子が解明されつつあるものの、それによる発症メカニズムに関してはやはり不明である。これまでに、ALSの特徴である運動ニューロンの変性・脱落が起こる原因として右の項目のような因子が報告されている。しかしながら、いずれの要因もALS発症の決定的な唯一の原因にはなり得ないことから、これら多数の要因が複雑に絡みあい疾病の発症と進行に関与していると考えられる。

現在国内では、酸化ストレスを標的としたエダラボン（フリーラジカルスカベンジャー）の点滴投与、また神経保護作用のある活

性型ビタミン B₁₂・メチルコバラミン多量投与などの臨床試験が行われている。前者では病状初期の患者に対する投与で呼吸機能、運動機能の改善が見られ、後者では1ヶ月の生存期間の延長が認められている。このように、1つの因子をターゲットとした薬物で症状の改善効果が認められるのであれば、多くの成分を含む生薬やそれぞれに役割をもつ生薬の組み合わせで出来ている漢方方剤にも新たな治療効果の可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、多くの生薬や漢方方剤の中から ALS 治療効果のあるものを探し出し、その作用メカニズムを明らかにすることである。これまで、その予備段階として漢方方剤の温脾湯を用い、細胞実験と動物実験を行った。温脾湯はこれまでの研究から、抗酸化作用が強く、酸化ストレスが深く関与する疾患に対して効果を発揮する事が分かっている。実際に運動神経由来 NSC-34 細胞を用いた *in vitro* の系で、ジエチルジチオカルバメート (抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) の阻害剤: SOD1 は家族性 ALS の原因遺伝子の1つ) 誘発による細胞障害に対する効果を検討したところ、温脾湯の添加は濃度依存的に障害を軽減した。そこで次に、ALS のモデル動物である、変異型ヒト SOD1 遺伝子を組み込んだトランスジェニック (Tg) マウスに予備的に温脾湯を投与し効果を検討した。その結果、発症までの期間は延長したものの、生存期間に変化は認められなかった。この温脾湯の ALS に対する効果の詳細を検討するとともに、*in vitro* と *in vivo* の結果を合わせ見ながら、*in vivo* で効果の期待される薬物を選抜するための、*in vitro* でのより良いスクリーニング系を設定し、天然資源から治療薬の探索を行う。

3. 研究の方法

変異型ヒト SOD1 (G93A 型) を導入したトランスジェニックマウス (SOD1^{G93A}; B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, Jackson Laboratory) をモデルマウスとして実験に用いた。♂の SOD1^{G93A} と野生型の♀B6SJL (Jackson Laboratory) を交配し、生まれた仔のうち、ヒト SOD1^{G93A} 遺伝子を有するものを ALS モデルマウス (Tg) とし、ヒト SOD1^{G93A} 遺伝子を持たない同腹仔の野生型 (Wt) を対照の正常群として用いた。

6 週齢の Tg を Vehicle 群、温脾湯投与群、陽性対照群に分け、温脾湯投与群には温脾湯エキスを 100 または 200 mg/kg B.W./day (それぞれ W100 群、W200 群)、陽性対照群にはリ

ルゾール 25 mg/kg B.W./day を、Vehicle 群および Wt 群には水を 7 週齢から 1 日 1 回、実験終了時まで連日経口投与した。温脾湯は水に溶解し、リルゾールは 0.5% カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し投与した。体重は週 2 回、運動機能 (Rota-rod test, Wire hang test, Grip test) は週 1 回測定した。また、disease onset は体重がピークに達した日とし、マウスを横倒しにして起き上がれなくなった日を clinical end point とした。

前述と同様の実験スケジュールで、6 週齢から薬物投与を行った動物を 16 週齢で屠殺した。生理食塩水で灌流後、脊髄を採取し、Lumber area を 4% パラホルムアルデヒド-PBS 溶液に浸漬、4°C にて固定した。その後、L2~L4 部分を切り出してパラフィン包埋し、3~4 μm の厚さで薄切し、組織染色に用いた。

4. 研究成果

1) 体重変化

Wt 群と比べて、SOD1^{G93A} マウスでは 13 週齢 (90 日齢) 前後から ALS の発症および進行と思われる体重減少が認められたが、温脾湯投与による有意な変化は認められなかった。

