

アミロイドーシスに対するサフランの効果：
 α -シヌクレインを標的としたパーキンソン病モデル
に対する作用を中心に

2023年 1月
井上 栄二

アミロイドーシスに対するサフランの効果：
 α -シヌクレインを標的としたパーキンソン病モデル
に対する作用を中心に

筑波大学大学院
理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
生命農学学位プログラム
博士（生命農学）学位論文

井上 栄二

目次	1
略語	3
第 1 章 序章	5
第 2 章 α -シヌクレイン (α S) 凝集に対するサフランおよびその成分の作用 (<i>in vitro</i>)	14
第 1 節 背景	14
第 2 節 材料・実験方法	18
2.2.1 材料	18
2.2.2 サフラン中のcrocin-1、crocin-2およびcrocetinの定量	20
2.2.3 α S凝集体形成および凝集体解離に対する作用	21
2.2.3.1 試料の調製	21
2.2.3.2 チオフラビンT蛍光法	21
2.2.3.3 透過電子顕微鏡 (TEM)	22
2.2.4 統計処理	22
第 3 節 結果	23
2.3.1 サフラン中のcrocin-1、crocin-2およびcrocetinの定量	23
2.3.2 α S凝集体形成および凝集体解離に対する作用	25
第 4 節 考察	32
第 3 章 パーキンソン病モデルショウジョウバエにみられる病態表現型出現に対するサフランの作用 (<i>in vivo</i>)	35
第 1 節 背景	35
第 2 節 材料・実験方法	37
3.2.1 材料	37
3.2.2 ショウジョウバエの系統、交配、維持	37
3.2.3 クライミング試験と寿命試験	39
3.2.4 ショウジョウバエ複眼イメージング	39
3.2.5 細胞毒性試験	40
3.2.6 統計処理	40

第 3 節 結果	42
3.3.1 A30PまたはG51D変異 α S 発現 ショウジョウバエのクライミングに対する作用 ..	42
3.3.2 A30PまたはG51D変異 α S 発現 ショウジョウバエの寿命に対する作用	46
3.3.3 A30P変異 α S 発現 ショウジョウバエの複眼形態に対する作用	49
3.3.4 α S 凝集体誘発 SH-SY5Y 細胞毒性に対する作用	52
第 4 節 考察	54
第 4 章 種々のアミロイドタンパク質 (α S、アミリン、タウ、アミロイド β および β 2-ミ クログロブリン) 凝集に対するサフランおよびその成分の作用 (<i>in vitro</i>)	59
第 1 節 背景	59
第 2 節 材料・実験方法	63
4.2.1 材料	63
4.2.2 種々のアミロイドタンパク質 (α S、アミロイド β 、タウ (3R、4R)、アミリンおよ び β 2-ミクログロブリン) 凝集に対する作用	63
4.2.2.1 試料の調製	64
4.2.2.2 チオフラビン T 蛍光法	65
4.2.3 統計処理	66
第 3 節 結果	67
4.3.1 種々のアミロイドタンパク質 (α S、アミリン、タウ (3R、4R)、アミロイド β およ び β 2-ミクログロブリン) 凝集体形成および凝集体解離に対する作用	67
第 4 節 考察	72
第 5 章 総括と今後の展望	74
第 1 節 総括	74
第 2 節 今後の展望	75
謝辞	83
参考文献	85

略語

cpm	Cycles per minute (サイクル毎分)
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline (ダルベッコ リン酸緩衝生理食塩水)
EC ₅₀	Half maximal effective concentration (50%有効濃度)
FBS	Fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
HCl	Hydrochloric acid (塩酸)
HPLC	High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration (50%阻害濃度)
β 2MG	β 2-microglobulin (β 2-ミクログロブリン)
MEM	Minimum essential medium (イーグル最少必須培地)
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルフォフェニル)-2H-テトラゾリウム)
PD	Parkinson's disease (パーキンソン病)
QOL	Quality of life (生活の質)
ROS	Reactive oxygen species (活性酸素種)
SE	Standard error (標準誤差)

SEM	Scanning electron microscope (走査電子顕微鏡)
α S	α -Synuclein (α -シヌクレイン)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)
UAS	Upstream activating sequence (上流活性化配列)
TEM	Transmission electron microscope (透過電子顕微鏡)

第 1 章 序章

20世紀から21世紀にかけて薬学は大きく進歩し、かつては治すことが難しかった疾患の多くを薬で治せるようになった。例えば、1928年アレクサンダー・フレミングにより発見された世界初の抗生物質ペニシリンは、かつてはなすすべもなく命を落とした細菌感染症を劇的に改善させた。一方で、未だ薬をはじめとした治療方法が十分でない疾患は現在でも数多く存在する。公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団では主要60疾患の薬剤貢献度と治療満足度を軸に、具体的にどの疾患の治療方法が十分でないのか調査し、公表している (Fig. 1)。

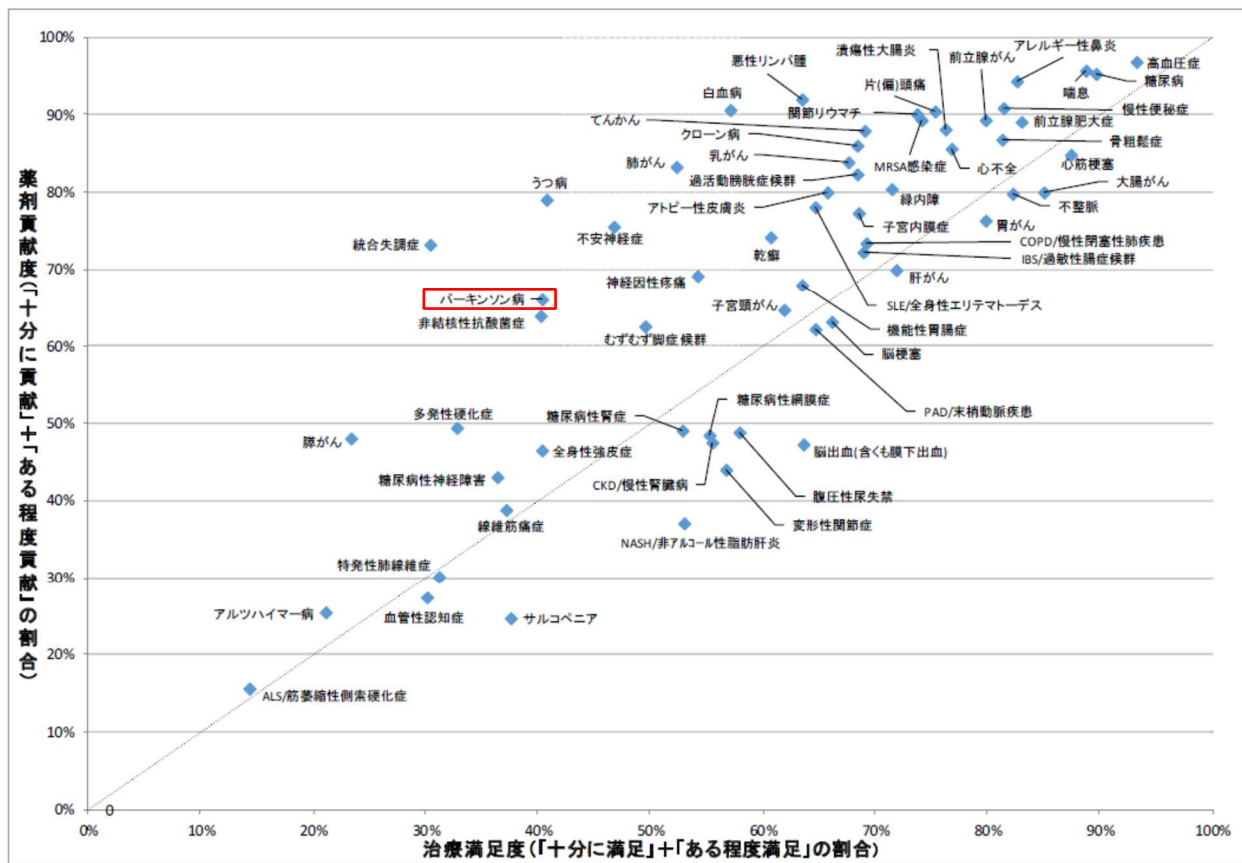


Fig. 1 主要60疾患の治療満足度および薬剤貢献度. ヒューマンサイエンス振興財団 (2020) より引用

この図において治療満足度の低い疾患は、未だ十分な治療方法が存在しないことを表している。著者はこれらの疾患の中から、薬剤貢献度が65%と高く、多くの薬が使用されているにもかかわらず、治療満足度が40%程度に留まっているパーキンソン病（PD）に着目した。PDは、四大症状と呼ばれる安静時振戦、固縮、無動、姿勢反射障害といった運動症状と、睡眠障害、認知・精神機能障害、自律神経障害感覚障害といった非運動症状を特徴とする神経変性疾患である（柳澤，2008）。その患者数は全世界で600万人強（2015年）、日本で20万人（65歳以上の100人に1人）（2017年）と報告されており、高齢社会の進展に伴って今後急速に増加し、2040年には全世界で1300万人弱になると推定されている（Fig. 2）。現在のPD治療薬は、PDによって失われたドーパミン神経細胞の機能を補う、または失われたドーパミン神経細胞に関連して生じた機能低下を補う対症療法であり、一時的に症状を改善させるものの、根本から治すというのではなく、完治は望めない。このため、PDの根本的治療につながる新しい治療薬の開発は喫緊の課題である。

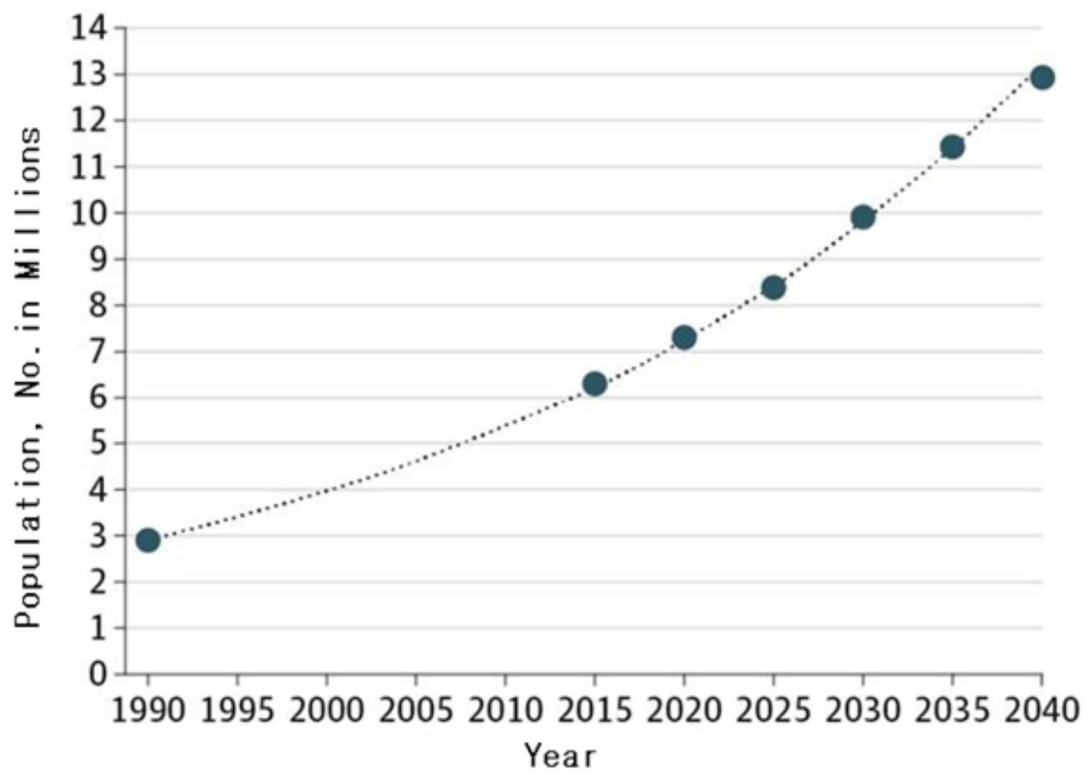
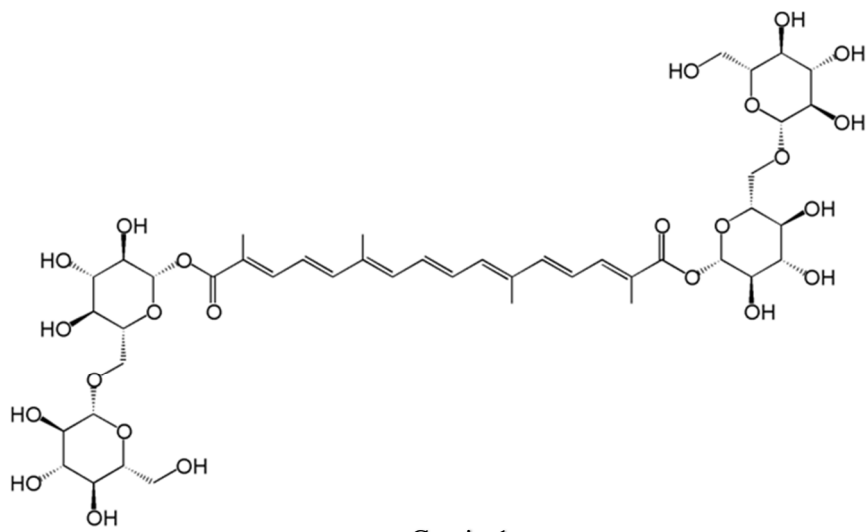
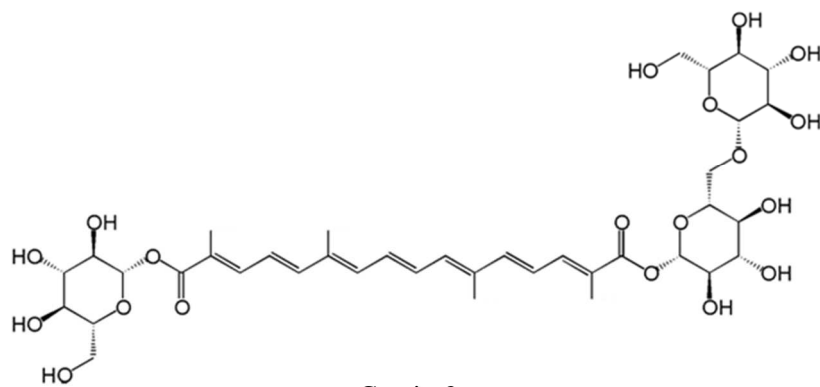


Fig. 2 Estimated and projected number of individuals with Parkinson's disease, 1990-2040. Dorsey and Bloem (2018)より引用

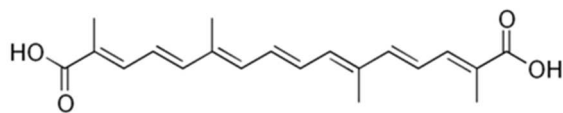
著者は、これまでに医薬品や健康食品の薬理研究、主に生薬・漢方薬の有効性と安全性を明らかにすることを目的として、薬理学的手法による薬効評価を行ってきた。生薬とは、天然の植物・鉱物・動物などの全部または一部を簡単な加工のみで薬として用いたもの、漢方薬とは、漢方医学の考え方に基づき、複数の生薬を定められた量で組み合わせたものである（日本漢方生薬製剤協会，2001）。生薬や漢方薬は、単一成分である西洋薬とは異なり、多成分系であることが特徴で、多種多様な薬理作用を示す。また、漢方薬では複数の生薬を組み合わせることによって、生薬単独よりも薬効の増強、作用の変換および毒性の低減などが生じているものも知られている。今回、著者はその専門分野である生薬・漢方薬で、難治性疾患であるPDを改善できないか、その手掛かりを探ることを目的に研究を始めた。数多くの生薬・漢方薬を検討した結果、PDの予防・治療に効果の期待できる生薬として、サフランに着目した。サフランは*Crocus sativus* Linné (*Iridaceae*) の柱頭であり、食品添加物（香辛料、黄色の食品着色料、香料）や医薬品（鎮痛、鎮静、通経剤）として使用されている（Namba, 1980）。サフランの化学成分として、150以上の揮発性および不揮発性成分の存在が明らかになっている（José Bagur et al., 2017）。その代表的な成分として、色素成分である crocin-1、crocin-2、crocetin、crocetin dialdehyde（zeaxanthinに由来するカロテノイド）、香気成分である safranal、苦味成分である picrocrocin が知られている（El Midaoui et al., 2022; Guo et al., 2022）。それらの化学構造をFig. 3に示した。



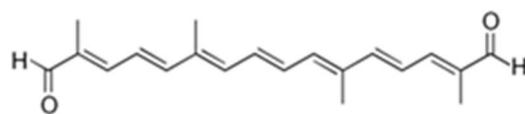
Crocin-1



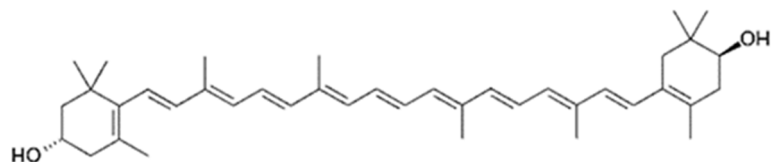
Crocin-2



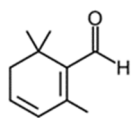
Crocetin



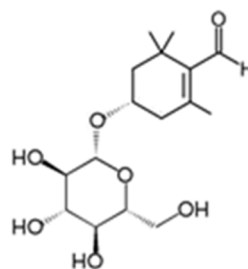
Crocetin dialdehyde



Zeaxanthin



Safranal



Picrocrocin

Fig. 3 Chemical structures of crocin-1, crocin-2, crocetin, crocetin dialdehyde, zeaxanthin, safranal and picrocrocin.

