

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5899321号
(P5899321)

(45) 発行日 平成28年4月6日(2016.4.6)

(24) 登録日 平成28年3月11日(2016.3.11)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02 Z N A
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10

請求項の数 11 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-531713 (P2014-531713)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月19日(2012.9.19)
 (65) 公表番号 特表2014-532048 (P2014-532048A)
 (43) 公表日 平成26年12月4日(2014.12.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/007505
 (87) 国際公開番号 W02013/042943
 (87) 国際公開日 平成25年3月28日(2013.3.28)
 審査請求日 平成26年3月19日(2014.3.19)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0094194
 (32) 優先日 平成23年9月19日(2011.9.19)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0102419
 (32) 優先日 平成24年9月14日(2012.9.14)
 (33) 優先権主張国 韓国(KR)

(73) 特許権者 514069023
 コンクク ユニバーシティー インダスト
 リアル コーポレーション コープ
 大韓民国, 143-729 ソウル特別市
 , クァンジン-グ, アチャサン-ロ, 26
 3
 (74) 代理人 110001416
 特許業務法人 信栄特許事務所
 (72) 発明者 ナ, スン ヨル
 大韓民国, 135-230 ソウル特別市
 , カンナム-グ, イルウォン-ドン, サエ
 ムトマウル, 105ドン306ホ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人参から分離同定した糖リボタンパク質ジントニンの天然薬用植物由来リガンドとしての用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

構成タンパク質が人参メジャーラテックス様タンパク質(major latex-like protein; MLP151)および人参リボヌクレアーゼ様メジャー貯蔵タンパク質(RNase-like major storage protein)からなる人参から分離した糖リボタンパク質ジントニン(gintonin)またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、リゾホスファチジン酸(LPA)受容体作用剤。

【請求項2】

前記人参メジャーラテックス様タンパク質(MLP151)は配列番号1~配列番号4のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項1に記載のリゾホスファチジン酸(LPA)受容体作用剤。

【請求項3】

前記人参メジャーラテックス様タンパク質(MLP151)は、配列番号5のアミノ酸配列からなり、3箇所N-グリコシル化部位(N-glycosylation site)を有することを特徴とする、請求項1に記載のリゾホスファチジン酸(LPA)受容体作用剤。

【請求項4】

前記人参リボヌクレアーゼ様メジャー貯蔵タンパク質は配列番号6~配列番号10のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、請求項1に記載のリゾホスファチジン酸(LPA)

受容体作用剤。

【請求項5】

前記人参リボヌクレアーゼ様メジャー貯蔵タンパク質は配列番号11のアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項1に記載のリゾホスファチジン酸(LPA)受容体作用剤。

【請求項6】

(1) LPA系統受容体遺伝子を含んでいるプラスミドおよび前記受容体を含んでいない空プラスミドの増幅および精製過程によって、空ベクター、およびLPA系統受容体を含む遺伝子を多量確保する段階と、

(2) Haematoglutin(HA)がタグされたLPA(tagged-LPA)受容体をB103細胞にトランスフェクションさせて発現した後、HAに対する1次抗体、および1次抗体に対する2次抗体としてHRP(horseradish peroxidase)でコンジュゲートされた2次抗体を用いて、発色反応を誘導するウエスタンブロット(western blotting)を施すことにより、LPA受容体タンパク質の発現を検証する段階と、

(3) Haematoglutin(HA)がタグされたLPA受容体をトランスフェクションさせて発現した後、HAに対する1次抗体、および蛍光物質たるCy3-コンジュゲートされた2次抗体を用いてこれらの受容体タンパク質の発現を共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser microscopy)によって検証する段階と、

(4) 前記空プラスミド、およびそれぞれのLPA系統受容体を含むプラスミドをB103細胞にトランスフェクション(transfection)する段階と、

(5) 2~3日後、トランスフェクションされたB103細胞にトリプシン(0.05% trypsin with EDTA, w/v)を処理して培養フラスコから細胞懸濁液(suspension)を準備する段階と、

(6) 懸濁された細胞にFura-2(2.5 μM)を処理して培養する段階と、

(7) Fura-2を含有する懸濁された細胞を含むキュベットにジントニンを処理して細胞質内遊離Ca²⁺(Free Ca²⁺)の増加を分光蛍光光度計(spectrofluorophotometer)で確認し、細胞内カルシウムの増加量を定量する段階とを含んでなることを特徴とする、ジントニンとLPA受容体との相互作用確認方法。

【請求項7】

(8) ジントニンを処理する前に、LPA受容体拮抗剤(antagonist)およびシグナル伝達関連薬物(例えば、百日咳毒素(pertussis toxin)、PLC抑制剤、IP₃受容体拮抗剤(receptor antagonist)を前処理した後、ジントニンによる細胞内遊離Ca²⁺(Free Ca²⁺)の増加作用を遮断または減少させることを検証する段階と、

(9) ジントニンがLPA受容体タンパク質のどのアミノ酸と相互作用してLPA受容体を活性化させるかを部位特異的突然変異誘発(site-directed mutagenesis)方法を用いて確認するための段階と、

(10) LPA受容体の他に、LPAが活性化させるものとして知られている他のオーファンGPCR(orphan GPCR)たるGPR35およびGPR87と、遊離脂肪酸GPCR(free fatty acid GPCR)たるGPR40、GPR41、GPR43およびGPR120をジントニンが活性化させるか否かを検証する段階とをさらに含むことを特徴とする、請求項6に記載のジントニンとLPA受容体との相互作用確認方法。

【請求項8】

人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、創傷治癒用薬学組成物。

【請求項9】

人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分と

10

20

30

40

50

して含む、血管平滑筋増殖に関連する疾患の予防および治療のための薬学組成物。

【請求項10】

前記血管平滑筋増殖に関連する疾患は手術後の血管狭窄症または再発狭窄症であることを特徴とする、請求項9に記載の薬学組成物。

【請求項11】

人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、炎症の予防および治療のための薬学組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、人参から分離同定した糖リポタンパク質たるジントニン (gintonin) の新規用途に係り、さらに詳しくは、ヒトを含む動物の体内に存在する内因性 (endogenous) 物質たるリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 受容体に作用する天然薬用植物由来リガンド、並びにLPA受容体に関連した疾患などの予防および治療剤として機能する、人参糖リポタンパク質ジントニンに関する。

【背景技術】

【0002】

人参は、一般に、長寿/生命延長のための強壮剤、または適応促進薬 (adaptogenic agent) として昔から利用されており、各種ストレス、疲労、疾病、癌および糖尿病に対抗して生体機能を向上させる。このような人参は、韓国だけでなく、中国、日本でも千年以上使われてきたが、最近世界で費やされる最も有名な薬草の一つである (Tyler, J. Pharm. Technol. 11, 214-220, 1995)。

人参成分の中でも、人参サポニンと呼ばれるジンセノサイド (Ginsenosides) は、1960年代初めに分離され、生理学的/薬理学的研究において代表的な成分として知られた後で多くの研究に用いられてきた (Shibata, et al. Tetrahedron Letters 1962, 1239-1245, 1963; Wagner-Jauregg and Roth, Pharm Acta Helv 37, 352-357, 1962)。この他にも、最近の研究では、人参には多糖類 (polysaccharides)、ポリアセチレン類 (polyacetylenes)、水溶性タンパク質 (protein) など、知られていない他の成分が含有されていることが明らかになった (Nah, Kor. J. Ginseng Sci. 21, 1-12, 1997)。

【0003】

これに先立ち、本発明者は、糖、脂肪およびタンパク質成分からなっている新規な糖リポタンパク質 (glycolipoproteins) を人参から分離同定することに成功し、その糖リポタンパク質をジントニン (gintonin) と命名した。ジントニンは、公知の人参ジンサポニン (ジンセノイド) とは異なり、未だ確認/解明されていない細胞膜タンパク質との相互作用によるシグナル経路 (membrane signal transduction pathway) を介してその活性が現れるものと明らかになった。例えば、マウスEAT (Ehrlich Ascites Tumor) 細胞にジントニンを処理する場合には、Gタンパク質共役受容体 (G protein coupled receptors, GPCRs 或いは7TM受容体) が活性化されるときシグナル伝達経路のようにホスホリパーゼC (phospholipase C, PLC) に連結されているシグナル伝達経路を介して細胞質内遊離 Ca^{2+} (Free Ca^{2+}) の増加を一時的に誘発し、アフリカツメガエル卵母細胞 (Xenopus oocytes) にジントニンを処理する場合には、PTX非感受性Gタンパク質 PLC IP_3 カルシウム貯蔵庫たる小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) におけるカルシウム放出を介してカルシウム依存性塩素チャネル (Ca^{2+} activated Chloride Channel, CaCC) が活性化されることを解明した (Pyo et al., J Ginseng Res, 35, 92-103, 2011)。

【0004】

10

20

30

40

50

細胞内カルシウム (Ca^{2+}) は、2次メッセンジャー (2nd messenger) であって、ヒトを含む動物において多様な生理活性作用を果たすものと知られている。簡単な例を挙げると、細胞内における基本的なカルシウムの役割は、細胞膜の興奮性調節、神経伝達物質/ホルモンの放出および分泌、類似核分裂、シナプシスの柔軟性および各種カルシウムに依存する酵素活性化、並びにイオン通路の調節に關与する。細胞内カルシウムが他方 (Intracellular) に移動する global Ca^{2+} wave がある場合には受精 (fertilization)、平滑筋、骨格筋肉、心臓筋肉などの各種筋肉の収縮、肝臓の代謝促進、遺伝子転写 (gene transcription) 刺激、細胞増殖 (cell proliferation) に關与する。

【0005】

10

また、細胞と細胞との間 (intercellular) でカルシウムが移動する global Ca^{2+} wave がある場合、創傷治癒促進、胆汁/インスリンの分泌、および一酸化窒素 (NO) の生成促進に關与すると知られている (Berridge et al., Nature 395. 645-648, 1998)。

細胞内で必要とする細胞内カルシウムの提供は主に2つの経路を介して行われる。第一に、脱分極 (depolarization) のように興奮性細胞の細胞膜の興奮の際に voltage-gated Ca^{2+} 通路 (channels) が活性化されるとき、このイオン通路を介して流入したカルシウムにより細胞内カルシウムが増加し、第二に、細胞外でGPCRリガンド (GPCR ligand) がそれに該当するGPCRに結合する場合、Gタンパク質 (一般に $G_{q/11}$ タンパク質) PLC IP_3 受容体 ER Ca^{2+} 貯蔵庫 Ca^{2+} 放出経路 (pathway) を介して細胞質内遊離 Ca^{2+} (Free Ca^{2+}) の増加を誘導する (Berridge et al., Nature 395. 645-648, 1998)。

20

【0006】

細胞膜Gタンパク質共役受容体 (protein-coupled receptors) に作用する神経伝達物質およびホルモンなどのリガンドによる一時的遊離 Ca^{2+} の増加を誘導する細胞膜シグナル伝達過程は、普遍的に $G_{q/11}$ タンパク質 PLC IP_3 受容体 ER Ca^{2+} 貯蔵庫 Ca^{2+} 放出を介して細胞内カルシウムを増加させるシグナル伝達過程に連結されているシグナル伝達経路を介して行われる (Berridge et al., Nature 395. 645-648, 1998)。

30

前述したように、動物細胞にジントニン进行处理する場合、 $G_{q/11}$ タンパク質 PLC IP_3 受容体 ER Ca^{2+} 貯蔵庫 Ca^{2+} を増加させるシグナル伝達経路を介して細胞質内遊離 Ca^{2+} の増加を誘発する現象を示しているが、ジントニンが細胞質内遊離 Ca^{2+} の増加を誘発するために、細胞膜に存在するどの種類のタンパク質 (受容体) と相互作用するかについては未だ解明されていない。

【0007】

一方、グリセロール (Glycerol-) およびスフィンゴシンベースリン脂質 (sphingosine-based phospholipids) は、細胞膜に非常に豊富であり、主に膜を構成する構造的な成分である。また、これらの成分は血液にも存在し、代謝過程を経る場合、一部はリゾリン脂質 (lysophospholipids) が形成される (Okudaira et al., Biochimie 92, 698-706. 2010)。

40

例えば、これらのリゾリン脂質にはリゾホスファチジルコリン (lysophosphatidylcholine, LPC) があるが、LPCがオートタキシン (autotaxin) としても知られているリゾホスホリパーゼD (lysophospholipase D) という酵素の作用を受けてリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA; 1- or 2-acyl-sn-glycerol-3-phosphate) が生成される (Aoki, Seminars Cell & Dev. Biol. 15, 477-489, 2004; Okudaira et al., Biochimie 92, 698-706. 2010)。

【0008】

初期にはLPAが血小板の活性の際に生成されるものと知られ、止血、創傷治癒および

50

組織再生に関連があると報告されたが、最近の研究によれば、LPAは血小板の他に血漿、血清 (serum)、唾液、精液 (seminal fluid)、卵胞液 (follicular fluid) などでは $1 \sim 5 \mu\text{M}$ 程度存在すると知られている (Aoki, Seminars Cell & Dev. Biol. 15, 477-489, 2004)。また、脂肪細胞、線維芽細胞 (fibroblast)、脳および各種器官などの多様な細胞に広く分布すると明らかになった (Pages et al., Prostaglandins 64, 1-10, 2001)。

【0009】

血液に存在するLPAは、主に血漿タンパク質 (例えば、アルブミン) と結合する場合にさらに安定し、主に血漿タンパク質 (主にアルブミン) と結合して血液循環の際に血漿タンパク質と共に循環しながら、ターゲット臓器に存在するLPA受容体と結合してその効果を発揮する (Croset et al., Biochem J 345, 61-67, 2000)。LPAのリン酸基 (phosphate group) とグリセロール骨格 (glycerol backbone) 部位がLPA作用に重要な役割を果たし (Jalink et al., Biochem J. 307, 609-615, 1995)、リン酸基が血液中に存在するLPAは $1 \sim 5 \mu\text{M}$ 程度で存在しても、血液または細胞膜にあるリゾリン脂質ホスファターゼ (lysophospholipid phosphatase) という酵素によってLPAのリン酸基が最も短時間で除去されてLPAが不活性化されるため、酵素の影響を受けて容易に代謝されず長期間作用するLPA類似体 (LPA analogs) の合成または開発に関する多くの研究を行っているが、臨床的応用に適した化合物は未だ発見されていない (Pilquill et al., Prostaglandins. 64, 83-92, 2001; Brindley and Pilquill, J Lipid Res. 50 SupplS225-230, 2009; Croset et al., Biochem J 345. 61-67, 2000; Deng et al., Gastroenterology 132. 1834-1851, 2007)。

