

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09299

研究課題名（和文）牛車腎気丸のパーキンソン病モデルを用いた神経保護効果の検証

研究課題名（英文）Neuroprotective effects of Go-sha-jinki-Gan in a Parkinson's disease model

研究代表者

馬場 孝輔（Baba, Kousuke）

大阪大学・医学系研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：90750159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題において臨床現場で使用されている牛車腎気丸（GJG）の抗神経炎症効果について中枢神経疾患モデルを用いて検証を行った。病態機序の異なる薬剤性パーキンソン病モデル及び実験的自己免疫性脊髄炎マウスモデルの2つのモデルにて、GJGがp38のリン酸化を抑制することで炎症性サイトカインTNFの発現抑制し、ミクログリア、アストロサイトの活性化、集簇を抑制することを生化学的、病理学的に確認した。これらの結果からGJGは経口投与にてミクログリアのp38のリン酸化を抑制することで中枢神経系での神経炎症を抑制する事が確認された。これらの結果を論文化しNeurotherapeutics誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで臨床現場で使用されてきた牛車腎気丸（GJG）が神経障害に効果を有することは経験的に知られてきた。本研究でその機序を生化学的に明らかにすることで科学的な裏付けが示す事が出来たと考える。また、今回の研究成果から経口投与で中枢神経系での炎症反応を抑制することが示され、本剤の臨床応用の可能性を拡げたと考える。

研究成果の概要（英文）：We examined the anti-neuroinflammatory effects of Go-sha-jinki-Gan (GJG), a herbal medicine used in clinical practice, using a model of central nervous system disease. Using two animal models with different pathological mechanisms, a drug-induced Parkinson's disease model and an experimental autoimmune myelitis model, we confirmed biochemically and pathologically that GJG suppresses the expression of the proinflammatory cytokine TNF by inhibiting p38 phosphorylation, and then inhibits the activation and aggregation of microglia and astrocytes. These results indicate that GJG inhibits neuroinflammation in the central nervous system by suppressing the phosphorylation of p38 in microglia through oral administration. These results were published in the journal Neurotherapeutics.

研究分野：神経内科

キーワード：神経疾患 牛車腎気丸 神経炎症 漢方薬

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、わが国で約 14 万人の患者がいると推定されている。その根治療法は存在しておらず、もたらされる社会的、経済的損失は大きい。我々は臨床現場で使用されている牛車腎気丸 (GJG) が老化促進マウスである SAMP8 マウスのサルコペニアを回復させる効果を世界で初めて示し、老化した筋組織での PGC1- $\alpha$  発現増強によるミトコンドリア機能改善、TNF- $\alpha$  の発現抑制による抗炎症作用を示す事を明らかにした。臨床現場では GJG は抗癌剤等による末梢神経の感覚障害に有効であることが報告されている。パーキンソン病をはじめとする中枢神経疾患においてもミトコンドリア機能障害、炎症による障害は重要な病態であり、GJG の治療効果が期待できると考えた。

PD は黒質ドパミンニューロンの変性脱落を特徴とする神経変性疾患である。その病態はこれまでの研究より異常蛋白質の凝集、ミトコンドリア機能障害、慢性炎症等が関わる事が示されている。ミトコンドリア機能異常との関連はすでに多くの研究報告があり実験的 PD モデルに用いる MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) は黒質ドパミン神経特異的にミトコンドリア機能を障害しパーキンソン症状を呈する。慢性炎症に関しては病理学的にミクログリアの浸潤が認められることや、PD 患者の脳脊髄液で IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 といった炎症性サイトカインの上昇が報告されている。また神経変性に起因すると考えられる不溶性  $\alpha$ -synuclein が細胞外に分泌され、それらがミクログリアに取り込まれ炎症反応を惹起し神経変性を促進する事が報告されている (Zhang, W et al. FASEB J. 2005. Reynolds A.D. et al. J. Neurochem. 2008)。これらの事からミトコンドリア機能障害と慢性炎症の制御は PD の進行抑制を目的とした治療戦略を考える上で非常に重要な課題と考えた。

一方、我々は前述したように GJG が老化促進マウスである SAMP8 マウスでのサルコペニア改善効果世界に先駆けて確認した (Kishida Y et al. Phytomedicine 2015)。この作用機序として GJG が筋組織内で PGC1- $\alpha$  発現増強によるミトコンドリア機能改善、TNF- $\alpha$  の発現抑制による抗炎症作用を示す事を明らかにした。また、GJG 経口投与の坐骨神経絞扼モデルマウスでは慢性の神経性疼痛が改善され、TNF- $\alpha$  の発現抑制、ミクログリアの抑制が関わる事を示した (Nakanishi M et al. Mol Pain 2016)。更に GJG の経口投与を行った SAMP8 マウスでは非投与群と比して加齢による海馬へのミクログリアの浸潤が抑制されることを確認した (第 58 回日本老年医学会学術集会ポスター発表)。また、これらの事から GJG が神経組織でも同様に機能し神経保護的に作用する可能性が非常に高いと予想された。

