

パーキンソン症候群における生薬ニンジンのエストロゲン受容体を介した改善効果に関する研究

Estrogen Receptor-Mediated Improvement Effects of Ginseng Components in Parkinson's Syndrome

令和3年度入学

亀卦川 真美 (Kikegawa, Mami)

目 次

序論

第一章 パーキンソン症候群の背景.....	6
第一節 パーキンソン症候群の病態.....	6
第二節 薬剤性パーキンソニズムの現状.....	6
第三節 重篤副作用疾患別対応マニュアル.....	8
第四節 医薬品副作用データベース.....	10
第二章 パーキンソン症候群に関連する副作用データベースの調査.....	12
第一節 パーキンソン様事象.....	12
第二節 Volcano plot による医薬品の観察.....	14
第三節 薬剤性パーキンソニズムと性差について.....	20

本論

第一章 生薬ニンジンの神経保護作用について.....	24
第一節 生薬ニンジン.....	25
第二節 生薬ニンジンの薬理効果について.....	28
第三節 生薬ニンジン代謝産物の ER α 活性作用の検証.....	30
第四節 エストロゲン受容体.....	32
第二章 PPD, PPT の ER における分子相互作用に関する研究.....	33
第一節 目的.....	33
第二節 方法.....	34
第三節 ER α 活性を持つ医薬品および天然化合物について.....	37
第四節 ドッキングシミュレーションの解析手法.....	40
第五節 結果.....	41

第一項 E2 結合モデルとの分子相互作用の結果.....	41
第二項 DES 結合モデルとの分子相互作用の結果.....	46
第三項 GEN 結合モデルとの分子相互作用の結果.....	46
第四項 RES 結合モデルとの分子相互作用の結果.....	50
第五項 RAL 結合モデルとの分子相互作用の結果.....	50
第六節 考察.....	54
第七節 小括.....	56
第三章 ER α 増殖活性作用の検証.....	57
第一節 目的.....	57
第二節 方法.....	57
第三節 結果.....	58
第四節 考察.....	59
第五節 小括.....	61
第四章 生薬ニンジン代謝産物投与時の遺伝子発現プロファイ ル.....	62
第一節 目的.....	62
第二節 方法.....	62
第三節 結果.....	64
第四節 考察.....	70
第五節 小括.....	71
総括.....	73
結語.....	76
参考文献.....	77

略語一覽

95% CI	95% Confidence Interval
Abs	Absorbance
DAVID	Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery
DES	Diethylstilbestrol
DIP	Drug-Induced Parkinsonism
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
E2	Estradiol
ER	Estrogen Receptor
ER α Activity	Estrogen Receptor Alpha Activity
ER β	Estrogen Receptor Beta
FBS	Fetal Bovine Serum
FPKM	Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Mapped Reads
GEN	Genistein
GRb ₁	Ginsenoside Rb ₁
GRg ₁	Ginsenoside Rg ₁
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
JADER	Japanese Adverse Drug Event Report Database
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LBD	Ligand-Binding Domain
MCF-7	Human Breast Cancer Cell Line Michigan Cancer Foundation-7
MedDRA/J Ver.25.0	Medical Dictionary for Regulatory Activities/Japanese version
MOE	Molecular Operating Environment
NIH	National Institutes of Health
PD	Parkinson's Disease
PDB	Protein Data Bank
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
PPD	20(<i>S</i>)-Protopanaxadiol
PPT	20(<i>S</i>)-Protopanaxatriol
PS	Parkinsonian Syndrome
PT	Preferred Terms
RAL	Raloxifene
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RES	Resveratrol
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA-seq	RNA sequencing
ROR	Reporting Odds Ratio
SMQ	Standardized MedDRA Query

序論

第一章 パーキンソン症候群の背景

第一節 パーキンソン症候群の病態

パーキンソン症候群(PS)は、パーキンソン病(PD)と類似の運動緩慢、振戦、筋強剛を中心とした病態を呈する疾患群である。PDは、中脳にある黒質線条体のドーパミン神経が変性または脱落することにより発症する神経変性疾患で、運動緩慢、振戦、筋固縮を中心とした運動症状を特徴とする。また、日本での有病率は0.1~0.18%と推定され、発症には加齢が関与するとされている。¹⁾一方、PDとは異なる原因や特徴を持ちながら、類似した症状を呈する病態を総称してPSといい、様々な要因によって発症する。PSの原因として多系統萎縮症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症などの神経変性を原因とする疾患や、脳血管性パーキンソニズム、正常圧水頭症などの血流障害が原因と推定される疾患が該当する。さらには二次性パーキンソニズムのような外傷や毒素、環境要因などを原因とする病態もパーキンソン病と類似した症候を示し、PSに該当する。中でも、医薬品の副作用が原因となるものを薬剤性パーキンソニズム(DIP)という。

第二節 薬剤性パーキンソニズムの現状

DIPは抗精神病薬によるドーパミンD₂受容体遮断作用が原因で引き起こされることが知られている。²⁾黒質線条体のドーパミン神経において、ドーパミン受容体遮断作用によりドーパミン分泌量が低下することがDIP発症の原因となる。DIPの障害は通常、不随意運動を制御する運動ネットワークの一部である錐体外路運動系の病変または機能不全から生じ、上述の運動機能障害を引き起こす。DIPでの運動機能障害は、

安静時振戦，固縮，および動作緩慢という典型的な症状を特徴とする.³⁾統合失調症の薬物治療に用いられる抗精神病薬は，必要量の医薬品を効果と副作用のバランスを取りながら使用することで，陽性症状や陰性症状などの精神症状を軽減し，再発予防や社会的機能の回復を目指す．しかしながら，統合失調症患者の約 30%において，抗精神病薬に対する効果が不十分であることが報告されており，²⁾陽性症状の改善を求めて臨床医は医薬品の高用量処方や複数の医薬品の併用に依存する可能性が高い.⁴⁾以上の治療実態から抗精神病薬使用により副作用が出現しやすくなっている状況が推定される．また，抗精神病薬の使用においてはドーパミン D₂ 受容体への親和性が高い医薬品ほど DIP の発症リスクが高いことが報告されている.⁵⁾しかし，DIP の治療には原因医薬品の減量若しくは一時的中止以外の選択肢は無い．さらに，多くの DIP 症例においては原因医薬品の中止後も症状が長期間続く．DIP は潜在的なパーキンソン病を顕在化させる可能性があることも報告されている.⁶⁾DIP は，患者の QOL を著しく低下させるだけでなく，多様な合併症のリスクを高め，PD との鑑別も困難であり，治療選択肢が限られていることから，適切な対応が遅れると重症化しやすい．さらに，多剤併用の影響や症状の可逆性が患者ごとに異なるため，治療が困難となることが課題となっている.⁷⁾そのため，DIP の早期発見と対策の確立が極めて重要である．

第三節 重篤副作用疾患別対応マニュアル

DIP は、薬物治療に関連する重篤な副作用の一つであり、厚生労働省が発行する「重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬剤性パーキンソニズム」においても、その重要性が強調されている。DIP の症状は、パーキンソン病に類似した振戦、筋強剛、動作緩慢などを呈し、特に高齢者では転倒や日常生活動作の低下につながることから、患者の生活の質(QOL)を著しく損なう。直接的な死因となることは稀であるものの、ADL の低下や合併症のリスク増加を通じて、結果的に生命予後にも影響を及ぼす可能性がある。重篤副作用疾患別対応マニュアルには DIP を引き起こす可能性のある医薬品が一覧として掲載されており（表1）、臨床現場における注意喚起に役立てられている。

しかしながら、これらの薬剤がどのような作用機序により DIP を引き起こすのかについては、未だ十分に解明されていない点も多い。また、未知のドーパミン D₂ 受容体遮断が関与する薬剤、ドーパミン D₂ 受容体遮断薬との構造類似薬、それ以外の機序による DIP に関連しうる薬物などが新たな DIP を引き起こす可能性がある。

そのため、DIP に関連しうる広範な医薬品の系統を明らかにするために、医薬品の網羅的な解析を行うことが重要だと考える。DIP の発症メカニズムに関する理解を深め、副作用予測や安全な薬物使用につながる手がかりを得ることが求められている。

表 1. 薬剤性パーキンソニズムを起こす可能性のある医薬品

分類	一般名
第一世代抗精神病薬	ハロペリドール
	フルフェナジン
	ペルデナジン
	クロルプロマジン
第二世代抗精神病薬	クロザピン
	オランザピン
	リスペリドン
	クエチアピン
	スルピリド
	アリピプラゾール
制吐剤	メトクロプラミド
ドーパミン低下薬剤	レセルピン
その他	リチウム
	バルプロ酸
	選択的セロトニン再取り込み阻害薬

第四節 医薬品副作用データベース

独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)の医薬品副作用データベース(JADER)は、2004年4月1日に施行された改正薬事法に基づき、医薬品の副作用情報を収集・分析し、医薬品の適正使用と公衆衛生の向上を目的として構築された。JADERは製薬企業や医療機関からPMDAへ報告された副作用情報をもとに構築されており、医薬品の安全性評価に重要な役割を果たしている。本データベースはPMDAのウェブサイトを通じて一般に公開されており、ダウンロードして利用することが可能である。JADERにおける各々の症例のデータは、報告項目別に「症例一覧テーブル」、「医薬品情報テーブル」、「副作用テーブル」、「原疾患テーブル」の4種に分割されたCSVデータファイルとして取得できる(図1)。⁸⁾「医薬品情報テーブル」において医薬品は被疑薬、併用薬、相互作用薬のいずれかに分類される。また、「副作用テーブル」の副作用語は、医薬品規制調和国際会議(International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH)により定められた国際医薬用語集日本語版(Medical Dictionary for Regulatory Activities/Japanese version; MedDRA/J)における基本語(Preferred Terms; PT)として登録されている。⁹⁾

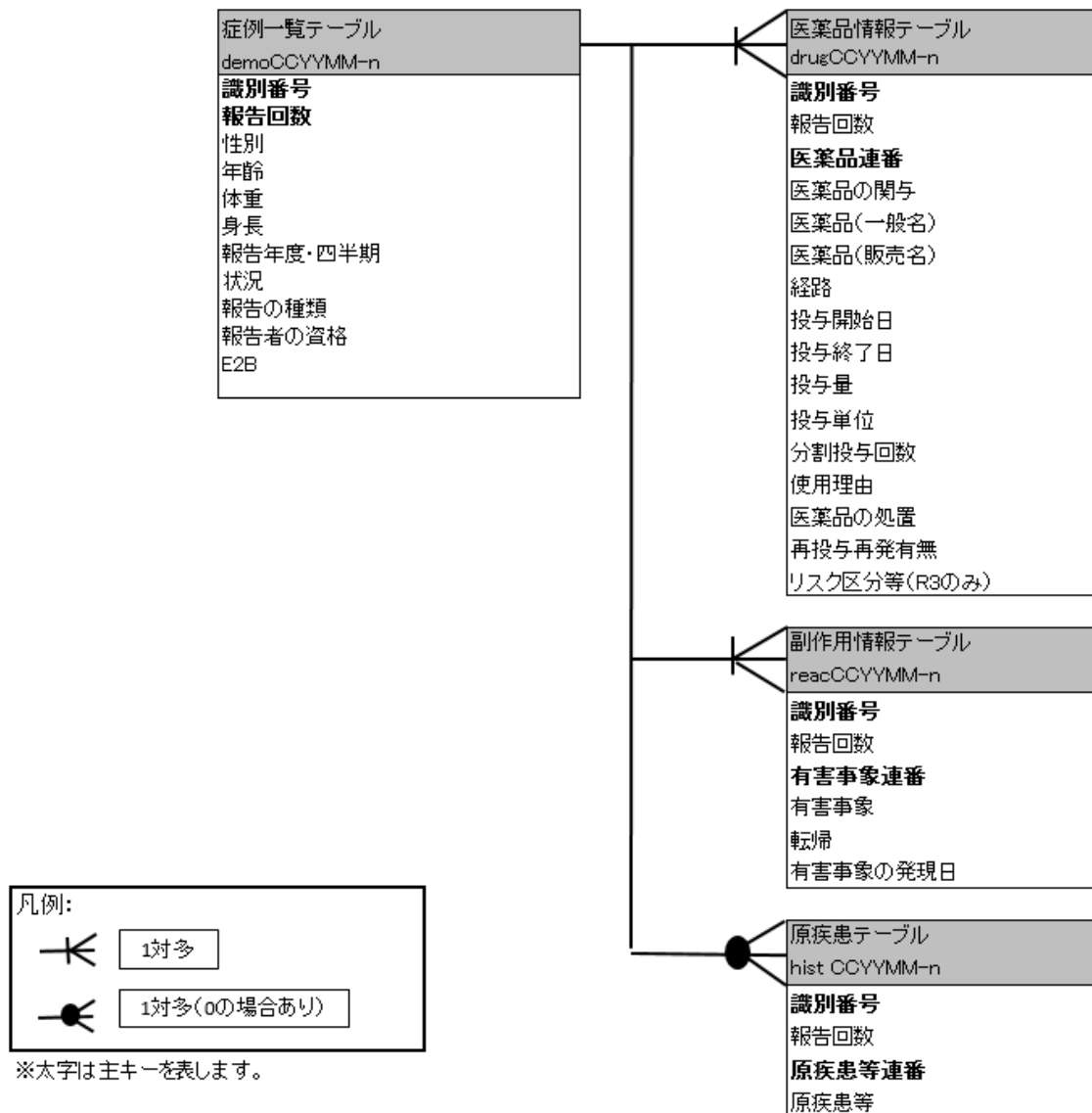


図 1 . JADER のエンティティ関連図

第二章 パーキンソン症候群に関連する副作用データベースの調査

前述の通り、PMDA が作成する「重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬剤性パーキンソニズム」では、DIP を引き起こす可能性のある多様な医薬品が症例報告とともに示されている。一方で、これらの医薬品が DIP を発症させる詳細なメカニズムについては、現時点で十分に解明されているとは言いがたい。

本研究では、DIP と関連する医薬品の傾向を把握するための仮説生成手段として JADER を用いた。JADER は自発報告に基づくものであり、因果関係の証明には適さないが、統計的傾向を通じて DIP を誘発する可能性のある医薬品の候補を抽出する手がかりを得ることができる。本章では、JADER を用いた解析により、DIP の報告例に関する統計的検討を行い、関連が推定される医薬品を抽出・評価した。そこで、JADER を用いた解析を通じて、DIP の報告例を統計的に検討し、DIP を誘発すると推定される医薬品と実際の PS 発症の関連性について評価を行った。¹⁰⁾

第一節 パーキンソン様事象

JADER には DIP に関連する多数の副作用語が登録されている。MedDRA における標準検索式(Standardized MedDRA Query; SMQ)において、パーキンソン様事象は特発性パーキンソン病の症状と同様の臨床的特徴を有すると定義される。⁷⁾本研究では、MedDRA/SMQ の『パーキンソン様事象』(狭義)に含まれる 18 の基本語(PT)を DIP 関連副作用と定義した。そのうち、JADER での報告件数が 50 件以上であった 9 つの PT を解析対象とした (表 2)。

表 2. 薬剤性パーキンソニズムとして定義された解析対象副作用語

副作用語	報告件数
パーキンソニズム	5007
パーキンソン病	1891
筋固縮	923
無動	482
運動緩慢	480
オンオフ現象	187
パーキンソン歩行	183
筋緊張亢進	165
安静時振戦	63

第二節 Volcano plot による医薬品の観察

分析用データテーブルの作成にあたっては，JADER を構成する医薬品情報(DRUG)テーブル（3,274,834 レコード），副作用情報(REAC)テーブル（1,257,971 レコード），および患者基本情報(DEMO)テーブル（872,822 レコード）から解析用情報を抽出した．症例識別番号を介してこれらのテーブルを結合した．すなわち，症例識別番号とともに医薬品名，副作用語（PT），性別，および年齢に関する情報を各テーブルから抽出し，重複排除することによって解析用テーブルを作成した．最終的に 6,618,979 レコードからなる解析用テーブルが構築された（図 2）．