【0010】

LPAは、単純な脂質の一つであって、細胞質 (cytoplasm) において2次メッセンジャーとして役割を果たすが、さらに重要なことは、LPAがリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid, LPA) および脊椎動物の細胞膜タンパク質 (extracellular receptors) と相互作用して細胞の生理学的 / 薬理学的作用を発揮することであるが、LPAが結合して作用する受容体は脳発生期に神経細胞が最初新生する (neurogenic) 部位たる脳の脳室帯 (ventricular zone) で最初にクローニング (cloning) が確認された (Hecht et al., 135, 1071-1083, 1996)。

前記LPA受容体は、Gタンパク質共役受容体 (GPCRs) の一つであり、内皮分化遺伝子系受容体 (endothelial differentiation gene (EDG) family receptors) とは塩基配列 (DNA sequence homology) およびタンパク質相同性 (protein homology) が多いものと示され、初期にはEDG familyに大きく分類され、さらに多くの研究を介してLPA受容体とS1P受容体のsubfamiliesに分類された (Chun J et al., Pharmacol Rev. 62, 579-587, 2010)。また、LPA受容体はさらに6種類のsubtypesに分けられている (Chun J et al., Pharmacol Rev. 62, 579-587, 2010)。

【0011】

現在までLPA1 ~ LPA6受容体に分類されており、特にLPA1とLPA2受容体は脳に多く分布して脳の発生 (development)、脳回 (gyrus) 形成および神経細胞の新生 (neurogenesis) に関与していることが知られている (An et al., J Biol Chem 283, 7906-7910, 1998)。

LPA1とLPA2を含む他のLPA受容体は、他のGPCRsに比べて脳発生から成体に至るまで、ヒトを含む脊椎動物のほぼ全ての臓器に広く分布しており、これらのLPA受容体は、ほぼ全ての臓器 (心血管系、神経系、内分泌系、生殖器系、免疫系) で多種の生理学的、薬理学的作用を果たす (Skoura and Hla, J Lipid Res. 50, S293-S298, 2009)。

さらに詳しくは、LPAがGPCRsの一つであるLPA1 ~ LPA6受容体に結合し

10

20

30

40

50

てそれぞれの受容体を活性化させる場合、細胞分化 (d i f f e r e n t i a t i o n)、細胞移動 (m i g r a t i o n および m o t i l i t y)、細胞形態 (m o r p h o l o g y) 変化、細胞増殖 (p r o l i f e r a t i o n)、細胞生存 (s u r v i v a l)、血管形成 (a n g i o g e n e s i s)、炎症 (i n f l a m m a t i o n)、血小板凝集 (p l a t e l e t a g g r e g a t i o n)、およびその他の多様な種類の生理学 / 薬理学的作用を調節 (m o d u l a t i o n) すると知られている (Toman and Spiegel, Neurochemical Research 27, 619-627, 2002; Gardall et al., 2006)。

【 0 0 1 2 】

このような L P A 受容体は、多様な臓器で多様な生理学的作用を果たすため、L P A 受容体の作用に関連した医薬品の開発のための重要なターゲットとなっているが、未だ脊椎動物の血液または細胞質から発見され、L P A 分解酵素によって代謝 / 分解されて不活性化 (i n a c t i v a t i o n) され易い L P A の他には、L P A 受容体に作用するリガンド (特に、植物に由来するリガンド) は未だ報告されたことがない (Tigyi, Br J Pharmacol 161, 241-270, 2010)。

これらの受容体の活性に関与する最も重要な共通的特徴の一つは、L P A が L P A 1 ~ L P A 6 受容体に結合してそれぞれの受容体を活性化させる場合、多様な種類の G T P 結合タンパク質 (b i n d i n g p r o t e i n s ; G _{i/o}、G _{q/11}、G _{12/13} および G _s) と結合して多様なエフェクター系 (e f f e c t o r s y s t e m s) に連係し、多様な生理学的作用を発揮することである (Yoshida and Ueda, Jpn J Pharmacol 87, 104-109, 2001)。

【 0 0 1 3 】

例えば、P L C が活性化され、次いで細胞質内遊離 C a ²⁺ の増加を誘発するが (Toman and Spiegel, 2002; Dubbin et al., J Neurosci 30, 7300-7309, 2010)、細胞質内遊離 C a ²⁺ は、既に 2 次メッセンジャーであって、上述のように生体信号 (l i f e s i g n a l) として各種酵素活性と遺伝子転写に至るまで多くの種類の生理活性作用を発揮すると知られているため (Berridge et al., Nature 395, 645-648, 1998)、L P A 1 ~ L P A 6 受容体に作用する L P A リガンドによる細胞質内遊離 C a ²⁺ 増加作用が前述の L P A 受容体の活性による多様な種類の生理活性作用に関与すると考えられている。但し、L P A 6 受容体は、活性化される場合、細胞質内遊離 C a ²⁺ 増加作用よりもアデニルシクラーゼ活性 (a d e n y l a t e c y c l a s e a c t i v i t y) に連係していると報告された (Yanagida et al., J Biol Chem 284, 17731-17741, 2009)。

【 0 0 1 4 】

L P A 受容体がノックアウト (k n o c k - o u t) された動物についての研究結果、L P A 受容体が、胎子の脳を含む多様な臓器の発達に影響を及ぼすと知られている。例えば、L P A 1 受容体がノックアウトされた動物で脳の形成が正常的に行われずに死産してしまい (Choi et al., Biochim Biophys Acta 1781, 531-539, 2008)、また、生殖器の場合、雌では妊娠の際に胎子の着床がうまく行われるものの、胎子の数は減る現象が現れると報告されており、その他の多様な副作用があると知られている。L P A 3 受容体がノックアウトされた動物の雄では精粗 (t e s t i s) の発育と精子の形成がうまく行われないと知られている (Choi et al., Biochimica Biophysica Acta 1781, 531-539, 2008; Ye X. Hum Reprod Update. 2008 14, 519-536, 2008)。

【 0 0 1 5 】

本発明者は、ジントニンを動物細胞に処理する場合、最も低い濃度でも G タンパク質 P L C I P ₃ 受容体 E R C a ²⁺ 貯蔵庫 C a ²⁺ 放出は C a ²⁺ の増加につながる経路を介して細胞質内遊離 C a ²⁺ の増加を誘発するという根拠の上で、動物細胞膜 G P C R s タンパク質のうちどの受容体を介して作用するかを確認するために多種の公知の G タンパク質 P L C I P ₃ 受容体 E R C a ²⁺ 貯蔵庫 C a ²⁺ 放出経路を持つ G P C R s 遺伝子およびリガンドが、知られていない多種のオーファン (o r p h a n) G P C R s 遺伝子をトランスフェクション (t r a n s f e c t i o n) および発現させた後、ジントニンの作用を検証した結果、ジントニンが E D G 系統 (f a m i l y) 受容

10

20

30

40

50

体のうちLPA1(edg-2)、LPA2(edg-4)、LPA3(edg-7)、LPA4およびLPA5受容体を活性化させ、百日咳毒素感受性および非感受性Gタンパク質PLCIP₃受容体ERCa²⁺貯蔵庫Ca²⁺放出を介して細胞質内遊離Ca²⁺の増加を誘発する新規な人参由来生理活性リガンドであることを見出し、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

そこで、本発明の主な目的は、人参から分離同定した糖リポタンパク質たるジントニン(gintonin)の新規用途を提供することにある。

10

また、本発明の他の目的は、ジントニンの、リゾホスファチジン酸(LPA)受容体に関連した疾患などの予防、改善および治療剤としての用途を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0017】

上記目的を達成するために、本発明は、人参から分離同定した糖リポタンパク質たるジントニンのリゾホスファチジン酸(LPA)受容体に対する天然薬用植物由来リガンドとしての新規用途を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンとLPA受容体との相互作用を確認する方法を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンの、LPA受容体の活性を増加させることにより細胞内のカルシウム濃度を効果的に増加させる、様々なカルシウム依存生理活性または/およびカルシウム濃度の低下に起因した疾患の予防、改善および治療剤としての用途を提供する。

20

【発明の効果】

【0018】

上述したような本発明によれば、人参に存在する糖リポタンパク質たるジントニンがリゾホスファチジン酸(LPA)受容体との相互作用を介してその生理学的、薬理的にその効能を発揮する効果がある。

特に、LPA受容体との相互作用により一連のシグナル伝達過程を活性化させて一時的に細胞質内遊離Ca²⁺の増加を誘発し、細胞内カルシウム濃度の一時的な増加により、これらのLPA受容体を発現する神経系、心血管系、内分泌系、生殖器系、消火器系、免疫系などを含む各種臓器において一時的に細胞内カルシウム濃度を増加させて生理活性作用を発揮することにより、カルシウムに依存する各種生理活性(例えば、強壮作用、免疫力増加、性機能強化、血管新生、抗糖尿作用など)および薬理活性の促進と、カルシウム濃度の低下に起因する各種疾患の予防、改善および治療に有用に使用できる。

30

また、本発明の組成物は、カルシウム不足による成長阻害などの予防、改善および治療にも効果を示す。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】本発明のジントニンのメタノール抽出前と後の透析膜の内部および外部に存在する成分に対する電気泳動後のクマシブルー染色結果を示す(lane1、Molecular mark; lane2、メタノール抽出前のジントニン; lane3、メタノール抽出後の透析膜内部透析液; lane4、メタノール抽出後の透析膜外部透析液)。

40

【図2】Aは空ベクター(empty vector)、Haematoglutin(HA)-tagged LPA1、HA-tagged LPA2、およびHA-tagged LPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、LPA受容体のタンパク質発現をウエスタンブロット(western blotting)で検証したものであり、Bは空ベクター、HA-tagged LPA1、HA-tagged LPA2、およびHA-tagged LPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、HAに対する1次抗体、および蛍光物質たるCy3-コンジュ

50

ゲート (conjugation) された 2 次抗体を用いて、これらの LPA1、LPA2 および LPA3 受容体タンパク質の細胞膜発現を共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser microscopy) で検証したものである。

【図3】Aは空ベクター、LPA1 (L1)、LPA2 (L2)、LPA3 (L3)、LPA4 (L4)、LPA (L5) および LPA6 (L6) 受容体を B103 細胞に一時的トランスフェクションさせた後、ジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理による細胞内カルシウム濃度の変化を示すものであり (# $p < 0.05$ 、## $p < 0.001$ 、空ベクター対比; * $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$ 、LPA3 受容体対比)、BはLPA受容体の他に、LPAによって活性化されるGPR3、GPR87、脂肪酸受容体として知られているGPR40、GPR41、GPR43、GPR120、S1P1およびS1P2受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、ジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理による細胞内カルシウム濃度の変化を示すものである (* $p < 0.001$ 、LPA3受容体細胞発現対比)。

10

【図4】Aは空ベクター或いはLPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、濃度別LPA処理による細胞内カルシウム濃度の変化を示すものであり、Bは空ベクター、LPA1、LPA2、LPA3、LPA4、LPA5およびLPA6受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、濃度別ジントニン処理による細胞内カルシウム濃度の変化を示すものであり、Cは空ベクター、LPA3またはLPA6受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、濃度別ジントニン処理によるcAMPの変化を示すものである。

20

【図5】Aは空ベクター或いはLPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、ジンセノサイドRb1、ジンセノイドRg1、ジンセノイドRg3或いはジントニン処理による細胞内カルシウム濃度の変化を示すものであり (* $p < 0.001$ 、ジントニン (GT) 処理 LPA3 受容体細胞発現対比)、Bは空ベクター或いはLPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、ジンセノサイドRb1、ジンセノイドRg1の存在下でジントニン処理によるカルシウム濃度の変化を示すものである。

【図6】AはLPA1、LPA2、LPA3或いはLPA5受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、PTXを処理していないグループとPTXを処理しているグループとの間でジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 処理によるカルシウム濃度の変化を示すものであり、Bは前記Aのヒストグラムである (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.001$ 、PTX未処理対比)。

30

【図7】AはLPA1受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、LPA受容体拮抗剤 (Ki16425)、PLC抑制剤 (U73122)、IP₃受容体拮抗剤 (2-APB)、或いは細胞内カルシウムキレート剤 (chelator) (BAPTA) 処理後、およびCa²⁺遊離緩衝液におけるジントニン処理によるカルシウム濃度の変化を示すものであり (* $p < 0.001$ 、ジントニン (GT) 処理対比)、BはLPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、LPA受容体拮抗剤 (Ki16425)、PLC抑制剤 (U73122)、IP₃受容体拮抗剤 (2-APB)、或いは細胞内カルシウムキレート剤 (BAPTA) 処理後、およびCa²⁺遊離緩衝液におけるジントニン処理によるカルシウム濃度の変化を示すものである (* $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$ 、ジントニン (GT) 処理 LPA3 受容体細胞発現対比)。

40

【図8】野生型LPA3受容体、R3.28A突然変異LPA3受容体、或いはW4.64A突然変異LPA3受容体をB103細胞に一時的トランスフェクションさせた後、ジントニン処理によるカルシウム濃度の変化を示すものである (* $p < 0.001$ 、野生型LPA3受容体対比)。

【図9】NMDA受容体を発現するXenopus oocytesにジントニンを処理する場合のNMDA受容体活性増加誘導を確認したものであって、AはNMDA受容体を発現するXenopus oocytesにNMDA (300 μM) を処理する場合、NMDA受容体の活性による内向き電流 (inward current) が誘導され、回

