

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07839

研究課題名(和文)トキソプラズマ再活性化と神経炎症の増悪サイクルに対するオトギリソウ属の薬草の効能

研究課題名(英文)Anti-Toxoplasma and neuroprotective potential of medicinal plant Hypericum

研究代表者

新庄 記子 (Shinjyo, Noriko)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：60794039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマ症は寄生原虫による感染症であり、世界人口の約30%に蔓延する日和見感染症であるが、妊婦の初感染による胎児への重篤な障害や、免疫不全における感染・再発が大きな問題となる。トキソプラズマは好神経性を示し、脳内慢性感染による中枢神経系における炎症が様々な精神神経疾患を誘発する可能性も示唆されているが、慢性感染に対する治療法はない。

近年、有効性と安全性の両面から伝統医薬の重要性が見直されつつある。本研究では、オトギリソウ属薬用植物に注目し、抗トキソプラズマ作用を検討し、西洋において抗鬱薬として知られる西洋オトギリソウに高い抗トキソプラズマ作用が期待されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマ慢性感染は日本において10-30%に蔓延するとされる。垂直感染が胎児に重篤な脳障害を来す一方、妊娠中の抗トキソプラズマ薬使用は制限されるため、安全性の高い生薬に期待が寄せられる。また、ストレスの蔓延する現代社会において抗病原体効果・抗神経炎症効果を持つ薬用植物資源の探索は、トキソプラズマ症に限らずサイトメガロウイルスなど、その他の日和見感染症に応用できるものであり、さらに神経炎症が関連する様々な精神神経疾患の治療・予防法の開発にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite, causing opportunistic infection in approximately one third of the world population. Vertical transmission can cause severe damages to the fetus, while Toxoplasma reactivation in immunocompromised individuals can render debilitating effects. In addition, T. gondii is a neurotropic parasite causing various neuropsychiatric disorders. There is no cure for Toxoplasma chronic infection, thus development of safer and more effective treatment is desired.

Hypericum spp. are plant species well-known for their medicinal properties. These plant species have long been used in folk medicines worldwide. This study investigated anti-Toxoplasma potential of two Hypericum spp., namely H. erectum and H. perforatum, and found that H. perforatum and its unique active constituent Hyperforin are potentially effective against Toxoplasma chronic infection.

研究分野：感染症、免疫学

キーワード：寄生虫 薬用植物 感染症

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ症は、寄生性原虫トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) による感染症であり、世界人口の約 30% に蔓延する日和見感染症であるが、妊婦の初感染が及ぼす胎児への重篤な障害や、免疫不全における感染・再発が大きな問題となる。注目すべきことに、トキソプラズマは好神経性を示し、慢性感染においては休眠型である緩増虫体として脳に潜在する。このことから、慢性感染においては中枢神経系に持続的炎症が引き起こされると推測され、様々な精神神経疾患 (特にうつ病など) を誘発する可能性が示唆されているが、慢性感染に対する治療法は無く、有効かつ安全な治療法の開発が求められる。

近年、有効性と安全性の両面から伝統医薬の重要性が見直されつつある。薬用植物由来の伝統生薬は、多数の有効成分による複合作用により治療効果を発揮し、古来より多種多様な疾患に用いられてきた。多成分により薬効を発揮するため副作用・薬剤耐性が起こりにくいという利点があり、また含有成分の類似する同属植物間での比較により、有効かつ安全な薬効成分の組合せと分子レベルでの作用機序の解析が可能である。オトギリソウ属植物 (*Hypericum spp.*) は世界中で広く薬草として使用されてきた歴史を持つ重要な属であり、その同属植物は約 500 種に上る。特に *H. perforatum* は、西洋において St. John's wort として知られ、抗鬱薬としての効果が評価されている。一方、日本に自生する同属植物 *H. erectum* は伝統生薬「オトギリソウ」の基原植物である。また、オトギリソウ属植物の抗病原体活性も見出されつつあり、申請者らは、これらの薬用植物に抗トキソプラズマ薬としての可能性が期待されると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 薬用植物 *H. erectum* と *H. perforatum* による原虫増殖抑制効果・抗神経炎症効果を、トキソプラズマ慢性感染モデル (*in vivo*) とミクログリア細胞培養系 (*in vitro*) において比較・検討すること、同時に、(2) トキソプラズマ慢性感染による精神神経疾患の誘発防止を目的とした新規標的を探索することであった。