2) 運動機能変化

Rota-rod test において、Wt 群は実験期間を通じてほぼ一定の運動機能を保っていたが、Vehicle 群では、10 週齢以降急激な運動機能の低下を示した。これに対し、温脾湯投与群では 12~13 週齢まで急激な運動機能の低下は認められず、11~13 週齢時では各週の対応する Vehicle 群より有意な運動機能低下の抑制が認められた。陽性対照のリルゾール投与群 (Tg+Riluzole) は、15 週齢において有意な抑制結果が示された (Figure 1)。

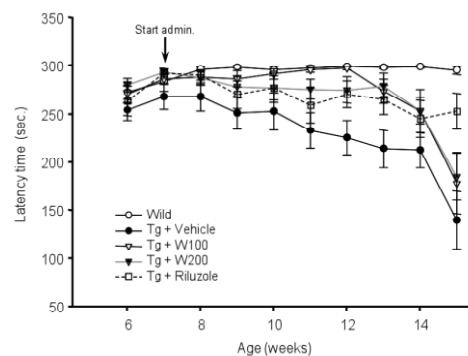


Figure 1 Effect of Wen-Pi-Tang extract on motor function by rota-rod test in SOD1^{G93A} mice. Motor function evaluated by the rota-rod test. Each group comprised 9–10 mice (5 males and 4–5 females), and drug administration was started from 7 weeks of age. Data represent the mean ± SE. There is significant interaction between the group and age ($p < 0.001$ for group, $p < 0.001$ for age, $p < 0.001$ for group and age, repeated-measures 2-way ANOVA). * $p < 0.05$ vs. Wild group, * $p < 0.05$ vs. vehicle-treated Tg group by Holm-Sidak method.

Wire hang test では、15 週齢の Tg 群で Latency time の著しい減少が見られたが、温脾湯投与群ではその減少が抑制される傾向にあった。またリゾール投与群では、15 週齢において有意な抑制が認められた (Figure 2A)。同様に、Grip test においても温脾湯投与群とリゾール投与群では、15 週齢時に見られる Tg 群の著しい握力低下に対し、抑制傾向が認められた (Figure 2B)。

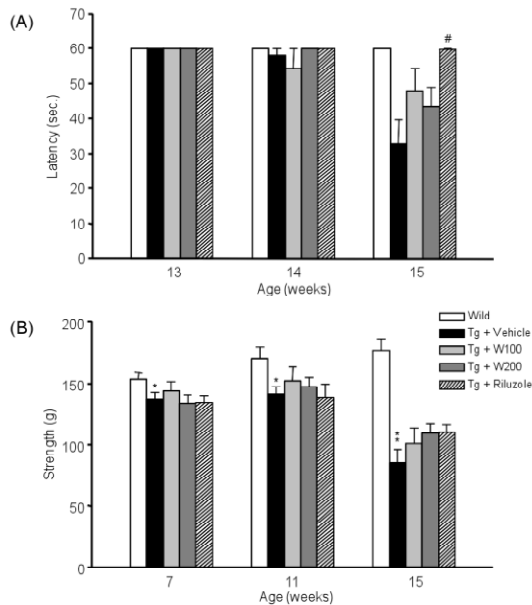


Figure 2 Effect of Wen-Pi-Tang extract on motor function in SOD^{G93A} mice
Motor function evaluated by the wire hang (A) and grip strength (B) tests. Each group comprised 9–10 mice (5 males and 4–5 females), and drug administration was started from 7 weeks of age. Data represent the mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs. Wild group, # $p < 0.01$ vs. vehicle-treated Tg group by Student's *t*-test

3) Disease onset および survival time

Disease onset および survival time は Kaplan-meier の生存曲線で示した (Figure 3)。Onset は Vehicle 群, W100 群およびリゾール群間で変化は見られなかったが, W200 群は Tg 群と比較して有意な onset の延長が認められた。一方, Survival time には温脾湯投与の影響は認められなかった。

4) 組織染色

16 週齢時の脊髄運動神経細胞数の変化について Nissl 染色にて検討した。Tg 群の運動神経細胞数は Wt 群と比較して、約 41%にまで減少していた。これに対し、温脾湯投与群では投与量に依存して神経細胞数の減少を抑制し (W100 群: 48%, W200 群: 51%), W200 群では Tg 群に対して有意な増加作用を示した (Figure 4)。また、陽性対照のリゾール投与群も有意に神経細胞数の減少を抑制していた。