50

復された後でジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を処理すると、*Xenopus oocytes* に内因性に存在する LPA 受容体の活性を通じて CaCC が活性化されたことを確認することができ、次いでさらに NMDA を処理する場合にはジントニン処理前よりさらに大きい内向き電流が誘導されるため、ジントニンの処理は NMDA 受容体活性の増加を誘導することを確認することができ、B はジントニンによる NMDA 受容体活性増加がジントニンの投与濃度に依存的であることを示しており、C はジントニンによる NMDA 受容体活性増加に対する濃度反応曲線 (concentration-response curve) である。

【図 10】ジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による NMDA 受容体活性増加作用が LPA1 および LPA3 受容体拮抗剤たる Ki16425 の処理によって遮断されることを確認したものであって、A は Ki16425 (10 μM) がジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を遮断することに対する代表的なトレースであり、B は Ki16425 がジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (* $p < 0.01$ 、対照群 (Con) 対比)。

10

【図 11】ジントニン (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による NMDA 受容体活性増加作用に対する up-stream 細胞膜シグナル伝達過程を示すものであって、A は活性 PLC 抑制剤 U73122 (1 μM) がジントニンによる内因性 CaCC 活性および NMDA 受容体活性増加作用を遮断することを示し、B は IP₃ 受容体拮抗剤たる 2-APB (100 μM) がジントニンによる内因性 CaCC 活性および NMDA 受容体活性増加作用を遮断することを示し、C は *Xenopus oocytes* に Ca²⁺ キレート剤たる BAPTA (100 μM 、3 h 処理) がジントニンによる内因性 CaCC 活性および NMDA 受容体活性増加作用を遮断することを示し、D は U-73122、2-APB 或いは BAPTA 処理がジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (* $p < 0.01$ 、対照群 (Con) 対比)。

20

【図 12】ジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用に対する down-stream シグナル伝達過程を示すものであって、A はタンパク質キナーゼ C (PKC) のリン酸化部位 (phosphorylation sites) の一つである S1308 のセリン (serine) をアラニン (alanine) (S1308A) で突然変異させる場合、ジントニンの作用が抑制されることを示し (* $p < 0.01$ 、対照群対比、# $p < 0.01$ 、*oocytes* expressing mutant S1312A 受容体対比)、B はチロシンキナーゼ抑制剤 (Tyrosine kinase inhibitor) として知られているゲニステイン (genistein) (10 μM) の処理でジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を遮断することを示し (* $p < 0.01$ 、対照群対比)、C は活性 (Active) Src 系統キナーゼ抑制剤 (Src-family kinase inhibitor) たる PP3 はジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を抑制するが、不活性 (inactive) Src 系統キナーゼ抑制剤たる PP2 はジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用を抑制しないことを示し (* $p < 0.01$ 、対照群対比)、D は *Xenopus oocytes* に活性或いは不活性 RPTP (receptor protein tyrosine phosphatase) を発現させた後、ジントニンによる NMDA 受容体活性増加作用が活性 RPTP の発現された細胞で遮断されたことを示す (* $p < 0.01$ 、対照群対比)。

30

40

【図 13】ジントニンによる海馬切片長期増強 (LTP) の誘導程度を確認したものである (赤い矢印: theta burst stimulation (TBS) 刺激開始時間)。

【図 14】ジントニンによる白色ラット海馬 LTP 誘導増加に対する対照群と濃度別ジントニン投与群との間の時間別 field traces を示したものであり、対照群およびジントニン投与群の TBS (20 分) 前の代表的 field trace、および TBS を与えてから 80 分後に生じた field trace である。

【図 15】ジントニンによる白色ラット海馬 LTP 誘導に対する濃度別増加要約ヒストグラムである (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、対照群対比)。

50

【図16】ジントニンによる長期記憶障害改善効能に対する受動的回避反応実験 (passive avoidance test) の結果であって、ジントニン投与濃度別にスコポラミンによる長期記憶 (long-term memory) 障害を防御する効能があることを示している (* $p < 0.0001$ 、スコポラミンを投与していないグループ; * $p < 0.01$ 、ジントニンを投与していないグループ; 陽性対照群として使用したタクリン結果は図示せず。)。

【図17】ジントニンによる空間認知記憶および単純空間記憶障害改善効能に対するモリス水迷路実験 (morris water maze test) の結果であって、図17aはジントニンが投与濃度別にスコポラミンによる空間認知記憶障害を防御する効能を持つことを確認することができ (* $p < 0.01$ 、スコポラミン投与群の day 1 と比較するとき; # $p < 0.001$ 、スコポラミンのみ投与したグループと比較するとき; 陽性対照群として使用したタクリンの結果は図示せず。)、図17bはプラットフォームがあったクワドラント (quadrant) 近くにおける水泳時間 (swimming time) である (* $p < 0.001$ 、ジントニンとスコポラミンを投与していないグループ; * $p < 0.01$ 、ジントニンを投与していないグループ)。

【図18】白色ラットから分離された副腎からのカテコールアミン分泌 (secretion) 実験を示す図である。

【図19】ジントニン処理によるカテコールアミンの分泌増加を示したものであって、それぞれ異なる濃度のジントニンを処理した後、15分間隔で4分間灌流液 (perfusate) を収集し、括弧内の数字は使用した副腎の個数であり、縦軸は4分間分泌されたカテコールアミンの量 (ng/perfusate) であり、横軸は灌流液を収集した時間である。

【図20】アセチルコリン処理によって分泌されるカテコールアミンに対するジントニンの効果であって、アセチルコリン (5.32 mM) の1回処理が様々な異なる濃度のジントニンによるカテコールアミンの放出に対する影響を示すものである (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、ns: 統計的に有意性がない)。

【図21】Aはジントニンによる *Xenopus oocytes* に発現した $BK_{Ca}K^+$ イオン通路の外向き (outward) $BK_{Ca}K^+$ イオン電流を投与濃度別に示すものであり、Bはジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路の増加に対する濃度反応曲線 (concentration-response curve) である。

【図22】ジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用が LPA1 および LPA3 受容体拮抗剤たる Ki16425 処理によって遮断されることを示すものであって、Aは Ki16425 (10 μ M) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する代表的な trace であり、Bは Ki16425 がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (* $p < 0.01$ 、対照群 (Con) 対比)。

【図23】ジントニンおよびジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する活性および不活性 PLC 抑制剤の影響を示すものであって、Aは活性 PLC 抑制剤 U73122 (1 μ M) に影響されたジントニンとジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する時間と電流の関係 (time-current relationship) (左) および代表的な traces (右) であり、Bは不活性 PLC 抑制剤 U73343 に影響されたジントニンとジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する時間と電流の関係 (左) と代表的な traces (右) であり、Cは U73122 (1 μ M) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラム (* $p < 0.01$ 、対照群 (Con) 対比) であり、Dは Y73343 (1 μ M) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (a. ジントニン投与前; b. ジントニン投与; c. ジンセノサイド Rg3 投与; d. 薬物洗浄 (washing out) 後)。

【図24】ジントニンおよびジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作

10

20

30

40

50

用に対する IP_3 受容体拮抗剤およびカルシウムキレート剤 (chelator) の影響を示すものであって、A は IP_3 受容体拮抗剤 2 - APB (100 μ M) に影響されたジントニンとジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する時間と電流の関係 (左) と代表的な traces (右) であり、B はカルシウムキレート剤たる BAPTA-AM に影響されたジントニンとジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する時間と電流の関係 (左) と代表的な traces (右) であり、C は 2 - APB (100 μ M) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラム (* $p < 0.01$ 、対照群 (Con) 対比) であり、D は BAPTA (100 μ M、3 h) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (a. ジントニン投与前; b. ジントニン投与; c. ジンセノサイド Rg3 投与; d. 薬物洗浄後)。

10

【図 25】ジントニンおよびジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する PKC 活性化剤 (activator) の影響を示すものであって、A は PMA (1 μ M) に影響されたジントニンとジンセノサイド Rg3 による $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用に対する時間と電流の関係 (下) と代表的な traces (上) であり、B は PMA (100 nM、3 h) がジントニンによる $BK_{Ca}K^+$ イオン通路活性作用を遮断することに対する要約ヒストグラムである (a. ジントニン投与前; b. ジントニン投与; c. ジンセノサイド Rg3 投与; d. ジンセノサイド Rg3 投与後)。

【図 26】創傷治癒 (wound healing) に対するジントニン効果を示すものであって、A は培養された HUVECs にピペットチップ (pipette tip) で搔き傷 (scratching wound) を誘導して細胞同士の間には傷をつけて間隔を与えたとき、20 時間後、対照群 (Con) は空間が満たされないが、ジントニン (30 μ g/mL) を処理した場合は空き空間が満たされることを示し、B はジントニンを処理していないグループ (control) とジントニンを処理しているグループ間の時間と創傷治癒の関係を示すものであり、C は対照群とジントニン処理 (30 μ g/mL) 群間の、傷をつけた後、空き空間の面積を計算して空き空間に対する % 換算である (* $p < 0.01$ 、対照群対比、VG: 血管内皮成長因子 (VEGF))。

20

【図 27】血管形成促進に対するジントニン効果を示すものであって、A はジントニン投与濃度別の Br-DU 混成 (incorporation) を促進することにより、HUVECs の増殖を増加させることを示し (* $p < 0.01$ 、対照群対比)、B はジントニン投与濃度別の HUVECs の移動 (migration) 促進を示し (* $p < 0.01$ 、対照群対比)、C はジントニンによる HUVECs の増殖および移動 (migration) 促進が新生血管形成促進を誘導することを示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、人參から分離同定した糖リポタンパク質たるジントニンのリゾホスファチン酸 (lysophosphatidic acid、LPA) 受容体 subtypes に対する天然薬用植物由来リガンド (ligand) としての用途を提供する。

具体的に、本発明は、LPA 受容体に作用する新規リガンドを提供する。

40

本発明に係る前記新規リガンドは人參から分離同定した糖リポタンパク質ジントニンであり、前記ジントニンは構成タンパク質が人參メジャーラテックス様タンパク質 (major latex-like protein; MLP151) と人參リボヌクレアーゼ様メジャー貯蔵タンパク質 (RNAse-like major storage protein) からなることを特徴とする。

また、前記人參メジャーラテックス様タンパク質 (MLP151) は、配列番号 1~4 のアミノ酸配列を含むことが特徴である。また、前記人參メジャーラテックス様タンパク質 (MLP151) は配列番号 5 のアミノ酸配列からなり、3 箇所 N-グリコシル化部位 (N-glycosylation site) を有する。

【0021】

50

配列番号 5 :

mgltgklicq tgiksdgdvf helfgtrphh vpnitpaniq gcdlhegefg kvgsvviwny
sidgnamiak eeivaideed ksvtfkvveg hlfeefksiv fsvhvdtkge dnlvtwsidy
ekl nes vkdp tsyldfllsv trdieahhlp k

【 0 0 2 2 】

この際、前記配列における、下線部分はプロテオーム解析によって得たペプチド断片（配列番号 1 ~ 4）に該当する部分であり、斜体のアミノ酸部位は N - グリコシル化部位である。

また、前記人参リボヌクレアーゼ様メジャー貯蔵タンパク質（RNAse-like major storage protein）は、配列番号 6 ~ 10 のアミノ酸配列を含み、配列番号 11 のアミノ酸配列からなることが特徴である。

【 0 0 2 3 】

配列番号 11 :

mraiyiisvi ivslsifswg gnarsdypwa mfalrlqwa gfcevnacd tksllntfti
hglypynakgtpalycdgta fdvnsvsdfl aemhlawpsh etntediqfw ehewkkhgrc
seallkqtdy frtalafrika fdivgllnqe giypnndlyr pkmikeaikk hlnavpeidf
tknenseyvl tdinvcvnqq atrfvdcptd datddyrlkf vrlpskmkfa dprtnsii

【 0 0 2 4 】

この際、前記配列における下線部分はプロテオーム解析によって得たペプチド断片（配列番号 6 ~ 10）に該当する部分である。

また、前記ジントニンは、LPA 受容体の作用剤として活性を有することが特徴である。

本発明において、前記ジントニンは水参、白参、紅参、長脳参、培養参および山参などの根、茎および葉などから分離することができ、人参は西洋参、中国人参および高麗人参（Panax ginseng C. A. Meyer）など全種類の人参を含む。好ましくは、4 ~ 6 年根の高麗人参から製造した紅参を使用することが良いが、これに限定されるものではない。

【 0 0 2 5 】

また、本発明は、ジントニンと LPA 受容体との相互作用を確認する方法を提供する。

本発明では、LPA 系統（family）受容体が、大部分の臓器を構成する細胞に内因性（endogenous）に存在するため、これらの受容体を内因性に含有していないものと知られている細胞（null cell）B103 ラット神経芽腫細胞（rat neuroblastoma cell；B103 細胞）を用い（Valentine et al., Biochim Biophys Acta 1780. 597-605）、LPA1（edg-2）、LPA2（edg-4）、LPA3（edg-7）、LPA4、LPA5 および LPA6 受容体をそれぞれコードする遺伝子を含んでいるプラスミド（plasmids；ベクター）と含んでいないプラスミド（空ベクター）を、これらの受容体を内因性に発現していない培養された B103 細胞にそれぞれ一時的トランスフェクション（transient transfection）させた後、2 ~ 3 日後に細胞懸濁（cell suspension）を準備して細胞透過（cell-permeable）させ、カルシウムに結合する蛍光物質 Fura-2 AM を処理した後、ジントニンを処理して細胞内遊離 Ca^{2+} （Free Ca^{2+} ）の増加誘発作用を分光蛍光度計（spectrofluorophotometer）を用いて確認することを特徴とする。

【 0 0 2 6 】

具体的に、本発明に係るジントニンが LPA 受容体と相互作用することを確認する方法は、

（1）LPA 系統（family）受容体遺伝子を含んでいるプラスミド（plasmids）、および前記受容体を含んでいない空プラスミド（empty plasmid）の増幅および精製過程（maxi-preparation）を介して、空ベクター、および LPA 系統受容体を含む遺伝子を多量で確保する段階と、（2）HA（Haemat