第 2 章では、PDの原因物質と考えられている α -シヌクレイン (α S) 凝集体に対するサフランの作用を検討し、サフランおよびcrocetinをはじめとするその色素成分が *in vitro* (試験管レベル) で α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用が確認されたことについて記述する (Inoue et al., 2018)。

第 3 章では、第 2 章の *in vitro* (試験管レベル) で認められたサフランおよびcrocetinによる α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用が *in vivo* (個体レベル) で効果を示すか検証するため、脳内や複眼に α Sが異常蓄積することが認められている遺伝子改変ショウジョウバエ (PDモデルショウジョウバエ) にサフランまたはcrocetinを摂取させたところ、運動機能低下をはじめとする病態表現型の出現を抑える効果が確認されたことについて記述する (Inoue et al., 2021)。

第 4 章では、第 2 章および第 3 章で認められたサフランの α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用について、 α S以外の凝集性のあるタンパク質 (アミロイド β 、タウ、アミリンおよび β 2-ミクログロブリン (β 2MG)) に対しても検討したところ、作用強度に違いがあったものの、 α Sと同様の作用が確認されたことについて記述する (日本国特許第7017238号, 2022; 井上ら, 2019a; 井上ら, 2019b) (一部未発表データを含む)。凝集性のあるタンパク質は「アミロイドタンパク質」と呼ばれ、その凝集体によって引き起こされる疾患の総称は「アミロイドーシス」と呼ばれている (後藤, 2009; Knowles et al., 2014; Giorgetti et al., 2018; Benson et al., 2020)。アミロイドーシスは、現在でも有効性の高い治療法はなく、QOLの低い疾患であることが知られている。アミ

ロイド β 、タウ、アミリンおよび β 2MGの凝集体は、主にアルツハイマー病（アミロイド β 、タウ）、II型糖尿病（アミリン）および透析アミロイドーシス（ β 2MG）の疾患との関連が示唆されている（Giorgetti et al., 2018）。さらに、サフラン成分のこれらのアミロイドタンパク質凝集体形成阻害作用に関して検討したところ、特にcrocetinおよびcrocetin dialdehydeが強力であったことについても記述する（日本国特許第7017238号, 2022; 井上ら, 2019a; 井上ら, 2019b）（一部未発表データを含む）。

第5章は、「総括と今後の展望」として、第2章から第4章までの研究結果を総括し、更に最新の知見をまとめ、サフランのPDを中心としたアミロイドーシスに対する可能性について、今後の展望を記述する。

第 2 章 α S凝集に対するサフランおよびその成分の作用 (*in vitro*)

第 1 節 背景

α Sは、140アミノ酸からなるタンパク質で、脳内に豊富に存在し、シナプス可塑性や神経伝達物質の調節に関与していると考えられている (Burré, 2015)。 α Sはヒト体内において通常単量体 (モノマー) で存在するが、加齢や酸化ストレスなどの要因により構造変化が起こると、少数の α Sが凝集したオリゴマーを形成し、さらに β -シート構造に富む不溶性の凝集体を形成する (Burré, 2015)。PD、レビー小体型認知症および多系統萎縮症のような神経変性疾患ではこの α S凝集体の異常蓄積がそれぞれ中脳黒質、大脳皮質および小脳・脳幹など複数の脳領域で主に認められ、 α -シヌクレイノパチーと総称されている (Burré, 2015; Goedert, 2001)。これらの関係をFig. 4に示した。

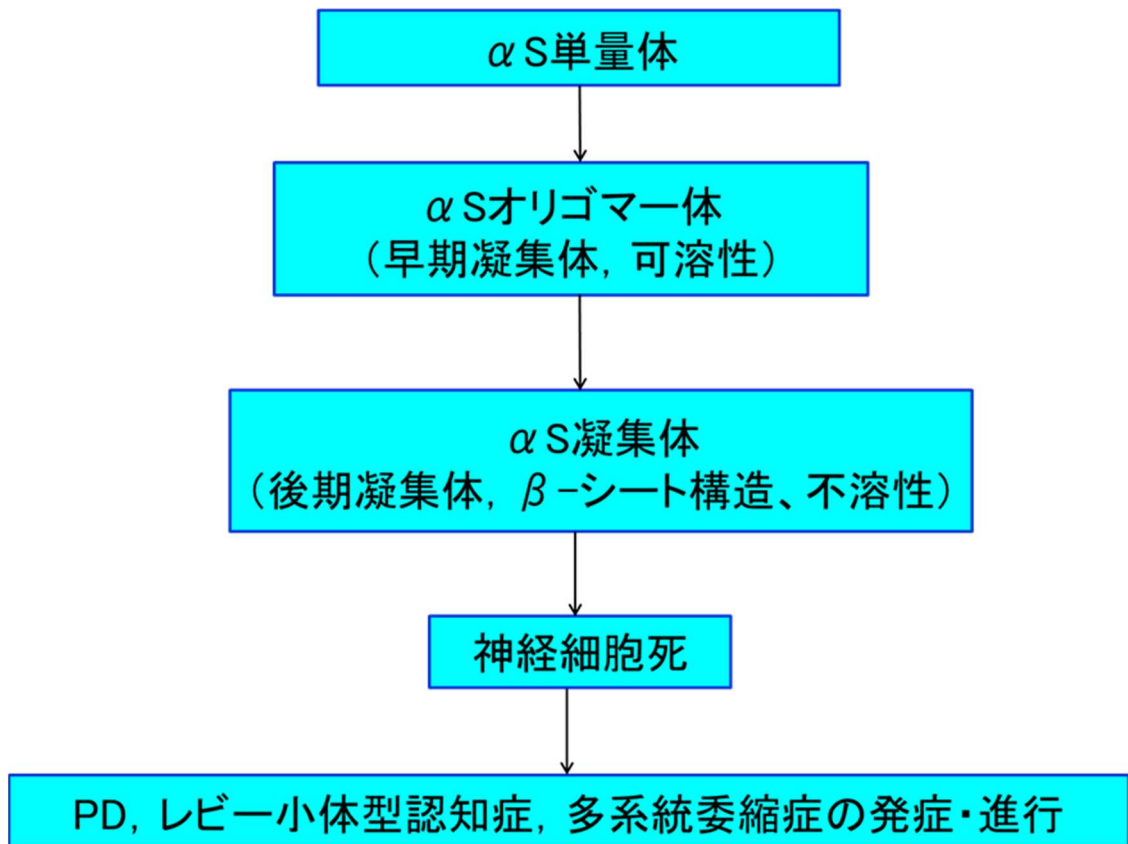


Fig. 4 α S凝集体と α -シヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統委縮症）。

また、 αS はアルツハイマー病患者の半数以上において脳内にその凝集体の蓄積が認められること (Hamilton, 2000)、アミロイド β や αS の凝集体は互いに他の異常たんぱく質の凝集を促進させることが知られており (Tsigelny et al., 2008)、アルツハイマー病の発症・進行にも関与すると考えられている。そのため、 αS 凝集体形成を阻害すること、または凝集体の解離を促進することはこれら疾患の予防・治療に繋がると考えられることから、このような作用を有する物質の探索に関して多くの研究が行われている (Ji et al., 2016; Ardah et al., 2014; Ardah et al., 2015)。

サフラン、およびその成分であるcrocin-1とcrocetinにはアミロイド β 凝集体形成を阻害する作用が報告されており (Papandreou et al., 2006; Ahn et al., 2011; Ghahghaei et al., 2013)、crocin-1にはタウ凝集体形成の阻害も報告されている (Karakani et al., 2015)。また、近年サフランには、うつ病 (Ahmadpanah et al., 2019; Mazidi et al., 2016)、不安症 (Kell et al., 2017; Mazidi et al., 2016)、ストレス障害 (Kell et al., 2017) および睡眠障害 (Lopresti et al., 2020; Pachikian et al., 2021) といった中枢神経系疾患に対して有効であったとする臨床報告が相次いでいる。例えばうつ病では、前頭皮質、海馬、基底核などの萎縮や神経細胞数の減少といった形態的变化が生じており、その原因の一つとしてアミロイド β や αS の凝集体による神経細胞死が挙げられている (山形, 2017)。このような背景から、著者は、サフランにはアミロイド β 、タウのみならず αS 凝集体形成も阻害し、 αS 凝集体が関与するPD、レビー小体型認知症および多系統委縮症のような神経変性疾患を改善させる可能性があるのではないかと着目した。本研究では、その手掛かり

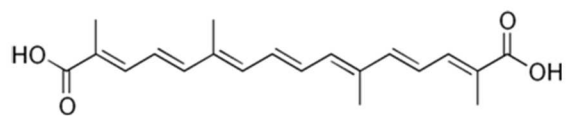
を探ることを目的にサフランとその成分（色素成分としてcrocin-1、crocin-2、crocetin、香気成分としてsafranal）およびcrocetin構造類似体（hexadecanedioic acid、norbixinおよび*trans, trans*-muconic acid）の α S凝集体形成および凝集体解離に対する作用を*in vitro*で検討した。

第 2 節 材料・実験方法

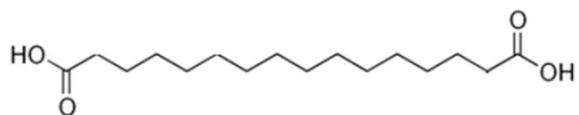
2.2.1 材料

サフラン粉末は松浦薬業（愛知、日本）より入手した。サフラン粉末を10% dimethyl sulfoxide (DMSO)/Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) または10% DMSO/蒸留水に懸濁させ、超音波発生装置 (Model 2510、Branson、CT、USA) を用いて25 °C、30分間超音波抽出後、遠心分離 (3000 rpm、10分間) した上清を試験に使用した。

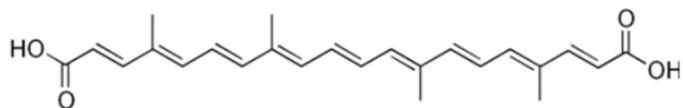
Crocin-1 (Carbosynth、UK)、crocin-2 (Adooq bioscience、Irvine、CA、USA)、crocetin、safranal (以上Toronto research chemicals、North York、Canada)、Hexadecanedioic acid、*trans*、*trans*-muconic acid (以上東京化成、東京、日本) およびnorbixin (Leap Labchem、杭州、中国) を入手し、使用した。crocetin構造類似体の化学構造をFig. 5に示した。



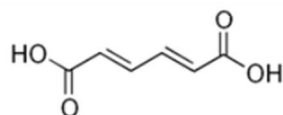
Crocetin



Hexadecanedioic acid



Norbixin



trans,trans-Muconic acid

Fig. 5 Chemical structures of crocetin structural analogs (hexadecanedioic acid, norbixin, and *trans, trans*-muconic acid).

Acetonitrile、DMSO、formic acid、D-PBS、 α S、tannic acid（以上和光純薬、大阪、日本）、 α S凝集体（コスモバイオ、東京、日本）、phosphotungstic acid（応研商事、東京、日本）、methanol（米山薬品、大阪、日本）およびチオフラビンT（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）を手し、使用した。

2.2.2 サフラン中のcrocin-1、crocin-2およびcrocetinの定量

Tong et al. (2015) の方法を一部修正して行った。サフラン抽出液に含まれる主成分（crocin-1、crocin-2、crocetin）の含有量は、High performance liquid chromatography (HPLC) を用いて以下の条件で測定した。

- ・装置：Alliance e2695 (Waters、Milford、MA、USA)
- ・検出器：2489 UV/visible detector (Waters)
- ・検出波長：440 nm
- ・カラム：Inertsil ODS-4 (5 μ m、250 \times 4.6 mm L.D.、GL Sciences、東京、日本)
- ・カラム温度：30 $^{\circ}$ C
- ・移動相：methanol : acetonitrile : 0.2% formic acidを50分間で10 : 15 : 75から100 : 0 : 0に直線グラジエント
- ・流量：0.7 mL/min

2.2.3 α S凝集体形成および凝集体解離に対する作用

2.2.3.1 試料の調製

Ardah et al. (2015) の方法を一部修正して行った。

・ α S凝集体形成に対する作用

α Sを終濃度6.5 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、さらに α S凝集体を終濃度0.36 μ Mになるように加えて、37 $^{\circ}$ Cで3時間振とう (731 cpm、直線) した。

・ α S凝集体解離に対する作用

α S凝集体を終濃度3.5 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間振とう (731 cpm、直線) した。

2.2.3.2 チオフラビンT蛍光法

LeVine (1999) の方法を一部修正して行った。本法はチオフラビンTが α S凝集体のような β シートに富んだ構造に結合すると、その蛍光励起スペクトルが変化することを測定原理としている。各試料にチオフラビンTを終濃度3 μ Mとなるように添加し、マイクロプレートリーダー (Synergy H1; Biotek, VT, USA) を用いて、励起波長450 nm、測定波長486 nmの蛍光強度を測定した。 α S凝集体形成阻害率または α S凝集体解離率は、以下の式を用いて算出した:

$$\begin{aligned} & \alpha \text{S凝集体形成阻害率 (\%)} \text{ または } \alpha \text{S凝集体解離率 (\%)} \\ & = [1 - (A-B) / (C-D)] \times 100 \end{aligned}$$

- A : α S、被験薬、チオフラビンT添加時の蛍光強度
- B : 被験薬、チオフラビンT添加時の蛍光強度
- C : α S、溶媒、チオフラビンT添加時の蛍光強度
- D : 溶媒、チオフラビンT添加時の蛍光強度

2.2.3.3 透過電子顕微鏡 (TEM)

各試料 (2 μ L) を支持膜付グリッド (Cu 400、日本電子、東京、日本) に載せ、2 μ Lのphosphotungstic acid (2%) を滴下し、ネガティブ染色した。TEM (JEM-1400、日本電子、東京、日本) を用いて加速電圧120 kV下で観察した。

2.2.4 統計処理

すべての実験は、再現性を確認するために少なくとも3回行われた。値は、平均値 \pm SEで示した。50%阻害濃度 (IC₅₀) または50%有効濃度 (EC₅₀) の値は、probit法により算出した。

第 3 節 結果

2.3.1 サフラン中のcrocin-1、crocin-2およびcrocetinの定量

サフラン抽出液中のcrocin-1、crocin-2およびcrocetinの含量は、それぞれ 3.92、1.18および0.0259%であった (Table 1)。

Table 1 Crocin-1, crocin-2, and crocetin contents (%) in the saffron extract

Saffron		
Contents (%)		
Crocin-1	Crocin-2	Crocetin
3.92±0.01	1.18±0.03	0.0259±0.0002

The data were expressed as the mean \pm SE (n=3).

2.3.2 α S凝集体形成および凝集体解離に対する作用

サフランは用量依存的に α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示し、その IC_{50} は0.656 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および EC_{50} は4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と算出された (Fig. 6、7)。TEMにおいて、サフラン処理群では対照群に比べて α S凝集体の粒子サイズの縮小および減少が観察された (Fig. 8、9)。Crocic-1、crocic-2、crocetin、norbixinは、 α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示し、 IC_{50} はそれぞれ4.00、0.541、0.0930 (実験1回目)、0.911 μM 、 EC_{50} はそれぞれ4.95、3.63、0.0617 (実験1回目)、0.244 μM であった。一方、safranal、hexadecanedioic acidおよび*trans*, *trans*-muconic acidは、50%以上の α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示さなかった。陽性対照薬であるtannic acidは、 α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示した (Table 2、3)。

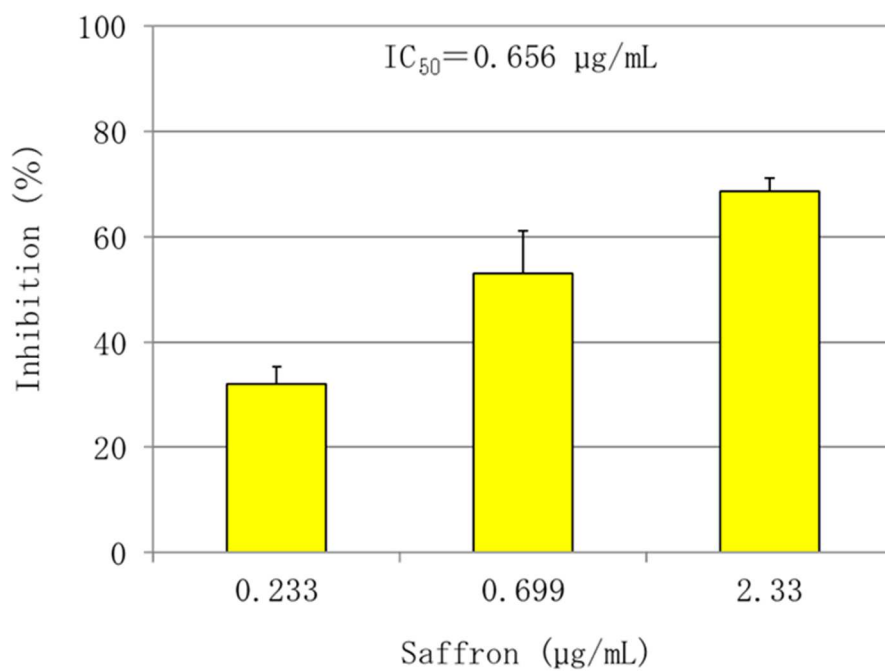


Fig. 6 Effect of saffron on α S aggregation (Thioflavin T fluorescence assay).