また免疫組織染色により、脊髄組織でのミクログリアおよびアストロサイトの著しい増加が、温脾湯投与で抑制されることが確認出来た (Figure 5–6)。

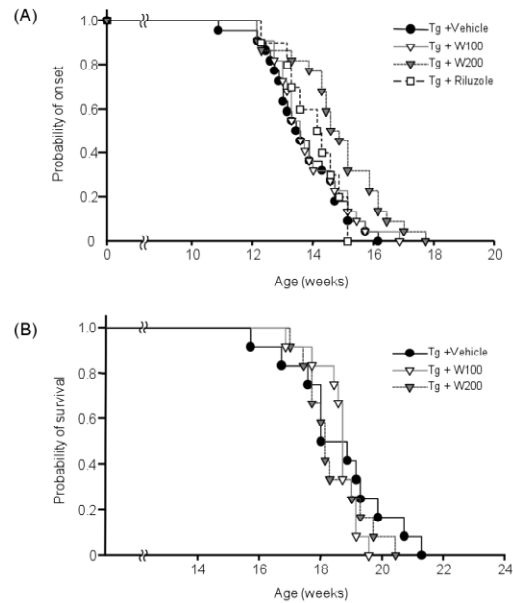


Figure 3 Effect of Wen-Pi-Tang extract on disease onset and survival in SOD^{G93A} mice
Kaplan-meier curves demonstrate the probability of onset (A), and survival time (B). The riluzole-treated Tg group comprised 9 mice (5 males and 4 females), and the other groups comprised 22 mice (10 males and 12 females). Drug administration was started from 7 weeks of age. The disease onset in the Wen-Pi-Tang (200 mg/kg)-treated Tg group (W200) was significantly delayed compared with that in the vehicle-treated Tg group ($p = 0.009$ by log-rank test).

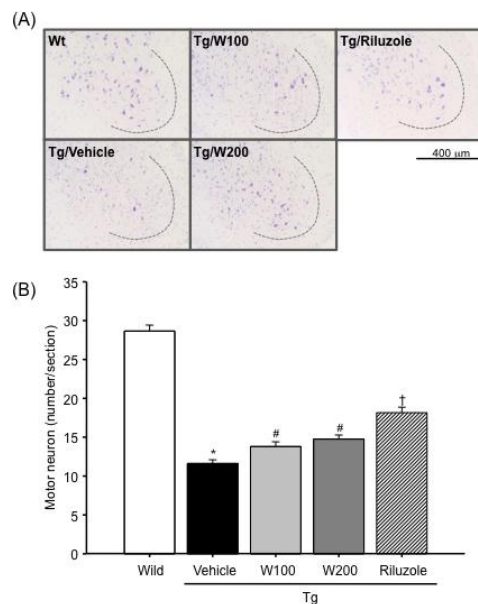


Figure 4 Effect of Wen-Pi-Tang extract on motor neuron loss in SOD^{G93A} mice spinal cord
(A) Microscopy of the ventral horn in Nissl-stained spinal cord sections from 16-week-old Wild, vehicle-treated Tg, W100, W200-treated Tg mice and Riluzole-treated Tg mice. Scale bar = 400 μ m. (B) The number of motor neurons in lumbar segments of the spinal cord was counted. Data represent the mean \pm SE. ($n = 54-95$). * $p < 0.001$ vs. Wild group, # $p < 0.05$ vs. vehicle-treated Tg group by Student's *t*-test, * $p < 0.05$ vs. vehicle-treated Tg group by one-way ANOVA with *post-hoc* Dunnett's test.