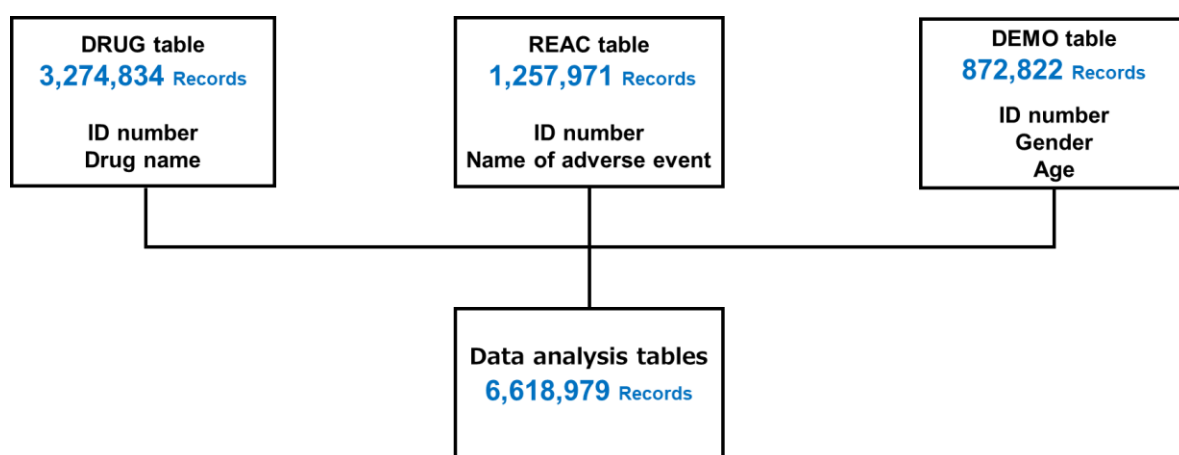


図 2．分析用データテーブルの作成

JADERを用いたシグナル検出では、不均衡分析に基づく解析手法を使用し、シグナル検出指標として報告オッズ比(Reporting Odds Ratio; ROR)を算出した。まず、RORの計算のために、解析用データテーブルにおける注目する医薬品のレコード数とそれ以外の医薬品のレコード数、および注目する副作用のレコード数とそれ以外の副作用数のレコード数から2×2分割表を作成した(表3)。この分割表からRORを計算することによって、注目する医薬品と注目する副作用の関連を推定することができる。¹¹⁾また、RORの計算において2×2 分割表のセルに0が入ることによる計算の発散を回避し、度数の小さい推定を修正するために全てのセルに0.5を加える補正(Haldane-Anscombe 1/2 correction)を実施した。¹²⁾

表 3 . 報告オッズ比の計算式

	注目する副作用	それ以外の副作用
注目する医薬品	a	b
それ以外の医薬品	c	d

$$ROR(\text{Reporting Odds Ratio}) = (a/b)/(c/d)$$

本研究では、報告された全医薬品と DIP との関連性を推定するために Volcano plot¹³⁾を作成することにより、そのシグナル検出指標の強度を俯瞰的に評価した（図 3）。Volcano plot においては、ROR の自然対数値(lnROR)を X 軸、Fisher の直接正確検定による P 値の常用対数を符号反転した値 ($-\log [P \text{ 値}]$) を Y 軸とした散布図で示した。散布図においては、X 軸正方向ほど注目する医薬品の ROR が大きいことから、DIP に対する明確なシグナルが検出されたことを示す。一方、Y 軸正方向ほど P 値が小さくなることから、統計的信頼性の高い ROR を伴う医薬品であることを示唆する。

DIP に対する JADER に掲載された全医薬品のシグナルを描画した Volcano plot において、シグナル検出領域、すなわち P 値が 0.05 未満であり、lnROR が 0 より大きい右上の領域には、161 種類の医薬品が検出された。これらの医薬品には抗精神病薬に加え、ベンゾジアゼピン系薬を含む多様な医薬品が認められた。さらに、 P 値が 10^{-30} 未満であり、lnROR が 1.5 より大きい、特に強いシグナルを示した 14 種類の医薬品について、表 4 に示した。161 種の医薬品には、統合失調症治療薬（31 種）、抗うつ薬（15 種）、睡眠・鎮静薬（14 種）、泌尿器科用薬剤（8 種）など、多様なカテゴリが含まれていた。これらにはドーパミン D_2 受容体に作用するだけでなく、GABA 受容体やセロトニン受容体も標的とする作用機序を持つ医薬品が含まれていることから、DIP の発症には広範な薬理学的影響が関与する可能性が考えられる。さらには、未知のドーパミン D_2 受容体遮断作用や構造類似薬などが DIP 発症の関連因子になり得ると考えられる。¹⁴⁾

次に、DIP の発症頻度が高いと推定される医薬品（表 4 に示す 14 種）の特徴について検討した。そのうち、スルピリド、アリピプラゾール、リスベリドン、およびクエチアピンフマル酸塩の ROR（95%信頼区間：CI）はそれぞれ 20.10(17.87–22.60), 10.44(8.88–12.28), および 8.50(7.38–9.79), 6.68(5.63–7.93)と高い値を示した。これら 4 剤はいずれも DIP との関連性が統計的に強く示唆され、かつ報告件数が 10,000 件を超えており、日常診療において使用頻度が高い薬剤でもあることから、DIP のリスク管理上、特に注意を要する医薬品であると考えられる。表 1 に示した DIP を起こす可能性のある医薬品には該当しないものの、表 4 に列挙された医薬品の中で強いシグナルを示したのは、ブロナンセリン、ミルタザピン、クロナゼパム、およびフルニトラゼパムであり、それぞれの ROR(CI)は、11.13(8.37–14.78), 6.90(5.39–8.84), 5.56(4.56–6.79), および 5.03(4.28–5.92)であった。

DIP は原因医薬品の中止後も症状が長期間持続することや潜在的な PD を顕在化させる可能性があることが指摘されている。¹⁵⁾PD の病理学的特徴として、黒質線条体のドーパミンニューロンの変性が広く知られているが、ノルアドレナリン、セロトニン、アセチルコリンなどの他の重要な中枢神経伝達物質系にも影響が及んでいることが報告されている。¹⁶⁾また、Cremer らはドーパミン作動性ニューロンが大幅に減少し、パーキンソン病の運動症状と類似する症状を示す Pitx3 遺伝子が欠損したマウスモデルにおいて、黒質のドーパミンニューロンが著しく減少すると、GABA 受容体の変化が顕著であったことを示した。¹⁷⁾さらに、Huot らによる研究では運動症状と非運動症状の両

方にセロトニン系が複雑に関与していることが報告されている。¹⁸⁾ 加えて、Rinne らは PD 患者の脳内において、黒質での GABA 受容体結合の減少を観察した。¹⁹⁾ これらの知見は、DIP がドーパミン D₂ 受容体遮断作用だけに起因するのではなく、GABA およびセロトニン受容体を標的とする医薬品によっても影響を受ける可能性を支持している。

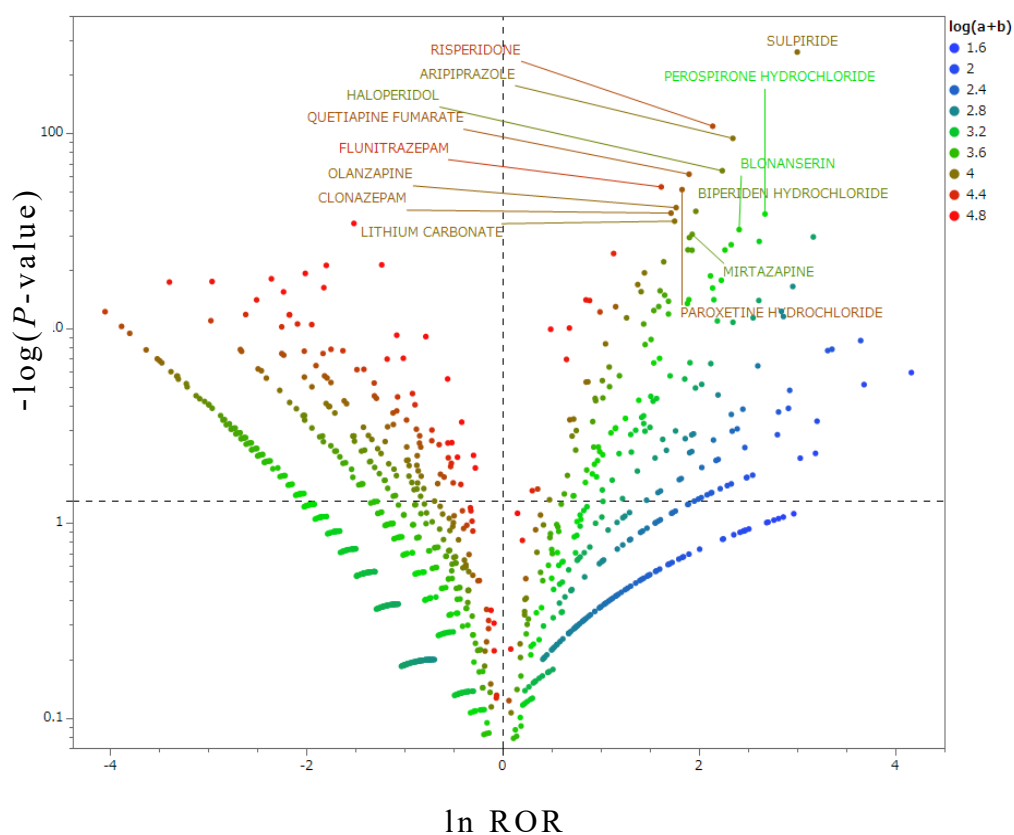


図 3．薬剤性パーキンソニズムが推定される医薬品の観察

表 4. 薬剤性パーキンソニズムの誘発が推定される医薬品例

医薬品	報告オッズ比（95%信頼区間）	薬理作用
スルピリド	20.10(17.87～22.60)	D ₂ 受容体アンタゴニスト
ペロスピロン塩酸塩	14.48(10.95～19.14)	D ₂ 受容体アンタゴニスト，5-HT ₂ 受容体アンタゴニスト
ブロナンセリン	11.13(8.37～14.78)	D ₂ 受容体アンタゴニスト，5-HT ₂ 受容体アンタゴニスト
アリピプラゾール	10.44(8.88～12.28)	D ₂ 受容体と 5-HT _{1A} 受容体部分アゴニスト，5-HT _{2A} 受容体アンタゴニスト
ハロペリドール	9.37(7.75～11.32)	D ₂ 受容体アンタゴニスト
リスペリドン	8.50(7.38～9.79)	D ₂ 受容体アンタゴニスト，5-HT ₂ 受容体アンタゴニスト
ビペリデン塩酸塩	7.16(5.75～8.91)	ムスカリン型アセチルコリン受容体アンタゴニスト
ミルタザピン	6.90(5.39～8.84)	5-HT ₂ 受容体，5-HT ₃ 受容体アンタゴニスト，アドレナリン受容体のアンタゴニスト
クエチアピソマル酸塩	6.68(5.63～7.93)	D ₂ 受容体アンタゴニスト，5-HT ₂ 受容体アンタゴニスト
パロキセチン塩酸塩	6.22(5.19～7.47)	選択的セロトニン再取り込み阻害剤
オランザピン	5.86(4.81～7.13)	D ₂ 受容体アンタゴニスト，5-HT ₂ 受容体アンタゴニスト
炭酸リチウム	5.77(4.66～7.13)	ノルアドレナリン作動系，ドーパミン作動系，セロトニン作動系が複合的に作用
クロナゼパム	5.56(4.56～6.79)	GABA _A 受容体のアゴニスト
フルニトラゼパム	5.03(4.28～5.92)	GABA _A 受容体のアゴニスト

第三節 薬剤性パーキンソニズムと性差について

次に、薬剤性パーキンソニズム発症における性差の特徴を明らかにするために JADER を用いた統計解析を実施した。その結果、パーキンソン様事象の症状を呈した患者群において、年齢層に着目すると、40 歳以上では 40 歳未満の 1.562 倍、70 歳以上では 1.524 倍の報告割合の増加が認められた。これらの結果には統計的に有意な関連が示され ($P < 0.0001$)、加齢が DIP 発症リスクの上昇と関連する可能性が示唆された。これは、65 歳以上の PD の年間発症率が約 0.16%、有病率が約 0.95% と高いことが報告されている事実と一致する。²⁰⁾

さらに、性差に着目すると、パーキンソン様事象の症状を呈した患者群において、女性は男性に比べて 1.287 倍高い報告割合を示し、この差は統計的に有意であった ($P < 0.0001$) (表 5)。この結果は、PD の発症率および有病率において女性が高いことを示唆する先行報告とも一致する。²¹⁾

女性における年齢別の副作用報告割合を解析したところ、平均閉経年齢である 50 歳以降において DIP の ROR が年齢とともに増加する傾向が認められた (図 4)。この観察結果より、閉経後の女性では医薬品の影響により DIP を発症する割合が高い可能性が示唆された。

以上の結果は、加齢および性差と DIP リスクとの関連が、PD に関する疫学調査報告と整合していることを示している。特に、閉経後女性における DIP リスクの上昇は、女性ホルモンであるエストロ

ゲンが PD 発症の抑制に関与している可能性を示唆する。実際、エストロゲンは黒質線条体のドーパミンニューロンに対して神経保護作用をもたらし、PD における神経変性の抑制に寄与する可能性が報告されている。²²⁾したがって、エストロゲン分泌が保たれている 50 歳未満の女性では、その神経保護作用の恩恵を受けることにより、DIP や PD の発症率が低くなると考えられる。

薬剤性パーキンソニズの発症を考えた場合、閉経後はエストロゲン分泌の減少にともない神経保護作用が弱くなるため、それが原因となって医薬品の影響を受けやすくなる。その結果、年齢依存的に薬剤性パーキンソニズムの割合が増加していると推察される。動物実験でも、老化による神経損傷が医薬品による神経毒性に対する感受性に影響を与える可能性が示されている。Imam らは、ラットにおいてメタンフェタミンがドーパミン作動性神経毒性を誘発し、加齢によってこの毒性に対する感受性が増加することを報告している。²³⁾Brewer らは老齢ラットの神経細胞が若年ラットよりも乳酸、グルタミン酸、 β アミロイドの毒性に対して感受性が増加することを実証している。²⁴⁾これらのことより、高齢者の神経は脆弱なため、DIP の病態が医薬品の影響下において PD を顕在化させる可能性があることが推察される。

表 5. 薬剤性パーキンソニズム発症における性差の特徴

患者背景		薬剤性パーキンソニズム 発症 有 (1,472)	薬剤性パーキンソニズム 発症 無 (695,733)	オッズ比	95% 信頼区間	<i>P</i> 値 (Fisher's 正確検定)
Age	≧ 40years old	1,307/1,472	581,156/695,733	1.562	1.328~1.836	<0.0001
	<40years old	165/1,472	114,577/695,733			
	≧ 70years old	761/1,472	287,019/695,733	1.524	1.376~1.688	<0.0001
	<70years old	711/1,472	408,714/695,733			
Sex	Female	812/1,472	340,077/695,733	1.287	1.161~1.426	<0.0001
	Male	660/1,472	355,656/695,733			