10

20

30

40

50

oglutin) がタグされた LPA (tagged - LPA) 受容体を B103 細胞にトランスフェクションさせて発現した後、HA に対する 1 次抗体、および 1 次抗体に対する 2 次抗体として HRP (horseradish peroxidase) でコンジュゲートされた 2 次抗体を用いて、発色反応を誘導するウエスタンブロット (western blotting) を施して LPA 受容体タンパク質の発現を検証する段階と、(3) HA (Haematoglutin) がタグされた LPA 受容体をトランスフェクションさせて発現した後、HA に対する 1 次抗体、および蛍光物質たる Cy3 - コンジュゲートされた 2 次抗体を用いて、これら受容体タンパク質の発現を共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser microscopy) を用いて検証する段階と、(4) 前記空プラスミド、およびそれぞれの LPA 系統受容体を含むプラスミドを B103 細胞にトランスフェクション (transfection) する段階と、(5) 2 ~ 3 日後、トランスフェクションされた B103 細胞にトリプシン (0.05% trypsin with EDTA, w/v) を処理して培養フラスコから細胞懸濁液 (suspension) を準備する段階と、(6) 懸濁された細胞に Fura - 2 (2.5 μM) を処理して培養する段階と、(7) Fura - 2 を含有する懸濁細胞を含むキュベットにジントニンを処理して細胞質内遊離 Ca^{2+} の増加を分光蛍光光度計 (spectrofluorometer) で確認し、細胞内カルシウムの増加量を定量する段階とを含む。

【0027】

また、上記に加えて、(8) ジントニンを処理する前に LPA 受容体拮抗剤 (antagonist) およびシグナル伝達関連薬物 (例えば、百日咳毒素 (pertussis toxin)、PLC 抑制剤、 IP_3 受容体拮抗剤 (receptor antagonist) を前処理した後、ジントニンによる細胞質内遊離 Ca^{2+} の増加作用を遮断し或いは減らすことを検証する段階と、(9) ジントニンが LPA 受容体タンパク質のどのアミノ酸と相互作用して LPA 受容体を活性化させるかを部位特異的突然変異誘発 (site-directed mutagenesis) 方法を用いて確認するための段階と、(10) LPA 受容体の他に、LPA が活性化させるものとして知られている別のオーファン GPCR (orphan GPCR) たる GPR35 および GPR87 と、遊離脂肪酸 GPCR (free fatty acid GPCR) たる GPR40、GPR41、GPR43 および GPR120 をジントニンが活性化させるか否かを検証する段階とをさらに含むこともできる。

また、本発明は、前記ジントニンの、LPA 受容体の活性を増加させることにより細胞内のカルシウム濃度を効果的に増加させる、様々なカルシウム依存生理活性または / およびカルシウム濃度の低下に起因した疾患の予防、改善および治療剤としての用途を提供する。

【0028】

具体的に、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、NMDA 受容体活性および海馬 LTP 増進による学習能力向上および記憶増進用薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、抗ストレス、ストレス抵抗力の増進およびストレスによる疲労の回復促進に役立つ薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、創傷治癒用薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、血管平滑筋増殖 (vascular smooth muscle proliferation) に関連する疾患の予防および治療のための薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、炎症 (inflammation) の予防および治療のための薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、カルシウム濃度の低下に起因する疾患の予防および治療のための薬学組成物を提供する。

また、本発明は、人参由来の糖リポタンパク質ジントニンまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含む、神経細胞死によって誘発される退行性脳神経系疾患の予防および治療のための薬学組成物を提供する。

【0029】

本発明において、カルシウム依存性生理活性は強壮作用、免疫力増加、性機能強化、血管新生、抗糖尿作用などがあり、前記血管平滑筋の増殖は手術後の血管狭窄症または再発狭窄症などの疾患を含む。また、前記カルシウム濃度の低下に起因する疾患は、統合失調症 (Schizophrenia)、アルツハイマー病 (Alzheimer's Disease)、ハンチントン病 (Huntington's Disease)、家族性片麻痺性片頭痛 (Familial hemiplegic migraine)、癲癇 (Epilepsy)、一過性運動失調症 (episodic ataxia)、脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxias) などから選ばれる1種以上の疾患を含み、前記神経細胞死によって誘発される退行性脳神経系疾患は脳卒中、中風、記憶喪失、記憶損傷、痴呆、健忘症、パーキンソン病、ピック病、クロイツフェルト・ヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病などから選ばれる1種以上の疾患を含むが、これらに限定されるものではない。

【0030】

人参は長い間生薬として使われてきたものであって、人参から分離した本発明のジントニンも毒性および副作用などの問題が全くない。

本発明のジントニンを含む、様々なカルシウム依存性生理活性または/およびカルシウム濃度の低下に起因した疾患の予防および治療用薬学的組成物は、組成物の全重量に対して、前記ジントニンを0.0001~10重量%、好ましくは0.001~1重量%含む。

また、本発明の組成物は、薬学的組成物の製造に通常使用する適切な担体、賦形剤および希釈剤をさらに含むことができ、本発明のジントニンの薬学的投与形態は、単独で、或いは他の薬理的活性化化合物との結合だけでなく適当な集合として使用できる。

【0031】

本発明に係るジントニンを含む組成物は、それぞれ通常の方法によって散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの経口型剤形、外用剤、坐薬および滅菌注射溶液の形態に剤形化して使用できる。前記組成物に含有できる担体、賦形剤および希釈剤としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリトリトール、マルチトール、澱粉、アカシアゴム、アルギナート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱物油を挙げることができる。製剤化する場合には、通常使用する充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を用いて調製される。経口投与のための固形製剤には錠剤、丸薬、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれる。このような固形製剤は、前記ジントニンまたはその分画物に少なくとも1種の賦形剤、たとえば澱粉、炭酸カルシウム、スクロースまたはラクトース、ゼラチンなどを混ぜることにより調製される。また、単純な賦形剤以外に、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤も使用される。経口のための液状製剤としては、懸濁剤、内用液剤、乳剤、シロップ剤などが該当するが、よく使用される単純希釈剤である水、流動パラフィン以外に、様々な賦形剤、例えば湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれ得る。非経口投与のための製剤には、滅菌した水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、坐薬が含まれる。非水性溶剤、懸濁剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能なエステルなどが使用でき、坐薬の基剤としては w i t e p s o l、m a c r o g o l、t w e e n 6 1、カカオ脂、ラウリ

ン脂、グリセロゼラチンなどが使用できる。

【0032】

本発明の組成物の好ましい投与量は、患者の状態および体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路および期間によって異なるが、当業者によって適切に選択できる。ところが、好ましい効果のために、本発明の組成物は1日0.0001~100mg/kgで投与することが良い。投与は1日1回投与してもよく、1日数回に分けて投与してもよい。前記投与量はいずれの観点からも本発明の範囲を限定するものではない。

本発明の薬学組成物は、ラット、マウス、家畜、ヒトなどの哺乳動物に様々な経路で投与できる。投与の全ての方式は予想できるが、例えば、経口、直腸または静脈、筋肉、皮下、子宮内頸膜または脳室内(intracerebroventricular)注射によって投与できる。

10

【0033】

本発明のジントニンを含む組成物は、前述したような剤形として、カルシウム濃度の低下に起因する疾患の予防および治療のための薬剤、食品および飲料などに様々な利用でき、前記ジントニンを添加することが可能な食品としては、例えば各種食品類、飲料、ガム、お茶、ビタミン複合剤、健康機能性食品類などがある。

本発明のジントニンは、毒性および副作用が殆どないので、予防目的で長期間服用の際にも安心して使用することができる。

本発明のジントニンは、様々なカルシウム依存生理活性または/およびカルシウム濃度の低下に起因した疾患の予防を目的として食品または飲料に添加できるが、この際、食品の場合、前記ジントニンを食品の全重量に対して0.01~15重量%で加えることができ、健康機能性飲料の場合、組成物100mLを基準として、前記ジントニンを0.02~5g、好ましくは0.3~1gの割合で加えることができる。

20

【0034】

本発明の健康機能性飲料の組成物は、指示された割合で必須成分として前記ジントニンを含有する以外は、他の成分には特別な制限がなく、通常の飲料のように様々な香味剤または天然炭水化物などをさらに含むことができる。この際、前記天然炭水化物は、例えば、ブドウ糖、果糖などの単糖類、マルトース、スクロースなどの二糖類、およびデキストリン、シクロデキストリンなどの多糖類などの通常の糖、並びにキシリトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールなどがある。また、香味剤としては、天然香味剤(タウマチン、ステビア抽出物、例えばレバウジオシドA、グリシルヒジンなど)および合成香味剤(サカリン、アスパルテムなど)を有利に使用することができる。前記天然炭水化物の割合は本発明の組成物100mLに対して一般に約1~20g、好ましくは約5~12gである。

30

【0035】

上記の他に、本発明の抽出物は、様々な栄養剤、ビタミン、鉱物(電解質)、合成風味剤および天然風味剤などの風味剤、着色剤および増進剤(チーズやチョコレットなど)、ペクチン酸およびその塩、アルギン酸およびその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤などを含有することができる。その他に、本発明の抽出物は、天然果物ジュース、および果物ジュース飲料や野菜飲料の製造のための果肉を含有することができ、このような成分を独立して或いは組み合わせて使用することができる。また、前記添加剤の割合は、あまり重要ではないが、本発明の抽出物100重量部に対して0~約20重量部の範囲で選択されることが一般的である。

40

【実施例】

【0036】

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は本発明を例示するためのもので、本発明の範囲を限定するものではないことは、当該分野における通常の知識を有する者にとって自明であろう。

【0037】

50

実施例 1 . ジントニンの配列確認

1 - (1) . ジントニンのメタノール透析

人参からジントニンを分離して (韓国特許出願第 1 0 - 2 0 1 0 - 0 0 5 2 9 1 3 号参照) ジントニン 2 0 0 m g を 1 0 0 % (w / v) メタノール 1 0 ~ 1 5 m L に溶解させた後、溶解したジントニンを透析膜 (pore size : 6 , 0 0 0 ~ 8 , 0 0 0 、 S i g m a - A l d r i c h 、 S t . L o u i s 、 U S A) に入れ、3 0 ~ 5 0 倍の体積の 1 0 0 % メタノールを用いて 4 8 時間透析した。

透析中にメタノールを 2 回交換した。透析後には、透析膜内に残っている透析膜内部透析液 (inner dialysate) と透析膜の外に出た透析膜外部透析液 (outer dialysate) を別々に濃縮乾燥させて定量した。

【 0 0 3 8 】

1 - (2) . In - gel tryptic digestion の実施

前記で取得した透析膜内に残っている成分 (透析膜内部透析液) を乾燥させた後、1 0 0 μ g / m L を用いて 1 0 % S D S - P A G E を実施した。

図 1 はメタノール透析前後のジントニンの電気泳動後のクマシブルー染色結果を示す。メタノール透析前のジントニンのバンド (band) は、広く広がって (broad) おりながらバンドの染色も強くなされていない形態であるが (図 1 の 2 l a n e) 、メタノール透析後のジントニンのバンドは、分子量の大きい変化なしで広く広がっているが、その染色はメタノール透析前のそれより一層強くなされていることが分かる (図 1 の 3 l a n e) 。

一方、メタノール透析後、透析膜の外に抜け出した成分 (透析膜外部透析液) は、クマシブルーに染色されていないものと示された (図 1 の 4 l a n e) 。

前述したような結果は、ジントニンの脂肪成分がクマシブルーによるタンパク質染色に影響を及ぼしていることを示唆する。

クマシブルー染色を施し、染色されたタンパク質部分を、ゲル (gel) から切り出した後、2 5 m M 重炭酸アンモニウム (ammonium bicarbonate) と 5 0 % (w / v) アセトニトリルが含有されている溶液で洗浄した。ゲル切片 (gel piece) はさらに 4 0 m M 重炭酸アンモニウム、1 0 % (w / v) アセトニトリルおよび 2 5 μ g / m L のトリプシン (Promega , Madison , WI , USA) に入れた後、3 7 $^{\circ}$ C で 1 8 ~ 2 0 時間培養した。

トリプシン処理によって消化されたペプチドは、5 0 m M 重炭酸アンモニウム、5 0 % アセトニトリルおよび 5 % (w / v) トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid ; TFA) を用いて 2 回抽出した。この際、得られたペプチド抽出物 (peptide extracts) を合わせた後、真空遠心分離機で凍結乾燥させ、使用前に 4 $^{\circ}$ C で貯蔵した。

【 0 0 3 9 】

1 - (3) . イオン - 移動度分光分析 (IM - MS) の実施

In - gel tryptic digestion の後、ジントニンに含有されているタンパク質成分の確認同定は、ソウル所在の韓国基礎科学支援研究所で実施した (Ono et al Mol. Cell Proteomics Sci. 5, 1338-1347, 2006; Gao et al., Mol. Cell Proteomics Sci. 7, 2399-2409, 2008) 。

上記の実験で凍結乾燥したペプチドを 0 . 1 % 蟻酸 (formic acid) 2 0 μ L に溶かした後、Nano Lock Spray イオン源 (ion source) を取り付けた nano ACQUITY 超高压力液体クロマトグラフィー (ultrahigh pressure liquid chromatography ; UPLC) と SynapQ - TOF (Time of flight) 質量分析計 (mass spectrometer) を用いて LC / MS ^E で分析した (Waters , Manchester , UK) 。

具体的に、再浮遊したペプチド (resuspended peptides ; 5 μ L) は、0 . 1 % 蟻酸がある溶液で 5 分間流量 (flow rate) 1 0 μ L / min の条件で Waters Symmetry C18 trapping column (1 8

10

20

30

40

50

0 μm i . d . \times 20 mm length with 5 μm particle size) に注入した。

【0040】

ペプチドは、前置カラム (pre - column) で溶出し、75 μm i . d . \times 250 mm length column packed with BEH130 C18樹脂 (resin) と粒子サイズ1.7 μm (溶出速度280 nl / min) の条件で55分間線形勾配 (linear gradient) 3 ~ 45 % (w / v) B を用いて分離した (A : 0.1 % (w / v) formic acid in water、B : 0.1 % (w / v) formic acid in acetonitrile) 。カラムは90 % (w / v) B で25分間洗浄した。

10

使用したカラムはさらに次の実験実施前に3 % B で20分間さらに平衡化した。全カラムの温度は35 $^{\circ}\text{C}$ に調整し、実施するMass accuracyは400 fmol / μm と流量500 nl / min を維持するNanoACQUITY NanoLockSprayの補助ポンプ (auxiliary pump) を介して伝達されるペプチド [glu1] - フィブリノペプチドB (fibrinopeptide B) を用いて検証した。

【0041】

ペプチドは、陽イオンモード (positive ion mode) で分析したとともに、典型的な分解能 (typical resolving power) 10,000 fwhmを持つvモードで作動するようにした。分析に先立ち、TOF分析器 (analyzer) は30 eVの衝突エネルギーと50 ~ 1990 m / z の mass range で得られた [glu1] - フィブリノペプチドB断片 (fragments) を標準として補正 (calibration) した。

20

Q - TOPはLC / MS^E獲得モード (acquisition mode) で作動するようにし、MS^Eモードは適切なdual exact mass protocolに応じてデータを獲得するようにプログラム化した。

ProteinLynx Global SERVER version 2.4 (PLGS 2.4) に統合されたProteinLynx Global SERVER version 2.4 (PLGS 2.4) が分析によって得られた全ての原データファイル (raw data file) をプロセスするようにした。それぞれのプロセスされたデータファイル (processed data file) は、UniProt (www.uniprot.org、May 3、2011 Released version、number of entries 3,213) で得られたApialesタンパク質データベース (Apiales protein database) から検索した。

30

【0042】

それぞれの試料のlow / high collision spectraから得られたタンパク質の同定は、少なくとも一つのペプチドが3つの断片イオン (fragment ion) と一致し、或いは一つのタンパク質が7個の断片イオンと一致し、或いは一つのタンパク質が2個のペプチドと一致するように要求する階級的接近 (hierarchical approach) によって作動するようにした。

40

人参を含む植物に含有されているタンパク質を同定する方法の一つは、タンパク質電気泳動したバンド切片に含有されているタンパク質成分をプロテオーム解析 (proteomic analysis) 方法によって確認する方法が広く用いられている (Nam et al. , Proteomics 3, 2351-2367, 2003) 。

下記表1に示すように、ジントニンの電気泳動結果として生じたタンパク質バンド (図1参照) からタンパク質を抽出し、トリプシン消化 (tryptic digestion) の後にIM - MS (Ion - mobility mass spectrometry) 分析を実施した結果、ジントニンに含有されたタンパク質は2種であると確認された。

ジントニンを構成するタンパク質に該当するペプチド断片 (peptide fragments) が人参MLP151の場合には4 (ribonuclease - like

50

storage protein) の場合には5つのペプチド断片を含有するものと示された。

【0043】

【表1】

表1 ジントニンタンパク質のIM-MS分光分析結果および該当タンパク質アミノ酸の配列

NW(KDa)/PI	アミノ酸配列	タンパク質	受入番号
16.87/4.9	RDIEAHLPK (配列番号: 1)	人參メジャーラ テックス様タン パク質 (MLP 151)	EU939308
	KDPTSYLDFLLSVTRD (配列番号: 2)		
	KEEIVAIDEEDKS (配列番号: 3)		
	KLNESVKD (配列番号: 4)		
27.3/5.5	RSDYPWAM (配列番号: 6)	人參リボヌクレ アーゼ様貯蔵タ ンパク質	AAR88098
	KAFDIVGLLNQEGIYPNNDLYRPKM (配列番号: 7)		
	KSLNLTFTIHGLYPYNAKG (配列番号: 8)		
	KHLNAVPEIDFTKN (配列番号: 9)		
	RTALAFRK (配列番号: 10)		

10

【0044】

言い換えれば、プロテオーム解析方法を用いた結果、ジントニンに含有されているタンパク質の成分が人参MLP151と人參リボヌクレアーゼ様貯蔵タンパク質であることを確認することができた。

20

これらのタンパク質は、MLP151の分子量が約17kDaであり、人參リボヌクレアーゼ様貯蔵タンパク質の分子量が約27kDaであると知られているが、実際に、人參リボヌクレアーゼ様貯蔵タンパク質の場合には、人參からC末端の一部が切断 (truncation) された分子量20~21kDaのリボヌクレアーゼ様貯蔵タンパク質も発見される (Kim et al., J Plant Physiol. 161, 837-845, 2004)。

図1に示すように、ジントニンの分子量は約13~15kDaであると確認される。

ところが、プロテオーム解析によって得られたジントニンのタンパク質成分の分子量は17~27kDaであって、実際のジントニンの分子量とは差異がある。このようなジントニンのタンパク質分析によって明らかになったタンパク質の分子量と電気泳動結果として得られたジントニンの分子量との差異は、ジントニンにはタンパク質成分だけではなく、糖および荷電成分が共に存在し、これらの成分が電気泳動の際にゲル移動 (gel migration) に影響を及ぼすためであると判断される。

30

【0045】

実施例2 . 細胞膜LPA受容体タンパク質発現の検証

LPA受容体を発現していない細胞 (null-cell) たるB103細胞は、Ishiiなどの方法 (Ishii et al., (2000) Mol Pharmacol 58. 895-902; Lee et al., (2006) J Biol Chem 281. 23589-23597; Yanagida et al., (2009) J Biol Chem 284. 17731-17741) によって、DMEM培地に、加熱不活性化した (heat-inactivated) 10% FBS、ストレプトマイシンおよびペニシリンを添加したDMEM培地を用いて、5% CO₂ / 95% 空気培養器で培養した。

40

また、ヒトLPA受容体サブタイプ (Lysophosphatidic acid receptor subtypes)、オーファンGPCR (orphan G protein coupled receptor) および他のGPCR関連受容体プラスミドは、Missouri S&T Resource Center (www.cDNA.org) から購入した。

まず、各GPCR受容体を含んでいるプラスミドをTE緩衝液 (buffer) で溶かした後、1~100ngをE. Coli (DH5⁺) (ECOS、Intron) にトランスフェクションし、抗生剤アンピシリン (ampicillin) を含有している固体LB培地を含むペトリ皿 (petri dish) に塗抹 (smearing) した後、

50

37 で一晩 (overnight) 培養した。ペトリ皿に生じたコロニー (colony) 5 ~ 6 個を取り、アンピシリンを含んでいる LB 液体培地で培養した後、DNA mini-preparation 過程を介して、購入したそれぞれの受容体プラスミドを増幅し、増幅されたそれぞれの受容体の遺伝子サイズを DNA 電気泳動によって確認した。該当遺伝子が合う場合、一部を群体 (stock) として貯蔵し、残りはさらに大量で増幅する DNA maxi-preparation を実施し、B103 ラットの神経芽腫細胞 (rat neuroblastoma) にトランスフェクションして使用する程度の十分な量の各 LPA 受容体 subtypes (LPA1 ~ LPA6) および他の GPCR 遺伝子に対する cDNAs を確保した。

【0046】

LPA 受容体 subtypes に対する一時的トランスフェクション (transient transfection) は、Invitrogen 社のリポフェクタミン (Lipofectamine) 2000 を用いて行った。それぞれの LPA 受容体 (LPA1、LPA2、LPA3、LPA4、LPA5 および LPA6) を含んでいるプラスミド (10.8 μg) を、10 cm の皿で培養した B103 細胞にトランスフェクションし、2 日後に実験に利用した。

LPA 受容体でトランスフェクションされた B103 細胞において実際に LPA 受容体タンパク質が発現されるかを確認するために、LPA 受容体を含んでいない空プラスミド、および HA (hematoglutinin) - LPA 遺伝子を含むプラスミド (Lee et al., J Biol Chem 281, 23589-23597, 2006) を、内因性に LPA 受容体を含んでいない B103 細胞にトランスフェクションした後、細胞ホモジネート (homogenates) において細胞膜の豊富な細胞膜分画 (cell membrane fraction) を用いて、HA に対する 1 次抗体を用いるウエスタンブロット (western blotting) を実施した。

【0047】

その結果、LPA 受容体を含んでいない空プラスミドをトランスフェクションした細胞では、LPA 受容体に対するタンパク質の発現がなされないことを観察することができたが、LPA 受容体遺伝子を持っているプラスミドをトランスフェクションした細胞では、LPA 受容体タンパク質が発現されたことを観察することができた。よって、ジントニンが LPA 受容体発現細胞に作用して細胞内カルシウム濃度の増加を誘導することを確認した (図 2 の A 参照)。

また、LPA 受容体を内因性に発現しない null B103 細胞、および LPA 受容体 subtypes を発現した B103 細胞において、LPA 受容体タンパク質発現を共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser microscopy) を用いて確認した。

このために、LPA 受容体を含んでいない空プラスミド、および HA (hematoglutinin) - LPA 遺伝子を含むプラスミド (Ishii et al., Mol Pharmacol 58, 895-902, 2000; Lee et al., J Biol Chem 281, 23589-23597, 2006) を B103 細胞に発現させた後、まず HA に対する 1 次抗体を細胞膜と反応させてラベリング (labeling) し、1 次抗体に対する 2 次抗体でありながら蛍光物質たる cy3 でコンジュゲートされた抗体でラベリングして、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoview FV1000、Olympus、USA) によって、細胞膜に LPA 受容体が発現されることを確認した。図 2 の B は LPA 受容体が発現されたことを示している。

【0048】

実施例 3 . ジントニンによる LPA 受容体、別のオーファン GPCR 受容体および S1P1、S1P2 受容体の活性による細胞内カルシウムの変化および cAMP の形成に及ぼす影響の確認

LPA 受容体をトランスフェクションさせていない Fura-2 AM 処理 B103 細胞に LPA を処理する場合、細胞内遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の一時的な増加を誘導しないが、LPA 受容体をトランスフェクションした Fura-2 AM 処理 B103 細胞に

10

20

30

40

50

L P A を処理する場合、細胞内遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の一時的な増加を誘導することが明らかになった (Bandoh et al., J Biol Chem 274: 27776-27785, 1999; Im et al., Mol Pharmacol 57: 753-759, 1999)。

本発明では、ジントニンまたはジンセノサイド R b 1、R g 1 が、L P A 受容体をトランスフェクションさせていない F u r a - 2 A M 処理 B 1 0 3 細胞、および L P A 受容体をトランスフェクションした F u r a - 2 A M 処理 B 1 0 3 細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の一時的増加に効果を示すかを確認するために、F u r a - 2 A M で前処理した B 1 0 3 細胞 ($2 \sim 4 \times 10^6 / mL$) を $1.5 mM Ca^{2+}$ 含有緩衝液 (buffer) または Ca^{2+} 遊離緩衝液 (free buffer) に懸濁して $37^\circ C$ で 30 分間培養した後、ジントニン或いはジンセノサイドを添加し、B 1 0 3 細胞における細胞内カルシウムの濃度に及ぼす効果を確認した。

10

但し、利用可能な純粋分離された個別ジントニン量の限界のため、粗 (crude) ジントニンを用いて B 1 0 3 細胞 (ATTC Cell Bank, USA) における $[Ca^{2+}]_i$ の増加について実験した。

【0049】

具体的に、J o r g e n s e n 等の方法 (Jorgensen N.K., Peterson S. F. and Hoffmann E.K. Am J Physiol Cell Physiol, 276, 26-37, 1999) によって、 $120 mM$ の $NaCl$ 、 $5 mM$ の KCl 、 $1 mM$ の $MgCl_2$ 、 $1.5 mM$ の $CaCl_2$ 、 $10 mM$ のグルコースおよび $25 mM$ の H E P E S からなる Ca^{2+} 含有緩衝液 ($pH 7.4$) と、 $120 mM$ の $NaCl$ 、 $5 mM$ の KCl 、 $1 mM$ の $MgCl_2$ 、 $0.2 mM$ の E G T A、 $10 mM$ のグルコースおよび $25 mM$ の H E P E S からなる Ca^{2+} 遊離緩衝液 ($pH 7.4$) を用いて、 $37^\circ C$ の培養器で 30 分間振盪しながら $2.5 \mu M$ の F u r a - 2 A M に B 1 0 3 細胞 ($1 \sim 2 \times 10^6 / mL$) を混合し、過量の f u r a - 2 A M は細胞を Ca^{2+} 含有緩衝液または Ca^{2+} 未含有緩衝液で 3 回洗浄して除去した。

20

$[Ca^{2+}]_i$ は、R F - 5 3 0 0 P C 細胞内イオン測定システム (Intracellular Ion Measurement System; Shimadzu Corporation, Japan) を用いて F u r a - 2 A M 処理細胞で推定した。

【0050】

具体的に、F u r a - 2 A M 処理細胞は、最終的に $2 \sim 4 \times 10^6 / mL$ となるまで実験緩衝液で希釈した後、ポリスチレンキュベット (Elkay Ultra-UV) に移し、細胞はテフロンでコートされた磁石を用いて攪拌し、キュベットハウジングは $37^\circ C$ に調節した。励起波長 (excitation wavelengths) はコンピュータ制御の下で $340 nm$ と $380 nm$ を交互にし、放出 (emission) は $510 nm$ で検出した。この際、励起および放出の隙間の幅は $3 nm$ とし、背景補正は J o r g e n s e n 等の方法に準じて行った。

30

測定された $340 nm$ と $380 nm$ の比率値 (ratio value) は、H o u n s e l l 等の式 (Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Smith, K.D. (1997) Protein protocol handbook, Humana press, Totawa, 803-804) を用いて $[Ca^{2+}]_i$ の値に変換した。

$[Ca^{2+}] = K_d \left[\frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \left(\frac{S_{f380}}{S_{b380}} \right)$

40

但し、 K_d は解離定数 ($224 nM$) であり、 R は測定された $340 nm$ と $380 nm$ の蛍光比 (fluorescence ratio) であり、 R_{max} および R_{min} は $50 \mu g / mL$ のジントニンを添加した Ca^{2+} 飽和濃度での R 値および $20 mM$ の E G T A を添加した Ca^{2+} 未含有緩衝液での R 値である。また、 S_{f380} と S_{b380} はジントニンと E G T A を添加したときの $380 nm$ での蛍光強度 (fluorescence intensity) である (Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien., J Biol Chem 260: 3440-3450, 1985)。