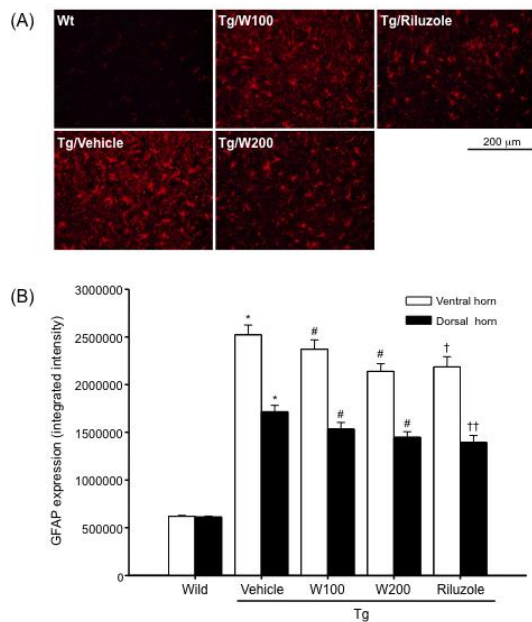


Figure 5 Immunohistochemistry for GFAP in the spinal cord of SOD1^{G93A} mice
(A) Immunofluorescent microscopy of the ventral horn in spinal cord sections from 16-week-old Wild, vehicle-treated Tg, W100, W200-treated Tg and Riluzole-treated Tg mice. Scale bar = 200 μm. (B) Fluorescence intensity analysis of immunohistochemistry for GFAP in SOD1^{G93A} mice spinal cords. Captured images were quantified using ATTO densitography. Data represent the mean ± SE. (n=91–189) *p<0.001 vs. Wild group, †p<0.05, ††p<0.001 vs. vehicle-treated Tg group by student's t-test. #p<0.05 vs. vehicle-treated Tg group by one-way ANOVA with post-hoc Dunnett's test.

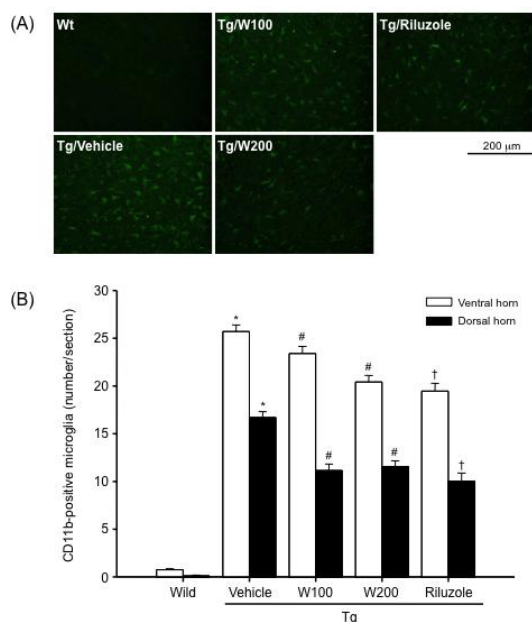


Figure 6 Immunohistochemistry for CD11b in the spinal cord of SOD1^{G93A} mice
(A) Immunofluorescent microscopy of the ventral horn in spinal cord sections from 16-week-old Wild, vehicle-treated Tg, W100, W200-treated Tg and Riluzole-treated Tg mice. Scale bar = 200 μm. (B) Fluorescence intensity analysis of immunohistochemistry for CD11b in SOD1^{G93A} mice spinal cords. Captured images were quantified using ATTO densitography. Data represent the mean ± SE. (n=56–80) *p<0.001 vs. Wild group, †p<0.05 vs. vehicle-treated Tg group by student's t-test. #p<0.05 vs. vehicle-treated Tg group by one-way ANOVA with post-hoc Dunnett's test.

まとめ

ヒト変異型 SOD1 を導入した ALS モデルマウスに、ALS 発症前の 7 週齢時より温脾湯エキスの連続投与を行ったところ、温脾湯は、ALS モデルマウスの生存期間に影響を与えることはなかったが、200 mg/kg B.W./day 投与群で発症期 (disease onset) を有意に延長した。また、Rota-rod test から、温脾湯は運動機能の低下を 2~3 週間遅らせることが明らかになった。さらに、Wire hang test や Grip test においても、温脾湯投与で運動能力の低下を遅らせる傾向にあることが示された。一方、陽性対照として用いたリルゾールは、グルタミン酸遊離阻害剤であるが (グルタミン酸受容体の過剰な興奮は神経毒性を引き起こすことが知られている)、このリルゾールは disease onset には影響を与えなかったが、15 週齢での運動機能測定の結果から ALS の進行を遅らせる傾向が認められた。このことから、ALS の onset を遅延させた温脾湯の作用は、リルゾールとは異なることが示された。

脊髄組織の検討では、温脾湯、リルゾールともに運動神経細胞の減少を抑制しており、これらの結果は運動機能の結果 (最終週の 15 週齢時) と良く関連していた。また、Wt 群ではミクログリアおよびアストロサイトの増加が認められたが、温脾湯投与群ではこれらも有意に抑制されており、ミクログリア由来と考えられる HO-1, iNOS も同様に低下していた (data not shown)。

ALS は、未だにその発症原因・発症メカニズムが解明されておらず、有効な治療法も確立されていない。本研究では ALS モデルマウスに対して天然由来薬物である漢方方剤の温脾湯が、改善効果を示した。今回の in vivo の実験結果を参考に、培養ニューロン、グリアを用いた in vitro のスクリーニング系を設定し、より多くの天然由来薬物の中から ALS 治療薬の探索を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1) Tanaka N, Kashiwada Y, Kim SY, Sekiya M, Ikeshiro Y, Takaishi Y.: Xanthenes from *Hypericum chinense* and their cytotoxicity evaluation., *Phytochemistry*, **70**(11-12), 1456-1461, 2009 (査読有り).