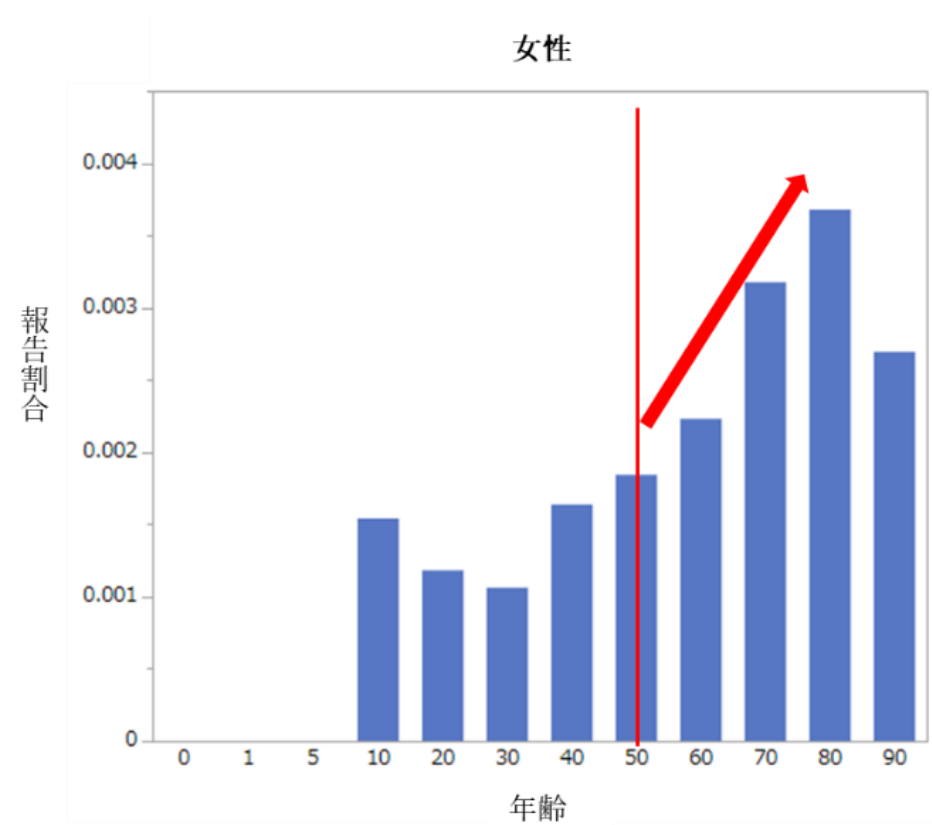
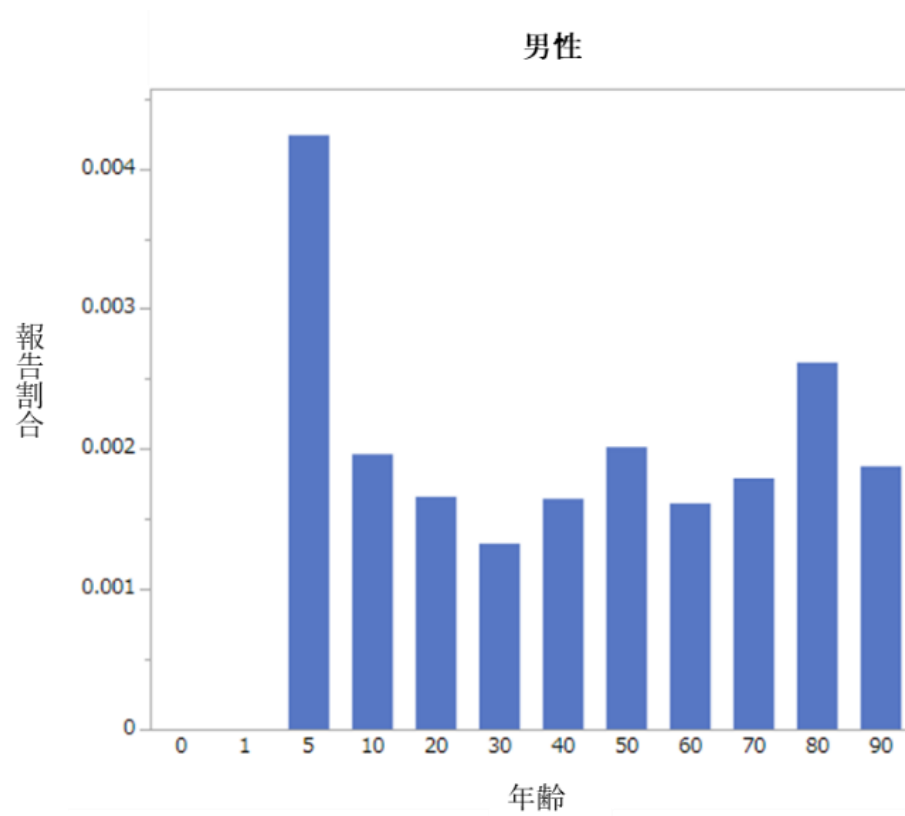


図４．年齢層における薬剤性パーキンソニズムの報告割合

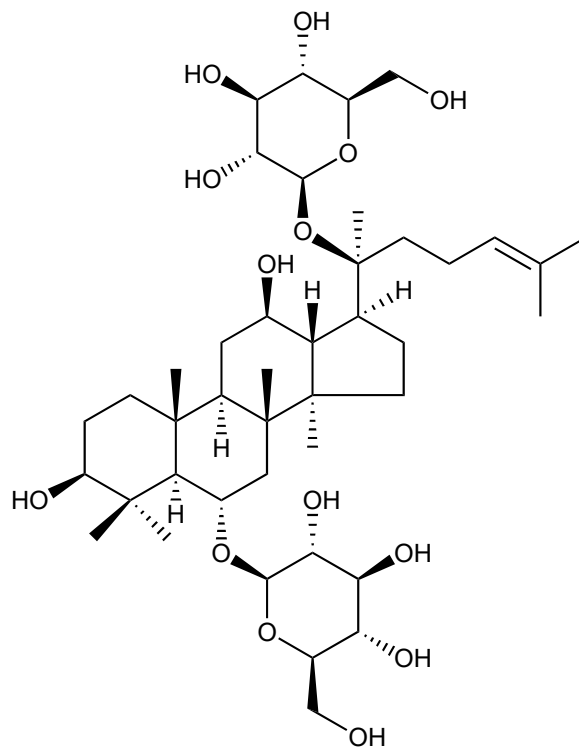
本論

第一章 生薬ニンジンの神経保護作用について

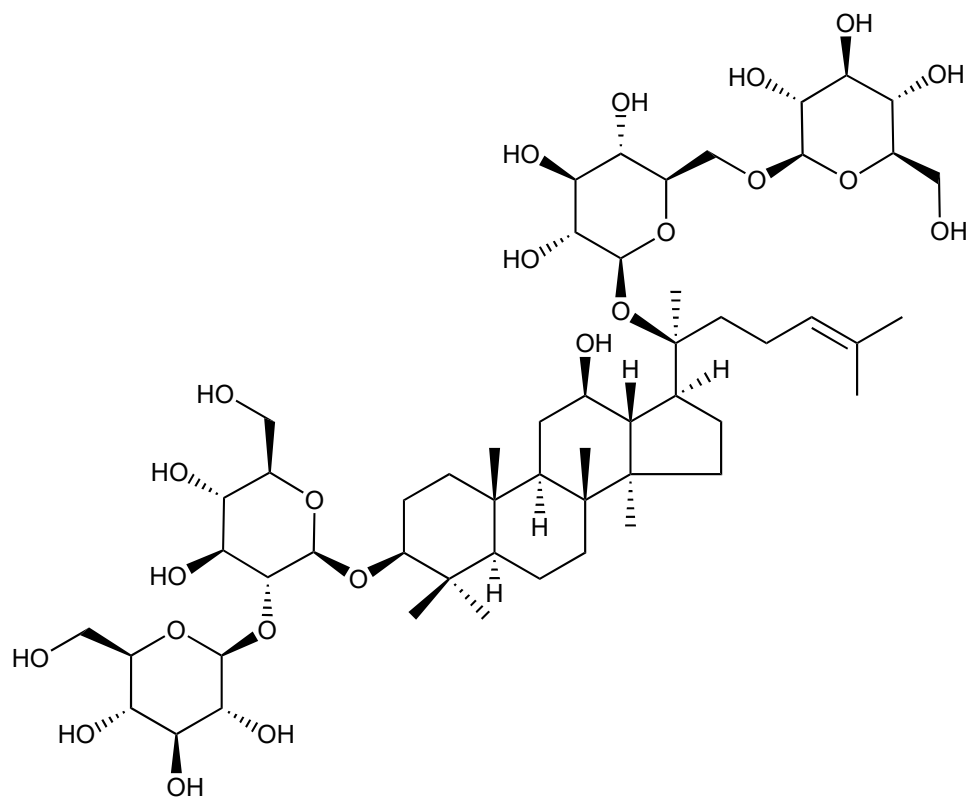
序論，第二章，第三節で述べたように JADER を用いた解析により，医薬品によって誘発される PS(DIP)において，エストロゲンによる神経保護作用が発症抑制に関与する可能性があると考えた．DIP の原因として一般的に認知されているドーパミン D₂ 受容体遮断薬に加え，GABA 受容体やセロトニン受容体に作用する医薬品，さらに中枢神経系に作用する薬理作用をもつ医薬品の関与が推定された．さらに，女性の閉経後以降で DIP の報告割合が年齢依存的に増加することよりエストロゲンによる神経保護作用の低下と DIP 発症が関連している可能性が推察された．これらの知見により，中枢神経系における各種薬物受容体の機能攪乱や，閉経による女性ホルモン低下による神経保護作用の減弱が DIP 発症の関連因子である可能性を推察した．すなわち，エストロゲンの神経保護作用は DIP を含む PS の治療薬に有用な標的になると考えた．そこで，性ホルモン受容体を活性化する可能性が推測されている生薬ニンジンに着目し，PS に対するエストロゲン受容体を介した神経変性の改善効果について研究した．

第一節 生薬ニンジン

生薬ニンジンは、ウコギ科のオタネニンジン *Panax ginseng* C. A. Meyer (*Panax schinseng* Nees)(*Araliaceae*)の細根を除いた根、或いはこれを軽く湯通ししたものである。ニンジンは多数のギンセノシド類を含有し、主成分としてギンセノシド $Rg_1(GRg_1)(C_{42}H_{72}O_{14} : 801.01)$ (図 5 A) 0.10%以上、及びギンセノシド $Rb_1(GRb_1)(C_{54}H_{92}O_{23} : 1109.29)$ (図 5 B) 0.20%以上を含むことが第 18 改正日本薬局方によって規定されている。GR g_1 と GR b_1 は配糖体であり、摂取後に消化管内の酵素や腸内細菌の働きによって加水分解されて、アグリコンである 20(*S*)-プロトパナキサトリオール(PPT) (図 6 A) と 20(*S*)-プロトパナキサジオール(PPD) (図 6 B) となることが知られている。²⁵⁻²⁶⁾

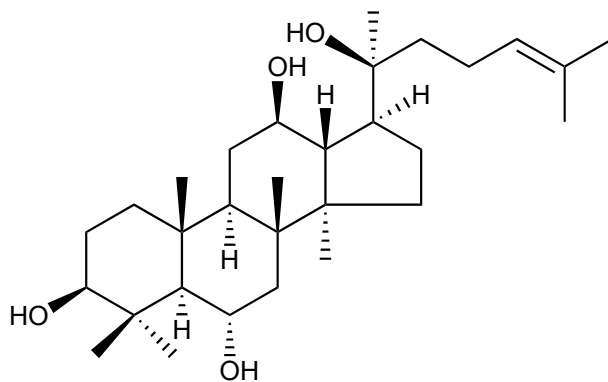


A. ギンセノシド Rg₁

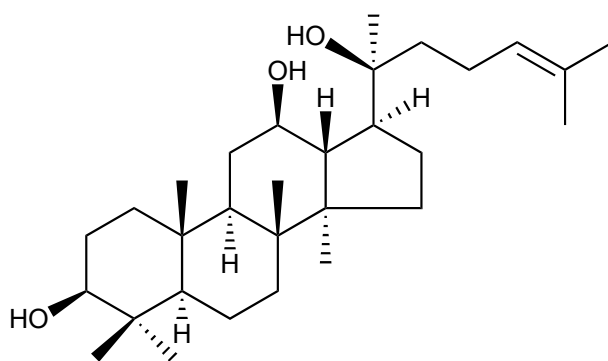


B. ギンセノシド Rb₁

図 5 . 生薬ニンジンの主成分であるギンセノシドの構造



A.20(*S*)-プロトパナキサトリオール (PPT)



B.20(*S*)-プロトパナキサジオール (PPD)

図 6 . ギンセノシド Rg₁ 及び Rb₁ 由来代謝物の構造

第二節 生薬ニンジンの薬理効果について

生薬ニンジンには、生殖系、中枢神経系、結腸、肺、腎臓、心血管系、免疫系などに対する多岐にわたる薬理効果が報告されている。²⁷⁾中でも、中枢神経系における効果として、神経変性疾患であるアルツハイマー病における生薬ニンジンの有効性を示した例を次に示す。アルツハイマー病患者が生薬ニンジン粉末（4.5 g/日）を12週間服用した研究では、ニンジン服用群(n=58)と対照群(n=39)に無作為に割り当てミニメンタルステート検査(MMSE)およびアルツハイマー病評価スケール(ADAS)を使用して評価した結果、ニンジン服用により成績が向上することが示唆された。²⁸⁾また、中等度のアルツハイマー病患者が生薬ニンジンを24週間服用した研究では、同様の認知機能テスト（MMSE および ADAS）で成績が向上し認知機能に有効性が示された。²⁹⁾一方、動物実験や細胞実験では、神経保護作用などの効果が報告されている。ギンセノシド Rd は細胞増殖や生存分化に関わる重要な役割を担う MAPK/ERK および PI3K/AKT 依存性経路を介して PC12 細胞の神経突起成長を促進した。³⁰⁾生薬ニンジン成分であるギンセノシド Rg₃ はミトコンドリア機能障害を改善することによってアルツハイマー病モデルラットの認知障害を防ぐことが示された。³¹⁾GRg₁ は酸化ストレスによる神経毒性に対して保護効果があることが報告された。³²⁻³³⁾多数のギンセノシド類にはエストロゲン様作用があるといわれ、研究者の間で活発な議論を呼んでいる。ギンセノシド類がエストロゲン受容体にどのように作用するのかについて、詳細なメカニズムは完全には解明されていない。ギンセノシド類のエストロゲン様作用が、エストラジオールと比べてどの程度の強さを持つのかについては依然として明らかではない。エストロゲン受容体を介した直接的な作用が報告さ

れている一方で、受容体非依存的なエストロゲン様作用の可能性も示唆されている。³⁴⁻³⁶⁾

第三節 生薬ニンジン代謝産物の ER α 活性作用の検証

序論，第二章，第三節で述べたように，JADER を用いた解析により，閉経後の女性において DIP の発症頻度が高いことが示された．この結果は，女性ホルモンであるエストロゲンが PD の発症を抑制する神経保護作用を有している可能性を示唆している．これを踏まえると，医薬品によって誘発される PS においても，エストロゲンの神経保護作用が発症抑制に寄与している可能性が考えられた．一方，エストロゲンの神経保護作用は広く知られているが，長期使用により乳がん，血栓症，心血管疾患などのリスクを増加させる可能性が指摘されている．特に，ホルモン補充療法では心血管疾患や脳卒中のリスクが治療の利益を上回る可能性がある．³⁷⁾そこで本研究では，より安全な代替アプローチとして，古くから薬用植物として利用され，エストロゲン様作用が報告されている生薬ニンジンに着目した．生薬ニンジンにはエストロゲン様作用や神経保護作用が期待されている一方で，エストロゲンとは異なり含有成分であるギンセノシドが血小板凝集を抑制し，血栓形成を防ぐ効果があることが報告されている．³⁸⁾

本研究では，JADER の解析結果を基に PS の発症リスクを低減する新たな治療戦略の一環として，生薬ニンジンの効果を検証することを目的とした．生薬ニンジンの主成分であるギンセノシド類は配糖体として存在し，腸管吸収率が低いことが予想される．消化管内の酵素や腸内細菌の働きによって加水分解されることで，アグリコンである PPD, PPT へと変換され吸収される．しかし，PPD 及び PPT に関する知見は限られており，これらの化合物が ER α アゴニストあるいはアンタゴニストとして ER α とどのように相互作用するかについての報告は極めて少ない．近年，PPD お

よび PPT の ER α との相互作用が研究され始めたものの，これらの化合物の生物学的活性に関する研究の多くは，ヒト癌細胞における増殖抑制作用を中心に報告されている.³⁹⁻⁴¹⁾

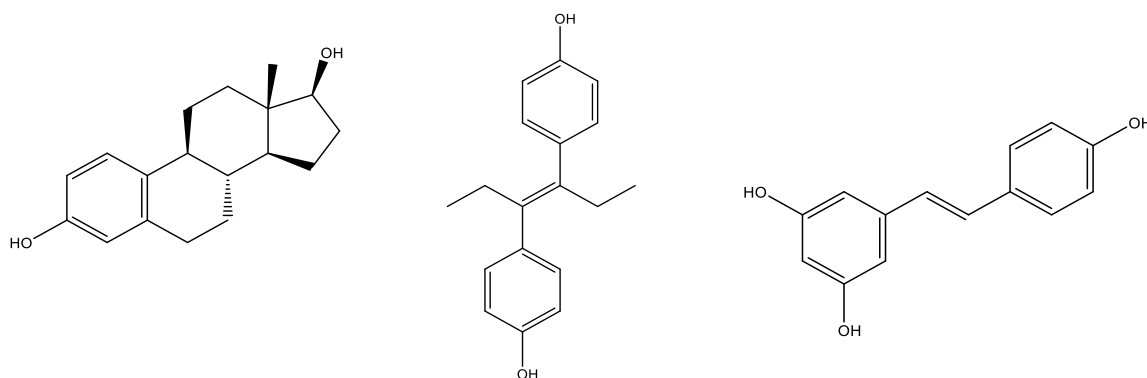
第四節 エストロゲン受容体

エストロゲン受容体(ER)は核内受容体スーパーファミリーに属し、 $ER\alpha$ および $ER\beta$ の 2 つのアイソフォームに分類される。中枢神経系におけるエストロゲンの作用は、脳神経保護、認知機能、感情制御、および神経疾患の発症・進行に関与している。エストラジオール(E2)は女性の体内で自然に産生される主要なエストロゲンであり、細胞内でのエストロゲンシグナル伝達を担う。ER は E2 と結合することで活性化され、ホモ二量体($ER\alpha$ - $ER\alpha$, $ER\beta$ - $ER\beta$)または、ヘテロ二量体($ER\alpha$ - $ER\beta$)を形成する。⁴²⁻⁴³⁾その後、核内へ移行し DNA 上のエストロゲン応答エレメント(ERE)に結合することで標的遺伝子の転写を活性化し、生理機能の発現を促す。⁴⁴⁾