3. 研究の方法

H. erectum 及び *H. perforatum* アルコール抽出物による原虫増殖抑制効果・抗炎症作用をトキソプラズマ感染モデル培養系 (Vero 細胞、Raw264 細胞、マウス神経・グリア細胞初代培養) において検討した。また、有効成分の探索を目的として、溶媒抽出法による極性分配行い、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) により、*H. erectum* 及び *H. perforatum* 抽出物含有成分の解析を行った。さらに主要成分による原虫増殖抑制効果・抗炎症作用を比較検討した。

4. 研究成果

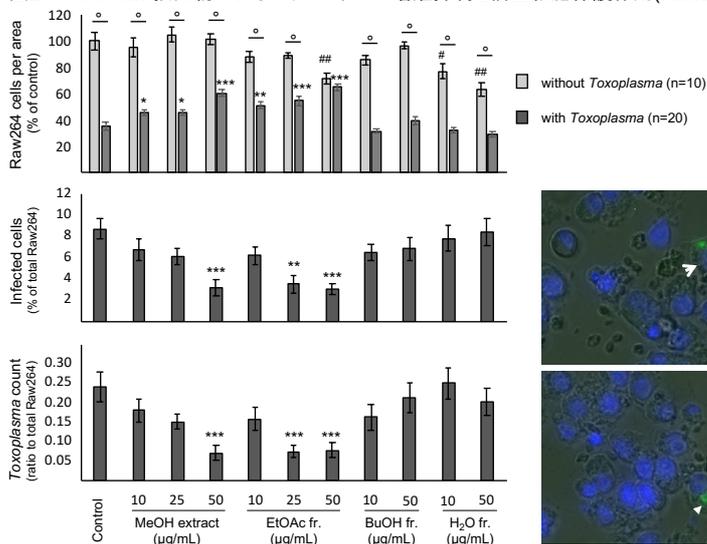
4-1. *H. erectum* による原虫増殖抑制効果

H. erectum アルコール抽出物は、腎臓上皮細胞由来細胞 (Vero 細胞) およびマクロファージ (Raw264) 培養系においてトキソプラズマ増殖を抑制した。また *H. erectum* は Hypericin を高濃度で含有し、Hypericin 濃縮画分である酢酸エチル画分 (図 1) が最も高いトキソプラズマ増殖抑制活性

図1. LC/MSIによる*H. erectum*含有成分の解析

Quantitative information of three major constituents	(µg/mg extract)		
	Hypericin	Quercetin	Chlorogenic acid
MeOH extract	2.19 ± 0.16	0.59 ± 0.04	0.43 ± 0.04
50% MeOH extract	-	0.81 ± 0.01	0.76 ± 0.07
MeOH-EtOAc fraction	8.76 ± 2.33	3.14 ± 0.09	0.37 ± 0.08
MeOH-BuOH fraction	-	-	1.24 ± 0.10
MeOH-Water fraction	-	-	-

図2. *H. erectum*抽出物によるトキソプラズマ増殖抑制と宿主細胞保護作用(Raw264)



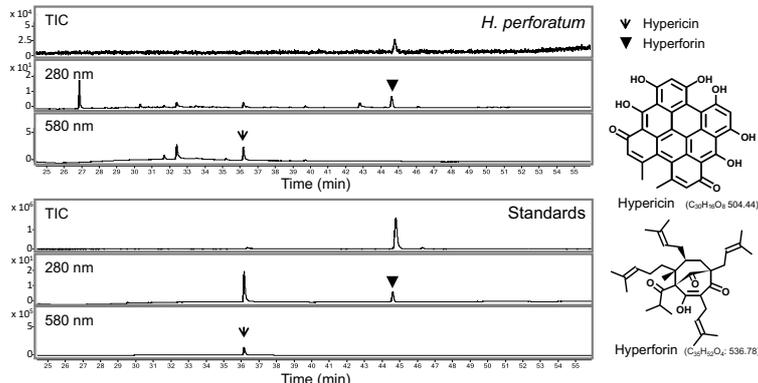
最も高いトキソプラズマ増殖抑制活性および宿主細胞保護作用を示した (図 2)。さらに、主要含有成分である Hypericin によるトキソプラズマ増殖抑制を検討したところ、宿主細胞に顕著な毒性を示すことなく原虫の増殖を抑制した他、*H. erectum* 抽出物および Hypericin は赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の近縁である (*E. invadens*) の増殖をも抑制した。以上より、本薬用植物が広く抗寄生虫増殖抑制作用を持つ可能性が示された。

(本成果は文献 1 にて報告)

4-2. *H. perforatum*によるトキソプラズマ増殖抑制効果および炎症抑制・神経保護作用

H. perforatum および同属植物(*H. erectum*, *H. ascyron*)アルコール抽出物によるトキソプラズマ増殖抑制効果を検討したところ、*H. perforatum*が最も高い抗トキソプラズマ作用を示した。*H. perforatum*アルコール抽出物はHypericinおよびHyperforinを高濃度で含有し、Hyperforinは

図3. LC/MSによる*H. perforatum*含有成分の解析



	Hypericin (μg/mg)	Hyperforin (μg/mg)
1. <i>Hypericum perforatum</i> MeOH extract	0.41±0.01	3.71±0.11
2. <i>Hypericum erectum</i> MeOH extract	2.44±0.45	n.d.
3. <i>Hypericum ascyron</i> MeOH extract	n.d.	n.d.
4. <i>Hypericum perforatum</i> Hexane fraction	0.013±0.003	34.31±1.63
5. <i>Hypericum perforatum</i> EtOAc fraction	0.83±0.03	0.148±0.009
6. <i>Hypericum perforatum</i> BuOH fraction	0.023±0.008	n.d.

は *H. perforatum* 特異的であった (図3)。*H. perforatum*抽出物から得られたHyperforin濃縮画分(ヘキサン画分)およびHyperforinは、慢性感染の原因となるシスト形成(*TgBAG*発現)を誘導することなく高い抗トキソプラズマ増殖抑制作用を示し、増殖抑制とシスト形成を同時に誘導するHypericinとは顕著に異なる抗トキソプラズマ作用を示す事が明らかとなった(図4)。さらに、Hyperforinは初代培養系において、感染によるミクログリアの活性化と炎症性サイトカインの発現誘導を抑制し、神経細胞死の誘導も阻害した(図5)。

以上より、薬用植物 *H. perforatum* による抗トキソプラズマ作用と、慢性感染予防効果が示唆された。

(本研究成果は文献2にて報告)

図4. *H. perforatum*および主要成分によるトキソプラズマ増殖抑制およびシスト形成誘導

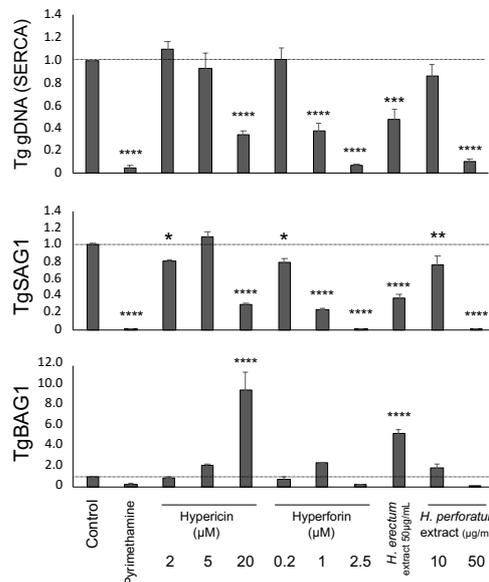
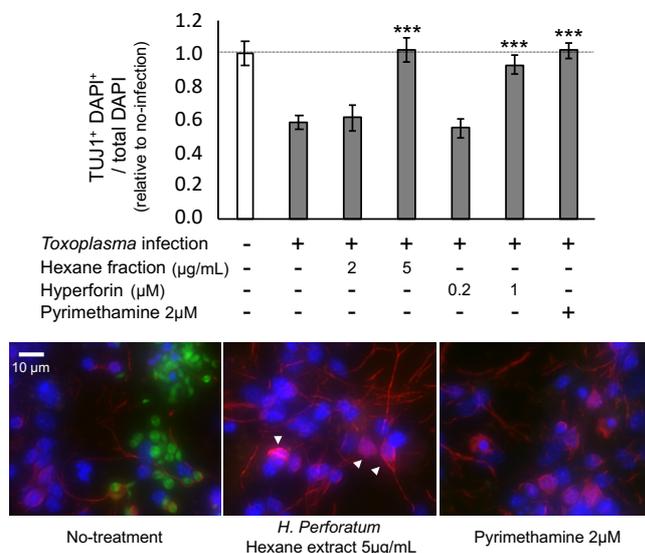


図5. *H. perforatum*抽出Hyperforin濃縮画分およびHyperforinによる神経細胞死抑制効果



4-3. トキソプラズマ慢性感染における脳内補体経路の活性化

トキソプラズマ慢性感染治療薬開発に向けた新たな標的の探索を目的とし、マウス慢性感染モデルにおける脳内補体活性化関連因子の遺伝子発現変化を解析した。その結果、第二経路(alternative pathway)活性化に関わる因子群の持続的発現亢進とグリア細胞の関与が見出され、慢性感染による中枢神経炎症抑制の新たな標的として補体第二経路が示唆された。

(本研究成果は文献3にて報告)

文献

1. Shinjyo *et al.* (2020) **J Nat Med.** 74(1):294-305. doi: 10.1007/s11418-019-01369-6
2. Shinjyo *et al.* (2020) **J Ethnopharmacol.** 267:113525. doi: 10.1016/j.jep.2020.113525
3. Shinjyo *et al.* (2021) **Front Immunol.** 11:603924. doi: 10.3389/fimmu.2020.603924.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shinjo Noriko, Nakayama Hideyuki, Ishimaru Kanji, Hikosaka Kenji, Mi-ichi Fumika, Norose Kazumi, Yoshida Hiroki	4. 巻 74
2. 論文標題 Hypericum erectum alcoholic extract inhibits Toxoplasma growth and Entamoeba encystation: an exploratory study on the anti-protozoan potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 294 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01369-6	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 Shinjo Noriko, Nakayama Hideyuki, Li Li, Ishimaru Kanji, Hikosaka Kenji, Suzuki Noriyuki, Yoshida Hiroki, Norose Kazumi	4. 巻 267
2. 論文標題 Hypericum perforatum extract and hyperforin inhibit the growth of neurotropic parasite Toxoplasma gondii and infection-induced inflammatory responses of glial cells in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology	6. 最初と最後の頁 113525 ~ 113525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jep.2020.113525	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 Shinjo Noriko, Waddell Guy, Green Julia	4. 巻 25
2. 論文標題 Valerian Root in Treating Sleep Problems and Associated Disorders - A Systematic Review and Meta-Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Evidence-Based Integrative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515690X20967323	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 該当する
1. 著者名 Shinjo Noriko, Parkinson James, Bell Jimmy, Katsuno Tatsuro, Bligh Annie	4. 巻 18
2. 論文標題 Berberine for prevention of dementia associated with diabetes and its comorbidities: A systematic review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Medicine	6. 最初と最後の頁 125 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joim.2020.01.004	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 該当する

1. 著者名 Shinjyo Noriko, Hikosaka Kenji, Kido Yasutoshi, Yoshida Hiroki, Norose Kazumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Toxoplasma Infection Induces Sustained Up-Regulation of Complement Factor B and C5a Receptor in the Mouse Brain via Microglial Activation: Implication for the Alternative Complement Pathway Activation and Anaphylatoxin Signaling in Cerebral Toxoplasmosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2020.603924	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 Sahuri-Arisoylu Meliz, Mould Rhys R., Shinjyo Noriko, Bligh S. W. Annie, Nunn Alistair V. W., Guy Geoffrey W., Thomas Elizabeth Louise, Bell Jimmy D.	4. 巻 8
2. 論文標題 Acetate Induces Growth Arrest in Colon Cancer Cells Through Modulation of Mitochondrial Function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	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) 10.3389/fnut.2021.588466	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 該当する

1. 著者名 Noriko Shinjyo, Hideyuki Nakayama, Kanji Ishimaru, Kenji Hikosaka, Fumika Mi-Ichi, Kazumi Norose, Hiroki Yoshida	4. 巻 74
2. 論文標題 Hypericum Erectum Alcoholic Extract Inhibits Toxoplasma Growth and Entamoeba Encystation: An Exploratory Study on the Anti-Protozoan Potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 294-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01369-6	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 Shinjyo Noriko, Kita Kiyoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Infection and Immunometabolism in the Central Nervous System: A Possible Mechanistic Link Between Metabolic Imbalance and Dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 765217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.765217	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 Shinjyo Noriko, Kagaya Wataru, Pekna Marcela	4. 巻 15
2. 論文標題 Interaction Between the Complement System and Infectious Agents ? A Potential Mechanistic Link to Neurodegeneration and Dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 710390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.710390	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 該当する

1. 著者名 Too Lay Khoon, Hunt Nicholas H., Shinjyo Noriko	4. 巻 16
2. 論文標題 Editorial: The Relationships Between Infectious Agents and Dementia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 831374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.831374	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Noriko Shinjyo, Kenji Hikosaka, Hiroki Yoshida, Kazumi Norose
2. 発表標題 Traditional Kampo formula (漢方) Scutellaria-Coptis is protective against Toxoplasma infection via synergistic immunomodulation
3. 学会等名 第84回日本インターフェロンサイトカイン学会
4. 発表年 2019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	野呂瀬 一美 (Norose Kazumi) (30156244)	千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授 (12501)	

6. 研究組織 (つづき)

	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	彦坂 健児 (Hikosaka Kenji) (30456933)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	吉田 裕樹 (Hiroki Yoshida) (40260715)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

	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
研究協力者	中山 秀幸 (Nakayama Hideyuki) 	佐賀県衛生薬業センター 	
研究協力者	石丸 幹二 (Ishimaru Kanji) (40223028)	佐賀大学 (17201)	
研究協力者	渡辺 均 (Watanabe Hitoshi) (80301092)	千葉大学 (12501)	
研究協力者	池上 文雄 (Ikegami Fumio) (90159608)	千葉大学 (12501)	
研究協力者	見市 文香 (Mi-ichi Fumika) (70576818)	佐賀大学 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	城戸 康年 (Kido Yasutoshi) (90511395)	大阪公立大学 (24405)	
研究協力者	北 潔 (Kita Kiyoshi) (90134444)	長崎大学 (17301)	

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			
スウェーデン	University of Gothenburg			
英国	University of Westminster			
中国	Caritas Institute of Higher Education			
オーストラリア	University of Sydney			