Data are expressed as the mean \pm SE (n=3-4).

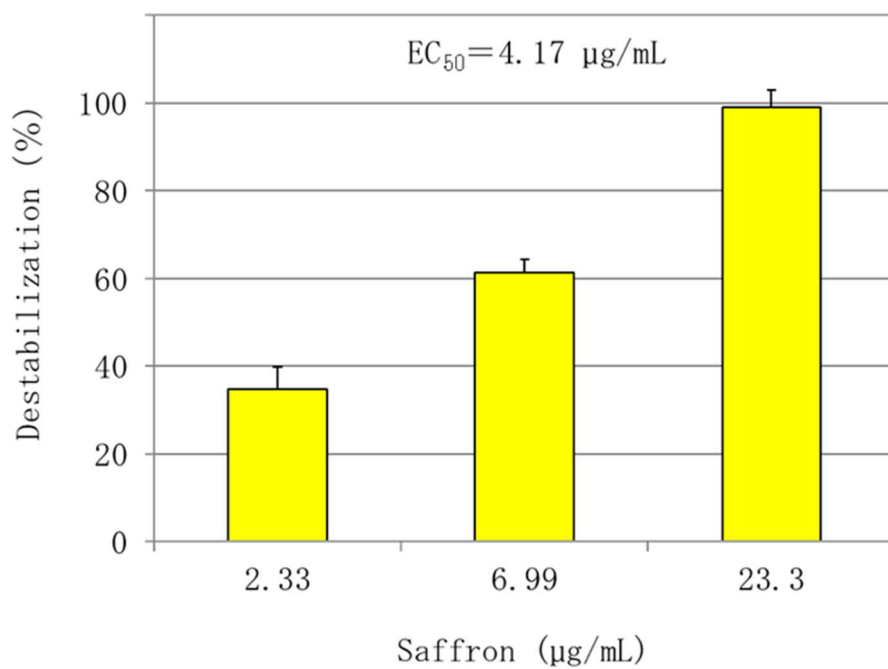
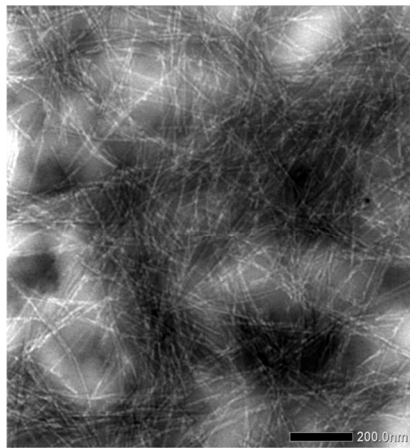
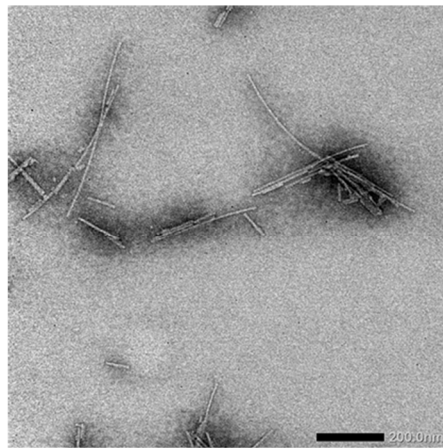


Fig. 7 Effect of saffron on α S fibril dissociation (Thioflavin T fluorescence assay).

Data are expressed as the mean \pm SE (n=4-6).



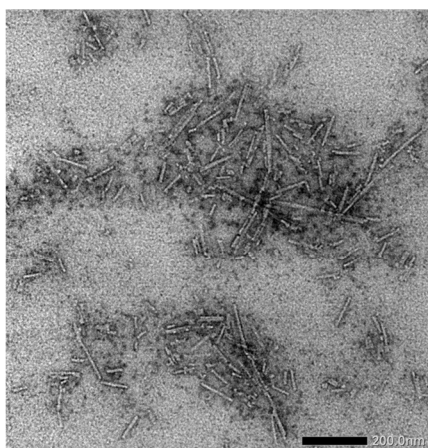
Control (0.5% DMSO)



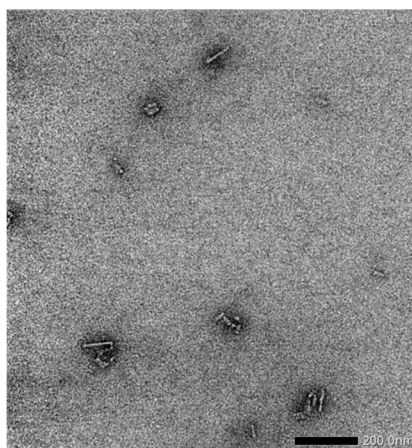
20 µg/mL saffron

Fig. 8 Effect of saffron on α S aggregation (Electron micrographs).

Scale bars indicate a length of 200 nm.



Control (0.5% DMSO)



20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ saffron

Fig. 9 Effect of saffron on αS fibril dissociation (Electron micrographs).

Scale bars indicate a length of 200 nm.

Table 2 IC₅₀ of saffron, crocin-1, crocin-2, crocetin, safranal, hexadecanedioic acid, norbixin, *trans, trans*-muconic acid, and tannic acid on α S aggregation

Drug	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (μ g/mL)	
	First	Second	First	Second
Saffron			0.656	
Crocin-1	4.00		3.91	
Crocin-2	0.541		0.441	
Crocetin	0.0930	0.132	0.0305	0.0433
Safranal	>50		>7.51	
Hexadecanedioic acid		>5		>1.43
Norbixin		0.911		0.346
<i>trans, trans</i> -Muconic acid		>5		>0.711
Tannic acid	1.03		1.75	

First and Second represent the results of the first and second experiments, respectively.

Table 3 EC₅₀ of saffron, crocin-1, crocin-2, crocetin, safranal, hexadecanedioic acid, norbixin, *trans, trans*-muconic acid, and tannic acid on α S fibril dissociation

Drug	EC ₅₀ (μ M)		EC ₅₀ (μ g/mL)	
	First	Second	First	Second
Saffron			4.17	
Crocin-1	4.95		4.84	
Crocin-2	3.63		2.96	
Crocetin	0.0617	0.0876	0.0203	0.0288
Safranal	>50		>7.51	
Hexadecanedioic acid		>5		>1.43
Norbixin		0.244		0.0928
<i>trans, trans</i> -Muconic acid		>5		>0.711
Tannic acid	0.468		0.796	

First and Second represent the results of the first and second experiments, respectively.

第 4 節 考察

サフランは、 α S凝集体形成を阻害し、 α S凝集体を解離させた。 α Sは、PD、レビー小体型認知症、多系統萎縮症およびアルツハイマー病（半数以上の患者）の患者脳にその凝集体の蓄積が観察され、これらの疾患の発症・進行と密接に関係している（Burré, 2015; Goedert, 2001; Hamilton, 2000; Tsigelny et al., 2008）。この結果は、サフランが α S凝集体に関与するこれらの疾患の治療に有用である可能性が考えられた。

次いで、サフランのどの成分が関与しているのか検討したところ、サフラン成分crocic-acid-1、crocic-acid-2およびcrocetinは、 α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示した。今回のサフラン抽出液にはcrocic-acid-1、crocic-acid-2およびcrocetinがそれぞれ3.92、1.18および0.0259%含有する。この含有量から算出されるサフランの作用強度は、今回認められたサフラン抽出液のそれに及ばないことから、これらの化合物だけでサフランの作用を説明することは難しく、その他の活性物質が存在する可能性も考えられた。Crocic-acid-1はcrocetinと2分子のgentiobiose（glucose2分子が β 1 \rightarrow 6結合したもの）が結合したもので、crocic-acid-2はcrocetinと1分子のgentiobioseと1分子のglucoseが結合したものである。サフランにはgentiobioseやglucoseの糖がさらに切断された類縁体（例えばcrocic-acid-3やcrocic-acid-4）も含まれている。また、サフランにはcrocetin（all-*trans*体）の異性体（13-*cis*体）も含まれている（Tong et al., 2015）。これらの類縁物質も、 α Sの凝集体形成阻害および凝集体解離に関与している可

能性が示唆された。

Crocetinが強い α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示したことから、次にcrocetinのどの化学構造部位が活性に影響を与えているのか明らかにするため、その構造類似体 (hexadecanedioic acid、norbixinおよび*trans, trans*-muconic acid) の作用を検討した。これらのうち、norbixinのみが同様の効果を示した。Norbixinとcrocetinに共通する化学構造であるイソプレン単位、 $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$ が、これらの作用を示すために必要であると考えられた。また、同様にイソプレン単位を持つvitamin Aや β -caroteneもこれらの作用を示すことが確認されている (Ono and Yamada, 2007)。一方、norbixinの α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用は、crocetinのそれよりも弱かった。Norbixinとcrocetinのイソプレン単位は、それぞれC20とC24の炭素鎖を含んでおり、これらの化合物の作用の違いは、 α Sに対する炭素鎖の結合親和性に起因すると推測された。

サフランおよびその成分 (crocin-1、crocin-2およびcrocetin) の作用の特徴として、いずれも α S単量体の凝集体形成を阻害し、一方で凝集体を解離させた。 α S凝集体形成阻害作用の機序として、①凝集体を形成する過程を阻害する②生じた凝集体を解離させるという2通りが考えられるが、これらの薬物の α S凝集体形成阻害作用には、凝集体解離作用が一部関わっていると考えられた。

TEMにおいて、サフラン処理群では対照群に比べて α S凝集体の粒子サイズの縮小および減少が観察された。このことは、チオフラビンT蛍光法で認められたサフランのこれらの作用を裏付けるものと考えられた。

サフラン成分crocin-1、crocin-2およびcrocetinは、 α S凝集体形成阻害作用

および α S凝集体解離作用を示し、crocetinが最も強力であった。Crocetin-1をマウスに経口投与すると、消化管および消化管上皮で糖が加水分解され、crocetinに代謝される (Asai et al., 2005)。また、crocetin-2も同様に加水分解され、crocetinに代謝される。サフラン抽出液に含まれるcrocetin量はcrocetin-1やcrocetin-2の量よりはるかに少ないが、このことは、サフランを経口摂取した場合、crocetin量が増えることにより、その生理活性が増強された形で表れることが推測される。

以上まとめると、サフランとその活性成分 (crocetin-1、crocetin-2およびcrocetin) は、 α S凝集体形成阻害作用および α S凝集体解離作用を示し、活性成分の中でcrocetinが最も強力であった。しかしながら、サフランには他の活性成分も含まれている可能性がある。ヒト体内でのサフラン成分の代謝を考慮した場合、この結果はサフランのPD、レビー小体型認知症および多系統萎縮症などの α -シヌクレイノパチーの治療への可能性を示唆するものである。また、今回検討したサフラン成分個々の作用強度が、サフラン抽出液に含まれる量から推定される強度に及ばないことから、より強力な作用を有する成分が含まれている可能性もあり、今後検討が必要と考えられる。

第 3 章 パーキンソン病モデルシヨウジヨウバエにみられる病態表

現型出現に対するサフランの作用 (*in vivo*)

第 1 節 背景

PDは、黒質をはじめとする脳領域のドーパミン神経細胞に α S凝集体（レビー小体）が異常蓄積することを特徴とする神経変性疾患である（Tofaris and Spillantini, 2007; Jankovic, 2008; Lees et al., 2009）。 α Sの凝集体は、ドーパミン神経細胞の機能障害を引き起こし、これがPDの発症・進行に関与していることが知られている（Burré, 2015; Goedert, 2001; Ganjam et al., 2019）。PDは、安静時の振戦、筋固縮、固縮、姿勢反射障害などの運動症状を引き起こす（Jankovic, 2008）。ドーパミン前駆体であるレボドパを用いた補充療法は、PDの幾つかの症状に対して有効である（Fahn et al., 2004）。しかしながら、PDが進行し、より多くの神経細胞が死ぬとレボドパが保持されにくくなり、レボドパの効果は低下する。これは、Wearing-off現象と呼ばれている。さらに、レボドパの長期服用は、不随意運動（ジスキネジア）を特徴とする合併症を引き起こす（Cilia et al., 2014; Schrag and Quinn, 2000）。そのため、新しいPD治療薬が求められている。

サフランとその成分（crocetinおよびcrocin）は、第 2 章で α Sの凝集体形成を阻害し、形成された凝集体を解離させることを報告した（Inoue et al., 2018）。また、Ghasemi et al. (2019) もcrocinが*in vitro*で α S凝集体形成を

阻害することを報告している。これらの報告は、サフランが*in vivo*でドーパミン神経細胞における α Sの異常な蓄積を抑制できる可能性を示している。PDモデル動物 (Giráldez-Pérez et al., 2014) は数多く報告されているが、その中でシヨウジョウバエのモデルは非哺乳動物であるものの、短期間でモデル動物を作成でき、ハイスループットであることから、薬物スクリーニングに適している (Ara et al., 2017; Long et al., 2009; Chung et al., 2020; Ito et al., 2017) 。そこで著者らは遺伝子改変により脳内や複眼に α Sが異常蓄積したPDモデルシヨウジョウバエを用いて、サフランの作用を検討した。その結果、サフランとcrocetinは、PDモデルシヨウジョウバエの運動機能の低下、寿命の短縮、複眼形態異常といった病態表現型の出現を抑えたことから、PD治療に役立つ可能性が示唆された。

第 2 節 材料・実験方法

3.2.1 材料

サフラン粉末は、松浦薬業（愛知、日本）より入手した。*In vivo*試験では、サフラン粉末を蒸留水に懸濁し、ショウジョウバエの培地に加えた。*In vitro*試験では、サフラン粉末を10% DMSO/D-PBSに懸濁させ、超音波発生装置（Model 2510、Branson、CT、USA）を用いて25 °C、30分間超音波抽出した。抽出液は遠心分離（3000 rpm、10分間）し、上清を孔径0.2 μmのメンブレンフィルター（25CS020AS、ADVANTEC TOYO、東京、日本）でろ過滅菌した後、培地に添加した。Acetonitrile、D-MEM/F-12培地、D-PBS、DMSO（以上和光純薬、大阪、日本）、 α S凝集体（コスモバイオ、東京、日本）、MEM non-essential amino acids溶液（ナカライテスク、京都、日本）、penicillin-streptomycin溶液（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）、Fetal bovine serum (FBS)（Life Technologies、Grand Island、NY、USA）およびCell Titer 96®（Promega、Madison、WI、USA）を入手し、使用した。

3.2.2 ショウジョウバエの系統、交配、維持

ショウジョウバエのUAS-SNCA-A30P株、UAS-SNCA-G51D株およびelav-GAL4/Cy0株は、Bloomington Drosophila Stock Center（Bloomington、IN、USA）より入手した。IF/Cy0;elav-GAL4 株は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機

構 (NARO) の霜田政美博士 (現東京大学 大学院農学生命科学研究科教授) よりご恵与していただいた。GMR-GAL4株は、国立遺伝学研究所生物遺伝資源センター (静岡、日本) より入手した。

α S発現系統の作製にはGAL4/UASシステムを用いた。GAL4/UASシステムとは、転写因子GAL4がその認識配列UASに結合する事で、UAS下流の構造遺伝子が発現される仕組みである。系統の作製には、任意の遺伝子プロモーターにGAL4を配置したGal4ドライバー系統と、UAS下流に任意の構造遺伝子を配置したUASレスポンドナー系統を掛け合わせる。Kawasaki et al. (2017) の方法を参考にした。具体的には、UAS-SNCA-A30P株の雌とelav-GAL4/Cy0株の雄を交配し、ヒトA30P変異 α Sを神経細胞に発現させたPDモデルショウジョウバエを作製した。UAS-SNCA-G51D株の雌とIF/Cy0;elav-GAL4株の雄を交配し、神経細胞にヒトG51D変異 α Sを発現させたPDモデルショウジョウバエを作製した。UAS-SNCA-A30P株の雌とGMR-GAL4/Cy0株の雄を交配し、複眼にヒトA30P変異 α Sを発現させたPDモデルショウジョウバエを作製した。

ショウジョウバエの維持は、Sakata et al. (2015) の方法に従った。ショウジョウバエは、培地の入ったバイアル中に、一定の温度 (25 °C) および湿度 (60%-80%) で12時間の明/暗サイクル下で飼育した。培地の組成として、8% コーンミール、5% glucose、5% 乾燥酵母エキスおよび0.64% 寒天からなる標準培地に、防腐剤である0.5% propionic acidと0.5% butyl *p*-hydroxybenzoateを配合した。交配、クライミング試験および寿命試験は25 °Cで行った。複眼分析試験は29 °Cで実施した。

3.2.3 クライミング試験と寿命試験

羽化した $elav-GAL4;UAS-SNCA-A30P$ 株および $UAS-SNCA-G51D;elav-GAL4$ 株の雄ショウジョウバエを回収し、1群24-30匹の複数群に群分けした。ショウジョウバエは、1バイアルあたり8-10匹の密度で収容し、3-4日ごとに新鮮な培地を入れた別のバイアルに移した。

クライミング試験は、Feany and Bender (2000) およびMohite et al.