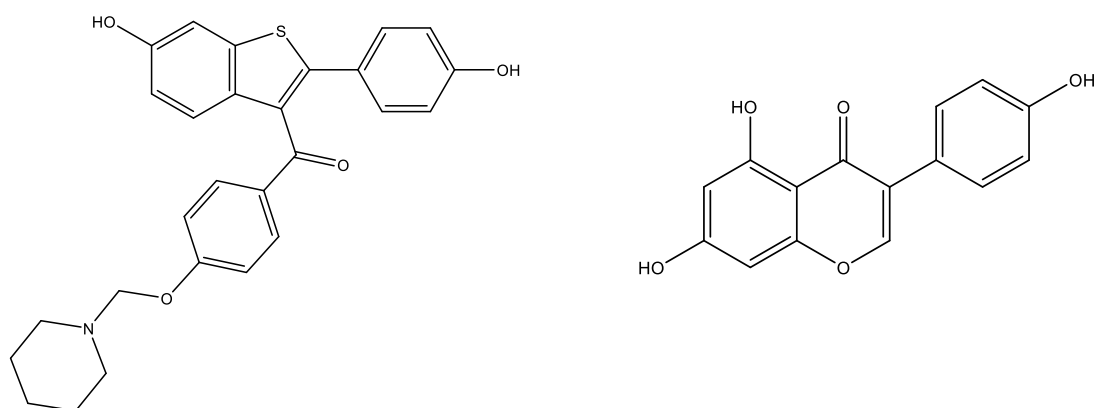
第二章 PPD, PPT の ER における分子相互作用に関する研究

第一節 目的

ER は、核内受容体スーパーファミリーに属し、エストロゲンシグナルの調節を担う転写因子である。ER の活性化には、分子相互作用が重要であり、リガンド依存的なコンフォメーション変化が誘導されることで、転写活性が駆動される。そこで、ER α に対してエストロゲン作用を示す以下の 5 つの代表的な化合物（図 7）に注目し、PPD と PPT の薬理作用を検証するため、ER α との分子相互作用を *in silico* 解析によって評価した。⁴⁵⁾



A. Estradiol(E2) B. Diethylstilbestrol(DES) C. Resveratrol(RES)



D. Raloxifene(RAL)

E. Genistein(Gen)

図 7. ER α に対して薬理作用を示す化合物の構造式

第二節 方法

PPD と PPT における, $ER\alpha$ との分子相互作用解析の評価は, ドッキングシミュレーションの手法を用いて実施した. ドッキングシミュレーションは, タンパク質と低分子化合物 (リガンド) の結合様式について計算予測し, 相互作用を推定する手法である.

タンパク質構造は, 米国の Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) が公開する Protein Data Bank (PDB) から取得し, リガンドの化学構造は米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health : NIH) が提供する化学物質関連データベース (PubChem) から取得した.

PDB より, $ER\alpha$ の各種リガンドとの共結晶構造を取得した. 共結晶中のリガンドには, $ER\alpha$ アゴニストである E2 およびジエチルスチルベストロール (DES), 部分アゴニストであるレスベラトロール (RES), アンタゴニストであるラロキシフェン (RAL), さらに $ER\alpha$ アゴニストかつ $ER\beta$ アンタゴニストであるゲニステイン (GEN) が含まれていた. これらをそれぞれ, $ER\alpha$ アゴニスト, 部分アゴニスト, アンタゴニストの相互作用モデルとして使用した. 各リガンドと $ER\alpha$ の共結晶に関する PDB コードを表 6 に示す. さらに, E2, DES, RES, RAL, GEN, PPD, および PPT の $ER\alpha$ アゴニスト活性に関する情報は, PubChem BioAssay (AID 743077; AID 743075, AID 720687, AID 720685 , AID 720678 , および AID 720681) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743077>) に登録された定量的ハイスループットスクリーニングアッセイにおいて, 各化合物

の添加時により誘導された ER α の転写活性を指標として算出された PubChem 活性スコアに基づく数値である。なお、本スコア値の最大値と最小値はそれぞれ 100 と 0 であり、40 以上のスコア値の場合にアゴニスト活性を示す化合物と定義されている。⁴⁶⁾ リガンドの分子構造は SciFinder (<https://sso.cas.org/>) を使用して描画した (図 7)。

表 6. ER α 活性を持つ医薬品および天然化合物のリストとその薬理学的作用機序

化合物名	ER α 生物活性スコア	薬理学的活性	PDB コード
Estradiol	65.08	ER α agonist	1ERE
			1GWR
			3UUD
Diethylstilbestrol	84.50	ER α agonist	3ERO
Resveratrol	49.67	ER α partial agonist	4PP6
Raloxifene	53.00	ER α antagonist	1ERR
Genistein	51.67	ER α agonist	1X7R
		(ER β antagonist)	

第三節 ER α 活性を持つ医薬品および天然化合物について

E2 (図 7 A, 表 6) は, 女性の生殖機能や骨・心血管・神経系の健康を維持する重要なホルモンであり, ER α および ER β のどちらにも結合することが可能である. E2 の効果は ER を介した遺伝子発現調節によって発揮される. 構造的には, ステロイド骨格とフェノール性ヒドロキシ基が特徴的であり, これらにより ER との高い親和性を示す.

DES (図 7 B, 表 6) は, 合成非ステロイド性エストロゲンであり, 純粋なアゴニストとしての薬理作用を示す. DES と ER α の相互作用は E2 の場合と同様であり, 両側のフェノール性水酸基がアミノ酸残基と水素結合を形成する. DES のフェノール環の平面から垂直に突き出ているエチル基は, リガンド結合部位の空間に適合し, その結果, DES の受容体に対する親和性が増加する.⁴⁷⁾

RES (図 7 C, 表 6) は, ER α の部分アゴニストとして機能し, E2 と比較して弱いエストロゲン作用を示す (図 7 C, 表 6). 単一方向に結合する E2 とは異なり, RES は ER α のサブユニットに結合した方向によって, 受容体が活性化された状態または不活性化された状態を決定する.⁴⁸⁾これが, RES が部分アゴニスト活性を有し, 抗エストロゲン活性を有する理由であるとされている.⁴⁹⁾

RAL (図 7 D, 表 6) は, E2 と異なり転写活性を誘導せず, 抗エストロゲン作用を示す選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) である. RAL の抗エストロゲン作用は組織特異的であり, 生殖組織では E2 による細胞増殖効果を抑制する. 一方, 骨などの

他の組織ではエストロゲン様の有益な作用を維持することが報告されている.⁵⁰⁾これは、RALがER α に結合した際の構造変化、特にコアクチベーターの結合を調節するヘリックス 12(H12)の配置に影響を与えることに起因すると考えられる。RALはER α と結合することでH12の活性型配置を妨げ、コアクチベーターの結合を阻害するため、E2のような転写活性が誘導されない。組織によってERが関与する補助因子（コアクチベーターやコリプレッサー）の発現状況が異なるため、RALの作用が組織特異的になると考えられる。すなわち、抗エストロゲン作用を示す。一方、骨や心血管系ではERのコアクチベーターとの親和性が相対的に低く、H12の変位の影響を受けにくい。その結果、RALは骨密度の維持などの部分的なエストロゲン作用を発揮する.⁵⁰⁾

GEN（図7E、表6）は、ER α とER β に対する選択的拮抗作用を有する。ER α とER β の両方に同じ結合様式をとるものの、ER α に対する結合親和性はER β に比べてかなり低いことが示された。この違いは、ERの結合部位にあるアミノ酸残基のわずかな違いによって生じ、ER β を選択する要因となっている。即ち、GENの5位ヒドロキシル基(5-OH)はER α のMet421側鎖と比較するとER β のIle373側鎖とより良好な相互作用を形成し、ER α のMet421が硫黄(S)を含む側鎖を持つため、ER β のIle373（脂肪族側鎖）に比べて空間的に制限された配置をとるためである。この違いにより、GENのER β 選択性が約30倍向上する可能性が示唆された。さらに、ER α のLeu384が、ER β ではMet336に置き換わっていることも選択性

に影響を与えており，これらの要因を合わせると ER β 選択性は数百倍に達する可能性が考えられる.⁵¹⁾

これらの5種類の代表的な化合物は ER との間にそれぞれ異なる相互作用機序を有している．

第四節 ドッキングシミュレーションの解析手法

本研究では PPD および PPT と ER α の相互作用機序を推定するために、テンプレートドッキング手法を用いた。すなわち、受容体ポケットを固定しリガンドのドッキングポーズおよび結合エネルギーを評価した。ドッキングシミュレーションには、分子シミュレーションソフトウェアである Molecular Operating Environment (MOE; Chemical Computing Group, Inc. Montreal, Quebec, Canada, バージョン 20180101) (OS バージョン: Windows 10) を使用した。ER α タンパク質のシミュレーションでは、1ERE, 1GWR, 3UUD, 3ERD, 4PP6, 1ERR, および 1X7R の結晶構造を PDB から取得した。得られた ER α の結晶構造は、欠損原子とアミノ酸残基を補完した上で、水素原子を付加し、構造最適化を行った後に解析した。PPD と PPT の分子構造には水素原子を付加し、解離状態の標準化、溶媒処理、互変異性体前処理を施した。続いて、部分電荷配分とエネルギー最小化計算を実施した。ER-LBD に対して、テンプレートドッキング法によって各リガンドのドッキングスコアを計算した。ER-LBD に結合するコントロール化合物は、PPD と PPT の共通部分構造をマッチングさせてポケットに配置した。Amber10: EHT 力場を用いて、MOE 2019 のテンプレートドッキングによるスコアリング関数(ドッキングスコア)によってリガンドのコンフォメーション 5 種類に関する結合エネルギーを計算し、各コンフォメーションと受容体の結合親和性の順序を予測した。その中から最も親和性の高いスコアを選択し、

受容体のアミノ酸残基とリガンドとの相互作用に関する 2 次元座標と予測される結合エネルギー kcal/mol の解析を行った。

第五節 結果

第一項 E2 結合モデルとの分子相互作用の予測結果

E2 および PPD, PPT の ER α との動的構造モデリングについて, E2 を共結晶とした多数の ER α 結晶構造の中から ER α の構造的な修正がなされ MOE に搭載されている共結晶構造コードである 1ERE, 1GWR, 3UUD について ER α アゴニスト相互作用を示す ER α タンパク質モデルとして用いた。

1ERE を用いた各化合物のドッキングシミュレーションの結果, E2 においては, その水酸基がリガンドの Leu387 と水素結合し, その分子間距離は 3.03 Å, 結合エネルギーは -1.1 kcal/mol であった。また, Leu387 と E2 の A 環は相互作用しており, 分子間距離は 4.61 Å, 結合エネルギーは -0.7 kcal/mol であった。1ERE と E2 のドッキングスコアは -8.47 kcal/mol であった (図 8 A, 表 7)。PPD の場合は, その 2 ヶ所の水酸基それぞれに Glu353 および Met343 との水素結合が観察され, 分子間距離はそれぞれ 2.61 Å および 3.50 Å, 結合エネルギーはそれぞれ -1.1 および -1.0 kcal/mol であり, 1ERE と PPD のドッキングスコアは -10.51 kcal/mol であった (図 8 B, 表 7)。また, PPT の場合は, PPT の 2 ヶ所の水酸基それぞれがリガンドの Glu353 および Met343 に水素結合し, 分子間距離はそれぞれ 2.55 Å および 3.46 Å, 結合エネルギーはそれぞれ -1.7 および -1.1 kcal/mol

であり，1ERE と PPT のドッキングスコアは -11.00 kcal/mol であった（図 8 C，表 7）.

1GWR を用いた各化合物とのドッキングシュミレーションにおいては，E2 の場合，その水酸基が His524 と水素結合し，分子間距離は 3.00 Å であり，結合エネルギーは -2.1 kcal/mol であった．さらに，Leu387 とは水素結合と π 相互作用の双方を形成しており，それぞれの分子間距離は 3.10 Å，芳香環からの距離が 4.38 Å，結合エネルギーはそれぞれ -1.1 および -0.5 kcal/mol であった．1GWR と E2 とのドッキングスコアは -8.53 kcal/mol であった（図 8 D，表 7）.

PPD の場合は，PPD の 2 ヶ所の水酸基がそれぞれ Glu353 および Met343 と水素結合し，分子間距離はそれぞれ 2.54 Å および 3.31 Å，結合エネルギーはそれぞれ -1.2 kcal/mol であり，1GWR と PPD のドッキングスコアは -10.53 kcal/mol であった（図 8 E，表 7）. PPT においては，PPT の水酸基と Glu353 が水素結合し，分子間距離は 2.54 Å，結合エネルギーは -1.2 kcal/mol であり，1GWR と PPT のドッキングスコアは -10.34 kcal/mol であった（図 8 F，表 7）.

3UUD を用いた各化合物とのドッキングシュミレーションにおいては，E2 の場合は，その水酸基と His524 が水素結合し，分子間距離は 2.96 Å，結合エネルギーは -2.3 kcal/mol，3UUD と E2 のドッキングスコアは -8.60 kcal/mol であった（図 8 G，表 7）. PPD の場合は，2 ヶ所の水酸基がそれぞれ Glu351 および Met341 と水素結合し，分子間距離はそれぞれ 3.16 Å および 3.51 Å，結合エネルギーはそれぞれ -0.6 および -0.9 kcal/mol であり，3UUD と PPD のドッキング

スコアは-10.96 kcal/molであった（図 8 H, 表 7). また, PPT の場合, 2 ヶ所の水酸基と Glu353 および Met343 が水素結合し, 分子間距離はそれぞれ 3.16 Å および 3.51 Å, 結合エネルギーはそれぞれ-0.6 および-0.9 kcal/mol であり, 3UUD と PPT のドッキングスコアは-10.89 kcal/mol であった（図 8 I, 表 7).