【0051】

L P A 受容体を発現していない n u l l B 1 0 3 細胞と、それぞれの L P A 受容体 s u b t y p e s を発現した B 1 0 3 細胞におけるジントニンによる細胞質内カルシウム $[$

50

Ca^{2+} および cAMP の変化を確認した結果、図 3 の A に示すように、LPA 受容体に対する遺伝子を含んでいないプラスミド（空ベクター）をトランスフェクションして、LPA 受容体を発現していない B103 細胞において、ジントニンは細胞内カルシウムの濃度を増加させる作用が殆どなかった（細胞内カルシウム濃度の増加 22.7 ± 4.1 nM）。ジントニンによる LPA 受容体 subtypes (LPA1 ~ LPA6) を発現する B103 細胞にジントニン ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を処理する場合、LPA1、LPA2、LPA3 および LPA5 受容体を発現する B103 細胞では、細胞内カルシウムの濃度をそれぞれ 185.9 ± 12.8 、 208.3 ± 13.0 、 206.5 ± 11.2 および 297.5 ± 21.8 nM 増加させた。ところが、LPA4 受容体に対するジントニンの作用は 61.6 ± 11.8 nM であって他の LPA 受容体に比べて微弱であり、LPA6 受容体に対するジントニンの作用はなかった。

10

【0052】

一方、LPA 受容体の活性は、細胞内カルシウムの増加だけでなく、細胞内 cAMP 形成抑制或いは刺激に連結されていることが報告された (Ishii et al., Mol Pharmacol 58, 895-902, 2000; Contos et al., Mol Pharmacol 58, 1188-1196, 2000; Kimura et al., J Biol Chem. 276, 15208-15215, 2001)。特に、LPA6 受容体の活性は細胞内カルシウムの増加に連結されているのではなく、細胞内 cAMP 形成経路に連結されていると報告された (Yanagida et al., J Biol Chem 284, 17731-17741, 2009)。

LPA3 と LPA6 受容体を発現する B103 細胞における、ジントニンによる細胞内 cAMP の変化を確認するために、ジントニン処理の際に LPA3 と LPA6 受容体を発現する B103 細胞における細胞内 cAMP の変化を測定した結果、ジントニンは細胞内 cAMP 濃度の変化には影響を及ぼさなかったと確認された (図 4 の C 参照)。

20

したがって、ジントニンによる LPA 受容体の活性は主に細胞内カルシウムの増加に連結されていることが分かった。

【0053】

また、LPA に反応するものと知られている他のオーファン GPCR である GPR35 (Oka et al., Biochem Biophys Res Commun. 395, 232-237, 2010) および GPR87 (Tabata et al., Biochem Biophys Res Commun. 363, 861-866, 2007) と、遊離脂肪酸 (free fatty acids) に結合する脂肪酸受容体 (fatty acid receptors) として知られている GPR40、GPR41、GPR43 および GPR120 (Hirasawa et al., Biol Pharm Bull. 31, 1847-1851, 2008) を B103 細胞に発現させた後、ジントニンの作用を確認した。

30

図 3 の B に示すように、ジントニンは、GPR35 を発現する B103 細胞において微弱に細胞内カルシウムを増加させるが、他の受容体を発現する B103 細胞においては細胞内カルシウムの増加を誘導しないものと確認された。このような結果は、ジントニンがカルシウム濃度の変化については主に LPA 受容体 subtypes に選択的に作用することを示す。

【0054】

実施例 4. LPA 受容体が発現された細胞における LPA とジントニンによる投与濃度別の細胞質内遊離 Ca^{2+} 変化の測定

40

ジントニンを含む濃度反応曲線を得るために、観察されたピーク (peak) の振幅を標準化および図表化した後、Origin software (Northampton, MA) を用いて下記の Hill 式に対応させた。

【0055】

$$y / y_{\text{max}} = [A]^n / ([A]^n + [EC_{50}]^n)$$

【0056】

式中、y はジントニンの与えられた濃度における % 活性であり、 y_{max} は最大ピーク細胞内カルシウム濃度の変化 (maximum peak intracellular calcium mobilization) であり、 $[EC_{50}]$ は最大反応の 50% を示すことが可能なジントニンの濃度であり、 $[A]$ はジントニンの濃度である。また、

50

nは相互作用係数 (interaction coefficient) であり、全ての値は平均 ± 標準誤差で表した。対照群のデータとジントニン処理群のデータとの平均差は unpaired Student's t - test を用いて分析した。統計学的有意性は $P < 0.05$ で検定した。

LPA受容体を含んでいないプラスミドと、確保されたそれぞれのLPA受容体 subtypes のうち代表的なLPA3受容体を、内因性のLPA受容体を発現していない null B103ラット神経芽腫細胞 (rat neuroblastoma cell) (Valentine et al., Biochim Biophys Acta 1780, 597-605, 2008) にトランスフェクションし、これらの各LPA3受容体が発現されるようにした後、LPA受容体リガンドであるLPAを処理する場合、細胞内カルシウムが増加することを検証することにより、LPA3受容体がるくりにB103細胞に正常的に発現され、LPAによく反応するかを確認した結果、LPAはLPA3受容体を発現させたB103細胞における細胞内カルシウムをLPA処理濃度に依存的に増加させることが分かった。この際、LPAに対する EC_{50} は 58.9 ± 5.54 nMであった (図4のA参照) 。

【0057】

ところが、LPA3受容体を発現していないB103細胞では、細胞内カルシウムの濃度を増加させる作用が殆どないことが分かった (図4のA参照) 。

また、LPA受容体 subtypes (LPA1 ~ LPA6) を発現するB103細胞における、ジントニンによる処理濃度別の細胞内カルシウム濃度の増加を確認した結果、図3のBに示すように、ジントニンによるLPA1、LPA2、LPA3およびLPA5受容体の活性による細胞内カルシウムの増加に対する EC_{50} はそれぞれ 0.10 ± 0.02 、 0.0040 ± 0.0004 、 0.12 ± 0.01 および 0.046 ± 0.003 nMであった。

特に、他のLPA受容体 subtypes に比べてLPA2受容体に対する EC_{50} 値が低いことからみて、ジントニンはLPA2受容体に対してさらに親和性が強いものと確認された。

【0058】

実施例5 . ジントニンおよびジンセノサイド Rb1、Rg1およびRg3によるLPA受容体の活性による細胞質内遊離 Ca^{2+} 増加の比較

人参から分離同定したジントニン、および今まで人参の生理学的 / 薬理的有効成分として知られているジンセノサイド (Nah et al., CNS Drug Rev. 13, 381-404, 2007) がLPA受容体の活性によって細胞内カルシウムの増加を誘導するか否かを確認するために、人参に存在するジンセノサイドのうち最も含量が多くて代表的なジンセノサイドとして知られているジンセノサイド Rb1、ジンセノサイド Rg1 或いはジンセノサイド Rg3 を用いてジントニンと比較した。

LPA受容体をトランスフェクションさせていない Fura-2AM 処理 B103細胞にLPAを処理する場合、細胞内遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の一時的な増加を誘導しないが、LPA受容体をトランスフェクションした Fura-2AM 処理 B103細胞にLPAを処理する場合、細胞内遊離カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ の一時的な増加を誘導することが明らかになった (Bandoh et al., J Biol Chem 274. 27776-27785, 1999; Im et al., Mol Pharmacol 57. 753-759, 1999) 。

【0059】

本発明では、ジントニンまたはジンセノサイド Rb1、Rg1が、LPA受容体をトランスフェクションさせていない Fura-2AM 処理 B103細胞と、LPA受容体をトランスフェクションした Fura-2AM 処理 B103細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の一時的増加に効果を示すかどうかを確認するために、Fura-2AM で前処理した B103細胞 ($2 \sim 4 \times 10^6 / mL$) を 1.5 mM の Ca^{2+} 含有緩衝液または Ca^{2+} 遊離緩衝液に懸濁して $37^\circ C$ で30分間培養した後、ジントニン或いはジンセノサイドを添加し、B103細胞における細胞内カルシウムの濃度に及ぼす効果を確認した。

但し、利用可能な純粋分離された個別ジントニン量の限界のため、粗 (crude) ジ

10

20

30

40

50

ントニンを用いてB103細胞(ATTC Cell Bank, USA)における $[Ca^{2+}]_i$ の増加について実験した。

【0060】

具体的に、Jorgensen等の方法(Jorgensen N.K., Peterson S. F. and Hoffmann E.K. Am J Physiol Cell Physiol, 276, 26-37, 1999)によって、120 mLのNaCl、5 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、1.5 mMのCaCl₂、10 mMのグルコースおよび25 mMのHEPESからなるCa²⁺含有緩衝液(pH 7.4)と、120 mMのNaCl、5 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、0.2 mMのEGTA、10 mMのグルコースおよび25 mMのHEPESからなるCa²⁺遊離緩衝液(pH 7.4)を用いて、37 °Cの培養器で30分間振盪しながら2.5 μMのFura-2-AMにB103細胞(1~2 × 10⁶ / mL)を混合し、過量のfura-2 AMは細胞をCa²⁺含有緩衝液またはCa²⁺未含有緩衝液で3回洗浄して除去した。

10

$[Ca^{2+}]_i$ は、RF-5300PC細胞内イオン測定システム(Intracellular Ion Measurement System; Shimadzu Corporation, Japan)を用いてFura-2 AM処理細胞で測定された。

【0061】

具体的に、Fura-2 AM処理細胞は、最終的に2~4 × 10⁶ / mLとなるまで実験緩衝液で希釈した後、ポリスチレンキュベット(Elkay Ultra-UV)に移し、細胞はテフロンでコートされた磁石を用いて攪拌し、キュベットハウジングは37 °Cに調節した。励起波長(excitation wavelengths)はコンピュータ制御の下で340 nmと380 nmを交互にし、放出(emission)は510 nmで検出した。この際、励起および放出の隙間の幅は3 nmとし、背景補正はJorgensen等の方法に準じて行うが、ジギトニンおよびEGTAはfura-2 AMが完全にCa²⁺と化合しCa²⁺から解離する状態を作るためのCa²⁺濃度調節試薬(concentration adjustment reagent)として使用した。

20

測定された340 nmと380 nmの比率値(ratio value)は、Hounsell等の式(Hounsell, E.F., Davies, M.J., and Smith, K.D. (1997) Protein protocol handbook, Humana press, Totawa, 803-804)を用いて $[Ca^{2+}]_i$ の値に変換した。

【0062】

$[Ca^{2+}]_i = K_d \left[\frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \right] \left(\frac{S_{f380}}{S_{b380}} \right)$

30

【0063】

但し、K_dは解離定数(224 nM)であり、Rは測定された340 nmと380 nmの蛍光比(fluorescence ratio)であり、R_{max}およびR_{min}は50 μg / mLのジギトニンを添加したCa²⁺飽和濃度でのR値、および20 mMのEGTAを添加したCa²⁺未含有緩衝液でのR値である。また、S_{f380}とS_{b380}はジギトニンとEGTAを添加したときの380 nmでの蛍光強度(fluorescence intensity)である(Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien., J Biol Chem 260: 3440-3450, 1985)。

ジギトニンを含む濃度反応曲線を得るために、観察されたピークの振幅を標準化および図表化した後、Origin software (Northampton, MA)を用いて下記のHill式に対応させた。

40

【0064】

$$y / y_{max} = [A]^n / ([A]^n + [EC_{50}]^n)$$

【0065】

式中、yはジギトニンの与えられた濃度における%活性であり、y_{max}は最大ピーク細胞内カルシウム濃度の変化(maximum peak intracellular calcium mobilization)であり、[EC₅₀]は最大反応の50%を示すことが可能なジギトニンの濃度であり、[A]はジギトニンの濃度である。また、nは相互作用係数(interaction coefficient)であり、全ての

50

値は平均 ± 標準誤差で表した。対照群のデータとジントニン処理群のデータとの平均差は unpaired Student's t-test を用いて分析した。統計学的有意性は $p < 0.05$ で検定した。

【0066】

その結果、図5のAに示すように、ジントニンはLPA3受容体の活性による細胞内カルシウムの濃度を増加させたが、ジンセノサイドRb1、Rg1、Rg3（それぞれ10 μ M）はその作用がなく、ジントニンと共に存在してもジントニンの作用を妨害しないものと確認された。よって、ジンセノサイドはLPA受容体の活性作用を誘導せず（図4のB参照）、ジントニンがLPA受容体の活性によって細胞内カルシウム増加作用を發揮することが分かった。

10

【0067】

実施例6．ジントニンによるLPA受容体の活性に対するLPA受容体拮抗剤Ki16425の影響の確認

ジントニンがLPA受容体に結合し、LPA受容体の活性によって細胞内カルシウムの濃度を増加させると、ジントニンの作用はLPA受容体拮抗剤によって遮断できると予想される。これを確認するために、LPA受容体拮抗剤がジントニン作用を遮断するかどうかを実験した。

図7に示すように、ジントニンによるLPA1～LPA5受容体の活性の際に、LPA1およびLPA3受容体拮抗剤であるKi16425(Ohta et al., Mol Pharmacol 64:994-1005, 2003)処理によって、LPA1とLPA3受容体を発現する細胞においてLPA受容体の活性を防ぐ場合、ジントニンによる細胞内カルシウム濃度増加作用が遮断されることが確認された。よって、ジントニンはLPA受容体の活性によって細胞内カルシウム濃度を増加させることが分かった。

20

【0068】

実施例7．ジントニンによるLPA受容体の活性に対する細胞外カルシウムおよび Ca^{2+} キレート剤BAPTAの影響の確認

$G_{q/11}$ 結合タンパク質($G_{q/11}$ -binding proteins)に連結された大部分のGPCRsに対するリガンドを処理する場合、細胞内カルシウム濃度が増加するが、この際、増加したカルシウムのソース(source)は細胞外(extracellular)に存在するカルシウムの流入によって増加させるか、或いはカルシウム貯蔵庫たる小胞体(ER)に存在する IP_3 受容体の活性によってカルシウム貯蔵庫からのカルシウム放出を促進させて細胞内カルシウム(Ca^{2+})の増加を誘導すると知られている(Berridge et al., Nature 395:645-648, 1998)。