(2018) の方法に従った。すなわち、ショウジョウバエを空のポリスチレン製バイアル (9.5 cm×2.5 cm) に入れ、穏やかに叩いてハエをバイアルの底に落とした後、10秒間に高さ8 cmのマークまで登ったハエをカウントした。試験は、各セット10回繰り返し行った。

試験期間中、週に一度、ショウジョウバエの生死を観察し、各群の生存率を算出した。ショウジョウバエは、刺激を与えても全く動かないのを死亡とした

(M'Angale and Staveley, 2016; Todd and Staveley, 2012)。

3.2.4 ショウジョウバエ複眼イメージング

$UAS-SNCA-A30P$ 株の雌と $GMR-GAL4/Cy0$ 株の雄を、被験薬含有培地中で交配させた。その後、羽化3日齢の $GMR-GAL4;UAS-SNCA-A30P$ 株の雄の子ショウジョウバエを回収し、その頭部を切り出し両面テープでステージに取り付け、金でスパッタコーティングした。走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-6301F、JEOL、東京、日本) を用いて、5kV下でショウジョウバエ複眼を撮影した (Inoue, 2006; Suzuki et al., 2013)。

3.2.5 細胞毒性試験

SH-SY5Y細胞は、DSファーマバイオメディカル（大阪、日本）から入手し、10% FBS、1% MEM non-essential amino acids溶液、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycinを含むD-MEM/F-12培地を用いて、37 °C、5% CO₂で培養した。細胞を96穴マイクロプレート（353072、Corning、NY、USA）に1×10⁴ cells/wellで移し、24時間培養した後、培地を被験薬と1 µM αS凝集体を含む培地に交換し、48時間培養した。生細胞数の測定を、Cell Titer 96®を用いた3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 法で行った。MTS法は、培地中に添加したMTSが、生細胞により還元されることで生成するホルマザン色素を、マイクロプレートリーダー（Synergy H1、Biotec、VT、USA）を用いて、波長490 nmの吸光度を測定した。このホルマザン色素量は生細胞数に比例する。細胞生存率は、以下の式を用いて算出した：

細胞生存率 (%)

$$= [(A-C) / (B-C)] \times 100$$

A : αS凝集体添加、被験薬添加時の吸光光度

B : αS凝集体未添加、溶媒添加時の吸光光度

C : Blankの吸光光度

3.2.6 統計処理

データの解析は、Excel（Microsoft、Redmond、WA、USA）、KaleidaGraph

(HULINKS、東京、日本) および R (The R Foundation for Statistical Computing、Vienna、Austria) を使用した。クライミング試験および細胞毒性試験のデータは、一元配置分散分析後、多重比較検定 (Dunnett法) にて評価した。寿命試験のデータは、Logrank検定にて評価した。複眼分析試験において、複眼を構成している各個眼の長軸サイズのヒストグラムを、分散分析 (Levene's test) にて評価した。値は、平均値±SEで示した。

第 3 節 結果

3.3.1 A30PまたはG51D変異 α S発現ショウジョウバエのクライミングに対する作用

PD患者は運動障害を示すことが知られている (Jankovic, 2008)。また、神経細胞に α Sを発現させたショウジョウバエは、クライミング能力の低下などの運動障害を示す (Ara et al., 2017; Long et al., 2009; Chung et al., 2020; Feany and Bender, 2000)。A30PやG51Dなどの α S変異は、家族性早期発症型PD患者と関連しており、A30P変異 α S (A30P変異 α S発現ショウジョウバエ) やG51D変異 α S (G51D変異 α S発現ショウジョウバエ) を発現するショウジョウバエは、野生型 α Sを発現するショウジョウバエ (野生型 α S発現ショウジョウバエ) に比べてクライミング能力がさらに低下する (Feany and Bender, 2000; Mohite et al., 2018)。第 2 章で、サフランとその成分 (crocin-1とcrocetin) が α Sの凝集体形成を阻害し、形成された凝集体を解離させることを *in vitro* で示した (Inoue et al., 2018)。これらの作用を *in vivo* で検証するため、食餌性のサフランとcrocetinがPDモデルショウジョウバエのクライミング能力に影響を与えるかどうかについて検討した。サフランおよびcrocetinは、A30P変異 α S発現ショウジョウバエ (Fig. 10A、10B) およびG51D変異 α S発現ショウジョウバエ (Fig. 10C、10D) のクライミング能力の低下を有意に抑制した。

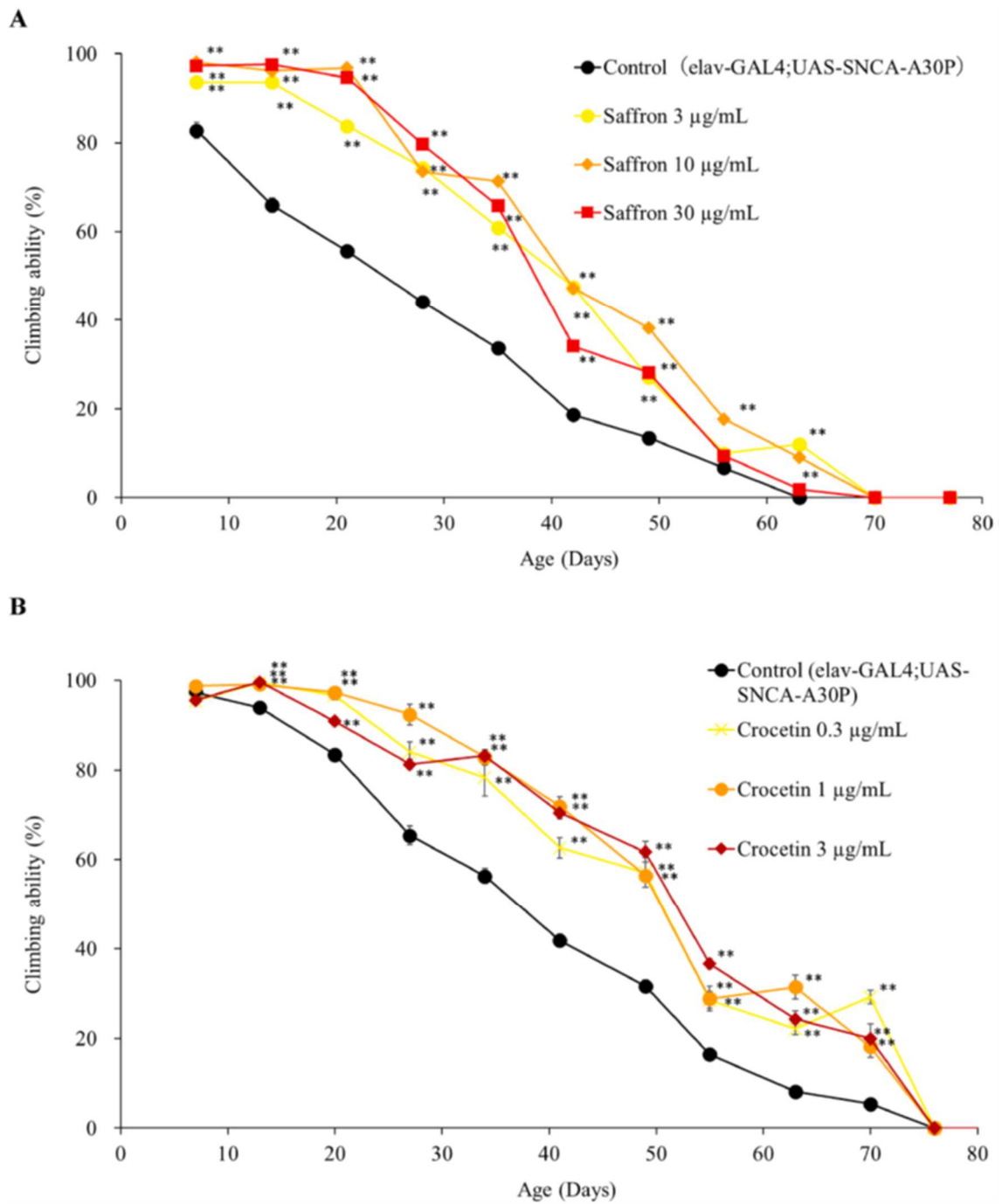


Fig. 10 (continued).

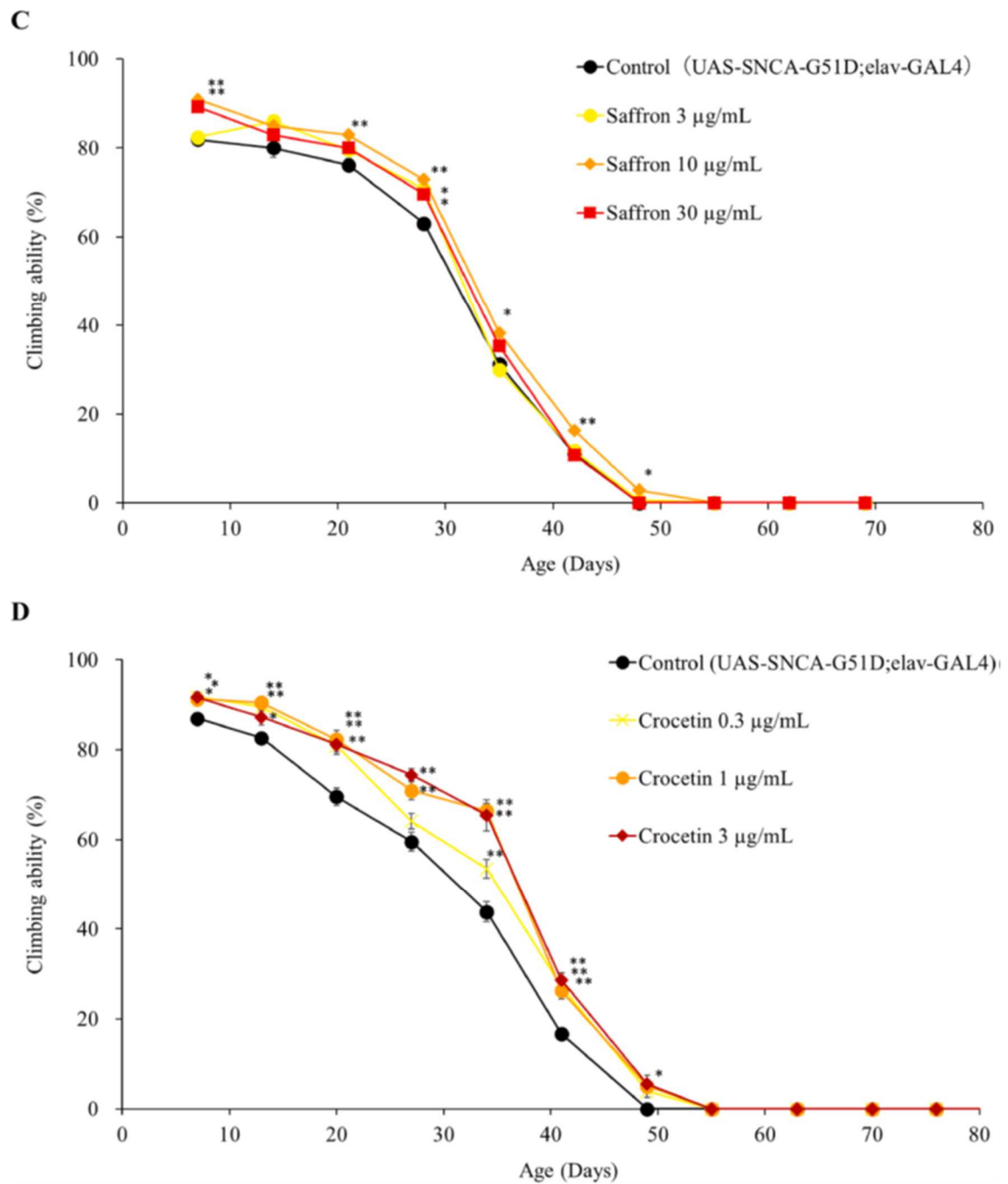


Fig. 10 Saffron and crocetin suppressed the decrease of climbing ability in A30P or G51D flies.

(A, B) Saffron and crocetin suppressed the decrease of climbing

ability in A30P flies. (C, D) Saffron and crocetin suppressed the decrease of climbing ability in G51D flies. Data are expressed as the mean \pm SE of ten trials at each point. (n=24-30). **: P < 0.01, *: P < 0.05 as compared with the control group using Dunnett's test.

3.3.2 A30PまたはG51D変異 α S発現ショウジョウバエの寿命に対する作用

PD患者は、同世代の人々と比較して寿命が短いことが知られている (Dommershuijsen et al., 2020)。A30P変異 α S発現ショウジョウバエは正常ショウジョウバエと比較して寿命に差が殆どないのに対し (Feany and Bender, 2000)、G51D変異 α S発現ショウジョウバエは正常ショウジョウバエよりも寿命が短くなる (Mohite et al., 2018)。サフランおよびcrocetinは、A30P変異 α S発現ショウジョウバエの寿命には影響を与えなかった (Fig. 11A、11B)。一方、3、10、30 μ g/mLのサフランおよび3 μ g/mLのcrocetinは、G51D変異 α S発現ショウジョウバエの寿命を有意に延長させた (Fig. 11C、11D)。

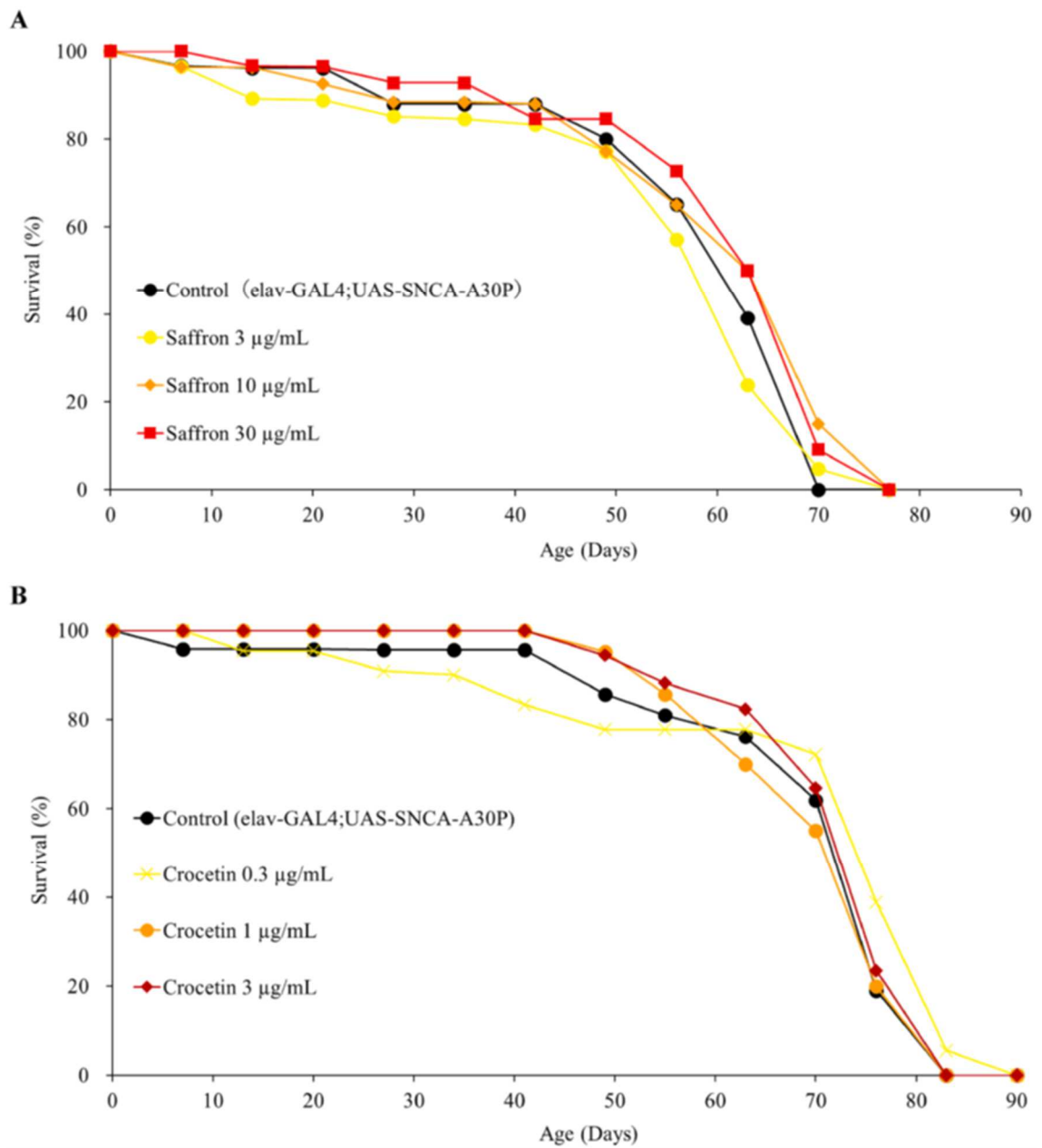


Fig. 11 (continued).