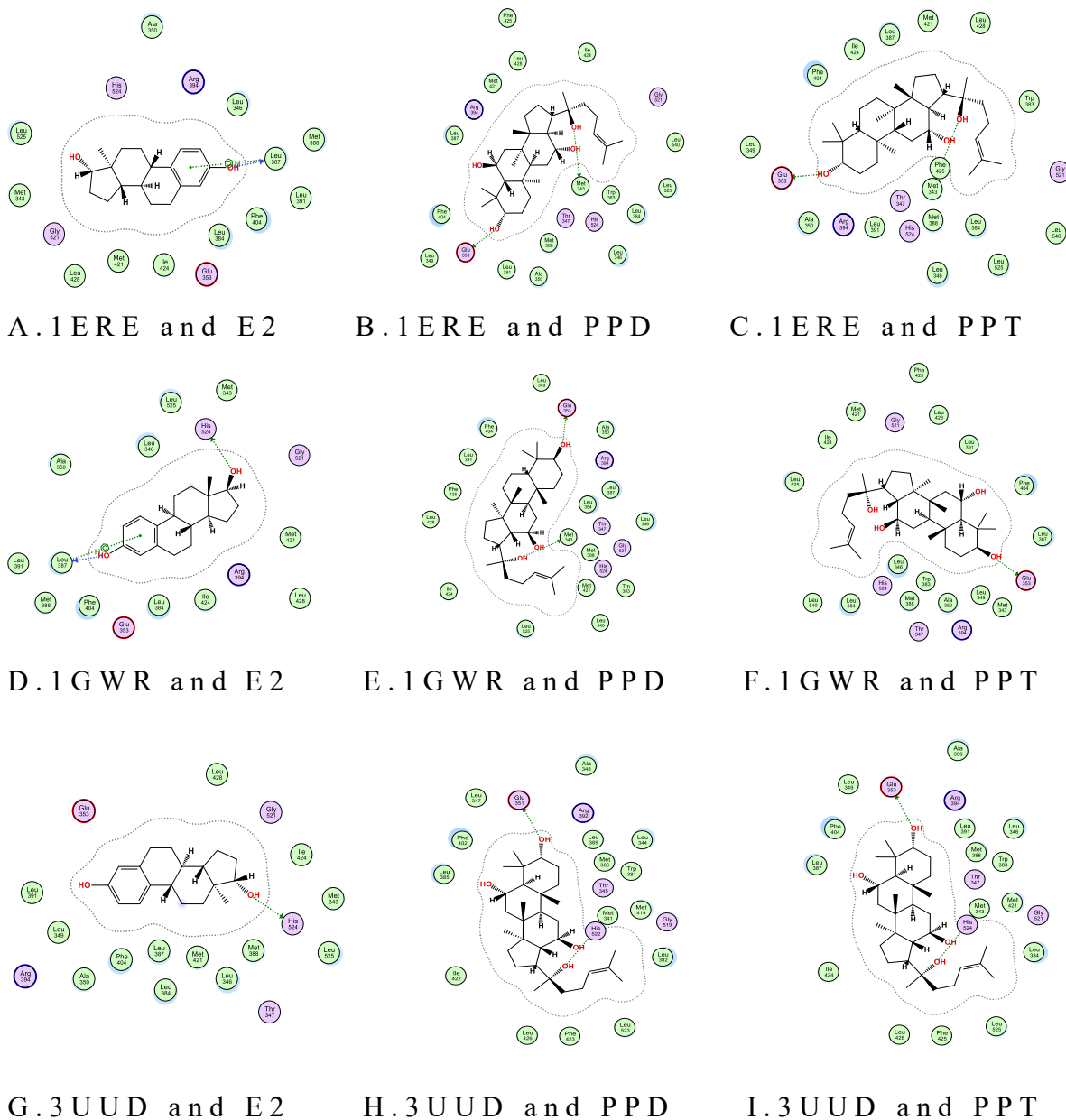


図 8 . E2 と ER α (1ERE, 1GWR, および 3UUD) との代表的なリ
ガンド相互作用の比較図

表 7. E2 結合モデルにおける PPD, PPT と ER α の分子ドッキングの予測結果

PDB Code	Compound name	Docking score (kcal/mol)	RMSD refine	Protein compound interaction					
				Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)	
1ERE	E2	-8.47	1.64	O	O	LEU 387 H-donor	3.03	-1.1	
				6-ring	C	LEU 387 pi-H	4.61	-0.7	
	PPD	-10.51	2.06	O	O	GLU 353 H-donor	2.61	-1.1	
				O	S	MET 343 H-donor	3.50	-1.0	
	PPT	-11.00	1.61	O	O	GLU 353 H-donor	2.55	-1.7	
				O	S	MET 343 H-donor	3.46	-1.1	
1GWR	E2	-8.53	1.63	O	N	HIS 524 H-donor	3.00	-2.1	
				O	O	LEU 387 H-donor	3.10	-1.0	
				6-ring	O	LEU 387 pi-H	4.38	-0.5	
	PPD	-10.53	1.47	O	O	GLU 353 H-donor	2.54	-1.2	
				O	S	MET 343 H-donor	3.31	-1.2	
	PPT	-10.34	0.98	O	O	GLU 353 H-donor	2.54	-1.2	
3UUD	E2	-8.60	1.16	O	N	HIS 524 H-donor	2.96	-2.3	
	PPD	-10.96	1.23	O	O	GLU 351 H-donor	3.16	-0.6	
				O	S	MET 341 H-donor	3.51	-0.9	
	PPT	-10.89	1.72	O	O	GLU 353 H-donor	3.16	-0.6	
				O	S	MET 343 H-donor	3.51	-0.9	

第二項 DES 結合モデルとの分子相互作用の予測結果

DES とアゴニスト相互作用を示す ER α タンパク質モデルである 3ERD に対するドッキングシミュレーションを実施した。DES は 3ERD に結合する際, Met332 および Glu342 と水素結合を形成した。分子間距離はそれぞれ 3.78 Å および 3.10 Å であり, 結合エネルギーはそれぞれ -0.6 kcal/mol および -1.8 kcal/mol であった。DES と 3ERD のドッキングスコアは -8.48 kcal/mol であった (図 9 A, 表 8)。

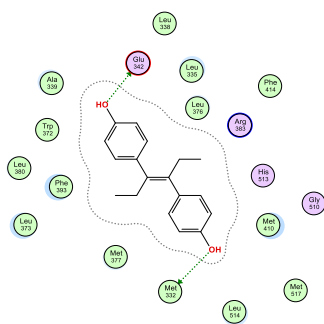
この ER α 結晶構造を用いて PPD のドッキングシミュレーションを実施したところ, PPD の水酸基がリガンドの Glu342 および Met332 と水素結合を形成し, 分子間距離はそれぞれ 2.50 Å および 3.66 Å であった。結合エネルギーは -0.6 kcal/mol および -1.0 kcal/mol であった。DES と PPD のドッキングスコアは -8.96 kcal/mol であった (図 9 B, 表 8)。一方, PPT ではリガンドとの特異的な相互作用が認められず, DES と PPT のドッキングスコアは -9.18 kcal/mol であった (図 9 C, 表 8)。

第三項 GEN 結合モデルとの分子相互作用の予測結果

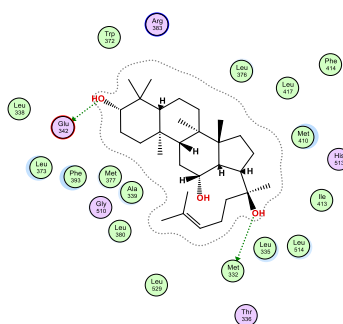
ER α アゴニストおよび ER β アンタゴニストである GEN と ER α アゴニストと相互作用を示す ER α タンパク質モデル 1X7R に対するドッキングシミュレーションを実施した。

GEN では, その水酸基と Leu387 および Glu521 とそれぞれ 3.04 Å および 3.00 Å の距離で水素結合を形成し, 結合エネルギーはそれぞれ -0.5 kcal/mol および -2.3 kcal/mol であった。GEN と 1X7R の

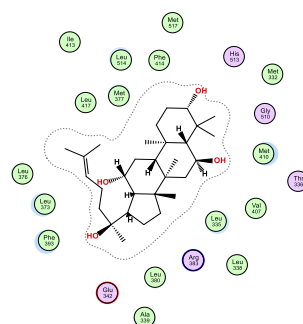
ドッキングスコアは-7.47 kcal/molであった (図 9 D, 表 8). PPD では, その水酸基と Glu535 と 2.58 Å の距離で水素結合を形成し, 結合エネルギーは-1.1 kcal/molであった. PPD と 1X7R のドッキングスコアは-8.93 kcal/molであった (図 9 E, 表 8). また, PPT では, その 3 ヶ所の水酸基が Phe404, Met343, および Met388 と水素結合を形成し, それぞれの分子間距離は 3.49 Å, 3.37 Å, 3.29 Å であった. 結合エネルギーはそれぞれ-1.4 kcal/mol, -1.6 kcal/mol, -0.5 kcal/mol であり, PPT と 1X7R のドッキングスコアは-9.63 kcal/mol であった (図 9 F, 表 8).



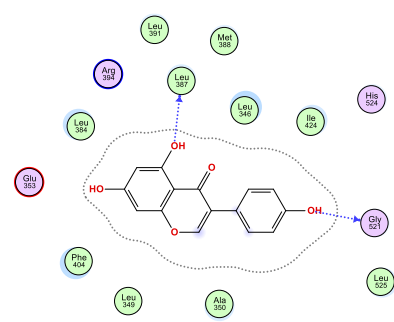
A.3ERD and DES



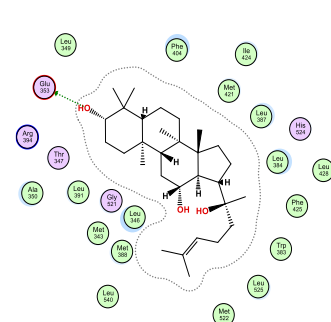
B.3ERD and PPD



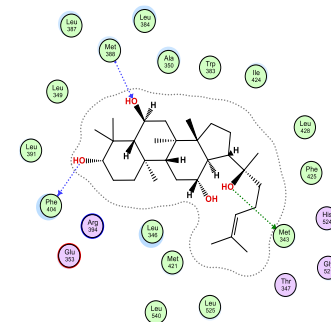
C.3ERD and PPT



D.1X7R and GEN



E.1X7R and PPD



F.1X7R and PPT

図 9 . DES 結合モデル ER α (3ERD) と GEN 結合モデル ER α (1X7R)の代表的なリガンド相互作用

表 8. ER α における DES と GEN 結合モデルと PPD, PPT の分子ドッキングの予測結果

PDB Code	Compound name	Docking score (kcal/mol)	RMSD refine	Protein compound interaction				
				Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)
3ERD	DES	-8.48	1.00	O	S	MET 332 H-donor	3.78	-0.6
				O	O	GLU 342 H-donor	3.10	-1.8
	PPD	-8.96	1.06	O	O	GLU 342 H-donor	2.50	-0.6
				O	S	MET 332 H-donor	3.66	-1.0
	PPT	-9.18	1.73	none	none	none	none	none
1X7R	GEN	-7.47	1.59	O	O	LEU 387 H-donor	3.04	-0.5
				O	O	GLU 521 H-donor	3.00	-2.3
				O	O	GLU 535 H-donor	2.58	-1.1
	PPD	-8.93	1.91	O	O	GLU 535 H-donor	2.58	-1.1
	PPT	-9.63	1.34	O	O	PHE 404 H-donor	3.49	-1.4
				O	S	MET 343 H-donor	3.37	-1.6
				O	C	MET 388 H-acceptor	3.29	-0.5

第四項 RES 結合モデルとの分子相互作用の予測結果

ER α と部分アゴニスト相互作用を示す RES と相互作用を示す ER α タンパク質モデル 4PP6 に対するドッキングシミュレーションを実施した (図 10).

RES は Leu387 および Phe404 と π 結合を形成し, それぞれの分子間距離は 4.33 Å と 4.09 Å であり, 結合エネルギーはそれぞれ -0.7kcal/mol と -0.5kcal/mol であった. 4PP6 と RES のドッキングスコアは -6.87kcal/mol であった (図 10A, 表 9).

4PP6 におけるドッキングシミュレーションの結果, PPD はその水酸基が Met343 と His524 と水素結合を形成し, それぞれの分子間距離は 3.95 Å と 3.02 Å, 結合エネルギーは -0.7kcal/mol であった. 4PP6 と PPD のドッキングスコアは -8.78 kcal/mol であった (図 10B, 表 9).

4PP6 におけるドッキングシミュレーションの結果, PPT は水酸基が Leu387 および Arg394 と水素結合を形成する二重水素結合様式を示し, それぞれの分子間距離は 2.60 Å と 2.94 Å, 結合エネルギーはそれぞれ -1.3 kcal/mol および -3.7 kcal/mol であった. 4PP6 と RES のドッキングスコアは -6.81 kcal/mol であった (図 10C, 表 9).

第五項 RAL 結合モデルとの分子相互作用の予測結果

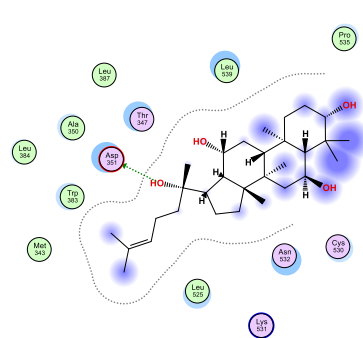
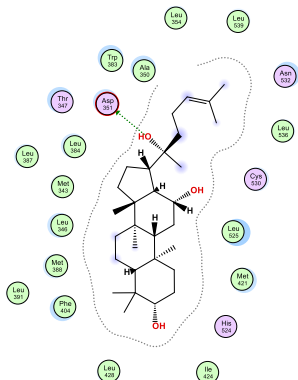
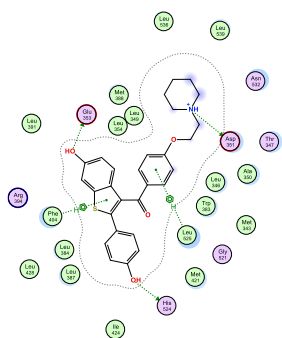
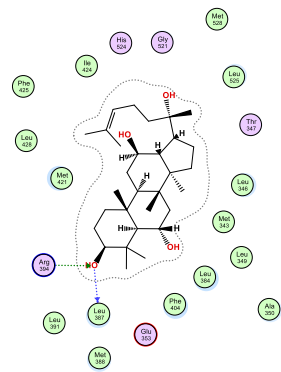
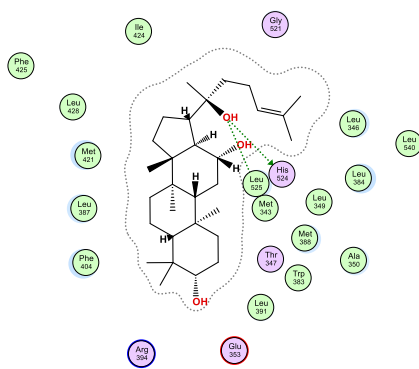
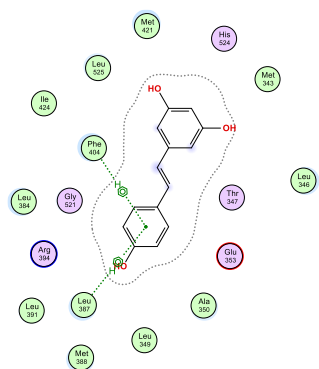
RAL とアンタゴニスト相互作用を示す ER α タンパク質モデルの 1ERR における PPD および PPT の ER α へのドッキングシミュレーションを実施した (図 10).

RAL の芳香環は Phe404 および Leu525 と相互作用し，分子間距離はそれぞれ 3.63 Å と 4.23 Å，結合エネルギーはそれぞれ -0.5 kcal/mol および -0.7 kcal/mol であった．また，Glu353, His524, Asp351 と水素結合を形成し，分子間距離はそれぞれ 2.41 Å，2.71 Å，2.66 Å であり，結合エネルギーは -1.1 kcal/mol，-4.2 kcal/mol，および -16.8 kcal/mol であった．さらに Asp351 とイオン結合を形成し，分子間距離は 2.66 Å，であり，結合エネルギーは -7.2 kcal/mol であった．つまり，Asp351 は水素結合を形成するだけでなく，リガンドの NH⁺ 基ともイオン結合した．1ERR と RES のドッキングスコアは -9.95 kcal/mol であった（図 10D，表 9）．

PPD では，その水酸基が Asp351 と水素結合を形成し，分子間距離は 3.00 Å，結合エネルギーは -1.0 kcal/mol，1ERR と PPD のドッキングスコアは -6.63 kcal/mol であった（図 10E，表 9）．

PPT では，その水酸基が Asp351 と水素結合を形成し，分子間距離は 2.74 Å，結合エネルギーは -1.9 kcal/mol，1ERR と PPT のドッキングスコアは -5.81 kcal/mol であった（図 10F，表 9）．

1ERR における結合様式では，ER α アンタゴニストと RAL の様式と比較し，PPT の結合様式は受容体ポケットから部分的に突出する構造を示し，外部に露出していることが示された（図 10F，表 9）．



A. 4PP6 and RES

B. 4PP6 and PPD

C. 4PP6 and PPT

D. 1ERR and RAL

E. 1ERR and PPD

F. 1ERR and PPT

図 10. ER α における RES 結合モデル(4PP6)と RAL 結合モデル(1ERR)の代表的なリガンド相互作用

表 9. ER α における RES と RAL 結合モデルと PPD, PPT の分子ドッキングの予測結果

PDB Code	Compound name	Docking score (kcal/mol)	RMSD refine	Protein compound interaction				
				Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)
4PP6	RES	-6.87	1.83	6-ring	C	LEU 387 pi-H	4.33	-0.7
				6-ring	C	PHE 404 pi-H	4.09	-0.5
	PPD	-8.78	1.65	O	S	MET 343 H-donor	3.95	-0.7
				O	N	HIS 524 H-donor	3.02	-0.7
	PPT	-6.81	1.19	O	O	LEU 387 H-donor	2.60	-1.3
				O	N	ARG 394 H-donor	2.94	-3.7
	RAL	-9.95	1.78	O	O	GLU 353 H-donor	2.41	-1.1
				O	N	HIS 524 H-donor	2.71	-4.2
				N	O	ASP 351 H-donor	2.66	-16.8
				N	O	ASP 351 Ionic	2.66	-7.2
				5-ring	C	PHE 404 pi-H	3.63	-0.5
				6-ring	C	LEU 525 pi-H	4.23	-0.7
1ERR	PPD	-6.63	1.86	O	O	ASP 351 H-donor	3.00	-1.0
	PPT	-5.81	1.58	O	O	ASP 351 H-donor	2.74	-1.9

第六節 考察

本研究では、ドッキングシミュレーションを用いてギンセノシド代謝産物である PPD および PPT が様々な ER α -LBD 構造と相互作用することを示すことができた。PPD および PPT は、ER α アゴニスト相互作用モデルであるタンパク質 1ERE において、E2 とは異なる結合様式を示す。E2 では Leu387 と相互作用するのに対し、PPD および PPT は Glu353 および Met343 と水素結合を形成する。一方、1GWR において、E2 では Leu387 に加え His524 と結合し、PPD は Leu387、PPT では Glu353 と水素結合を形成する。さらに、3 UUD において、E2 では His524 と結合し、PPD は Glu351 と Met341、PPT では Glu353 と MET343 と水素結合を形成する。つまり、E2 結合理型 ER α であっても異なる結合様式を示した。特に、PPD および PPT は E2 よりも高いドッキングスコアを示し、より安定した分子相互作用を示した。

PPD と DES の結合様式を比較すると、PPD と DES は両者ともに Met332 および Glu342 と水素結合を形成することから、類似した結合状態を示すことが推定された。PPT は PPD および DES と同様に結合したが、隣接するアミノ酸残基への影響は少なかった。

また、ER α アゴニスト相互作用モデルタンパク質である 1X7R における PPD および PPT のドッキングシミュレーションにおいても、GEN と比較して、PPD、PPT はより高い親和性を示した。PPD はその水酸基が Glu535 と水素結合を形成し、PPT は 3 ヶ所の水酸基がそれぞれ Phe404、Met343、Met388 と水素結合を形成していた。

これは Leu387 及び Glu521 に水素結合した GEN と異なる結合様式であった。(図 9)

部分アゴニストである RES を共結晶とした ER α の結晶構造である 4PP6 を用いたドッキングシミュレーションでは, RES の水酸基が Leu387 および Phe404 と相互作用し, ドッキングスコアが -6.87 kcal/mol であった. この 2 つのアミノ酸残基の結合状態が全体のドッキングスコアを低下させていると考えられた. PPD は Met343, His524 と水素結合を形成し, ドッキングスコアが -8.78 kcal/mol と RES よりも低かった. 一方, PPT は -6.81 kcal/mol であったことから, PPD の方がより ER α との相互作用が安定している可能性が示唆された.

アンタゴニストである RAL を共結晶とした ER α の結晶構造である 1ERR を用いた検討では, RAL の芳香環は Phe404 および Leu525 と相互作用し, さらに Glu353, His524, Asp351 との水素結合を介して強固に結合していた. PPD および PPT において Asp351 への結合様式が類似していたものの, 他のアミノ酸残基とは結合がなく, PPT ではステロイド骨格の A, B 環がポケットの外に露出していた. この知見は, ER α アンタゴニストとしての作用が弱い可能性が示唆された.

第七節 小括

以上の結果から，PPD および PPT は複数のアゴニスト活性モデルにおいて高い親和性を示し，特に低いドッキングスコアを示した 1ERE や 1GWR と類似した配置を取る可能性が高いと推定される．また，PPD および PPT はいずれも Glu および Met を介した相互作用が顕著であり，それぞれ複数のアミノ酸残基との結合が確認された．ER α は活性ポケット内に複数の Glu および Met 残基を有しており，これらがアゴニスト活性を示す多様な結合様式を可能にしていると考えられる．一方，アンタゴニストである RAL を共結晶とするモデルにおける検討によって，ER α アンタゴニストとしての作用は限定的であると推察された．

第三章 ER α 増殖活性作用の検証

第一節 目的

これまで、ER α を介した神経保護作用を期待して生薬ニンジン代謝産物である PPD と PPT に対する ER α の薬理作用を分子相互作用で検証した結果、ER α アゴニストとしての薬理作用が期待できることが推定された。そこで、PPD と PPT の ER α 活性を生物学的に評価するためヒト乳がん細胞(MCF-7)について E2 を指標として細胞増殖実験を行った。

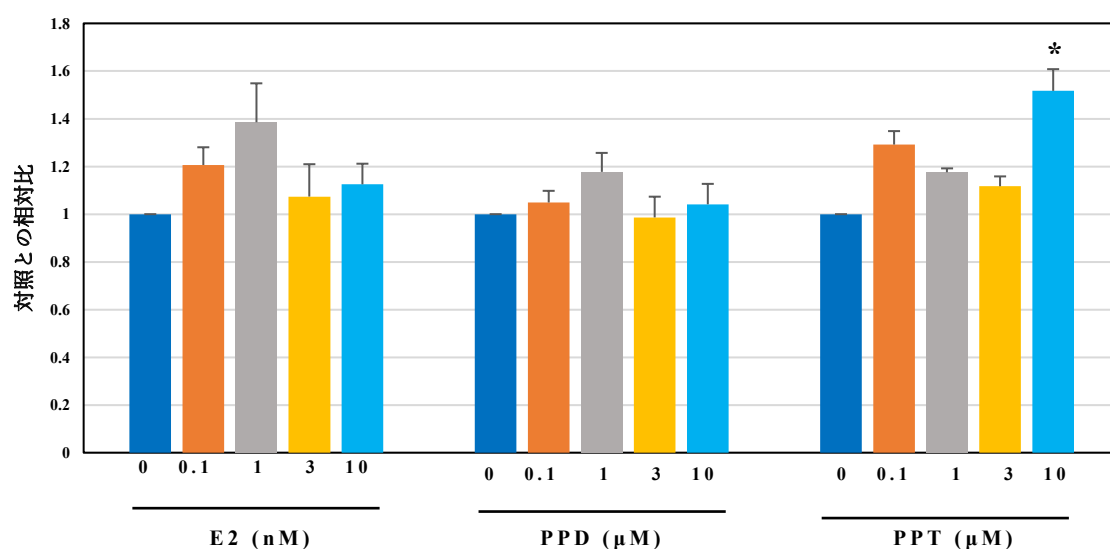
第二節 方法

MCF-7 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 培地 (Cellgro, Mediatech Inc., Manassas, VA, USA) に L-グルタミンおよびピルビン酸ナトリウムを添加し、HEPES およびフェノールレッドを含まない培地で培養した。さらに、活性炭/デキストラン 処理済み 10% ウシ胎児血清 (FBS; HyClone, Thermo Scientific, South Logan, UT, USA) および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (100X) (P/S; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を加え、37°C, 5% CO₂ 環境下で培養した。MCF-7 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、E2 (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan), PPD および PPT (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) をそれぞれ 5 種類の濃度で処理した。対照として、最終濃度 0.01% の DMSO (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) の溶媒溶液を使用した。E2 の濃度は 0, 0.1, 1, 3, 10 nM, DMSO は 0.01% に調整した。PPD と

PPT は 0, 0.1, 1, 3, 10 μ M, DMSO は 0.01% に調整した。薬剤処理 48 時間後, 各ウェルに WST-8 試薬 (Cell Count Reagent SF; Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を添加し, 脱水素酵素によるホルマジン色素の比色定量を指標とした細胞増殖数を測定した。比色定量の方法は, 還元されたホルマジン色素を 450 nm 付近の吸光度 (Abs) で測定し, 対照との相対比を縦軸に取りグラフ化した。統計解析には Microsoft Excel (Microsoft 365) を用いて実施した。F 検定によりすべての比較において分散の等質性が確認されたため, 2 群間の比較には Student の t 検定を用いた。また, 多重比較を含む解析では Bonferroni 補正を適用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。すべてのデータは 3 回の独立した実験に基づく平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) として表した。

第三節 結果

E2 は, MCF-7 に対するポジティブコントロールとして使用した。E2 では, 0.1 nM および 1 nM の濃度で, 1.21 倍および 1.39 倍に MCF-7 細胞が増殖した。一方, PPD では 1 μ M の濃度で 1.18 倍に増殖し, PPT では 10 μ M の濃度で, 1.52 倍の有意な細胞増殖が確認された (図 11)。



* $p < 0.05$ (Student's t -test). データは平均±標準誤差 (SEM) で表示.

$n=3$

図 11. MCF-7 細胞における E2, PPD, PPT の細胞増殖活性作用

第四節 考察

E2 は ER α 陽性乳がん細胞である MCF-7 細胞の増殖を促進することが知られている. E2 は内因性の女性ホルモンであり, 生理的には数 nM 程度の濃度で作用することが知られている. 一方, ギンセノシド Rb1 および Rg1 の生体内代謝物である PPD および PPT は, 生薬ニンジンの服用により脳組織に到達するが, その濃度は比較的低いと考えられる. ギンセノシド Rb1 を 12.5 mg/kg で静脈内または鼻腔内投与した場合, 血漿中濃度は最大で 1~100 $\mu\text{g/mL}$ に達するとの報告がある.^{.52)} 経口投与では 0.5~200 ng/mL とされている.^{.53)}

本研究では、PPD および PPT を 0.04~4 $\mu\text{g/mL}$ (0.1~10 μM) の濃度範囲で使用しており、これは薬理効果が期待される濃度域に相当すると考えられる。

MCF-7 細胞における E2, PPD, PPT の細胞増殖活性作用は E2 において 0.1 nM および 1 nM の低濃度で明確な増殖促進作用を示した。同様に、PPD も同濃度 (0.1 μM および 1 μM) で MCF-7 細胞の増殖を促進した。一方、PPT も MCF-7 細胞の増殖を促進し、それぞれ 0.1 μM および 10 μM で増殖効果を示したが、濃度依存性は認められなかった。

前述の通り、PPD と PPT は ER アゴニストとしての活性が示唆されており、MCF-7 細胞に対する増殖促進効果も ER α を介して発現している可能性が高い。また、PPD の効果は E2 に比べやや弱く、PPD および PPT は ER α の完全アゴニストではなく、部分アゴニストとして作用している可能性が考えられる。さらに、PPT による増殖促進は低濃度および高濃度で高い活性を示した一方で、濃度依存的な変化は見られなかった。PPD と PPT はいずれも濃度依存性のない増殖効果を示しており、前章で示した RES および 4PP6 との分子相互作用モデルの結果からも、これらが ER α の部分アゴニストとして機能している可能性が支持される。

また、PPD および PPT は ER α に対するアゴニスト作用だけでなく、場合によってはアンタゴニスト的な作用も示すことが推察される。ただし、E2, PPD, PPT の三者で濃度と増殖効果の様式が異なることから、ER α を介した転写活性の制御様式にも差異があると考え

えられる．以上の結果から，PPD および PPT は $ER\alpha$ を介して MCF-7 細胞の増殖を促進しつつ，E2 とは異なる特性を持つエストロゲン様作用を示すことが示唆された．加えて，これらの化合物はエストロゲンシグナル以外の経路にも関与している可能性があり，今後はその詳細なメカニズムの解明が求められる．

第五節 小括

$ER\alpha$ を高発現している MCF-7 細胞を用いて， $ER\alpha$ を介した細胞増殖能を検討した．その結果，E2，PPD 及び PPT はいずれも低濃度において MCF-7 細胞の増殖を促進したが，中間濃度ではその効果が減少した．特に PPT では，最高濃度で再び増殖促進効果が認められ，二相性の応答を示した．これらの結果から，PPD は $ER\alpha$ アゴニストとして作用する可能性が示唆された．一方，PPT は $ER\alpha$ アゴニスト活性に加えて，他の作用機序を併せ持つ可能性があると考えられる．PPT の二相性の増殖活性は，エストロゲン受容体以外のシグナル経路の関与によるものと推察され，単純なエストロゲン様作用とは異なる薬理特性を有することが示唆される．今後，PPD および PPT が示すこれらの作用の詳細な分子機序を明らかにすることが重要な課題である．

第四章 生薬ニンジン代謝産物投与時の遺伝子発現プロファイル

第一節 目的

序論，第二章，第三節で，DIPの原因が中枢神経系に關与する広範な医薬品によって引き起こされるとともに，エストロゲン分泌が減少する閉経後女性において DIP の発症率が増加する可能性が示唆された．そのため，本論，第二章，第三章で，PPD，PPT の PS に対する治療効果を期待してエストロゲン様作用を有しているか検証した．

その結果，PPD，PPT が $ER\alpha$ のアゴニストである可能性が示唆された．さらに，PPD および PPT の作用が $ER\alpha$ の活性化にとどまらず，より広範な神経保護メカニズムに關与する可能性を探るため，遺伝子発現プロファイルの解析を行った．MCF-7 細胞に E2，PPD，PPT を曝露した後に RNA を抽出し，遺伝子の発現量を網羅的に定量した．そして，DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)を用いた遺伝子ネットワーク解析を実施した．このネットワーク解析を行うことで，PPD および PPT がエストロゲン受容体シグナルを超えて，神経変性疾患関連経路や神経炎症応答にどのような影響を及ぼすかを包括的に評価することが可能となる．

第二節 方法

細胞増殖実験と同様の条件で MCF-7 細胞を 24 ウェルプレートに播種し，E2(1 nM)，PPD(1 μ M)，PPT(1 μ M)を添加した．すべての細

胞について DMSO の最終濃度を 0.01 %に調整し，48 時間培養した．各条件について $n = 3$ のサンプルについて全 RNA は，ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (Promega Corporation, Madison, WI, USA)を用いて分離し，条件ごとに次世代シーケンサーを用いた RNA sequencing(RNA-seq)を実施した．RNA-seq は GENEWIZ Inc. (South Plainfield, NJ, USA) により実施され，サンプルあたり 6Gb のシーケンシングデータを取得した．

RNA-seq の正規化データは，GEO ウェブサイト (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE186470>) に GSE186470 として公開されている．正規化された 60,612 遺伝子の発現データを解析し，E2, PPD, PPT によってコントロール比で 2 倍以上の変化を示した総計 123,655 件のデータを対象に，JMP Pro 16 を用いて主成分分析を実施した．また，FPKM 正規化データを基に，変化が 2 倍以上の E2, PPD, PPT の遺伝子発現データを，さらに Fold Change > 1.7 および < 0.59 の発現量の変動を示した 1480 遺伝子を抽出した．

これらの遺伝子群に対し，DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics, Developmental Therapeutics Program, Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD, USA)を用いた機能解析を行った．その結果，KEGG パスウェイを延べ 14 経路抽出した (表 10)．抽出した 14 経路に含まれる遺伝子群の機能を調べ，神経変性疾患関連への影響を検討した．

第三節 結果

RNA-seq 解析における全遺伝子発現の主成分分析において、E2、PPD、および PPT による遺伝子の変動が対照と比較して異なることが示された。主成分分析のスコアプロットにおいて、E2 と PPD は近接していたことから、これらの遺伝子に与える影響は類似した特性を持つことが判明した（図 12）。

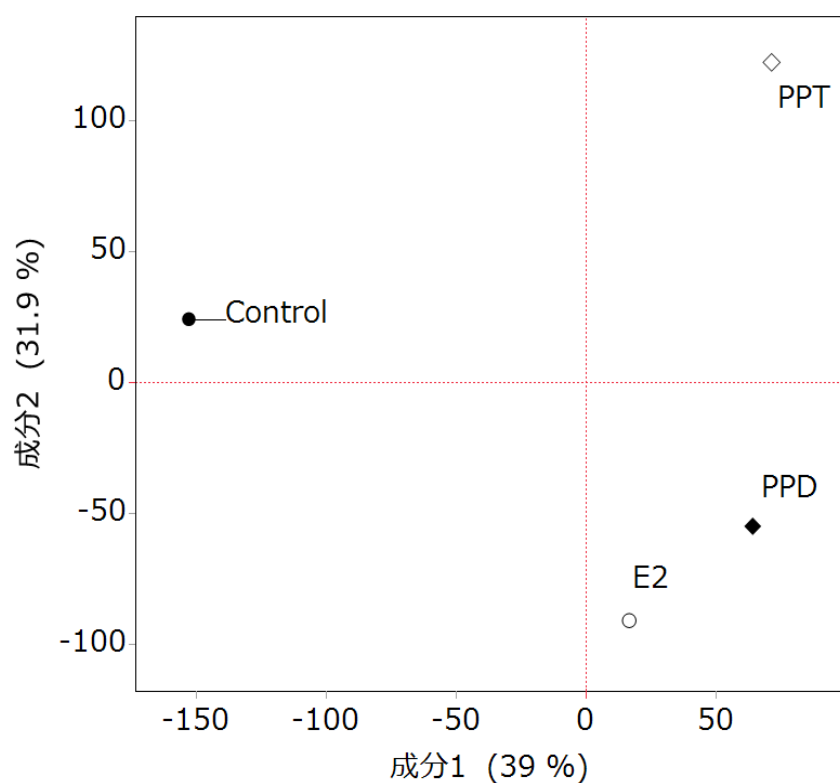


図 12. MCF-7 細胞における E2, PPD, PPT の主成分分析の結果

次に，DAVID を用いて E2，PPD，PPT の差別的遺伝子発現プロフィールに基づく経路解析を行った．その結果，KEGG 経路が 14 経路抽出された（表 10）．なかでも注目すべきは，Neuroactive ligand-receptor interaction（神経活動リガンド受容体相互作用）であり，この経路の P 値は E2 で 0.00023 と有意に低く，PPD でも 0.1 と低い傾向を示していた．また，この経路には，PPT において有意性が認められた Renin secretion 経路 ($P=0.021$) で変動した 4 遺伝子のうち，ADORA1，PTGER2，PTGER4 の 3 遺伝子が重複して含まれていた．このような結果をふまえ，本研究では Neuroactive ligand-receptor interaction に着目し，該当遺伝子を機能に基づいて分類した．具体的には，A 群：神経伝達に関与する遺伝子群，B 群：炎症および免疫応答に関与する遺伝子群，C 群：ストレス応答に関与する遺伝子群に分け，それぞれの遺伝子発現量のコントロール比を示した（図 13）．