30

本発明では、ジントニンによるLPA受容体の活性に対する細胞外カルシウムの影響に関する実験によって、ジントニンによる細胞内カルシウム増加のソースがどこに由来するかを確認した。

【0069】

その結果、ジントニンによってLPA1とLPA3受容体を発現する細胞において、ジントニンによるLPA受容体の活性によって誘導された $[Ca^{2+}]_i$ の一時的な増加が、細胞外の Ca^{2+} を除去(Ca^{2+} を含有せず且つ0.2mMのEGTAを含有する緩衝液を使用)することにより大きく減少した(図7参照)。これは、細胞外の Ca^{2+} もジントニン処理の際にLPA受容体の活性を介して細胞内に入り込むことを意味する。

40

一方、細胞外の Ca^{2+} がなくても、ジントニンによるLPA受容体の活性によって誘導された $[Ca^{2+}]_i$ の小幅の増加は、細胞内に貯蔵された Ca^{2+} の放出が行われることを示唆する。また、ジントニンを、LPA受容体を発現する細胞に処理する場合には、細胞内の Ca^{2+} キレート剤であるBAPTAを前処理すると、ジントニンによる細胞内カルシウムの増加が消滅するものと確認された(図7参照)。

前述のような結果は、ジントニンがLPA受容体を活性化させ、LPA受容体の活性が、細胞外または細胞内に由来する細胞内カルシウムの増加を誘導することを証明している。

50

【0070】

実施例8．ジントニンによるLPA受容体の活性に対するシグナル伝達の確認

LPAによるLPA受容体の活性は、LPA受容体を発現する細胞の種類によって、百日咳毒素(perussis toxin、PTX)感受性GTP結合タンパク質($G_{i/0}$)の活性、或いは百日咳毒素非感受性GTP結合タンパク質($G_{q/11}$ 或いは $G_{12/13}$)の活性、或いは両方($G_{i/0}$ 、 $G_{q/11}$ 或いは $G_{12/13}$)部分的に混合されたGTP結合タンパク質の活性を通じて行われていると報告された(An et al., Mol Pharmacol 54, 881-886, 1998; Yoshida and Ueda, Jpn J Pharmacol 87, 104-109, 2001)。

【0071】

まず、ジントニンのLPA受容体活性を通じての細胞内カルシウム増加作用が百日咳毒素(PTX)感受性GTP結合タンパク質の活性を通じて行われるかを確認したが、図6に示すように、LPA3受容体を発現するB103細胞にPTX(200 ng/mL、16時間)を処理する場合、PTXを処理していないグループに比べて25%程度有意にジントニンの作用が減少することが分かった。

このような結果は、ジントニンのLPA3受容体活性による細胞内カルシウム増加作用は主にPTX非感受性 $G_{q/11}$ 或いは $G_{12/13}$ タンパク質の活性を通じて行われるが、部分的には $G_{i/0}$ タンパク質もジントニン作用に関与することを示す(図6のB参照)。

一般に $G_{q/11}$ 結合タンパク質に共役されたGPCRsの活性はホスホリパーゼC(PLC)を活性化させる。PLCの活性化はジアシルグリセロール(diacyl glycerol、DAG)と IP_3 を生成するが、DAGはタンパク質キナーゼC(protein kinase C、PKC)を活性化させ、 IP_3 は細胞内カルシウム貯蔵庫でたる小胞体(endoplasmic reticulum、ER)に存在する IP_3 受容体を活性化させて、ERに貯蔵されているカルシウムが細胞質内に出るようにして細胞内カルシウムの濃度を増加させるものと知られている(Berridge et al., Nature 395, 645-648, 1998)。

【0072】

本発明では、LPA3受容体を発現するB103細胞において細胞内カルシウムの濃度を増加させるジントニンの作用がPLCの活性を通じて行われるか否かを確認した。

その結果、図7に示すように、活性PLC抑制剤(active PLC inhibitor)であるU73122の処理は、著しくジントニンの作用を遮断するものと確認された。また、 IP_3 受容体拮抗剤である2-APBを処理する場合にも、ジントニンの作用が消滅するものと確認され、ジントニンはLPA受容体への結合- $G_{q/11}$ 結合タンパク質の活性化-PLCの活性化-DAGおよび IP_3 の生成- IP_3 受容体の活性化-細胞内カルシウムの増加につながる経路を通じて細胞内カルシウムの増加を誘導することが分かった。

また、LPA受容体を発現するB103細胞にPKC活性剤(activator)たるPMAを前処理してPKCを予め活性化させる場合、ジントニンによる細胞内カルシウムの増加が抑制されることからみて、ジントニンによる細胞内カルシウムの増加作用にPKCが関与していることが分かった(Urs et al., J Biol Chem. 283, 5249-5257, 2008)(図示せず)。

【0073】

実施例9．突然変異LPA受容体に対するジントニンの影響の確認

LPA受容体タンパク質に対するLPA結合部位と思われる特定のアミノ酸を他のアミノ酸に突然変異させた突然変異(mutant)LPA受容体をB103細胞にトランスフェクションした後、LPAを処理する場合、LPAの作用が著しく減少または消滅すると報告された(Valentine et al., J Biol Chem 283, 12175-12187, 2008)。

これはLPA受容体にLPAが結合する特定アミノ酸部位が存在し、LPAがこの特定アミノ酸に結合してその効果を発揮するものと知られているが、本発明では、LPA受容

10

20

30

40

50

体においてLPA結合部位として知られている特定アミノ酸を突然変異させる場合、ジントニンのLPA受容体活性による細胞内カルシウムの増加作用に影響を与えるか否かを、LPA3受容体を用いて確認した。

図8に示すように、LPA1~LPA3受容体においてLPAが共通に結合すると報告された部位であるArg3.28残基(residue)をArg3.28Ala(すなわち、ArgをAlaに突然変異させる; R3.28A)に突然変異させた、或いはLPA3受容体にLPAが結合すると報告された部位Trp4.64残基をTrp4.64Ala(すなわち、TrpをAlaに突然変異させる; W4.64A)に突然変異させたLPA受容体(Valentine et al., J Biol Chem 283, 12175-12187, 2008)をB103細胞にトランスフェクションさせた後、ジントニン作用を野生型(wild-type)のそれと比較してみたとき、野生型ではジントニンによる細胞内カルシウムの増加が現れるが、突然変異LPA受容体をトランスフェクションした細胞ではジントニンの作用が大きく減少することを示している。よって、ジントニンによるLPA受容体の活性はLPA受容体に対するLPA結合部位との相互作用によって行われ、ジントニンはLPA受容体の活性のためにLPA結合部位を共有するものと確認された。

【0074】

実施例10. ジントニンによるNMDA受容体活性の確認

NMDA(N-methyl D-aspartate)受容体は、主に中枢神経系の海馬(hippocampus)に多く存在し、リガンド結合部位とイオン通路を共に持つイオン性(ionotropic)グルタミン酸受容体の一つである。この受容体の活性は選択性なし(non-selective)陽イオン通路(cation channel)を開く機能を持っている。

この受容体の特徴は、電圧に依存的に開き、グリシン(glycine)結合部位があり、細胞外の Mg^{2+} イオンによって遮断されることであると知られている。よって、NMDA(N-methyl D-aspartate)受容体が活性化される場合、 Na^{+} および Ca^{2+} イオンが細胞内に入り込み、 K^{+} イオンが細胞外に出て後シナプス(postsynaptic)の神経細胞の脱分極(depolarization)を誘発する(Dingledine et al., Pharmacol. Rev. 51, 7-61, 1999; Cull-Candy et al., Curr. Opin. Neurobiol. 11, 327-335, 2001; Paoletti and Neyton, Curr Opin Pharmacol 7, 39-47, 2007)。

【0075】

また、NMDA受容体が中枢神経系、特に海馬において重要な役割を果たすことは、この受容体が活性化されて入り込んできた Ca^{2+} イオンはシナプス可塑性(synaptic plasticity)と密接な関連がある長期増強(long-term potentiation, LTP)を誘発させて学習(learning)と記憶(memory)において最も重要な役割を果たすと知られている(Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White Neuroscience, 4th Ed., Sinauer Associates. pp. 191-195. http://www.sinauer.com/neuroscience4e_synaptic_plasticity)。

本発明では、ジントニンによるNMDA受容体の活性を確認するために、次のとおり、NMDA受容体を発現するXenopus oocytesにおけるNMDA受容体の活性を測定した。

【0076】

10-(1). NMDA受容体に対する遺伝子およびNMDA受容体に対するcRNAの準備

NMDA受容体サブユニット(NR1およびNR2)に対するcDNAを使用した(Zheng et al., J Neurosci. 17, 8676-8686, 1997)。NMDA受容体サブユニット(NR1とNR2)に対するcRNAs(100ng/40nl)は、それぞれのoocyteの動物(animal)或いは植物極(vegetal pole)に10mLのmicrodispenser(VWR Scientific, USA)を用いて注入し、注入

4～5日後に実験に利用した(Zheng et al., J Neurosci. 17, 8676-8686, 1997)。

【0077】

10 - (2) . O o c y t e の 準 備

Xenopus I (Ann Arbor, MI, USA) から得た Xenopus laevis を最上の規格指針にしたがって保管および処理し、oocytes (卵子) を分離するためにカエルを3-アミノ安息香酸エチルエステル(3-amino benzoic acid ethyl ester)の通気溶液(aerated solution) (collagenase) で処理した後、82.5mMのNaCl、2mMのKCl、1mMのMgCl₂、5mMのHEPES、2.5mMのピルビン酸ナトリウム、100units/mLのペニシリンおよび100μg/mLのストレプトマイシンが含まれたカルシウム遊離(Ca²⁺ free)培地で2時間攪拌して分離した。

V-VI段階の卵子を収集し、50μg/mLのゲンタマイシンを追加したND96(96mMのNaCl、2mMのKCl、1mMのMgCl₂、1.8mMのCaCl₂、および5mMのHEPES; pH 7.4)で保管した。前記卵子を含む溶液は連続的に軽く振盪しながら18に維持し、毎日交換した。

【0078】

10 - (3) . N M D A 受 容 体 活 性 の 測 定

二電極式ボルテージクランプ(two-electrode voltage clamp)記録は、小型のプレキシガラス(plexiglass)ネットチャンバー(5mL)に置かれた個別的な卵子から得た。電気生理学実験(electrophysiological experiments)は、3MのKClで充填したマイクロ電極(抵抗:0.2~0.7MΩ)と卵子固定増幅器(Oocyte Clamp amplifier; OC-725C, Warner Instrument, CT, USA)を使用した。NMDA受容体の活性に対する電気生理学的記録のために、まず、oocytesはMg²⁺ free ND96(96mMのNaOH、2mMのKOH、0.3mMのCaCl₂、5mMのHEPES pH7.6 with methanesulfonic acid)で灌流した。Oocytesは-60mV保持電位(holding potential)で固定し、NMDA電流(300mM NMDA + 10mMグリシンの投与によって誘導)を記録した(Zheng et al., J Neurosci. 17, 8676-8686, 1997; Chang and Kuo, J Neurosci. 28, 1546-1556, 2008)。

【0079】

その結果、図9のAに示すように、NMDA受容体を発現するoocytesにNMDAを処理する場合、内向き電流(inward current)が誘導されてNMDA受容体が成功的に発現されていることが分かった。図9のBおよびCに示すように、NMDA受容体を発現させたXenopus oocytesにおいて、ジントニンは投与濃度別にNMDA受容体の活性による内向き電流を増加させ、ED₅₀は0.49±0.10μg/mLであると確認された。

また、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用は、Xenopus oocytesに内因性に存在するLPA1受容体(Kimura et al., J Biol Chem. 276, 15208-15215, 2001)の活性によるGタンパク質-PLC-IP₃-Ca²⁺経路というシグナル伝達経路を介してNMDA受容体活性増加作用が行われている可能性を示しているため、LPA受容体拮抗剤を処理する場合、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が遮断されるかどうかを確認した。

その結果、図10のAに示すように、LPA1とLPA3受容体拮抗剤として知られているKi16425(10μM)(Ohta et al., Mol Pharmacol 64, 994-1005, 2003)を処理する場合、NMDAによるNMDA受容体の活性には影響を及ぼさないが、ジントニンによるCaC活性が減少し、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が統計学的に有意に抑制されるから(*p<0.001、対照群対比)、ジントニンは細胞膜に内因性に存在するLPA受容体を活性化させてNMDA受容体活性増加を誘導することを確認した(図10のB参照)。

10

20

30

40

50

【0080】

また、ジントニンによるNMDA受容体活性作用に対するシグナル伝達過程を確認した結果、活性PLC (active phospholipase C) 抑制剤 (inhibitor) であるU73122 (1 μ M) を処理する場合、NMDAによる内向き電流を遮断しないが、ジントニンによるCaCC活性を抑制するものと確認された。また、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用を遮断するものと確認された (図11のA参照)。ところが、不活性PLC (inactive phospholipase C) 抑制剤であるU73343 (1 μ M) を処理する場合には、ジントニンによるNMDA受容体活性作用を遮断する作用がないものと確認された (図示せず)。

また、IP₃受容体拮抗剤である2-APBを処理する場合にも、NMDAによる内向き電流を遮断しないが、ジントニンによるCaCC活性を抑制し、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用を遮断するものと確認された (図11のB参照)。

また、細胞質内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AMを処理する場合にも、NMDAによる内向き電流を遮断しないが、ジントニンによるCaCC活性を抑制し、NMDA受容体活性増加作用を遮断するものと確認された (図11のC参照)。よって、ジントニンは、Xenopus oocytesに内因性 (endogenous) に存在するLPA1受容体 (Kimura et al., J Biol Chem. 276, 15208-15215, 2001) を活性化させ、NMDA受容体シグナル伝達とは異なるPLC-IP₃-Ca²⁺経路というup-streamシグナル伝達経路を介してNMDA受容体活性増加を誘導することを確認した (図11のD参照)。