## 2. 研究の目的

PD をはじめとする GJG の抗炎症作用を中心とした神経保護効果の可能性について検証を行い、その作用機序を明らかにすることで新たな神経治療薬としての可能性を明らかにすることを本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、中枢神経系での炎症がより強い多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脊髄炎マウスモデル (EAE モデルマウス) と薬剤性パーキンソン病モデル (MPTP 投与モデルマウス) を用いて GJG の神経保護効果の確認を行った。

EAE モデルマウスに対して 4% の GJG を含む餌を与える群と通常餌群の 2 群に分けてマウスの運動機能評価、4 週後の脊髄の炎症および脱髄に関して免疫染色による病理学的評価とウェスタンブロッティング法による生化学的評価を行った。主な評価項目としては GFAP (アストロサイトマーカー)、Iba1 (ミクログリア)、TNF $\alpha$ 、p38 とした。

MPTP 投与モデルマウスに関しても同様に 2 群に分け MPTP 投与後 7 日目にドパミン神経脱落と炎症について免疫染色による病理学的評価とウェスタンブロッティング法による生化学的評価を行った。主な評価項目としては TH (ドパミン神経マーカー) GFAP (アストロサイトマーカー)、Iba1 (ミクログリア)、TNF- $\alpha$ 、p38 とした。

## 4. 研究成果

EAE モデルマウスの GJG 投与群では運動機能障害がコントロール群と比較して有意に改善された。また脊髄を用いた病理学的解析では脱髄の改善、ミクログリア、アストロサイトの集簇の抑制を認めた。これらは生化学的解析においても同様の結果であった。また、GJG 投与群では TNF $\alpha$  の産生抑制、更に TNF $\alpha$  の発現に関わる p38 のリン酸化が阻害されている事を確認した。薬剤性パーキンソン病モデルである MPTP 投与モデルマウスにおいても EAE モデルマウスと同様に p38 のリン酸化抑制による TNF- $\alpha$  の産生抑制、それに続くグリア細胞活性化の抑制を確認した。病態機序の異なる薬剤性パーキンソン病モデル及び実験的自己免疫性脊髄炎モデルの 2

つのモデルにて、GJG が p38 のリン酸化を抑制することで炎症性サイトカイン TNF の発現抑制し、ミクログリア、アストロサイトの活性化、集簇を抑制することを生化学的、病理学的に確認した。これらの結果から GJG は経口投与にてミクログリアの p38 のリン酸化を抑制することで中枢神経系での神経炎症を抑制する事が確認された。これらの結果を論文化し Neurotherapeutics 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hayakawa Hideki, Nakatani Rie, Ikenaka Kensuke, Aguirre Cesar, Choong Chi Jing, Tsuda Hiroshi, Nagano Seiichi, Koike Masato, Ikeuchi Takeshi, Hasegawa Masato, Papa Stella M., Nagai Yoshitaka, Mochizuki Hideki, Baba Kousuke | 4. 巻<br>35              |
| 2. 論文標題<br>Structurally Distinct Synuclein Fibrils Induce Robust Parkinsonian Pathology  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Movement Disorders   | 6. 最初と最後の頁<br>256 ~ 267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/mds.27887  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Takemoto Y, Inaba S, Zhang L, Baba K, Hagihara K, Fukada S.                             | 4. 巻<br>16          |
| 2. 論文標題<br>Go-sha-jinki-gan (GJG), increases muscle weight in severe muscle dystrophy model mice. | 5. 発行年<br>2017年     |
| 3. 雑誌名<br>Clinical Nutrition Experimental   | 6. 最初と最後の頁<br>13-23 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Jiang S, Baba K, Hayakawa H, Hagihara K, Mochizuki H.  |
| 2. 発表標題<br>GO-SHA-JINKI-GAN (GJG) prevent inflammation in MPTP induced Parkinson's disease model mice.      |
| 3. 学会等名<br>6th Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress (MDS-AOS 2019) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shiyong Jiang, Kousuke Baba, Tatsusada Okuno, Hideki Hayakawa, Chiharu Shiimoto, Kensuke Ikenaka, Tsutomu Sasaki, Seiichi Nagano, Yoshitaka Nagai, Keisuke Hagihara, Hideki Mochizuki |
| 2. 発表標題<br>GO-SHA-JINKI-GAN (GJG) Palliates Progression of EAE Mice by Anti-inflammatory Mechanism   |
| 3. 学会等名<br>第59回日本神経学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shiyang Jiang, Kousuke Baba, Tatsusada Okuno, Hideki Hayakawa, Chiharu Shiimoto, Kensuke Ikenaka, Tsutomu Sasaki, Seiichi Nagano, Yoshitaka Nagai, Keisuke Hagihara, Hideki Mochizuki |
| 2. 発表標題<br>GO-SHA-JINKI-GAN (GJG) Palliates Inflammation In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Mice   |
| 3. 学会等名<br>XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017), Kyoto, Japan (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 連携研究者 | 萩原 圭祐<br><br>(Hagihara Keisuke)<br><br>(60423183) | 大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)<br><br><br>(14401) |    |
| 連携研究者 | 早川 英規<br><br>(Hayakawa Hideki)<br><br>(70468594)  | 大阪大学・医学系研究科・特任研究員<br><br><br>(14401)    |    |

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 |
|---------|---------|