2) Tanaka N, Kashiwada Y, Kim SY, Hashida W, Sekiya M, Ikeshiro Y, Takaishi Y.: Acylphloroglucinol, biyouyanagiol, biyouyanagin B, and related

spiro-lactones from *Hypericum chinense*., *Journal of Natural Products*, **72**(8), 1447-1452, 2009 (査読有り).

3) Sekiya M, Ichianagi T, Ikeshiro Y, Yokozawa T.: The Chinese Prescription Wen-Pi-Tang Extract Delays Disease Onset in ALS Model Mice While Attenuating the Activation of Glial Cells in the Spinal Cord., *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **32**(3), 382-388, 2009 (査読有り).

4) Tanaka N, Kashiwada Y, Nakano T, Shibata H, Higuchi T, Sekiya M, Ikeshiro Y, Takaishi Y.: Chromone and chromanone glucosides from *Hypericum sikokumontanum* and their anti-Helicobacter pylori activities., *Phytochemistry*, **70**(1), 141-146, 2009 (査読有り).

5) Tanaka N, Kashiwada Y, Sekiya M, Ikeshiro Y, Takaishi Y.: Takaneones A-C, prenylated butylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sikokumontanum*., *Tetrahedron Letters*, **49**(17), 2799-2803, 2008 (査読有り).

6) Hashida W, Tanaka N, Kashiwada Y, Sekiya M, Ikeshiro Y, Takaishi Y.: Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*., *Phytochemistry*, **69**(11), 2225-2230, 2008 (査読有り).

7) Rhyu DY, Kang KS, Sekiya M, Tanaka T, Park JC, Yokozawa T.: Active Compounds Isolated from Traditional Chinese Prescription Wen-Pi-Tang Protecting Against Peroxynitrite-Induced LLC-PK₁ Cell Damage., *The American Journal of Chinese Medicine*, **36**(4), 761-770, 2008 (査読有り).

8) Ichianagi T, Shida Y, Rahman MM, Sekiya M, Hatano Y, Mtsumoto H, Hirayama M, Konishi T, Ikeshiro Y.: Effect on both aglycone and sugar moiety towards Phase II metabolism of anthocyanins., *Food Chemistry*, **110**(2), 493-500, 2008 (査読有り).

[学会発表] (計 7 件)

1) 筋萎縮性側索硬化症モデルにおける温脾湯の抗酸化を介した作用, 関谷倫子, 横澤隆子, 第 30 回 グアニジノ化合物研究会(筑波, 2009)

2) 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた温脾湯の検討(2), 関谷倫子, 一柳孝司, 池城安正, 東田千尋, 横澤隆子, 日本薬学会第 129 年会(京都, 2009)

3) 前駆脂肪細胞の分化調節機能を有する天然物(3) -かきのもとの分化促進作用成分について-, 鎌倉孝法, 三浦恵理, 柏田良樹, 関谷倫子, 一柳孝司, 池城安正, 高石喜久, 日本薬学会第 129 年会(京都, 2009)

4) 前駆脂肪細胞の分化調節機能を有する天然物(4) -青ジソ根の分化抑制作用成分について-, 佐々木久子, 阿部有里子, 柏田良樹, 関谷倫子, 池城安正, 高石喜久, 日本薬学会第 129 年会(京都, 2009)

5) 筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた温脾湯の検討, 関谷倫子, 田原愛, 一柳孝司, 池城安正, 東田千尋, 横澤隆子, 日本薬学会第 128 年会(横浜, 2008)

6) アントシアニンの構造と消化管吸収の関係, 一柳孝司, 関谷倫子, 田原愛, 波田野義比古, 池城安正, 日本薬学会第 128 年会(横浜, 2008)

7) スイゼンジナ (*Gynura bicolor* DC.) に含まれる抗酸化成分の研究(その 1), 田原愛, 一柳孝司, 関谷倫子, 池城安正, 日本薬学会第 128 年会(横浜, 2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関谷 倫子 (MICHIKO SEKIYA)

新潟薬科大学・薬学部・生薬学教室・助教
研究者番号: 40367412

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: