

## 57 種のビルマ伝統医薬抽出物中の神経分化誘導物質の探索

## Induction of neural differentiation by 57 spices of traditional Burmese medicines extracts in PC12 cells

○吉井恵<sup>1</sup>, Nyunt Phay<sup>2</sup>, 浮谷基彦<sup>1</sup>, 深津誠<sup>1</sup>, 仁科淳良<sup>1</sup>\*Kei Yoshii<sup>1</sup>, Nyunt Phay<sup>2</sup>, Motohiko Ukiya<sup>1</sup>, Makoto Fukaysu<sup>1</sup>, Atsuyoshi Nishina<sup>1</sup>

Abstract: It has been reported that lithium and valproic acid are effective for psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, and depression. However, drugs presently used for psychiatric disorders caused a variety of side-effects such as cardiac toxicity, sexual dysfunction, body weight gain and sleep disorder; moreover, the cure rate is still as low as 70%. Thus, a safer, better-tolerated synthetic drug with higher effect is still on the way. From this point of view, the therapeutic discovery in this field might have drawn more attention to natural medicine. The present study aimed to examine the neuroprotective effects of 57 spices of traditional Burmese medicines extracts by observing phosphorylation of p42/44ERK and Akt as the index of neuro-differentiation and to select target herbal medicines which were investigated as sources of putative neuroprotective compounds. The current findings demonstrated that one of the traditional Burmese medicine induced phosphorylation of p42/44ERK and Akt as well as NGF.

## 1. 目的

統合失調症, 双極性障害, うつ病といった精神疾患の分子メカニズムとして, ニューロトロフィンの減少, 神経新生減少, アポトーシスの亢進, 神経伝達物質の異常, 炎症, 酸化ストレス, NO に起因するニトロソ化ストレス, ミトコンドリアの機能障害, コルチゾールと視床下部-下垂体-副腎系 (HPA 軸) の変性, および, エピジェネティックな異常などが挙げられている. また, いわゆる神経保護物質は上記の異常のいずれかまたは複数を阻害できる物質と考えられる. 最近, Dodd ら[1]は, リチウムや既知の向精神薬であるアスピリン, ミノサイクリン, スタチン, N-アセチルシステイン, レプチン, メラトニンなどの神経保護作用に関して検討し, リチウムとバルプロ酸が有効であると述べている. しかし, リチウムとバルプロ酸はともに内臓障害の副作用が報告されている. また, 医薬品による抑うつの治療率は70%未満であり, 神経保護作用を有する化合物の開発は発展途上といえる. 一方, 生薬等に含まれる神経保護物質の探索も盛んに研究されており, 副作用が少ない天然素材由来成分の実用化が期待されている.

上記の実情に鑑み, 本研究では, 神経モデルとして多用される PC12 細胞と陽性参照化合物として NGF を用いて, 生薬成分中の神経保護物質の探索を試みることにした. PC12 細胞を NGF で刺激することにより, ras/MAPK 経路と PI3K/Akt 経路が活性化され細胞増殖が止まり, 神経突起が伸張する神経分化が誘導される. 本研究では, PC12 細胞の培地に所定量の生薬抽出物添加し, p42/44ERK と Akt の活性化を神経分化の指標としてスクリーニングを行うことにした. 研究対象となる生薬は共同研究先のパセイン大学ニュン学長の好意により入手した, 57 種のビルマ伝統医薬を用いた. 中国起源の漢方薬やインド起源のアーユルベエダと比べて, ビルマ伝統医薬成分や効能の科学的な解明は進んでいない. 本研究では, ビルマ伝統医薬 57 種のメタノール抽出物の神経分化誘導作用を測定し, 神経保護物質を探索する対

Table 1. Yield and cytotoxicity of 57 spices of traditional Burmese medicine methanol extracts