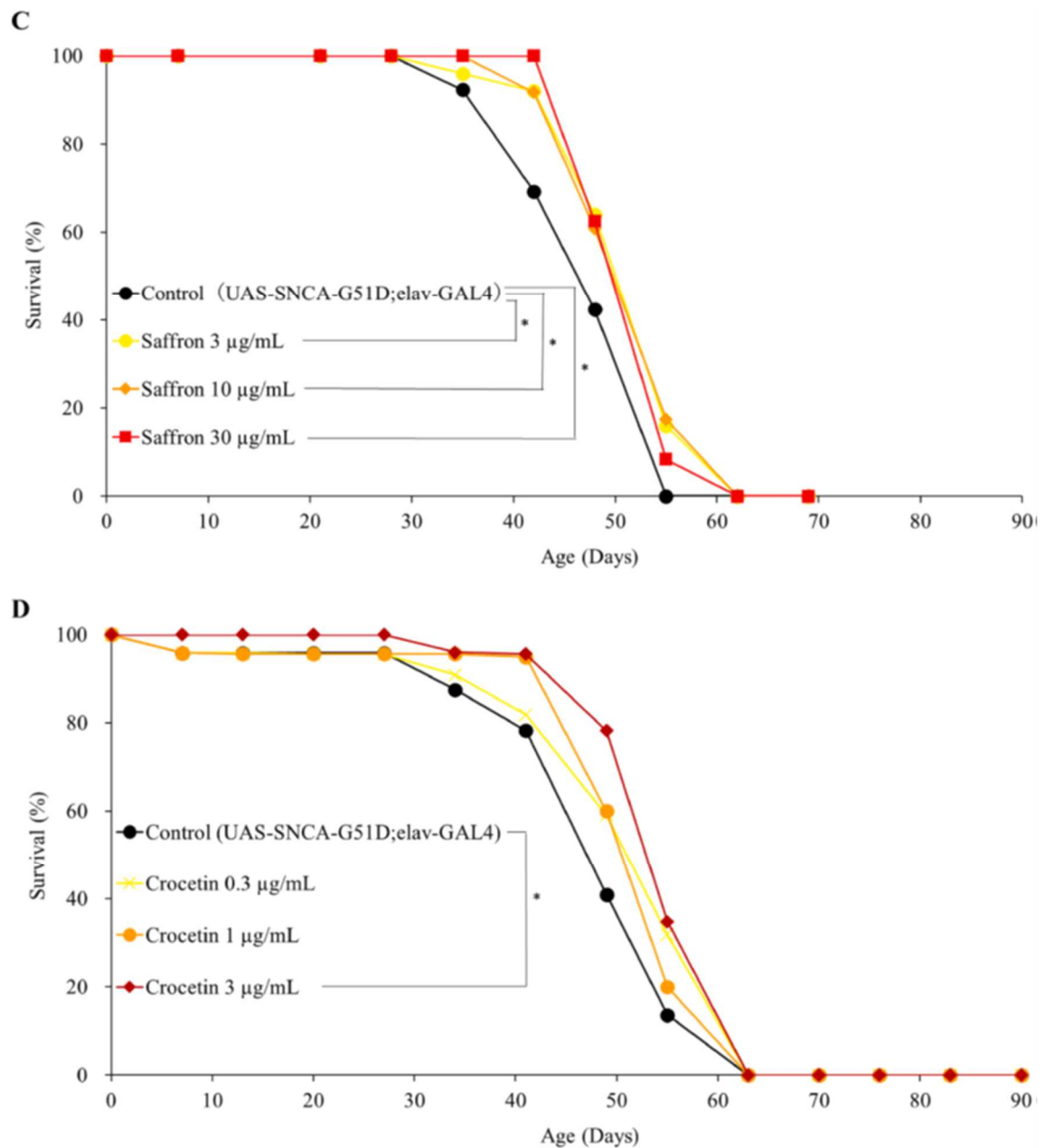


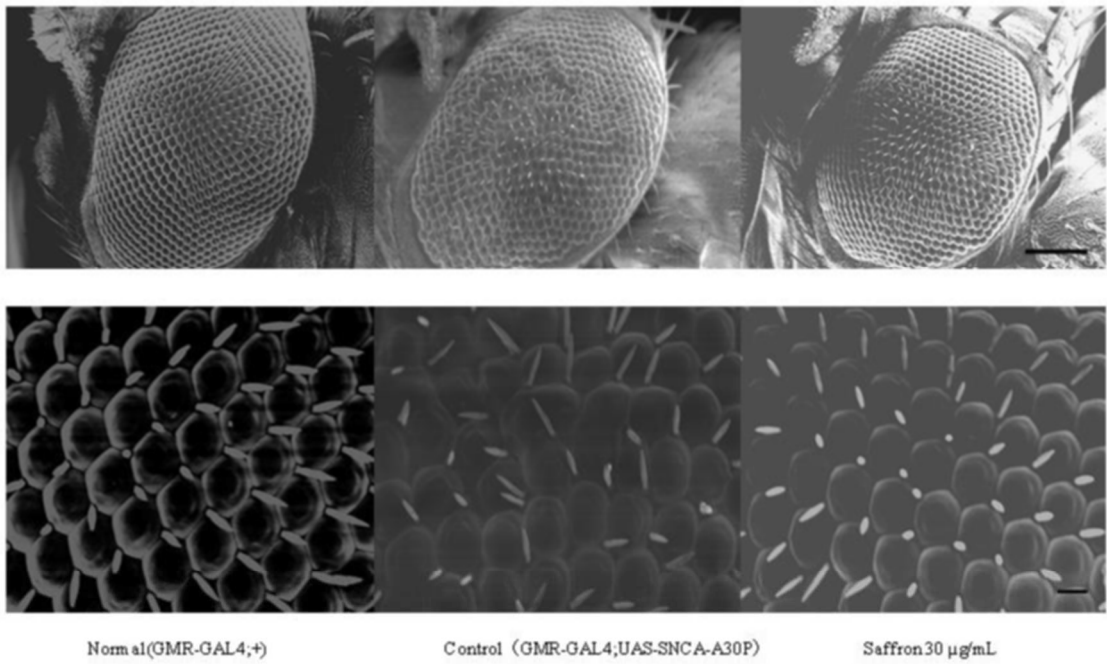
Fig. 11 Saffron and crocetin extended the life span of the G51D flies.

(A, B) Saffron and crocetin did not affect the life span of the A30P flies. (C, D) Saffron and crocetin extended the life span of the G51D flies. The curves show the survival rates of the flies. (n=24-30). *: $P < 0.05$ as compared with the control group using the logrank test.

3.3.3 A30P変異 α S発現ショウジョウバエの複眼形態に対する作用

PD患者の大部分は、視覚障害および網膜異常を生じることが知られている (Indrieri et al., 2020)。複眼に α Sを発現させたショウジョウバエは、網膜の変性を示す (Chung et al., 2020; M'Angale and Staveley, 2016)。A30P変異 α S発現ショウジョウバエは、粗複眼(rough eye)の複眼形態異常を示した (Fig. 12A)。また、A30P変異 α S発現ショウジョウバエの個眼の長軸サイズのヒストグラムは、正常ショウジョウバエのそれよりも分散していた。サフランは、A30P変異 α S発現ショウジョウバエの複眼形態異常を抑制し、個眼のヒストグラムにおいて10 μ g/mL以上から有意にその分散を抑制した (Fig. 12B)。

A



B

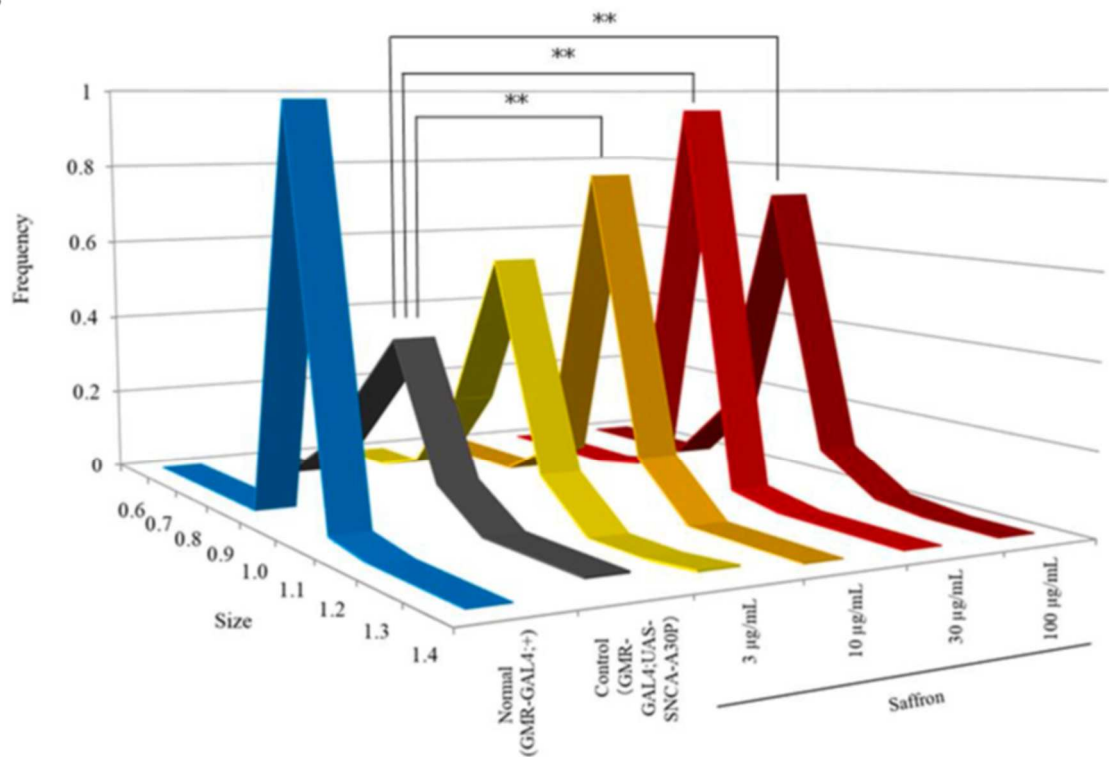


Fig. 12 Saffron suppressed the eye morphological defects in the A30P flies.

(A) The A30P flies had a rough-eyed phenotype and saffron suppressed the phenotype expression. Scale bars indicate a length of 100 (Upper) or 10 (lower) μm . (B) Size histogram of the major axis of the ommatidium in the A30P flies compared with that of the normal flies. **: $P < 0.01$ as compared with the control group using Levene' s test. (n=6 on Normal, n=7 on Control, n=8 on saffron 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=3 on saffron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=9 on saffron 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, n=8 on saffron 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.3.4 α S凝集体誘発SH-SY5Y細胞毒性に対する作用

ヒト由来の神経細胞モデルであるSH-SY5Y細胞に α S凝集体を暴露することによって引き起こされる細胞毒性に対するサフランの作用を検討した。 α S凝集体暴露すると、細胞生存率が約23%低下した。サフラン添加群は、 α S凝集体による細胞生存率の低下を濃度依存的に抑制し、特に20 μ g/mLでcontrol群に比較して有意差が認められた (Fig. 13)。

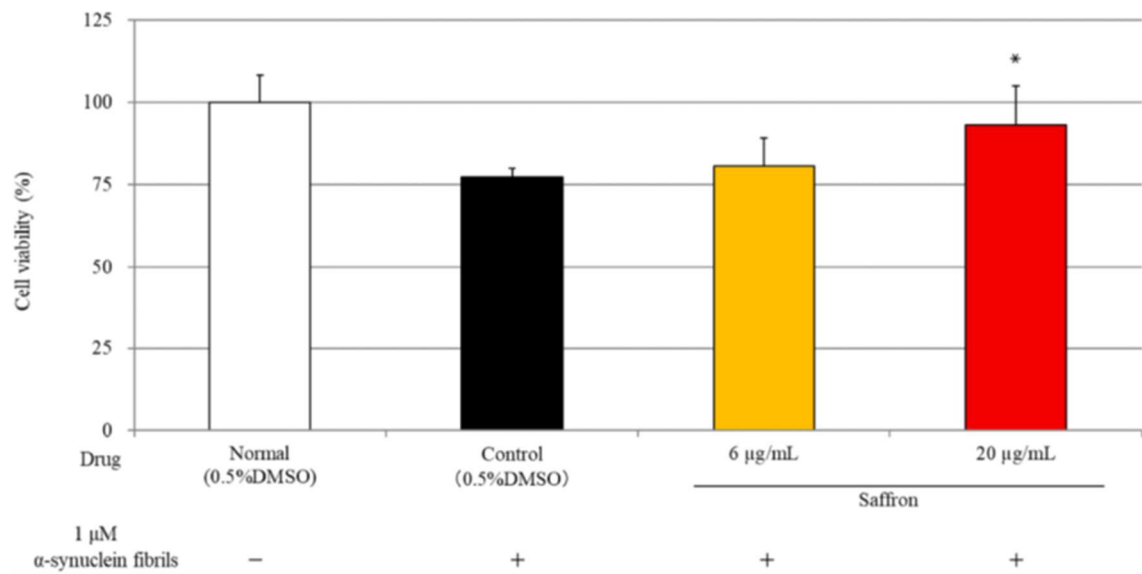


Fig. 13 Saffron had a cytoprotective effect on SH-SY5Y cells cultured with α S fibrils.

Data are expressed as the mean \pm SE. (n=6 or 3 on saffron 6 μ g/mL).

*: P < 0.05 as compared with the control group using Dunnett's test.

第 4 節 考察

サフランのPDモデル動物に対する作用を *in vivo* で検討するために、UAS/GAL4 システムを用いた遺伝子改変ショウジョウバエを作製した。すなわち、*elav* ドライバーを用いてショウジョウバエの神経細胞にA30P変異 α S (*elav-GAL4;UAS-SNCA-A30P*株) またはG51D変異 α S (*UAS-SNCA-G51D;elav-GAL4*株) が発現するように、またはGMRドライバーを用いてショウジョウバエの複眼にA30P変異 α S (*GMR-GAL4;UAS-SNCA-A30P*株) が発現するようにそれぞれトランスフェクトした。神経細胞に野生型 α S を発現させたショウジョウバエは、クライミング能力の低下を示し (Ara et al., 2017; Long et al., 2009; Chung et al., 2020; Feany and Bender, 2000)、複眼に野生型 α S を発現させたショウジョウバエは、網膜変性を示す (Chung et al., 2020; M'Angale and Staveley, 2016)。A30PやG51Dなどの変異 α S は家族性早期発症型PD患者で認められ、A30PまたはG51D変異 α S 発現ショウジョウバエは、野生型 α S 発現ショウジョウバエよりも重篤なPD様症状を示す。例えば、A30PまたはG51D変異 α S 発現ショウジョウバエは、野生型 α S 発現ショウジョウバエよりもさらにクライミング能力が低下する (Feany and Bender, 2000; Mohite et al., 2018)。また、野生型 α S 発現ショウジョウバエは、正常ショウジョウバエと比較して寿命の短縮は認められないが、G51D変異 α S 発現ショウジョウバエは、寿命が短縮する (Mohite et al., 2018)。

今回、サフランはA30PまたはG51D変異 α S 発現ショウジョウバエのクライミング能力の低下を有意に抑制し、G51D変異 α S 発現ショウジョウバエの寿命を有意

に延長させた。さらに、サフランはA30P変異 α S発現ショウジョウバエの複眼形態異常を抑制した。第2章でサフランが*in vitro*で α Sの凝集体形成を阻害し、形成された凝集体を解離させることを報告した (Inoue et al., 2018)。このことは、*in vitro*で認められたサフランの α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用が*in vivo*でも発現し、PDモデルショウジョウバエにおけるクライミング能力の低下、寿命の短縮、複眼形態異常といった病態表現型の出現を抑えたと考えられた。一方、サフランは、抗酸化作用など多くの薬理作用を有する (Mashmoul et al., 2013)。 α S凝集体の蓄積は、活性酸素種 (ROS) を発生させる (Cookson, 2005)。過剰なROSは酸化ストレスを生じ、ドーパミン神経細胞を含む神経細胞に障害を引き起こすこと、さらにショウジョウバエではクライミング能力の低下など運動機能障害を引き起こすことが知られている (Cookson, 2005; Long et al., 2009)。このことから、サフランの抗酸化作用が今回のPDモデルショウジョウバエに対する効果に一部関与している可能性も考えられた。

Crocetinは、PDモデルショウジョウバエに対してサフランと同様の改善作用を示した。サフラン成分の中で、crocetin類 (crocetin-1、crocetin-2) およびcrocetinは、*in vitro*で α S凝集体形成を阻害し、形成された凝集体を解離させることを報告した (Inoue et al., 2018)。サフランにはcrocetinよりもcrocetin-1が圧倒的に多く含有している (Inoue et al., 2018) が、crocetin-1は血液脳関門を殆ど通過できず、 α Sが異常蓄積している脳神経組織に到達できない。一方、crocetinは経口摂取でも脳血液関門を通過することがラットで報告されている (Yoshino et al., 2011)。また、crocetin-1は経口摂取すると消化

管内および消化管上皮で糖が加水分解され、crocetinに代謝されることがマウスで報告されている (Asai et al., 2005)。また、crocin-2も同様に加水分解され、crocetinに代謝される。これらのことから、PDモデルショウジョウバエに対するサフランの作用は、生体内でcrocin類から代謝されたcrocetinによって主に引き起こされていると推測された。

サフランおよびcrocetinは、クライミング能力に関してはG51D変異 α S発現ショウジョウバエよりもA30P変異 α S発現ショウジョウバエに、一方寿命に関してはA30P変異 α S発現ショウジョウバエよりもG51D変異 α S発現ショウジョウバエに対して強力な改善作用を示した。このように2つの変異 α S発現ショウジョウバエに対しサフランおよびcrocetinの作用が異なったが、これは正常のショウジョウバエに比較して、A30P変異 α S発現ショウジョウバエではクライミング能力の低下が、G51D変異 α S発現ショウジョウバエでは寿命短縮がより顕著に現れることから、サフランやcrocetinが*in vivo*で α S凝集体を抑制した結果、A30P変異 α S発現ショウジョウバエではクライミング能力の改善として、G51D変異 α S発現ショウジョウバエでは寿命の延長として現れやすかったものと推察された。

サフランは、 α S凝集体によるSH-SY5Y細胞障害を抑制した。現在のPD研究は、ヒト由来の初代ドーパミン神経細胞を入手・維持することが難しいため、神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を神経細胞モデルとして用いられている (Xicoy et al., 2017)。この細胞株は、ヒト由来でドーパミンを含むカテコールアミン作動性神経細胞の特性を持っている (Xicoy et al., 2017)。今回の結果は、サフランが α S凝集体によるヒト由来神経細胞に対する細胞障害を防御する可能性が推測された。

以上まとめると、サフランは*in vivo*で α S発現ショウジョウバエの運動機能の低下、寿命の短縮、複眼形態異常といったPD様の病態表現型の出現を抑え、crocetinが主要な活性成分であることを示した。サフランおよびcrocetinは、 α S凝集体形成を阻害し、形成された凝集体を解離させることで、これらのPD様の病態表現型の出現を抑えたことが示唆された (Fig. 14)。以上のことから、サフランおよびcrocetinはヒトのPD治療に役立つ可能性が示唆された。

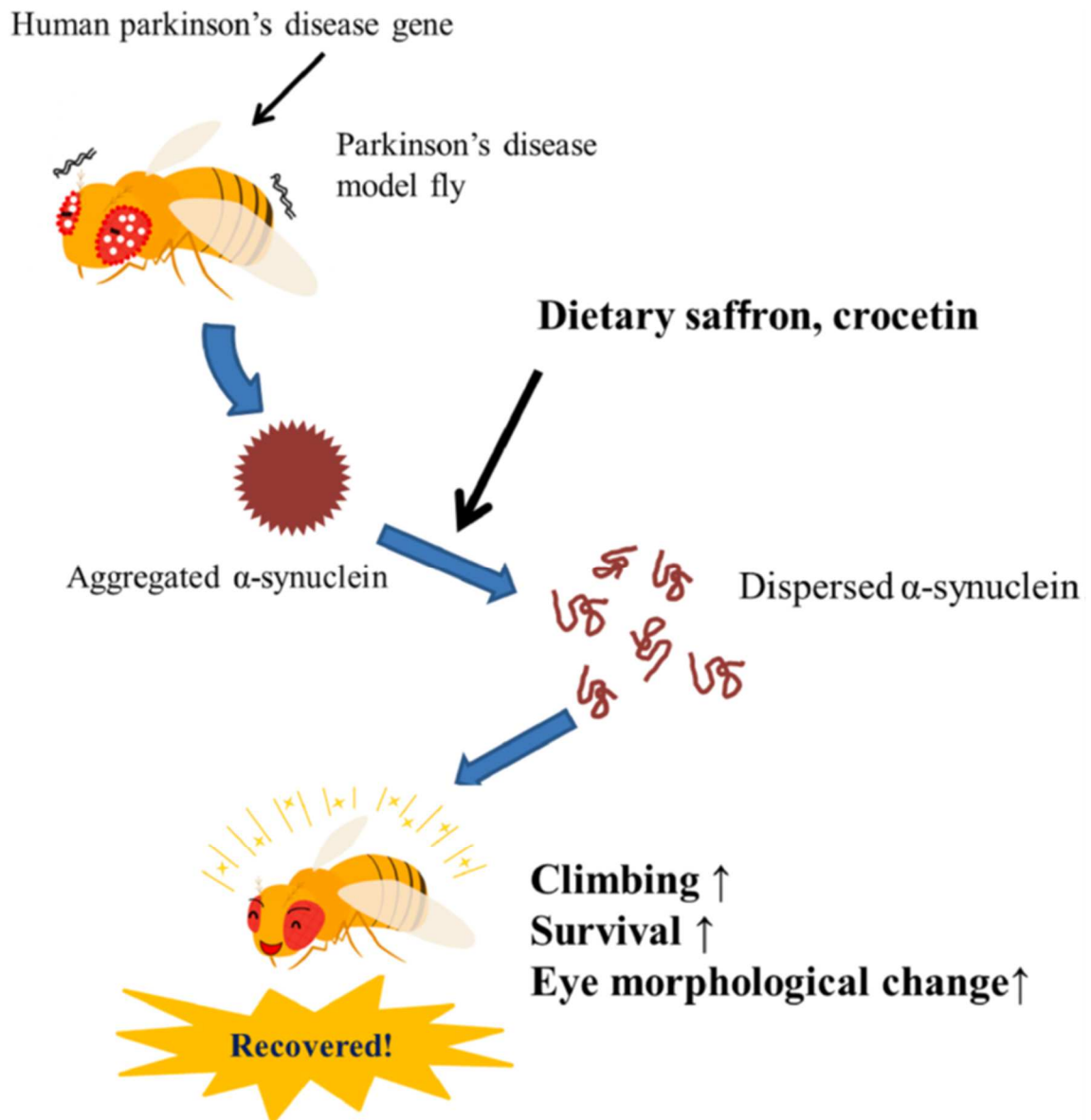


Fig. 14 Graphical concepts.

Human Parkinson's disease genes (A30P or G51D mutated α S) were expressed in the flies' eyes or neurons using the elav or GMR drivers, respectively. Administering dietary saffron and crocetin to PD model flies had a positive effect on α S aggregation, climbing ability, survival rate, and eye morphological defects.

第 4 章 種々のアミロイドタンパク質 (α S、アミリン、タウ、アミロイド β および β 2MG) 凝集に対するサフランおよびその成分の作用 (*in vitro*)

第 1 節 背景

第 2 章および第 3 章で、サフランおよびその成分 crocetin が α S 凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示し、脳内や複眼に α S が異常蓄積した PD モデル ショウジョウバエの運動機能の低下、寿命の短縮、複眼形態異常といった病態表現型の出現を抑えたことから、ヒトの PD 治療に役立つ可能性を報告した。

α S のように凝集性のあるタンパク質は「アミロイドタンパク質」と呼ばれ、その凝集体によって引き起こされる疾患の総称は「アミロイドーシス」と呼ばれている (後藤祐児, 2009; Knowles et al., 2014; Giorgetti et al., 2018; Benson et al., 2020)。アミロイドーシスは、現在でも有効性の高い治療法はなく、QOL の低い疾患であることが知られている。代表的なアミロイドタンパク質とアミロイドーシスの疾患名との関係を Table 4 にまとめた。例えば、アミロイド β 凝集体である老人斑や、タウ (3R、4R) 凝集体である神経原線維化はアルツハイマー型認知症患者の脳内で、タウ (3R) 凝集体であるピック球およびタウ (4R) 凝集体である房状アストロサイトが、それぞれ前頭側頭型認知症 (ピック病) および進行性核上性麻痺患者の脳内で観察される。アミリン凝集

体は90%以上の2型糖尿病患者の膵臓β細胞で認められており、アルツハイマー型認知症患者の脳内にも見出だされていることから、その病態への関与が示唆されている (Zhang et al., 2016)。β2MGは通常腎臓から排泄されて蓄積しないが、腎機能の低下した透析患者においてその凝集体が観察され、透析アミロイドーシスと呼ばれている。また、β2MGの凝集体は、主に骨関節組織に蓄積し、手根管症候群、破壊性脊椎関節症および骨嚢胞などの多彩な骨関節障害を生じる。病態が進行するとその蓄積が全身の諸臓器にも及び、心臓に蓄積すると心不全症状を引き起こす (秋葉, 2011)。

Table 4 Associations between amyloid proteins and clinical disease of amyloidosis

Amyloid protein	Clinical disease of amyloidosis
α S	Parkinson's disease Lewy body disease Multiple system atrophy
Amyloid β	Alzheimer's disease
Tau (3R, 4R)	Alzheimer's disease
(3R)	Pick's disease
(4R)	Progressive supranuclear palsy
Amylin	Type2 diabetes
β 2MG	Dialysis related amyloidosis
Prion	Creutzfeldt-Jakob disease
Transthyretin	Familial amyloidosis
Huntingtin	Huntington's disease
Cristallins	Cataract

サフランは、 α Sのみならず他のアミロイドタンパク質の凝集体形成も阻害し、その凝集体によって引き起こされる疾患を改善できるのではないかと考えた。その手掛かりを探ることを目的に本章では、 α S以外の代表的なアミロイドタンパク質（アミロイド β 、タウ、アミリンおよび β 2MG）に対するサフランの凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を検討した。また、サフランの活性成分の探索として、第2章および第3章で検討したサフラン成分に加えて今回新たに2つのサフラン成分（crocetin dialdehyde、zeaxanthin）を入手した。これら化合物のアミロイドタンパク質凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用も併せて検討した。

第 2 節 材料・実験方法

4.2.1 材料

サフラン粉末は松浦薬業（愛知、日本）より入手した。サフラン粉末を10% DMSO/D-PBSに懸濁させ、超音波発生装置（Model 2510、Branson、CT、USA）を用いて25 °C、30分間超音波抽出後、遠心分離（3000 rpm、10分間）した上清を試験に使用した。

Crocin-1、crocetin dialdehyde（以上Carbosynth、UK）、crocin-2（Adooq bioscience、Irvine、CA、USA）、crocetin、safranal（以上Toronto research chemicals、North York、Canada）およびzeaxanthin（以上Cayman、Ann Arbor、MI、USA）を入手し、使用した。

DMSO、D-PBS、 α S（以上和光純薬、大阪、日本）、 α S凝集体（コスモバイオ、東京、日本）、アミロイド β （1-42）（ペプチド研究所、大阪、日本）、アミリン（Bachem、Bubendorf、Switzerland）、 β 2MG（Lee Biosolutions、Maryland Heights、MO、USA）、ヘパリン（扶桑薬品、大阪、日本）およびチオフラビンT（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）を入手し、使用した。タウは、微小管結合領域（Microtubule-binding domain）が3リピート（3R）タウまたは4リピート（4R）タウをYao et al.（2003）の方法に従って作製し、使用した。

4.2.2 種々のアミロイドタンパク質（ α S、アミロイド β 、タウ（3R、4R）、アミリンおよび β 2MG）凝集に対する作用

4.2.2.1 試料の調製

- ・ α S凝集体形成に対する作用

α Sを終濃度6.5 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、さらに α S凝集体を終濃度0.36 μ Mになるように加えて、37 $^{\circ}$ Cで3時間振とう（731 cpm、直線）した。

- ・ α S凝集体解離に対する作用

α S凝集体を終濃度3.5 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間振とう（731 cpm、直線）した。

- ・ アミロイド β 凝集体形成に対する作用

アミロイド β を終濃度10 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間振とう（731 cpm、直線）した。

- ・ アミロイド β 凝集体解離に対する作用

アミロイド β をD-PBSに溶解させ、37 $^{\circ}$ C、24時間振とう（731 cpm、直線）してアミロイド β 凝集体を作製した。アミロイド β 凝集体を終濃度10 μ Mとなるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間振とう（731 cpm、直線）した。

- ・ タウ（3R、4R）凝集体形成に対する作用

タウ（3R）またはタウ（4R）を終濃度10 μ Mとなるよう溶解させた50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) –hydrochloric acid (HCl) 緩衝液（pH 7.6）に、被験薬を加え、さらにヘパリンを終濃度10 μ Mになるように加えて、37 $^{\circ}$ Cで、タウ（3R）を用いた場合16時間、タウ（4R）を用いた場合144時間、静置した。

- ・アミリン凝集体形成に対する作用

アミリンを終濃度10 μM となるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間振とう (731 cpm、直線) した。

- ・アミリン凝集体解離に対する作用

アミリンをD-PBSに溶解させ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、48時間振とう (731 cpm、直線) してアミリン凝集体を作製した。アミリン凝集体を終濃度10 μM となるよう溶解させたD-PBSに、被験薬を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で15分間振とう (731 cpm、直線) した。

- ・ β 2MG凝集体形成に対する作用

β 2MGを終濃度25 μM となるよう溶解させた100 mM NaClを含む50 mM glycine-HCl緩衝液 (pH 2.5)に、被験薬を加え、さらにヘパリンを終濃度20 units/mLになるように加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間静置した。

- ・ β 2MG凝集体解離に対する作用

β 2MGを20 units/mLヘパリンおよび100 mM NaClを含む50 mM glycine-HCl (pH 2.5)に溶解させ、37 $^{\circ}\text{C}$ 、72時間静置して β 2MG凝集体を作製した。 β 2MG凝集体を終濃度25 μM となるよう溶解させた100 mM NaClを含む50 mM glycine-HCl緩衝液 (pH 2.5)に、被験薬を加え、さらにヘパリンを終濃度20 units/mLになるように加えて37 $^{\circ}\text{C}$ で24時間静置した。

4.2.2.2 チオフラビンT蛍光法

各試料にチオフラビンTを終濃度3 μM (タウ測定の場合、10 μM) となるように添加し、マイクロプレートリーダーを用いて、励起波長450 nm、測定波長486 nmの蛍光強度を測定した。種々のアミロイドタンパク質 (αS 、アミロイド β 、

タウ（3R、4R）、アミリンおよびβ2MG）凝集体形成阻害率または凝集体解離率は、以下の式を用いて算出した：

アミロイドタンパク質凝集体形成阻害率（%）またはアミロイドタンパク質凝集体解離率（%）

$$= [1 - (A-B) / (C-D)] \times 100$$

A：アミロイドタンパク質、被験薬、チオフラビンT添加時の蛍光強度

B：被験薬、チオフラビンT添加時の蛍光強度

C：アミロイドタンパク質、溶媒、チオフラビンT添加時の蛍光強度

D：溶媒、チオフラビンT添加時の蛍光強度

4.2.3 統計処理

すべての実験は、再現性を確認するために少なくとも3回行われた。IC₅₀またはEC₅₀の値は、probit法により算出した。

第 3 節 結果

4.3.1 種々のアミロイドタンパク質 (α S、アミロイド β 、タウ (3R、4R)、アミリンおよび β 2MG) 凝集に対する作用

サフランは、第 2 章で報告した α S 凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用に加えて、他のアミロイドタンパク質 (アミロイド β 、タウ (3R、4R)、アミリンおよび β 2MG) に対しても凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用 (タウ (3R、4R) 凝集体解離に対する作用は未検討) を示した。その IC_{50} および EC_{50} は、アミロイドタンパク質によって大きく異なり、タウ (4R) に対する IC_{50} および β 2MG に対する IC_{50} と EC_{50} は 100 μ g/mL 以上と弱かった一方で、 α S、アミロイド β およびアミリンに対する IC_{50} は 1 μ g/mL 以下と強力であった (Table 5-7)。

サフランは、成分として crocin-1、crocin-2、crocetin、zeaxanthin、crocetin dialdehyde および safranal を含有する (El Midaoui, 2022; Guo et al., 2022)。Crocin-1、crocin-2 および crocetin は、 α S 凝集体形成阻害作用および α S 凝集体解離作用を示し、crocetin が最も強力であったこと、ならびに safranal はそれらの作用を示さなかったことを第 2 章で報告した。今回 zeaxanthin および crocetin dialdehyde を新たに検討したところ、zeaxanthin は α S 凝集体解離作用を示さなかった一方で、crocetin dialdehyde はその作用を示し、作用強度において crocetin よりも EC_{50} で約 3 倍強力であった (Table 7)。

Crocin-1、crocin-2、crocetin および crocetin dialdehyde は、 α S 以外の他のアミロイドタンパク質 (アミロイド β 、タウ (3R、4R)、アミリンおよび β

2MG) に対して、タウ (4R) 凝集体形成に対する crocin-1、 β 2MG 凝集体形成および凝集体解離に対する crocetin および crocetin dialdehyde を除いて凝集体形成阻害作用 (アミリン凝集体形成に対する crocetin dialdehyde の作用は未検討) および凝集体解離作用 (タウ (3R、4R) 凝集体解離に対する作用は未検討) を示した。特に crocetin のアミロイド β 、アミリン凝集体形成阻害作用、アミリン凝集体解離作用、crocetin dialdehyde のタウ (3R、4R) 凝集体形成阻害作用、 α S、アミロイド β 凝集体解離作用は、検討した成分の中で最も強力であった。一方、zeaxanthin は、タウ (3R、4R) 凝集体形成阻害作用が認められたものの、それ以外のアミロイドタンパク質に影響せず、safaranal はいずれのアミロイドタンパク質にも影響しなかった (Table 5-7)。

Table 5 IC₅₀ of saffron, crocin-1, crocin-2, crocetin, crocetin dialdehyde (crocetindial), zeaxanthin and safranal on αS, amyloid β and β2-microglobulin (β2MG) aggregation

Drug	αS		Amyloid β		Amylin		β2MG	
	IC ₅₀		IC ₅₀		IC ₅₀		IC ₅₀	
	(μM)	(μg/mL)	(μM)	(μg/mL)	(μM)	(μg/mL)	(μM)	(μg/mL)
Saffron	0.656		0.802		0.562		132	
Crocin-1	4.00	3.91	0.622	0.608	0.412	0.403	27.3	26.7
Crocin-2	0.541	0.441	0.0706	0.0575	0.180	0.147	30.8	25.1
Crocetin	0.113	0.0369	0.0445	0.0146	0.0279	0.00916	>50	>16.4
Crocetindial	N/A	N/A	0.0542	0.0161	N/A	N/A	>50	>14.8
Zeaxanthin	N/A	N/A	>5	>2.88	N/A	N/A	>5	>2.88
Safranal	>50	>7.51	>5	>7.51	N/A	N/A	>5	>7.51

N/A: not available

Table 6 IC₅₀ of saffron, crocin-1, crocin-2, crocetin, crocetin dialdehyde (crocetindial), zeaxanthin and safranal on tau (3R, 4R) aggregation

Drug	Tau 3R		Tau 4R	
	IC ₅₀		IC ₅₀	
	(μ M)	(μ g/mL)	(μ M)	(μ g/mL)
Saffron		6.8		136
Crocin-1	2.1	2.1	>10	>9.8
Crocin-2	2.3	1.9	0.35	0.29
Crocetin	4.6	1.5	1.2	0.39
Crocetindial	0.13	0.039	0.26	0.077
Zeaxanthin	7.2	4.1	3.8	2.2
Safranal	>10	>1.5	>10	>1.5

This study was conducted by Prof. Hachiro Sugimoto at the Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, in collaboration with Kyushin Pharmaceutical Co. Permission to use the data was granted by Prof. Hachiro Sugimoto.