さらに，その他の化合物ごとの特徴として，PPT による転写プロフィールは，全身性エリテマトーデスに関連する遺伝子発現の特性を示した．一方，E2 に関しては，エストロゲンシグナル伝達経路およびドーパミン作動性シナプスシグナル伝達経路（うつ病などに関連）が示された．

このうち，神経活性リガンド受容体相互作用に着目して関連する遺伝子について検討したところ，神経伝達に関連する遺伝子群について，GABA_B 受容体 (GABBR2) は，E2，PPD，PPT のいずれの条件下でも発現が増加した．一方，GABA_A 受容体 (GABRP) は，PPD 曝露

時に顕著な発現上昇を示した。また、ヒスタミン受容体(HRH2, HRH3)は、E2, PPD, PPT のすべての条件で発現が減少した(表 10, 図 13A)。

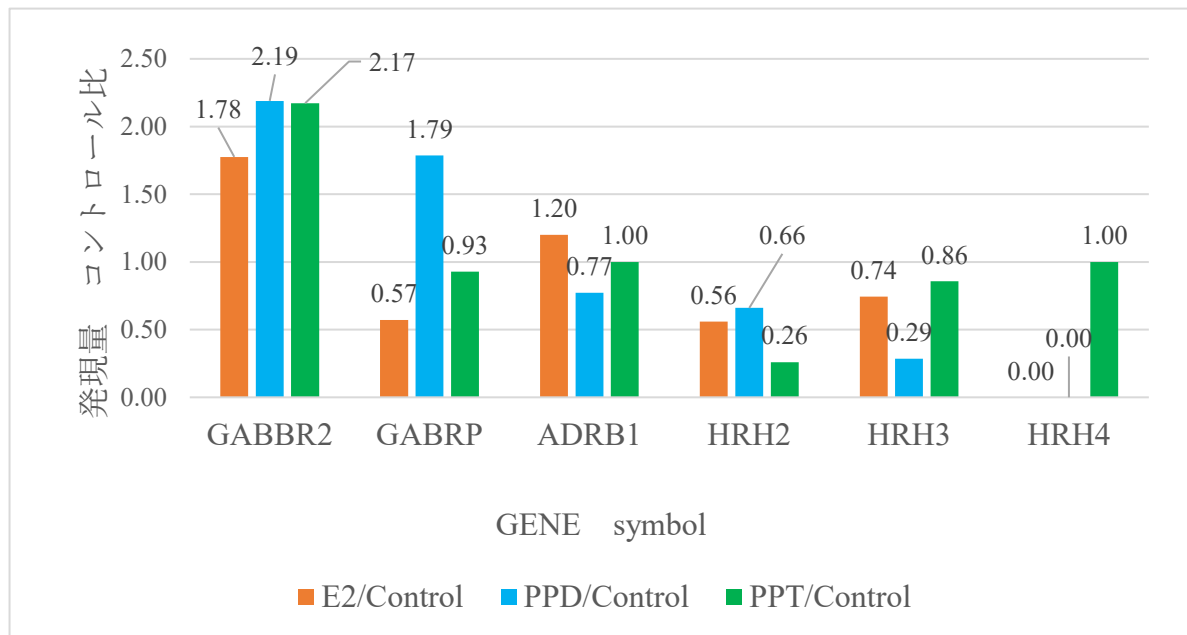
炎症および免疫応答に関連する遺伝子群について、プロスタグランジン E 受容体(PTGER)および血小板活性化因子受容体(PTAFR)の発現は、E2, PPD, PPT のいずれの条件下においても減少した(表 10, 図 13B)。

ストレス応答に関連する遺伝子群について、アデノシン A1 受容体(ADORA1), ガラニン受容体(GALR2)の発現は、E2, PPD, PPT のすべての条件で減少した。一方、アデノシン A2B 受容体(ADORA2B)は、E2, PPD, PPT 処理のいずれの条件下でも発現が増加した。また、アデノシン A2A 受容体(ADORA2A)においては、E2 曝露により発現が減少したが、PPT 曝露時には発現が増加した(表 10, 図 13C)。

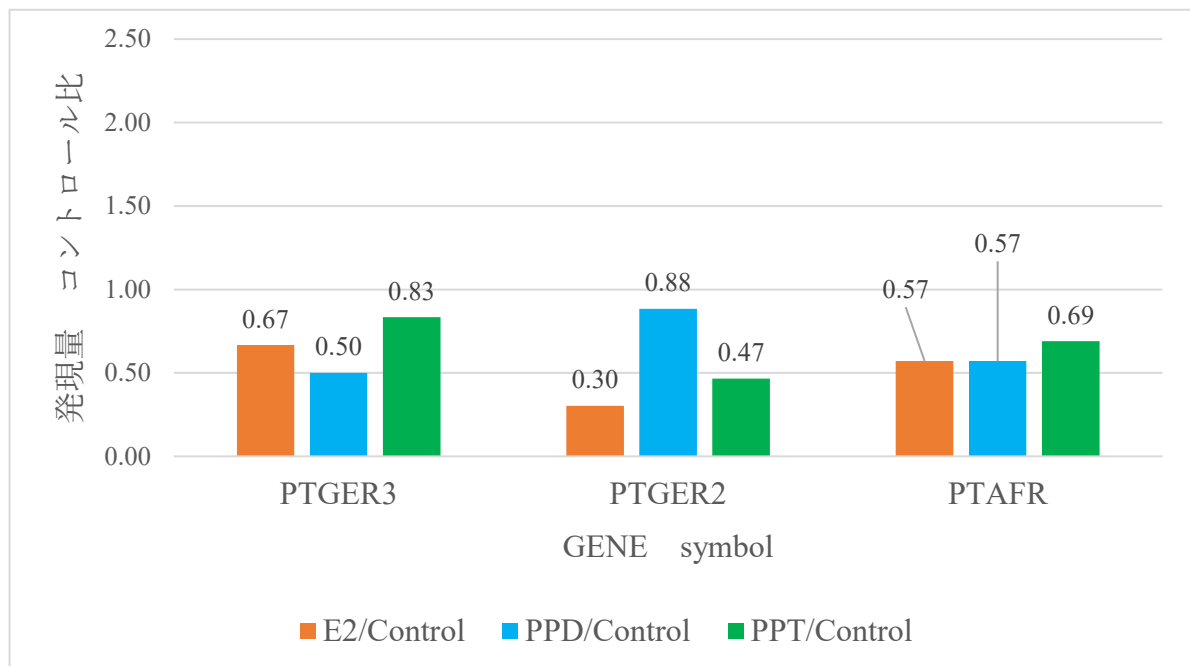
このように、化合物の種類によって標的遺伝子の発現変動が異なり、特定の受容体に対する選択的な影響が示唆された。

表 10. MCF-7 における PPD, PPT, E2 の差別的遺伝子発現を用いた機能解析

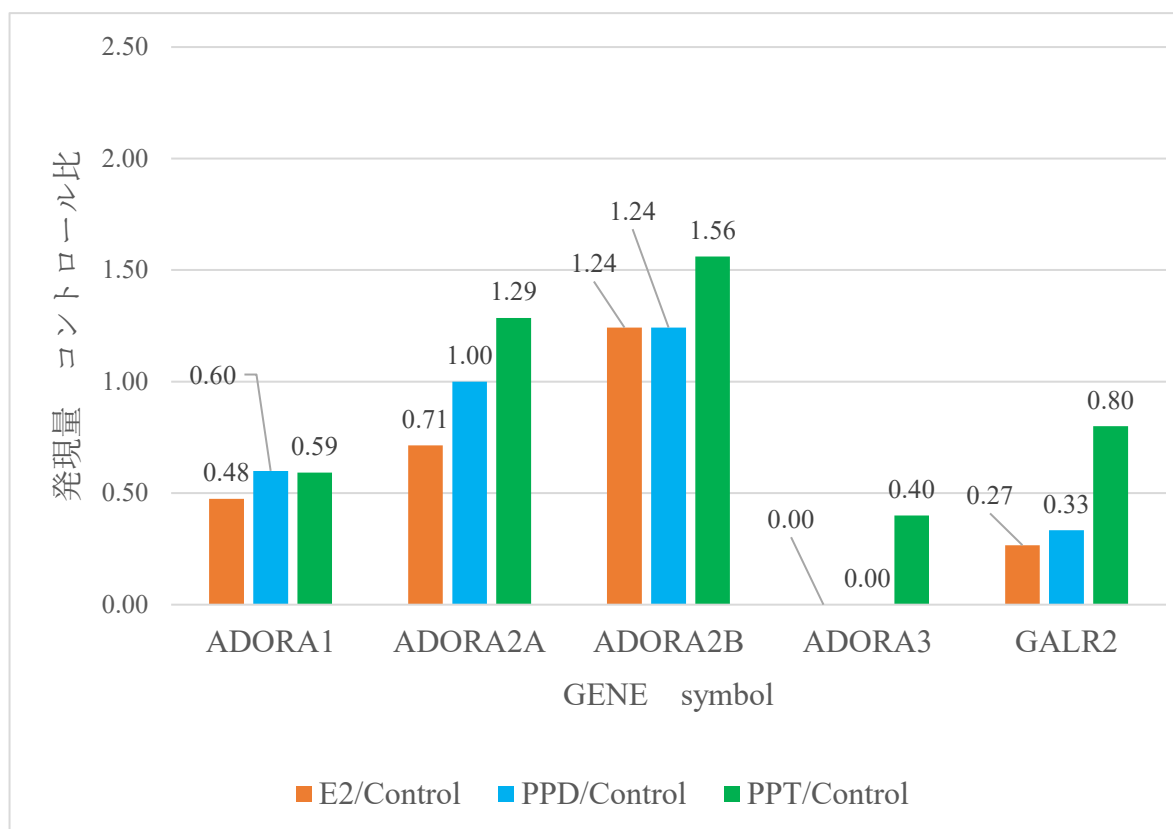
KEGG pathways	Gene name	Gene count	P-value
E2			
Neuroactive ligand-receptor interaction	ADORA1, ADRA2B, CHRM4, CHRN1, C5AR1, DRD4, GALR2, GABRP, GABBR2, CGA, GHR, HRH2, PTAFR, PTGER2, PTGER4	15	0.00023
Circadian entrainment	FOS, GNG3, CACNA1I, CALML6, KCNJ3	5	0.078
Systemic lupus erythematosus	Rodgers blood group, C8G, HIST1H2AB, HIST1H2AJ, HIST1H2BI, HIST1H4J	6	0.078
Cholinergic synapse	FYN, FOS, GNG3, CHRM4, KCNJ3	5	0.12
Dopaminergic synapse	FOS, GNG3, CALML6, DRD4, KCNJ3	5	0.17
Alcoholism	GNG3, CALML6, HIST1H2AB, HIST1H2AJ, HIST1H2BI, HIST1H4J	6	0.18
Estrogen signaling pathway	FOS, CALML6, GABBR2, KCNJ3	4	0.24
Oxytocin signaling pathway	FOS, CACNG6, CALML6, KCNJ3	4	0.47
PPD			
Neuroactive ligand-receptor interaction	GALR2, GABRP, GABBR2, GHR, PTAFR, PTGER4	6	0.1
PPT			
Renin secretion	ADORA1, CALML6, PTGER2, PTGER4	4	0.021
Systemic lupus erythematosus	Rodgers blood group, HIST1H2AB, HIST1H2AJ, HIST1H2BI, HIST1H4J	5	0.036
Alcoholism	CALML6, HIST1H2AB, HIST1H2AJ, HIST1H2BI, HIST1H4J	5	0.082
cAMP signaling pathway	ADORA1, CALML6, GABBR2, HCAR3, PTGER2	5	0.11



A. 神経伝達に関与する遺伝子群



B. 炎症と免疫応答に関与する遺伝子群



C. ストレス応答に関与する遺伝子群

図 13. 「神経活動リガンド受容体相互作用」に関わる遺伝子群の発現に対する E2, PPD, PPT の影響

第四節 考察

本研究では、E2、PPD、PPT が MCF-7 細胞において異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。主成分分析の結果からも、E2、PPD、PPT の転写プロファイルに違いがあることが確認され、PPD の転写プロファイルは PPT よりも E2 に類似していた。この結果は、PPD と PPT が ER α に作用するものの、その影響が異なる経路を介して発揮される可能性を示唆している。

RNA-seq により遺伝子発現の変動を測定し、バイオインフォマティクスによる薬剤処理の特徴を解析した結果、E2 処理によって神経活性リガンド受容体相互作用 (Neuroactive ligand-receptor interaction) 経路に影響を与えることが示された (表 10)。そこで、Neuroactive ligand-receptor interaction 経路に着目し、E2、PPD、PPT を比較した。特に、GABA 受容体 (GABBR2, GABRP) の発現変動は、E2、PPD、PPT が抑制性神経伝達の調節に関与する可能性を示唆する。GABA 作動性シグナルは神経系の興奮と抑制のバランスを維持する重要な役割を持ち、その調節異常は神経変性疾患や精神疾患と関連することが知られている。⁵⁴⁾ また、ヒスタミン受容体 (HRH2, HRH3) の発現低下は、ヒスタミン作動性シグナルが抑制されることで、神経伝達や免疫応答に影響すると考えられる。

また、ストレス応答関連遺伝子の発現解析では、アデノシン受容体 (ADORA1, ADORA2A, ADORA2B) やガラニン受容体 (GALR2) の発現の変動が確認された。ADORA2B の発現増加は、アデノシン作動性シグナルが活性化されることで神経保護作用を示す可能性があ

り,⁵⁵⁾PPD および PPT の神経保護効果の新たなメカニズムとして注目される。さらに、ADORA2A の発現は E2 で低下し、PPT で増加したことから、PPT は E2 とは異なる調節機構を持つことが考えられる。

本研究の結果は、PPD および PPT が ER α に関連する作用、神経系やストレス応答に関与する多様なシグナル伝達経路を調節する可能性を示唆している。特に、PPD は神経活性リガンド受容体相互作用経路、PPT は免疫応答関連経路の変動に関与することが示された。今後、これらの作用が実際の神経疾患や炎症性疾患の病態改善にどのように寄与するのかを解明することが求められる。

第五節 小括

本研究では、E2、PPD、PPT を用いた遺伝子発現プロファイル解析により、それぞれが神経伝達、炎症・免疫応答、ストレス応答など多様な経路に影響を及ぼす可能性が示唆された。特に、PPD は E2 と近い転写プロファイルを示し、抑制性神経伝達やアデノシン作動性シグナルへの関与が考えられる一方、PPT は E2 とは異なる制御機構を持つ可能性が示された。これらの知見は、単なるエストロゲン様作用にとどまらず、より広範な神経保護や抗炎症作用を発現する可能性を示唆するものである。

しかし、本研究で用いたサンプル数には限りがあり、一般的に mRNA の発現変動とタンパク質量・機能レベルの変動は常に一致するわけではない。そのため、今回の発現解析結果の生理学的意義を

明確にするためには、今後プロテオミクスや機能評価などによる検証が求められる。

総括

本研究では、JADER 解析により DIP を誘発する医薬品として、GABA 受容体やセロトニン受容体に作用する薬剤が有意なシグナルとして検出されたことから、DIP の病態にはドーパミン系に限らず複数の神経伝達系が関与している可能性が示唆された。これを踏まえ、生薬ニンジンが ER を介して神経変性に及ぼす改善効果の確認と臨床での活用を目指す前段階として、その臨床応用に向けた基礎的検討を行った。具体的には、(1)生薬ニンジン代謝産物の ER α 活性作用の評価、(2)エストロゲン応答性細胞株における増殖活性作用の検証、(3)生薬ニンジン代謝産物投与時の遺伝子発現プロファイルの解析、という 3 つの課題を中心に研究を進めた。

生薬ニンジン代謝産物の ER α 活性作用の検証では、PPD および PPT が複数のアゴニスト活性モデルにおいて高い親和性を示し、特に低いドッキングスコアを示した 1ERE や 1GWR と類似した配置を取る可能性が高いと推定される。また、PPD および PPT はいずれも Glu および Met を介した相互作用が顕著であり、複数のアミノ酸残基との結合が確認された。ER α は活性ポケット内に複数の Glu および Met 残基を有しており、これらがアゴニスト活性を示す多様な結合様式を可能にしていると考えられる。一方、アンタゴニストである RAL を共結晶とするモデルを用いた検討により、PPD および PPT の ER α アンタゴニストとしての作用は限定的であると推察された。

ER α 増殖活性作用の検証では、ER α を高発現している MCF-7 細胞を用いて、ER α を介した細胞増殖能を検討した。E2、PPD 及び PPT の処理によって、いずれも低濃度において MCF-7 細胞の増殖を促進した。一方、PPT では、MCF-7 細胞の増殖について中間濃度で増殖促進作用が減少し、最高濃度で再び増殖した。すなわち、PPD は ER α アゴニストである可能性が示唆されたが、PPT は ER α アゴニストだけでなく他の活性も有する可能性が示唆された。PPT の二相性の増殖活性は、cAMP signaling pathway の活性化による影響が考えられる。cAMP signaling pathway は ERK, CREB, Akt, mTOR などにも関与し ER に影響を与えるため、単純なエストロゲン様の薬理作用ではないことが予測される。これらについて、詳細な機序の解明が今後の課題となる。

生薬ニンジン代謝産物処置時の遺伝子発現プロファイルの解析では、E2、PPD、PPT を用いて比較検討を行った。その結果、PPD および PPT は GABA 受容体関連遺伝子 (GABBR2, GABRP) の発現に影響を与える可能性が示され、神経伝達、炎症・免疫応答、ストレス応答など、多様な生物学的経路に関与することが示唆された。特に PPD は E2 と類似した転写プロファイルを示し、抑制性神経伝達やアデノシン作動性シグナルへの関与が考えられた。一方で、PPT は E2 とは異なる遺伝子発現パターンを示し、独自の制御機構を有する可能性がある。これらの知見は、PPD および PPT が単なるエストロゲン様作用にとどまらず、神経保護や抗炎症作用を有する可能性を示唆するとともに、DIP の背景にある複雑な神経伝達物質

系の不均衡，特に GABA 作動性神経系にも直接的・間接的に影響を及ぼすという，多面的な作用機序の可能性を示している．

しかし，本研究において発現解析によって得られた所見の生理的意義を実証するためには，今後，プロテオミクス解析および機能評価を通じたさらなる検討が必要である．なお，本研究では ER α 陽性細胞として標準的に用いられる MCF-7 細胞を使用した，これらは乳がん由来の細胞であり，神経細胞とは性質が異なる．そのため，第 4 章で行った遺伝子発現解析の結果は，神経細胞における作用を直接的に保証するものではない．今後，PPD および PPT の多面的な作用を神経細胞モデルにおいても検証することで，閉経後女性におけるパーキンソン症候群やその他の神経変性疾患に対する新たな治療戦略の構築につながる可能性が期待される．

結語

生薬ニンジンの最終代謝物 PPD および PPT はドッキングシミュレーションにおいてアゴニストとして ER α に結合し、特定のコンフォメーションを誘導した。そして、ヒト細胞を用いた *in vitro* 実験によって ER α 依存性増殖活性を示し、GABA 受容体などの遺伝子群が神経伝達経路に関与する可能性が示唆された。これらの結果はエストロゲンとは異なる遺伝子プロファイルを示すものであった。PD の示す病態にはドーパミン受容体と GABA 受容体による抑制作用が密接に関与している。これらの結果から、生薬ニンジン代謝物が PD・PS に対して神経保護作用を示す可能性が示唆された。しかし、遺伝子プロファイルの結果は mRNA 発現データに基づくものであり、これらの遺伝子が実際に神経伝達経路の活性にどのように寄与しているかを評価するためには、さらなる実験的検証が必要である。今後の課題として、生薬ニンジンがエストロゲン受容体や GABA 受容体に関与することで、どのように神経細胞に対し保護作用を示すか詳細に検討していく必要がある。神経変性疾患や PS に対する PPD および PPT の治療的意義を検討することが期待される。

参考文献

- 1) Japanese Society of Neurology, “*Prologue. Parkinson’s Disease Clinical Practice Guidelines 2018*,” Parkinson’s Disease Treatment Guidelines Creation Committee, Igaku Shoin, Tokyo, Japan, 2018, p. VII.
- 2) Correll C.U., Brevig T., Brain C., Patient characteristics, burden and pharmacotherapy of treatment-resistant schizophrenia: Results from a survey of 204 US psychiatrists. *BMC Psychiatry.*, **19**, 362 (2019).
- 3) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, 2006, *Treatment Manual for Each Serious Side Effect Disease: Drug-Induced Parkinsonism* . < <https://www.mhlw.go.jp/topics/2006/11/dl/tp1122-1c01.pdf> > , cited 7 February, 2025.
- 4) Japanese Society of Neuropsychopharmacology, Japanese Society of Clinical Neuropsychopharmacology., *Guideline for Pharmacological Therapy of Schizophrenia*, Japan, 2022, p. 26.
- 5) Farde L., Wiesel F.A., Halldin C., Sedvall G., Central D2-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch. Gen. Psychiatry.*, **45**, 71–76 (1988).
- 6) Yoo H.S., Bak Y., Chung S.J., Lee Y., Ye B.S., Sohn Y.H., Shin N.Y., Lee P.H., Impaired functional connectivity of sensorimotor network predicts recovery in drug-induced parkinsonism. *Park. Relat. Disord.*, **74**, 16–21 (2020).
- 7) Maria A.M., Justo G.Y., Drug-induced parkinsonism. *Expert Opin. Drug Saf.*, **5**, 759–771 (2006).

- 8) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. 副作用が疑われる症例報告に関する情報について, ER 図 .
<<https://www.pmda.go.jp/files/000213668.png>>, cited 7 February, 2025.
- 9) MedDRA, Japanese Maintenance Organization .
<<https://www.jmo.pmrj.jp>>, cited 7 February, 2025.
- 10) Kikegawa M., Sone H., Uesawa Y., Comprehensive Analysis of Drug-Induced Parkinson-like Events. *Pharmaceuticals (Basel)*., **17(8)**:1099 (2024).
- 11) van Puijenbroek E.P., Bat A., Leufkens H.G.M., Lindquist M., Orre R., Egberts A.C.G., A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **11**, 3–10 (2002).
- 12) Greenland S., Schwartzbaum J.A., Finkle W.D., Problems due to small samples and sparse data in conditional logistic regression analysis. *Am. J. Epidemiol.*, **151**, 531–539 (2000).
- 13) Chen J.J., Wang S.J., Tsai C.A., Lin C.J., Selection of differentially expressed genes in microarray data analysis. *Pharmacogenomics J.*, **7**, 212–220 (2007).
- 14) Dash R.C., Bhosale S.H., Shelke S.M., Suryawanshi M. R., Kanhed A.M., Mahadik K.R., Scaffold hopping for identification of novel D (2) antagonist based on 3D pharmacophore modelling of illoperidone analogs. *Mol. Divers.*, **16**, 367–375 (2012).
- 15) Burkhard P., “Treatment of Drug-Induced Parkinsonism,”Current

Clinical Neurology, Vol. 66, Springer, 2019.

- 16) Lim S.Y., Fox S.H., Lang A.E., Lim S.Y., Overview of the extranigral aspects of Parkinson disease. *Arch. Neurol.*, **66**, 167–172 (2009).
- 17) Cremer J.N., Amunts K., Graw J., Piel M., Rösch F., Zilles K., Neurotransmitter receptor density changes in Pitx3ak mice—A model relevant to Parkinson’s disease. *Neuroscience.*, **285**, 11–23 (2015).
- 18) Huot P., Fox S.H., Brotchie J.M., The serotonergic system in Parkinson’s disease. *Prog. Neurobiol.*, **95**, 163–212 (2011).
- 19) Rinne U.K., Koskinen V., Laaksonen H., Lönnberg P., Sonninen V., GABA receptor binding in the parkinsonian brain. *Life Sci.*, **22**, 2225–2228 (1978).
- 20) Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J., Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.*, **26**, S1–58 (2011).
- 21) 西川典子., 神経治療, Parkinson 病における性差. 41, 259-261 (2024).
- 22) Lee Y.H., Cha J., Chung S.J., Yoo H.S., Sohn Y.H., Ye B.S., Lee P.H., Lee YH., Beneficial effect of estrogen on nigrostriatal dopaminergic neurons in drug-naïve postmenopausal Parkinson's disease. *Sci. Rep.*, **9**, 10531 (2019).
- 23) Imam S.Z., Ali S.F., Aging increases the susceptibility to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: correlation with peroxynitrite production and hyperthermia. *J.*

Neurochem., **78**(5):952-959 (2001).

24) Brewer G.J., Age-related toxicity to lactate, glutamate, and beta-amyloid in cultured adult neurons. *Neurobiol. Aging.*, **19**, 561–568 (1998).

25) Lü J.M., Yao Q., Chen C., Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **7**, 293–302 (2009).

26) Wang X.F., Liu X.J., Zhou Q.M., Du J., Zhang T.L., Lu Y.Y., Su S.B., Ginsenoside Rb1 reduces isoproterenol-induced cardiomyocytes apoptosis in vitro and in vivo. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2013**, 45439 (2013).

27) Jia M., Zhang B., Qi Y., Yang J., Yao Z., Qin Z., Zhang Z., Yao X., UHPLC coupled with mass spectrometry and chemometric analysis of Kang-Ai injection based on the chemical characterization, simultaneous quantification, and relative quantification of 47 herbal alkaloids and saponins. *J. Sep. Sci.*, **43**, 2539–2549 (2020).

28) Lee S.T., Chu K., Sim J.Y., Heo J.H., Kim M., Panax ginseng enhances cognitive performance in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **22**, 222–226 (2008).

29) Heo J., Lee S., Oh M., Park H., Shim J., Chu K., Kim M., Improvement of cognitive deficit in Alzheimer's disease patients by long-term treatment with Korean Red Ginseng. *J. Ginseng Res.*, **35**, 457–461 (2011).

30) Wu S.D., Xia F., Lin X.M., Duan K.L., Wang F., Lu Q.L., Cao H.,

Qian Y.H., Shi M., Ginsenoside-Rd promotes neurite outgrowth of PC12 cells through MAPK/ERK- and PI3K/AKT-dependent pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 177 (2016).

31) Zhang Y., Yang X., Wang S., Song S., Ginsenoside Rg3 prevents cognitive impairment by improving mitochondrial dysfunction in the rat model of Alzheimer's disease. *J. Agric. Food Chem.*, **67**, 10048–10058 (2019).

32) Moriano C.F., Burgos E.G., Iglesias I., Lozano R., Serranillos M.P.G., Evaluation of the adaptogenic potential exerted by ginsenosides Rb1 and Rg1 against oxidative stress-mediated neurotoxicity in an in vitro neuronal model. *PLoS One.*, **12** (8): e0182933 (2017).

33) Xu T.Z., Shen X.Y., Sun L.L., Chen Y.L., Zhang B.Q., Huang D.K., Li W.Z., Ginsenoside Rg1 protects against H₂O₂-induced neuronal damage due to inhibition of the NLRP1 inflammasome signaling pathway in hippocampal neurons in vitro. *Int. J. Mol. Med.*, **43**, 717–726 (2019).

34) Tam D.N.H., Truong D.H., Nguyen T.T.H., Quynh L.N., Tran L., Nguyen H.D., Shamandy B.E., Le T.M.H., Tran D.K., Sayed D., Vu V.V., Mizukami S., Hirayama K., Huy N.T., Ginsenoside Rh1: A systematic review of its pharmacological properties. *Planta Med.*, **84**, 139–152 (2018).

35) Cho J., Park W., Ahn S.L.W., Lee Y., Ginsenoside-Rb1 from *Panax ginseng* C.A. Meyer activates estrogen receptor-alpha and -beta, independent of ligand binding. *Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 3510–3515

(2004).

36) Lee Y.J., Jin Y.R., Lim W.C., Ji S.M., Choi S., Jang S., Lee S.K., A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells, *J. Steroid Biochem Mol. Bio.*, **84**, 463–468 (2003).

37) McCullough L.D., Hurn P.D., Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends Endocrinol. Metab.*, **14**, 228–235 (2003).

38) Luo B.Y., Jiang J.L., Fang Y.F., Yang F., Yin M.D., Zhang B.C., Zhao R.R., Shao J.W., The effects of ginsenosides on platelet aggregation and vascular intima in the treatment of cardiovascular diseases: From molecular mechanisms to clinical applications. *Pharmacol. Res.*, **159**, 105031 (2020).

39) Dong H., Bai L.P., Wong V.K., Zhou H., Wang J.R., Liu Y., Jiang Z.H., Liu L., The in vitro structure-related anti-cancer activity of ginsenosides and their derivatives. *Molecules.*, **16**, 10619–10630 (2011).

40) Xu F.Y., Shang W.Q., Yu J.J., Sun Q., Li M.Q., Sun J.S., The antitumor activity study of ginsenosides and metabolites in lung cancer cell. *Am. J. Transl. Res.*, **8**, 1708–1718 (2016).

41) Zhang B., Zhou W.J., Gu C.J., Wu K., Yang H.L., Mei J., Yu J.J., Hou XF., Sun J.S., Xu F.Y., Li D.J., Jin L.P., Li M.Q., The ginsenoside PPD exerts anti-endometriosis effects by suppressing estrogen receptor-mediated inhibition of endometrial stromal cell autophagy and NK cell cytotoxicity. *Cell Death Dis.*, **9**, 574 (2018).

- 42) Anstead G.M., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A., The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids.*, **62**, 268–303 (1997).
- 43) Guillaume M., Montagner A., Fontaine C., Lenfant F., Arnal J.F., Gourdy P., Nuclear and membrane actions of estrogen receptor alpha: contribution to the regulation of energy and glucose homeostasis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1043**, 401–426 (2017).
- 44) Chen D., Riedl T., Washbrook E., Pace P.E., Coombes R.C., Egly JM., Ali S., Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol. Cell.*, **6**, 127–137 (2000).
- 45) Kikegawa M., Nakajima A., Yu J., Asai M., Uesawa Y., Sone H., Molecular profiling of ginsenoside metabolites to identify estrogen receptor alpha activity. *Gene.*, **813**, 146108 (2022).
- 46) qHTS assay to identify small molecule agonists of the estrogen receptor alpha (ER-alpha) signaling pathway: Summary .
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743077>>, cited 7 February, 2025.
- 47) Shiau A.K., Barstad D., Loria P.M., Cheng L., Kushner P.J., Agard DA., Greene GL., The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.*, **95**, 927–937 (1998).
- 48) Bruning J.B., Parent A.A., Gil G., Zhao M., Nowak J., Pace M.C.,

Smith C.L., Afonine P.V., Adams P.D., Katzenellenbogen J.A., Nettles KW., Coupling of receptor conformation and ligand orientation determine graded activity. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 837–843 (2010).

49) Bowers J.L., Tyulmenkov V.V., Jernigan S.C., Klinge C.M., Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.*, **141**, 3657–3667 (2000).

50) Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.A., Molecular basis of antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.*, **389**, 753–758 (1997).

51) Manas E.S., Xu Z.B., Unwalla R.J., Somers W.S., Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. *Structure.*, **12**, 2197–2207 (2004).

52) Lu T., Jiang Y., Zhou Z., Yue X., Wei N., Chen Z., Ma M., Xu G., Liu X., Intranasal ginsenoside Rb1 targets the brain and ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**(8), 1319–1324 (2011).

53) Jin S., Jeon J.-H., Lee S., Kang W.Y., Seong S.J., Yoon Y.R., Choi M.-K., Song I.-S., Detection of 13 Ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg3, Rh2, F1, Compound K, 20(S)-Protopanaxadiol, and 20(S)-Protopanaxatriol) in Human Plasma and Application of the Analytical Method to Human Pharmacokinetic Studies Following Two Week-Repeated Administration of Red Ginseng Extract, *Molecules.*, **24**(14),

2618 (2019).

54) McArdle C.J., Arnone A.A., Heaney C.F., Raab-Graham K.F., A paradoxical switch: the implications of excitatory GABAergic signaling in neurological disorders, *Front. Psychiatry.*, **14**, 1296527 (2024).

55) Ehrentraut H., Westrich J.A., Eltzschig H.K., Clambey E.T., Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One.*, **7**, e32416 (2012).

謝辞

本研究に対して、終始ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜りました植沢芳広教授（明治薬科大学 医療分子解析学研究室）、曾根秀子教授（横浜薬科大学 食化学研究室）に深謝申し上げます。また、本論文について審査いただきました主査の櫛山 暁史教授（明治薬科大学 薬物治療学研究室）、副査の高取（木下）薫教授（明治薬科大学 生薬学研究室）、紀 嘉浩教授（明治薬科大学 病態 RNA 制御学研究室）に謹んで感謝の意を申し上げます。