|    | Medicine                        | Part          | Yield (%) | Cytotoxicity : IC <sub>50</sub> |
|----|---------------------------------|---------------|-----------|---------------------------------|
| 1  | Annie's lace                    | Roots         | 14.3      | 100                             |
| 2  | Bastard sandalwood              | Stem          | 5.1       | 100                             |
| 3  | Bishop's weed lovage            | Seeds         | 1.9       | 100                             |
| 4  | Black cumin                     | Seeds         | 8.2       | 12.45                           |
| 5  | Black hellebore                 | Roots         | 17.0      | 73.31                           |
| 6  | Black Pepper                    | Seeds         | 8.7       | 68.74                           |
| 7  | Chaulmoogra                     | Fruit         | 6.0       | 100                             |
| 8  | Cinnamon                        | Stem          | 13.9      | 100                             |
| 9  | Climbing lily                   | Roots         | 1.4       | 100                             |
| 10 | Cobra's saffron                 | Flower        | 10.2      | 100                             |
| 11 | Crab's claw ; Japan Wax Tree    | Fruit         | 53.5      | 100                             |
| 12 | Cumin                           | Seeds         | 3.3       | 100                             |
| 13 | Devils tree                     | Bark          | 3.6       | 100                             |
| 14 | Dill                            | Seeds         | 1.3       | 100                             |
| 15 | Dingy white                     | Solid         | 82.3      | 100                             |
| 16 | Drum stick                      | Bark          | 1.1       | 63.21                           |
| 17 | Emblic Myrobalan                | Fruit         | 4.0       | 100                             |
| 18 | Fennel                          | Seeds         | 2.0       | 94.94                           |
| 19 | Physic nut                      | Seeds         | 2.3       | 100                             |
| 20 | Garden cress                    | Seeds         | 7.0       | 100                             |
| 21 | Ginger                          | Bulbs         | 4.9       | 100                             |
| 22 | Hara nut tree                   | Fruit         | 5.3       | 100                             |
| 23 | Heart Leaved moon               | Stem          | 3.9       | 100                             |
| 24 | Heliotrope                      | Leaves        | 3.5       | 19.01                           |
| 25 | Gentiana kurroo Royle           | Stem          | 5.7       | 100                             |
| 26 | Indian Birthwort                | Leaves        | 3.5       | 87.41                           |
| 27 | Indian Cassia Lignea            | Leaves , Bark | 10.2      | 91.23                           |
| 28 | Indian Wild Pepper              | Leaves        | 3.1       | 100                             |
| 29 | Jasmine                         | Flower        | 5.8       | 59.77                           |
| 30 | King of bitters                 | Stem,Leaves   | 6.2       | 100                             |
| 31 | Lesser galangal                 | Roots         | 3.4       | 100                             |
| 32 | Liquorice                       | Stem          | 13.9      | 100                             |
| 33 | Long Pepper                     | Stem          | 3.3       | 100                             |
| 34 | Musk root                       | Roots         | 5.8       | 100                             |
| 35 | Pagoda tree                     | Flower        | 8.5       | 100                             |
| 36 | Prickly Poppy                   | Flower        | 10.5      | 100                             |
| 37 | Purgative croton                | Seeds         | 5.8       | 100                             |
| 38 | Red sandal wood                 | Stem          | 5.6       | 100                             |
| 39 | Lead Wort                       | Roots         | 11.9      | 100                             |
| 40 | Sandal wood                     | Stem          | 0.4       | 100                             |
| 41 | Small calthrops                 | Fruit         | 1.5       | 100                             |
| 42 | Star Flower                     | Flower        | 4.8       | 100                             |
| 43 | Three Leaved caper              | Bark          | 0.7       | 100                             |
| 44 | Trumpet flower                  | Bark          | 3.8       | 100                             |
| 45 | Turmeric                        | Roots         | 9.4       | 100                             |
| 46 | Turmeric (Bitter)               | Roots         | 2.4       | 100                             |
| 47 | Valerian                        | Bulbs         | 4.7       | 93.53                           |
| 48 | Wax Myrtle ; Bay Berry (Male)   | Bark          | 27.1      | 100                             |
| 49 | Wax Myrtle ; Bay Berry (Female) | Bark          | 33.5      | 74.44                           |
| 50 | Ya-wo-mo                        | Stem          | 1.1       | 100                             |
| 51 | King of Bitters                 | leave         | 2.8       | 100                             |
| 52 | Gamon                           | bud           | 1.0       | 100                             |
| 53 | Indian Cork Tree                | bark          | 1.1       | 100                             |
| 54 | Paramingnya Longispina Hook     | root          | 0.7       | 100                             |
| 55 | Heart-leaved moon seed          | bark          | 1.3       | 100                             |
| 56 | Long Pepper                     | fruit         | 1.5       | 100                             |

1:日大理工・応化, Department of Materials and Applied Chemistry, CST, Nihon-U, 2:パセイン大学, Pathein-U

象となるターゲット生薬のリストアップを目的とした。

## 2. 実験材料と方法

- ・パセイン大学ニュン学長の好意により 57 種のビルマ伝統医薬を入手した。
- ・生薬を裁断し、粉碎後、粉碎物 100g に対して 500ml のヘキサンを加えて、一昼夜抽出した。上澄と残渣をろ別し、風乾した残渣に酢酸エチルを 500ml を加えて、ヘキサン抽出物と同様の方法で、酢酸エチル抽出物を調製した。同様の方法でメタノール抽出物を調製した。上澄はロータリーエバポレーターで乾燥して、ヘキサン抽出物とした。本研究では、メタノール抽出物を検討対象とした。
- ・PC12 細胞は DMEM (馬血清 10%, 牛胎児血清 5%) を用いて、CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C で培養した。
- ・細胞毒性は MTT 法で細胞の生存率を測定して求めた。
- ・各抽出物の神経分化誘導作用の強弱は p42/44ERK と Akt を指標に判定した。すなわち、細胞ライセートを SDS ページで分離し、タンパク質を PVDF 膜にブロットした後、免疫染色により p42/44ERK とリン酸化 p42/44ERK, Akt とリン酸化 Akt を検出した。