Table 7 EC₅₀ of saffron, crocin-1, crocin-2, crocetin, crocetin dialdehyde (crocetindial), zeaxanthin and safranal on α S, amyloid β and β 2-microglobulin (β 2MG) fibril dissociation

Drug	α S		Amyloid β		Amylin		β 2MG	
	EC ₅₀		EC ₅₀		EC ₅₀		EC ₅₀	
	(μ M)	(μ g/mL)	(μ M)	(μ g/mL)	(μ M)	(μ g/mL)	(μ M)	(μ g/mL)
Saffron	4.17		13.9		5.75		242	
Crocine-1	4.95	4.84	3.06	2.99	2.79	2.73	17.6	17.2
Crocine-2	3.63	2.96	2.04	1.66	0.936	0.763	27.5	22.4
Crocetin	0.0747	0.0246	0.523	0.172	0.0714	0.0234	>50	>16.4
Crocetindial	0.0278	0.00824	0.112	0.0332	1.17	0.347	>50	>16.4
Zeaxanthin	>5	>7.51	>5	>2.88	>5	>7.51	>5	>7.51
Safranal	>50	>7.51	>5	>7.51	>50	>7.51	>5	>7.51

第 4 節 考察

サフランは、 α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用に加えて、他のアミロイドタンパク質（アミロイド β 、タウ（3R、4R）、アミリンおよび β 2MG）に対しても凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示した。このことから、サフランがこれらのアミロイドタンパク質が関与するアミロイドーシスの予防・治療に有用である可能性が示唆された。

一方、サフランのアミロイドタンパク質凝集体形成作用および凝集体解離作用強度はアミロイドタンパク質により大きく異なり、タウ（4R）に対する IC_{50} および β 2MGに対する IC_{50} と EC_{50} は100 μ g/mL以上であったのに対し、 α S、アミロイド β およびアミリンに対する IC_{50} は1 μ g/mL以下となった。このことからアミロイドタンパク質ごとにサフランに含まれる成分に対する結合親和性が異なり、作用強度に差が生じていることが推測された。

そこで、サフランのどの成分がアミロイドタンパク質の凝集に関与しているのか検討したところ、サフラン成分crocic-acid-1、crocic-acid-2、crocinおよびcrocin dialdehydeは、アミロイドタンパク質（ α S、アミロイド β 、タウ（3R、4R）、アミリンおよび β 2MG）に対して、タウ（4R）凝集体解離に対するcrocin-1、 β 2MG凝集体形成および凝集体解離に対するcrocinおよびcrocin dialdehydeを除いて凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示した。それらの成分が、サフランのアミロイドタンパク質凝集体形成作用および凝集体解離作用に関与して

いると推測された。

上記のサフラン成分でアミロイドタンパク質凝集体形成作用および凝集体解離作用が認められたことから、その構造活性相関を評価した。アミロイドタンパク質 (α S、アミロイド β 、タウ (3R、4R) およびアミリン) の凝集体形成阻害作用または凝集体解離作用は、crocin-1およびcrocin-2よりもcrocetinおよびcrocetin dialdehydeが強力であり、特にcrocetinのアミロイド β 、アミリン凝集体形成阻害作用、アミリン凝集体解離作用、crocetin dialdehydeのタウ (3R、4R) 凝集体形成阻害作用、 α S、アミロイド β 凝集体解離作用が最も強力であった。Crocin-1およびcrocin-2はcrocetinにgentiobioseやglucoseのような糖鎖が結合した配糖体、crocetin dialdehydeはcrocetinのカルボキシル基 (-COOH) がアルデヒド基 (-CHO) に置換したものである。これらのことから、配糖体は活性を弱める可能性があること、カルボキシル基 (-COOH) とアルデヒド基 (-CHO) はアミロイドタンパク質ごとに異なるが少なくとも活性に影響することが示唆された。一方、アミロイドタンパク質 (β 2MG) の凝集体形成阻害作用または凝集体解離作用は、crocin-1およびcrocin-2で認められたのに対し、crocetinおよびcrocetin dialdehydeでは認められなかったことから、 β 2MGにおいては他のアミロイドタンパク質 (α S、アミロイド β 、タウ (3R、4R) およびアミリン) と異なり、配糖体はその活性に必須であることが示唆された。

第 5 章 総括と今後の展望

第 1 節 総括

本研究は、PDを中心としたアミロイドーシスに対するサフランの可能性について探ることを目的に行った。

本研究によって、PDの原因物質と考えられている α S凝集体に対するサフランの作用を*in vitro*で検討し、サフランおよびcrocetinをはじめとするその色素成分が α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示すことを明らかにした。次いで、*in vitro*で認められたサフランおよびcrocetinによる α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用が*in vivo*で効果を示すかどうかを検証するため、脳内や複眼に α Sが異常蓄積することが認められているPDモデルショウジョウバエにサフランまたはcrocetinを摂取させたところ、運動機能低下、寿命短縮および複眼形態異常といった病態表現型の出現を抑えることを明らかにした。更に、 α S以外の他のアミロイドタンパク質（アミロイド β 、タウ、アミリンおよび β 2MG）に対しても、サフランおよびcrocetinをはじめとするその色素成分がアミロイドタンパク質凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示すことを明らかにした。最後に、サフラン色素成分のアミロイドタンパク質凝集体阻害作用および凝集体解離作用について比較検討を行い、構造活性相関を明らかにした。

第 2 節 今後の展望

PDの治療は、第 1 章で報告したように治療満足度が低く、現状十分とはいえない。特にPD治療薬は、対症療法であり、根本から治すというものではなく、完治は望めない。そのため、新しい治療薬の開発が求められている。PD治療薬の国内の開発状況をFig. 15に示した。その中でABBV-951（持続皮下注射用のレボドパ/カルビドパのプロドラッグ [ホスレボドパ/ホスカルビドパ]）、KW-6356（ドーパミンアゴニスト）、KW-6356（アデノシンA2A受容体アンタゴニスト）TAK-071（M1受容体ポジティブアロステリックモジュレーター）、DSP-9632P（セロトニン5-HT1A受容体パーシャルアゴニスト）および他家iPS細胞由来ドーパミン神経前駆細胞は、PDによって失われたドーパミン神経細胞の機能を補う、または失われたドーパミン神経細胞に関連して生じた機能低下を補う対症療法であり、根本から治すというものではなく、やはり完治は望めない。一方、PDの原因物質とされる α S凝集体を標的としたPD治療戦略は、根本的な治療法であり、大きな可能性を持っている。その治療戦略は大きく分けて、① α S発現抑制、② α S凝集体形成阻害、③ α S凝集体クリアランス促進、④ α S凝集体毒性の下流を抑制、⑤ α S細胞間伝播阻止の5つに分類される（Fig. 16）。細胞間伝播阻止（抗体により細胞外 α Sを除去する）を機序としたPD治療薬候補TAK-341/MEDI1341（抗 α S抗体）およびRG7935（抗 α Sモノクローナル抗体）の開発が進められている。特にRG7935は、早期PDを対象としたフェーズ1bの臨床試験で、60 mg/kg投与群において血清中遊離 α Sを投与前の3%のレベルまで低下させている（長谷川，2020）。一

方、国内ではなく海外（米国）であるが、 α S凝集体形成阻害を機序したPD治療薬候補NPT200-11（ノバルティスファーマ株式会社）の開発が進められている（長谷川，2020）。NPT200-11をヒト α S発現マウスに2カ月間経口投与すると、網膜および大脳皮質 α S蓄積が抑制され、運動機能が改善したことを報告しており（Price et al., 2018）、現在米国でフェーズ2の臨床試験が進行中である。著者は、食品添加物（香辛料、着色料、香料）および医薬品（鎮痛、鎮静、通経剤）としてヒトで長い使用経験のある、すなわちヒトでの安全性が高いサフランの α S凝集体に対する可能性を検討した。

フェーズ	品名 (開発番号等)	予定効能/作用機序等/一般名/剤形等	会社名	提携・起源等
抗パーキンソン病薬 〔新規化合物等〕				
フェーズ3	ABBV-951	パーキンソン病	アッヴィ	
フェーズ2	KDT-3594	パーキンソン病/ドパミン受容体刺激作用/ 経口	キッセイ薬品工業	
フェーズ2	KW-6356	パーキンソン病/アデノシンA2A受容体拮抗 剤/逆作動剤/経口	協和キリン	
フェーズ2	TAK-071	パーキンソン病/M1ポジティブアロステリッ クモジュレーター (M1PAM) /経口	武田薬品工業	
フェーズ1/2	他家iPS細胞由来ドパミン 神経前駆細胞	パーキンソン病/他家iPS細胞由来ドパミン 神経前駆細胞/細胞/医師主導治験	住友ファーマ	京都大学iPS細胞研究所
フェーズ1	TAK-341/MEDI1341	パーキンソン病/抗 α -シヌクレイン抗体/注	武田薬品工業	AstraZeneca
フェーズ1	RG7935	パーキンソン病/抗 α -シヌクレインモノク ローナル抗体/prasinezumab/注	中外製薬	ロシュ, Prothena
フェーズ1	DSP-9632P	パーキンソン病におけるレボドパ誘発性ジ スキネジア/セロトニン5-HT1A受容体パー シャルアゴニスト/貼付剤	住友ファーマ	

Fig. 15 2022年4月版 新薬開発一覧 ー薬効・会社別主な国内開発状況ー 2022

年3月15日現在. 株式会社じほう (2022) より引用

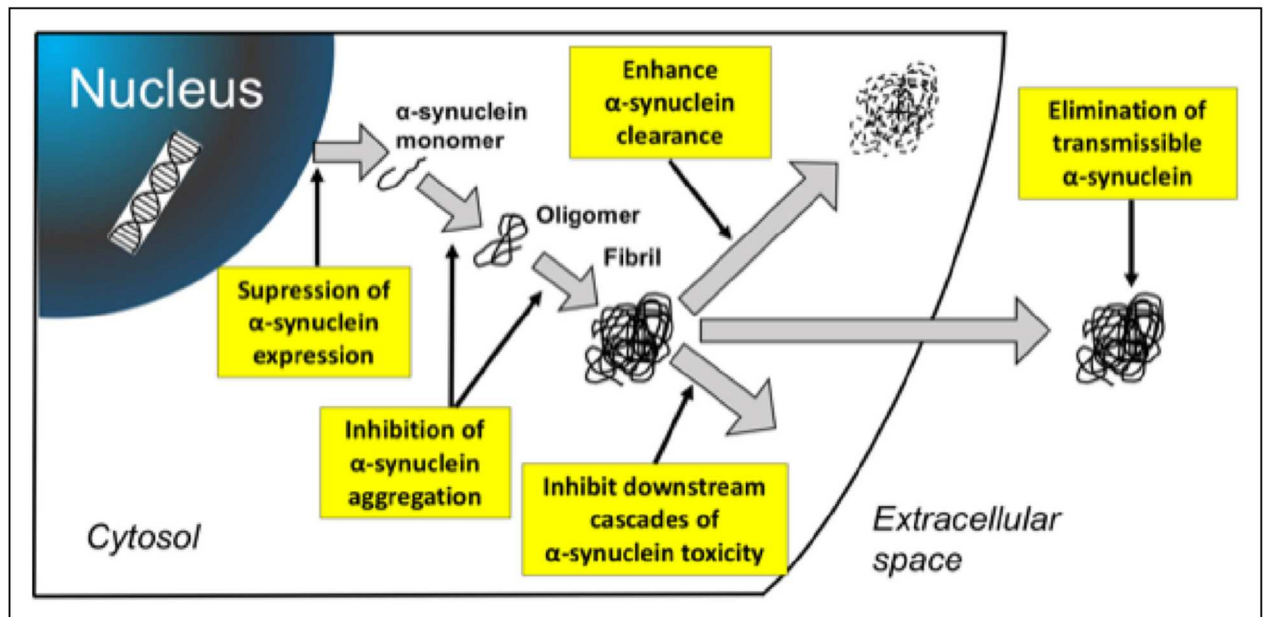


Fig. 16 Emerging disease-modifying strategies targeting α S. 長谷川 (2020) より引用

本研究において、サフランおよびその成分crocetinが*in vitro*で α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示すこと、脳内や複眼に α Sが異常蓄積したPDモデルショウジョウバエにサフランまたはcrocetinを摂取させたところ、運動機能低下をはじめとする病態表現型の出現を抑えることを確認した。このことから、*in vitro*で認められたサフランおよびcrocetinによる α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用が*in vivo*でも発現し、PD様の病態表現型の出現を抑えたと考えられ、ヒトのPDに対する予防・治療薬として応用できる可能性が示唆された。

言うまでもなく、これらの評価方法のみからサフランのヒトPD予防・治療薬としての可能性を考察することには限界がある。今回サフランのPDモデルに対する効果は、昆虫類であるショウジョウバエを用いて確認されている。ヒト遺伝子の約70%がショウジョウバエにも存在し、特にヒト疾患原因遺伝子に至っては、その約75%がショウジョウバエにも存在している（山口，2016）ものの、哺乳類であるヒトでも同様の効果が発現するかについては更なる検証が必要であり、今後哺乳類であるラットやマウスを用いて詳細な検証を行い、最終的な目的であるヒト臨床試験へのステップとする必要があると考えられた。

サフランは、 α S以外の他のアミロイドタンパク質（アミロイド β 、タウ（3R、4R）、アミリンおよび β 2MG）に対しても凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示した。アミロイド β 、タウ、アミリンおよび β 2MGの凝集体は、主にアルツハイマー病（アミロイド β 、タウ、アミリン）、II型糖尿病（アミリン）お

よび透析アミロイドーシス (β 2MG) の疾患との関連が示唆されている (Giorgetti et al., 2018)。今後、これら疾患の動物モデルを用いた *in vivo* 試験やヒト臨床試験で、サフランの効果を検証することが課題であるが、アルツハイマー病に対する効果に関しては、既にヒト臨床試験が行われている。すなわち、サフランには軽度から中等度のアルツハイマー病患者に対する2重盲検臨床試験があり、サフラン30 mg/日、22週間服用により、アルツハイマー病治療薬であるドネペジル10 mg/日と同等の認知機能の改善があったこと、同投与量で16週間服用により、サフラン服用群の認知機能はプラセボ投与群より有意に高かったことが報告されている (Akhondzadeh et al., 2009; Akhondzadeh et al., 2010)。さらに、サフランには中等度から重度のアルツハイマー病患者に対する2重盲検臨床試験があり、サフラン30 mg/日、48週間服用により、アルツハイマー病治療薬であるメマンチン20 mg/日と同等であったことが報告されている (Farokhnia et al., 2014)。このことは、*in vitro*で認められたサフランによるアミロイド β 、タウの凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用がヒト臨床でも発現し、アルツハイマー病の認知機能を改善した可能性が示唆された。

サフランはどのような機序でアミロイドタンパク質の凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用を示したのか、今回の研究では明らかに出来なかった。Saffari and Amininasab (2021) は、サフラン成分crocin-1の α S凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用機序について明らかにしている。すなわち、原子分子動力学 (MD) 法により、crocin-1が α S単量体のC末端およびNon-amyloid β protein component (NAC) 領域に結合し、それによってタンパク質のコンフォメーションが安定化し、凝集体形成を阻害していること、また、crocin-1が α S凝

集体に結合し、それによって熱力学的不安定化をもたらし、凝集体の解離を促進させることを報告している。Crocin-1以外のサフラン成分の α Sに対する作用機序およびサフラン成分の α S以外のアミロイドタンパク質に対する作用機序についても同様に検証することが今後の課題である。