## 3. 結果と考察

- ・生薬抽出物の収量  
各生薬のメタノール抽出物の収量と細胞毒性 (IC<sub>50</sub>) を Table 1 に記載した。
- ・生薬抽出物の細胞毒性与 p42/44ERK と Akt の活性化作用  
生薬抽出物の p42/44ERK と Akt の活性化作用を Figure 1 に示した。57 種のビルマ伝統医薬のうち、No. 37 は顕著に PC12 細胞の p42/44ERK のリン酸化を促進した。リン酸化のレベルは陽性参照化合物の NGF と同程度であった。NGF は PC12 細胞の Akt のリン酸化も促進したが、No. 37 の Akt のリン酸化促進作用は認められなかった。

以上の結果から、57 種のビルマ伝統医薬のうち、No. 37 が神経保護物質探索の対象となりえることが明らかになった。今後、No. 37 をクロマトグラフィーで精製し、神経保護物質の単離、同定をめざす。また、得られた神経保護物質の細胞内情報伝達経路への効果を測定して、作用メカニズムの解明を行う。

## 4. 参考文献

- [1] S. Dodd, M. Maes, G. Anderson, O.M. Dean, S. Moylan, M. Berk, Putative neuroprotective agents in neuropsychiatric disorders, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 42 (2013) 135-145.

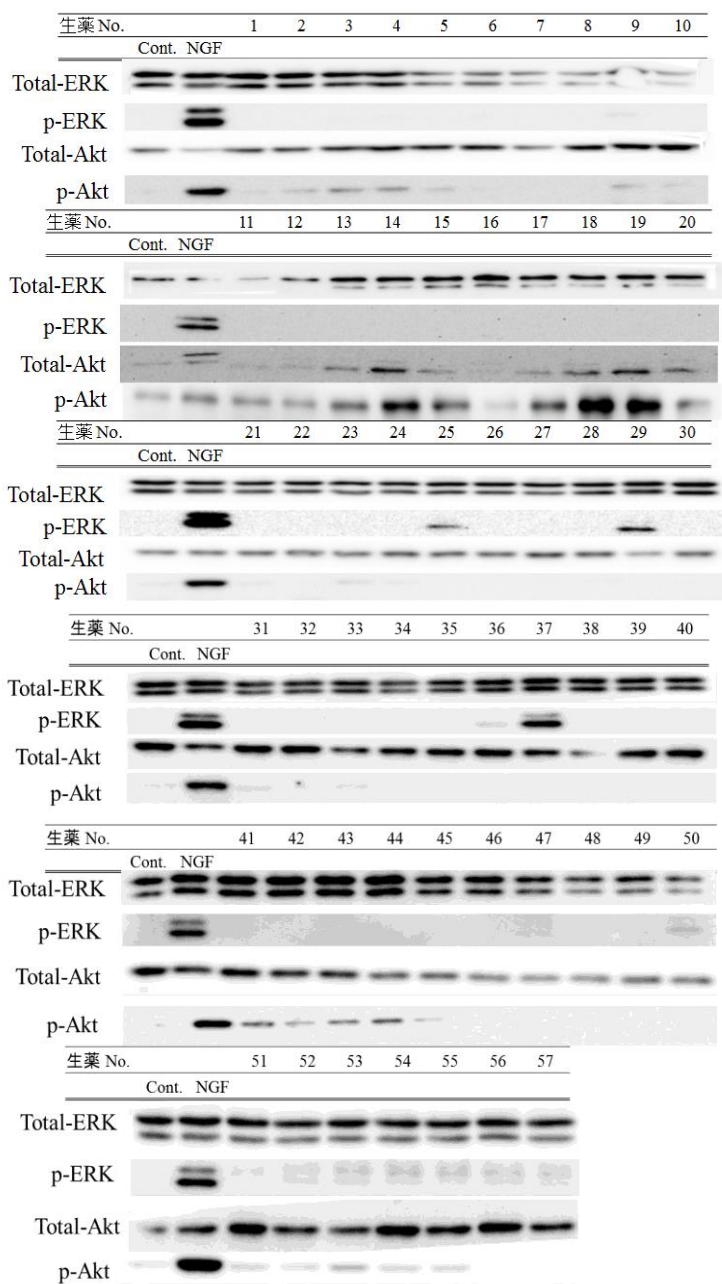


Figure 1. Phosphorylation of ERK and Akt by traditional Burmese medicines extracts