サフラン成分のアミロイドタンパク質凝集体形成阻害作用および凝集体解離作用について比較検討を行うことで、構造活性相関を明らかにし、特にcrocetinおよびcrocetin dialdehydeが α S、アミロイド β 、タウ、およびアミリンに対し強力に作用することを見出した。天然物であるサフランは、産地の違いや気候の変化等によって、その中に含まれる成分の含量が変化し、効果が不安定になる可能性も考えられる。そのため、サフランを服用するよりも、特に作用が強力であったサフラン成分crocetinまたはcrocetin dialdehydeを服用した方が、確実な効果が期待できると推測される。従って、アミロイドーシス治療薬としてのサフランの開発を進めると同時に、その活性成分の開発も進めるべきであると考えられた。しかしながら一般に天然物の活性成分がそのまま医薬品となっているケースは圧倒的に少なく (Newman and Cragg, 2020)、活性成分を元に (リード化合物と呼ばれる) その構造を修飾することにより、その化学的安定性や活性の増強、標的に対する選択性の向上、毒性の低減など、最適化が図られている。Crocetinまたはcrocetin dialdehydeの構造の一部を変えることにより、こういった最適化を検討することが、今後の課題である。

PDをはじめとするアミロイドーシスの現在の治療は、いずれも症状を軽減させるだけの対症療法であり、病状は徐々に進行していくため、進行を抑制する根本的な治療法の開発が望まれている。その原因はアミロイドタンパク質凝集体の異

常蓄積が関与しているとされ、その凝集体を抑制することは根本的な治療法に繋がると考えられている。本研究は、サフランがPDをはじめとするアミロイドーシスの病状進行を抑える根本的な治療薬としての可能性を示唆するものとして、社会的に大きな意義をもつと考えられ、更なる研究を進めている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導御鞭撻を賜りました筑波大学生存ダイナミクス研究センター センター長（教授） 深水昭吉 先生に謹んで深謝の意を表します。

本論文を審査していただきました筑波大学生命環境系 准教授 木村圭志 先生、筑波大学生命環境系 准教授 柏原真一 先生、筑波大学生命環境系 講師 加香孝一郎 先生に深謝の意を表します。

本研究の第 3 章は、公益財団法人 国際科学振興財団と救心製薬株式会社の共同研究の成果をまとめたものであり、御指導賜りました国際科学振興財団時間生物学研究所 所長 石田直理雄 先生、川崎陽久 博士、鈴木孝洋 博士に深く感謝申し上げます。

本研究の第 4 章における、タウ（3R、4R）作製およびタウ凝集体形成に対するサフランの作用の検討を快く引き受けて頂き、また本論文にそのデータの使用をご許可くださいました同志社大学生命医科学研究科 客員教授 杉本八郎 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の機会を与えていただきました、救心製薬株式会社 堀 正典会長、堀厚社長（博士）に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言、御助力を賜りました、救心製薬株式会社東京研究所 所長 清水康晴 博士に心より感謝申し上げますと共に、種々のご協

力を頂きました救心製薬株式会社の皆様に感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、支えてくれた家族に心より感謝致します。

参考文献

- Akhondzadeh S, Sabet MS, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SSh, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Zare F, Moradi A (2009) Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther* 35:581-588
- Akhondzadeh S, Shafiee Sabet M, Harirchian MH, Togha M, Cheraghmakani H, Razeghi S, Hejazi SS, Yousefi MH, Alimardani R, Jamshidi A, Rezazadeh SA, Yousefi A, Zare F, Moradi A, Vossoughi A (2010) A 22-week, multicenter, randomized, double-blind controlled trial of *Crocus sativus* in the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 207:637-643
- Ahmadpanah M, Ramezanshams F, Ghaleiha A, Akhondzadeh S, Sadeghi Bahmani D, Brand S (2019) *Crocus Sativus* L. (saffron) versus sertraline on symptoms of depression among older people with major depressive disorders—a double-blind, randomized intervention study. *Psychiatry Res* 282:112613
- Ahn JH, Hu Y, Hernandez M, Kim JR (2011) Crocetin inhibits beta-amyloid fibrillization and stabilizes beta-amyloid oligomers. *Biochem Biophys Res Commun* 414:79-83

- Ara G, Afzal M, Jyoti S, Siddique YH (2017) Effect of myricetin on the transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Bull Fac Pharm Cairo Univ* 55:259-262
- Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Abul Khair SB, Kazim AS, Minhas ST, Al-Tel TH, Al-Hayani AA, Haque ME, Eliezer D, El-Agnaf OM (2014) Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of α -synuclein fibril formation and toxicity. *Front Aging Neurosci* 6:197
- Ardah MT, Paleologou KE, Lv G, Menon SA, Abul Khair SB, Lu JH, Safieh-Garabedian B, Al-Hayani AA, Eliezer D, Li M, El-Agnaf OM (2015) Ginsenoside Rb1 inhibits fibrillation and toxicity of alpha-synuclein and disaggregates preformed fibrils. *Neurobiol Dis* 74:89-101
- Asai A, Nakano T, Takahashi M, Nagao A (2005) Orally administered crocetin and crocins are absorbed into blood plasma as crocetin and its glucuronide conjugates in mice. *J Agric Food Chem* 53:7302-7306
- Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westermarck P (2020) Amyloid nomenclature 2020: update and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 27:217-222
- Burré J (2015) The synaptic function of α -synuclein. *J Parkinsons Dis*

5:699-713

Chung HJ, Islam MS, Rahman MM, Hong ST (2020) Neuroprotective function of Omi to α -synuclein-induced neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 136:104706

Cilia R, Akpalu A, Sarfo FS, Cham M, Amboni M, Cereda E, Fabbri M, Adjei P, Akassi J, Bonetti A, Pezzoli G (2014) The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain* 137 (Pt 10):2731-2742

Cookson MR (2005) The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* 74:29-52

Dommershuijsen LJ, Heshmatollah A, Darweesh S, Koudstaal PJ, Ikram MA, Ikram MK (2020) Life expectancy of parkinsonism patients in the general population. *Parkinsonism Relat Disord* 77:94-99

Dorsey ER, Bloem BR (2018) The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol* 75:9-10

El Midaoui A, Ghzaïel I, Vervandier-Fasseur D, Ksila M, Zarrouk A, Nury T, Khallouki F, El Hessni A, Ibrahimi SO, Latruffe N, Couture R, Kharoubi O, Brahmi F, Hammami S, Masmoudi-Kouki O, Hammami M, Ghraïri T, Vejux A, Lizard G (2022) Saffron (*Crocus sativus* L.): A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases. *Nutrients* 14:597

- Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K (2004) Parkinson study group, levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351:2498-2508
- Farokhnia M, Shafiee Sabet M, Iranpour N, Gougol A, Yekehtaz H, Alimardani R, Farsad F, Kamalipour M, Akhondzadeh S (2014) Comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: a double-blind randomized clinical trial. *Hum Psychopharmacol* 29:351-359
- Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404:394-398
- Ganjam GK, Bolte K, Matschke LA, Neitemeier S, Dolga AM, Höllerhage M, Höglinger GU, Adamczyk A, Decher N, Oertel WH, Culmsee C (2019) Mitochondrial damage by α -synuclein causes cell death in human dopaminergic neurons. *Cell Death Dis* 10:865
- Ghahghaei A, Bathaie SZ, Kheirkhah H, Bahraminejad E (2013) The protective effect of crocin on the amyloid fibril formation of A β 42 peptide in vitro. *Cell Mol Biol Lett* 18:328-339
- Ghasemi TM, Ghahghaei A, Lagzian M (2019) In-vitro and in-silico investigation of protective mechanisms of crocin against E46K α -synuclein amyloid formation. *Mol Biol Rep* 46:4279-4292
- Giorgetti S, Greco C, Tortora P, Aprile FA (2018) Targeting Amyloid

- Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms. *Int J Mol Sci* 19:2677
- Giráldez-Pérez R, Antolín-Vallespín M, Muñoz M, Sánchez-Capelo A (2014) Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2:176
- Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2:492-501
- Guo ZL, Li MX, Li XL, Wang P, Wang WG, Du WZ, Yang ZQ, Chen SF, Wu D, Tian XY (2022) Crocetin: A Systematic Review. *Front Pharmacol* 12:745683
- Hamilton RL (2000) Lewy bodies in Alzheimer's disease: a neuropathological review of 145 cases using alpha-synuclein immunohistochemistry. *Brain Pathol* 10:378-384
- Indrieri A, Pizzarelli R, Franco B, De Leonibus E (2020) Dopamine, Alpha-Synuclein, and Mitochondrial Dysfunctions in Parkinsonian Eyes. *Front Neurosci* 14:567129
- Inoue E, Shimizu Y, Masui R, Hayakawa T, Tsubonoya T, Hori S, Sudoh K (2018) Effects of saffron and its constituents, crocin-1, crocin-2, and crocetin on α -synuclein fibrils. *J Nat Med* 72:274-279
- Inoue E, Suzuki T, Shimizu Y, Sudo K, Kawasaki H, Ishida N (2021) Saffron ameliorated motor symptoms, short life span and retinal

- degeneration in Parkinson's disease fly models. *Gene* 799:145811
- Inoue TA (2006) Morphology of foretarsal ventral surfaces of Japanese *Papilio* butterflies and relations between these morphology, phylogeny and hostplant preferring hierarchy. *Zoolog Sci* 23:169-189
- Ito K, Kawasaki H, Suzuki T, Takahara T, Ishida N (2017) Effects of Kamikihito and Unkei-to on Sleep Behavior of Wild Type and Parkinson Model in *Drosophila*. *Front Psychiatry* 132:Published online 2017 Jul 31
- Jankovic J (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosur Psych* 79:368-376
- Ji K, Zhao Y, Yu T, Wang Z, Gong H, Yang X, Liu Y, Huang K (2016) Inhibition effects of tanshinone on the aggregation of α -synuclein. *Food Funct* 7:409-416
- José Bagur M, Alonso Salinas GL, Jiménez-Monreal AM, Chaouqi S, Llorens S, Martínez-Tomé M, Alonso GL (2017) Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food. *Molecules* 23:30
- Kawasaki H, Suzuki T, Ito K, Takahara T, Goto-Inoue N, Setou M, Sakata K, Ishida N (2017) Minos-insertion mutant of the *Drosophila* GBA gene homologue showed abnormal phenotypes of climbing ability, sleep and life span with accumulation of hydroxyglucocerebroside. *Gene* 614:49-55

- Karakani AM, Riazi G, Mahmood Ghaffari S, Ahmadian S, Mokhtari F, Jalili Firuzi M, Zahra Bathaie S (2015) Inhibitory effect of corcin on aggregation of 1N/4R human tau protein in vitro. Iran J Basic Med Sci 18:485-492
- Kell G, Rao A, Beccaria G, Clayton P, Inarejos-García AM, Prodanov M (2017) affron® a novel saffron extract (Crocus sativus L.) improves mood in healthy adults over 4 weeks in a double-blind, parallel, randomized, placebo-controlled clinical trial. Complement Ther Med 33:58-64
- Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. Nat Rev Mol Cell Biol 15:384-396
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. Lancet 373:2055-2066
- LeVine H 3rd (1999) Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. Methods Enzymol 309:274-284
- Long J, Gao H, Sun L, Liu J, Zhao-Wilson X (2009) Grape extract protects mitochondria from oxidative damage and improves locomotor dysfunction and extends lifespan in a Drosophila Parkinson's disease model. Rejuven Res 12:321-331
- Lopresti AL, Smith SJ, Metse AP, Drummond PD (2020) Effects of saffron on sleep quality in healthy adults with self-reported poor

- sleep: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Sleep Med* 16:937-947
- M'Angale PG, Staveley BE (2016) The Bcl-2 homologue Buffy rescues α -synuclein-induced Parkinson disease-like phenotypes in *Drosophila*. *BMC Neurosci* 17:24
- Mashmoul M, Azlan A, Khaza' ai H, Yusof BN, Noor SM (2013) Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug. *Antioxidants* 2:293-308
- Mazidi M, Shemshian M, Mousavi SH, Norouzy A, Kermani T, Moghiman T, Sadeghi A, Mokhber N, Ghayour-Mobarhan M, Ferns GA (2016) A double-blind, randomized and placebo-controlled trial of Saffron (*Crocus sativus* L.) in the treatment of anxiety and depression. *J Complement Integr Med* 13:195-199
- Mohite GM, Dwivedi S, Das S, Kumar R, Paluri S, Mehra S, Ruhela N, S A, Jha NN, Maji SK (2018) Parkinson's Disease Associated α -Synuclein Familial Mutants Promote Dopaminergic Neuronal Death in *Drosophila melanogaster*. *ACS Chem Neurosci* 9:2628-2638
- Namba T (1980) Colored Illustrations of Wakan-Yaku Vol. II, Hoikusha, Osaka, Japan, pp. 114-117
- Newman DJ, Cragg GM (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 83:770-803

- Ono K, Yamada M (2007) Vitamin A potently destabilizes preformed alpha-synuclein fibrils in vitro: implications for Lewy body diseases. *Neurobiol Dis* 25:446-454
- Pachikian BD, Copine S, Suchareau M, Deldicque L (2021) Effects of Saffron Extract on Sleep Quality: A Randomized Double-Blind Controlled Clinical Trial. *Nutrients* 13:1473
- Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Margaritis M, Lamari FN (2006) Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem* 54:8762-8768
- Price DL, Koike MA, Khan A, Wrasidlo W, Rockenstein E, Masliah E, Bonhaus D (2018) The small molecule alpha-synuclein misfolding inhibitor, NPT200-11, produces multiple benefits in an animal model of Parkinson's disease. *Sci Rep* 8:16165
- Saffari B, Amininasab M (2021) Crocin Inhibits the Fibrillation of Human α -synuclein and Disassembles Mature Fibrils: Experimental Findings and Mechanistic Insights from Molecular Dynamics Simulation. *ACS Chem Neurosci* 12:4037-4057
- Sakata K, Kawasak, H, Suzuki T, Ito K, Negishi O, Tsuno T, Tsuno H, Yamazaki Y, Ishida N (2015) Inositols affect the mating circadian rhythm of *Drosophila melanogaster*. *Front Pharmacol*

6:111

- Schrag A, Quinn N (2000) Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson' s disease. A community-based study. *Brain* 123 (Pt 11):2297-2305
- Suzuki T, Shimoda M, Ito K, Hanai S, Aizawa H, Kato T, Kawasaki K, Yamaguchi T, Ryoo HD, Goto-Inoue N, Setou M, Tsuji S, Ishida N (2013) Expression of human Gaucher disease gene GBA generates neurodevelopmental defects and ER stress in *Drosophila* eye. *PLoS one* 8:e69147
- Todd AM, Staveley BE (2012) Expression of Pink1 with α -synuclein in the dopaminergic neurons of *Drosophila* leads to increases in both lifespan and healthspan. *Genet Mol Res* 11:1497-1502
- Tofaris GK, Spillantini MG (2007) Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci* 64:2194-2201
- Tong Y, Yan Y, Zhu X, Liu R, Gong F, Zhang L, Wang P (2015) Simultaneous quantification of crocetin esters and picrocrocin changes in Chinese saffron by high-performance liquid chromatography-diode array detector during 15 years of storage. *Pharmacogn Mag* 11:540-545
- Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, Spencer B, Rockenstein E, Trejo M, Platoshyn O, Yuan JX, Masliah E (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the

- pathogenesis of combined Alzheimer' s and Parkinson' s Diseases.
PLoS ONE 3:e3135
- Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ (2017) The SH-SY5Y cell line in
Parkinson' s disease research: a systematic review. Mol
Neurodegener 12:10
- Yao TM, Tomoo K, Ishida T, Hasegawa H, Sasaki M, Taniguchi T (2003)
Aggregation analysis of the microtubule binding domain in tau
protein by spectroscopic methods. J Biochem 134:91-99
- Yoshino F, Yoshida A, Umigai N, Kubo K, Lee MC (2011) Crocetin reduces
the oxidative stress induced reactive oxygen species in the
stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) brain. J
Clin Biochem Nutr 49:182-187
- Zhang XX, Pan YH, Huang YM, Zhao HL (2016) Neuroendocrine hormone
amylin in diabetes. World J Diabetes 7:189-197
- 秋葉 隆 (2011) 新しい診断と治療のABC3 透析合併症 改訂第2版. 2012年最新
医学別冊, 最新医学社, 大阪, pp. 207-214
- 井上栄二, 清水康晴, 須藤慶一 (2019a) アミロイドβおよびタウ凝集に対する
サフランの作用. 日本薬学会第139年会講演要旨集:26P-pm208
- 井上栄二, 坪野谷智衣, 清水康晴, 須藤慶一 (2019b) アミリン凝集に対するサ
フランの作用. 日本生薬学会第66回年会講演要旨集:P-50
- 株式会社じほう (2022) 2022年4月版 新薬開発一覧 -薬効・会社別主な国内開
発状況- 2022年3月15日現在. PHARM TECH JAPAN ONLINE

日本国特許第7017238号 (2022) 神経変性疾患の予防及び／又は治療用医薬組成物.

後藤祐児 (2009) アミロイド線維形成とタンパク質科学. 高分子 58:92-96

日本漢方生薬製剤協会 (2001) 漢方の新しい展開 21 -漢方薬の普及から定着へ-

長谷川隆文 (2020) α シヌクレイン凝集・伝播を標的としたParkinson病疾患修飾療法開発の現況. 神経治療学 37:597-600

ヒューマンサイエンス振興財団 (2020) 国内基盤技術調査報告書「60 疾患に関する医療ニーズ調査 (第6回)」

柳澤信夫 (2008) パーキンソン病の病態. 理学療法 25:1499-1508

山形弘隆 (2017) うつ病と神経細胞死. 日本生物学的精神医学会誌 28:169-174

山口政光 (2016) ヒト希少神経難病にショウジョウバエで挑む. 生物工学会誌 94:515-517