【0081】

一方、NMDA受容体は、細胞質内カルシウムの増加によるタンパク質キナーゼC (PKC) によってリン酸化される場合、活性が増加し、PKCによってリン酸化される部位 (sites) を持っており、PKCの活性はNMDA受容体の活性を誘導するものと報告された (Urushihara et al., J Biol Chem 267, 11697-11700, 1992; Zheng et al., J Neuroscience 15, 8676-8686, 1997; Lia et al., Mol Pharmacol 59, 960-964, 2001)。また、G_{q/11}タンパク質共役受容体の活性はPKC、チロシンキナーゼ (tyrosine kinase) およびSrc系統 (Src-family) チロシンキナーゼのシグナル伝達経路を通じてNMDA受容体の活性と連係していることを報告した (Lu et al., Nature neuroscience 2, 331-338, 1999)。

本発明では、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用と、細胞膜シグナル伝達に対するdown-streamに關与するキナーゼおよびタンパク質ホスファターゼ (protein phosphatase) との連関性を確認した。

【0082】

本発明で確認したキナーゼおよびチロシンホスファターゼ (tyrosine phosphatase) はPKC、チロシンキナーゼおよびSrc系統キナーゼであり、タンパク質ホスファターゼは受容体タンパク質チロシンホスファターゼ (receptor protein tyrosine phosphatase, RPTP) である。PKCはPLC活性の際にIP₃の他にジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) が生成されるが、DAGはPKCを活性化させるものと知られており、RPTPはG_{q/11}タンパク質共役受容体の活性によって活性化されたSrc系統キナーゼおよびチロシンキナーゼの作用を調節する重要な酵素として知られている (Tsai et al., EMBO J, 18, 109-118, 1999; Petrone et al., EMBO J 22, 4121-4131, 2003)。

次の段階では、チロシンキナーゼ、Src系統キナーゼ、および受容体タンパク質チロシンホスファターゼ (RPTP) の役割を確認した。

図12のAに示すように、PKCによってリン酸化 (phosphorylation) される部位として知られているNMDA受容体の1308番目に存在するセリン (S1308) をアラニンに突然変異させた突然変異NMDA受容体 (S1308A) を発現する細胞ではジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が抑制されるが、突然変異NMDA受容体 (S1312A) ではジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が維持さ

10

20

30

40

50

れることが確認された。よって、ジントニンによるPKC活性はNMDA受容体の特定部位(S1308)のリン酸化を促進させ、リン酸化されたNMDA受容体はその活性が増加し、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用はPKC活性に連係していることが分かった。

【0083】

また、一般的なチロシンキナーゼ抑制剤(tyrosine kinase inhibitor)としてよく知られているゲニステイン(10 μM)を処理する場合、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が抑制されることが確認された。よって、ジントニンはチロシンキナーゼの活性を誘発させ、活性化されたチロシンキナーゼはNMDA受容体のチロシン残基(tyrosine residue)をリン酸化させてNMDA受容体活性増加を誘導することが分かった(図12のB参照)。

10

また、Src系キナーゼの活性抑制剤(active inhibitor)であるPP2(30 μM)を処理する場合にもジントニンの作用が遮断されるが、不活性抑制剤(inactive inhibitor)であるPP3(30 μM)処理は効果がないことが確認された。よって、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用はジントニンがこれらのキナーゼの活性を誘導することにより誘発されることが分かった(図12のC参照)。

【0084】

また、活性或いは不活性リンタンパク質ホスファターゼ(phosphoprotein phosphatase, RPTP)を発現するoocytesにおいてジントニンによるNMDA受容体活性増加作用が減少するものと確認された(図12のD参照)。

20

また、脱リン酸酵素の活性は、ジントニンによる様々なキナーゼ活性によるNMDA受容体のリン酸化がNMDA受容体の活性増加につながるが、RPTPの発現によりNMDA受容体がリン酸化されることを遮断することにより、ジントニンによるNMDA受容体活性増加作用を抑制することが確認された。よって、Xenopus oocytesへのジントニンの処理はXenopus oocytesに内因性に存在するLPA受容体を活性化させ、活性化された受容体はPLC-IP₃-Ca²⁺経路を介して細胞質内カルシウム濃度の増加につながり、増加した細胞質内カルシウムはカルシウムに存在するPKC、チロシンキナーゼおよびSrc系タンパク質キナーゼの活性を誘導し、結果としてNMDA受容体活性増加作用を誘発するものと確認された。

30

【0085】

実施例11. ジントニンによる白色ラット海馬切片における長期増強(LTP)の誘導に及ぼす影響の確認

長期増強(Long-term potentiation)は、2つの神経細胞の間で同時刺激に由来するシグナル伝達過程の長期間の上昇或いは強化として知られている(Cooke and Bliss, Brain 129, 1659-1673, 2006)。この現象は神経細胞間のシナプス可塑性(synaptic plasticity)の主要原因となり、シナプス間の結束力(synaptic strength)の強化を誘発して学習および記憶が行われる過程として広く知られている。よって、LTPは学習(learning)と記憶(memory)の根本となる現象として知られている(Bliss and Collingridge, Nature 361, 31-39, 1003)。

40

LTPは、学習と記憶に関与するものと知られている大脳の海馬(hippocampus)から主に観察される。海馬を用いてシナプス伝達を研究するとき、テタニー(tetany)刺激によるLTPを誘導して研究するが、このモデルは脳において情報を記憶するシナプスの役割のうち活性依存変化(activity-dependent change)を研究するためのモデルである。テタニー刺激が行われる間、大きくて長い脱分極が起こるが、これはNMDA受容体が活性化を誘導し、その結果Ca²⁺の透過性が高くなり、Ca²⁺がNMDA受容体通路を介して細胞内に入り込むと、シナプス効力(synaptic efficacy)を増強させる一連の過程を誘発する。このような理由により、NMDA受容体活性を通じて受容体通路から入ってきたCa²⁺イオンが、

50

LTPの誘導役割を果たすスイッチであるというのである。

【0086】

NMDA受容体通路に依存的なシナプス可塑性は、学習と記憶の細胞基盤 (cellular basis) の役割を果たすことができると知られている。

前述したように、ジントニンはNMDA受容体の活性を増加させるものと確認され、ジントニンが白色ラット海馬切片 (slices) のLTP生成に及ぼす影響を確認するために (Moon et al., *Neurosci. Lett.* 466, 114-119, 2009; Lee et al., *J Neurosci. Res.* 89, 96-107, 2011)、ジントニンの3つの異なる濃度 (0.1、1 或いは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を処理する場合のLTP誘発への影響について調べた。

【0087】

11 - (1) . 白色ラット海馬切片 (rat hippocampal slices) の準備

3 ~ 5週齢の雄白色ラット (Sprague-Dawley strain) (Charles River, U.S.A) を麻酔剤の使用なしで速く犠牲させて頭を得た (Steidl et al., *Brain Res.* 1096, 70-84, 2006)。Rongeur (Fine Science Tools Inc., USA) を用いて頭蓋骨を除去し、脳を取り出して直ちに氷で冷却させ、酸素で飽和された (95% O_2 / 5% CO_2) スクローズを含む人工髄液 (artificial cerebrospinal fluid; aCSF) (組成: スクローズ 248 mM、 NaHCO_3 26 mM、グルコース 10 mM、 KCl 3 mM、 CaCl_2 2 mM、 MgCl_2 1 mM、HEPES 10 mM、pH 7.4) に浸漬した。

海馬切片は、vibratom (MA752 motorised advance vibroslice; Campden inc.) を用いて400 μm の厚さに切って人工髄液 (artificial cerebrospinal fluid) (aCSF) (組成: NaOH 124 mM、 NaHCO_3 26 mM、グルコース 10 mM、 KCl 3 mM、 CaCl_2 2 mM、 MgCl_2 1 mM、HEPES 10 mM、pH 7.4) 内で1時間安定させた (LeLong and Rebel, *J Pharmacol Toxicol Methods.* 39, 203-210, 1998)。

【0088】

11 - (2) . 白色ラット海馬切片 (organotypic hippocampal slice, OHSC) の培養

OHSCはStoppini等の方法 (Stoppini et al., *J Neurosci Methods* 37, 173-182, 1991) によって培養し、全ての手続きは滅菌した実験台で行った。

前述のように準備された白色ラットの脳は、直ちに氷で冷たくなったHBSS - 培地 (LB 003 - 01, Sigma, St. Louis, Mo, USA) に浸して海馬を分離した後、組織粉碎機 (tissue chopper; Mickle Laboratory Engineering Co., Surrey, UK) を用いて400 μm の厚さに切り出した。切り出された切片はmembrane insert (polytetrafluorethylene membranes, 0.4 μm , Millicell-CM, Millipore Co., Bedford, MA, USA) に置き、これを培養液で充填した。

【0089】

この際、培養液の組成は50% MEM - 培地 (LM 007 - 01, JBI, Daegu, South Korea)、25% ウマ血清 (horse serum; S 104 - 01, Daegu, South Korea)、25% ハンクス平衡塩類溶液 (Hank's balanced salt solution; LB 003 - 1, JBI, Daegu, South Korea)、6 g/L のD - グルコース (G - 7528, Sigma, St. Louis, MO, USA)、1 mM のL - グルタミン (G - 8540, Sigma, St. Louis, MO, USA)、20 mM のHEPES (H - 4034, Sigma, St. Louis, MO, USA) および1% ペニシリン - ストレプトマイシン (LS 202 - 02, Gibco BRL, USA) であり、pHは7.1に調節し

10

20

30

40

50

た。培養液は毎2～3日ごとに1回ずつ交換し、培養器(36、95%O₂、5%CO₂)で培養された海馬切片は14日後に実験に利用した。

【0090】

11-(3). 電気生理学的記録

1) MEAプローブ(probes)における海馬切片(slice)の準備

MEAプローブを使う前に、MEAプローブ(Multi channel system GmbH, Germany; each electrode; 30×30μm, distance: 200μm)の表面は0.1%ポリエーテルイミド(polyetherimide; PEI, Sigma, St. Louis, MO, USA)でコートし、90分間滅菌実験台でUVの下に乾燥させた。プローブは2次蒸留水で1～2回洗浄した。Membrane insertにある海馬切片は、分離してプローブの近くに置き、周辺の水分を除去し、新しいaCSF溶液を切片上に注いだ。

10

切片を含んでいるMEAアレイ(array)をMEA1060増幅器(Multi Channel Systems GmbH, Germany)の界面側へ移動し、切片が温度調節器(Multi Channel System GmbH, Germany)によって32℃に到達した後、刺激が切片に到達するようにした。MEAアレイの溶液はAg/AgClペレットを用いて接地(grounding)されるようにした。

【0091】

2) 長期増強(LTP)の誘導

両極性定電流パルス(bipolar constant current pulse)は、内蔵型分離器(built-in isolator; Multi Channel Systems GmbH, Germany)に取り付けられているデジタル刺激器(digital stimulator)を介して得られたデータ収集ソフトウェア(data acquisition software)で生成されるようにした。典型的な反応(typical responses)を集めるために、電極の一つはSchaffer collateral fibers領域で刺激電極位置(stimulating electrode position)として、もう一つは記録電極位置(recording electrode position)としてアンモン角(Cornu ammonis)1の放射状層(stratum radiatum)で選択した(Shimono et al., Neural Plast. 9(4), 249-254, 2002)。

20

30

LTPは標準プロトコル(100Hz theta burst stimulation)を用いて生成されるようにした。簡略に記述すると、テタヌス刺激(tetanic stimulation)は100Hzで1秒間適用し、30秒間隔で2回繰返し行った。LTP誘導の後に部位電位(field potential, FP)記録は毎30秒ごとに単一パルス刺激(single pulse stimulation)によって120分間さらに行った。刺激と記録はRecorder-Rack software(Multi Channel Systems GmbH, Germany)を用いた。

【0092】

3) ジントニンの処理

実験期間中に、切片は持続的に95%O₂と5%CO₂を含有するCSF溶液を用いて1mL/minの速度にて灌流(perfusion)し、TBS(Theta burst stimulation)のない正常的な条件における記録時間表(time schedule)、TBSのみある記録条件、およびTBSとジントニンを共に処理した条件は図13に示した。

40

【0093】

4) データ分析

MC_Rack(v.3.2.1.0, Multi Channel Systems)とキムテソン博士によって製作された分析システム(Dr. Tae-Sung Kim, department of medical-engineering Kyung-h

50

ee University) が取り付けられている MatLab (v. 7.0.1、The Mathworks inc.) を用いてデータを分析した (Moon et al., *Neurosci. Lett.* 466, 114-119, 2009; Lee et al., *J Neurosci. Res.* 89, 96-107, 2011)。

その結果、図 13 における縦軸の fEPSPs (field excitatory postsynaptic potentials) と横軸の時間との関係から分かるように、TBS (Theta burst stimulation) を与える場合、ジントニンを処理していない切片では LTP が刺激によって誘導されるが、ジントニンを処理する場合、投与濃度別にジントニンを処理していない海馬切片に比べて LTP 誘導がさらに大きく形成されていることを確認することができた。

【0094】

また、図 14 では TBS (20 分) 前の代表的な field trace と、TBS を与えてから 80 分後に生じた field trace を示している。ジントニンを処理していない切片 (control) では、部位電位が大きく活性化されないが、ジントニンを投与する場合、部位電位が投与濃度別に増加することを示している。図 14 は total fEPSPs (total field excitatory postsynaptic potentials) 活性を要約した結果であって、ジントニンを処理していない対照群が $152.8 \pm 7.21\%$ であるが、これに対し、ジントニン $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で $180.90 \pm 7.53\%$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で $205.32 \pm 6.40\%$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ で $214.14 \pm 11.55\%$ の増加を示している。よって、ジントニン処理は培養した海馬切片において LTP 形成を刺激すると確認された ($n = 4$ 、それぞれの切片数) (図 15 参照)。

【0095】

実施例 12. ジントニンによる長期記憶および空間認知能力向上の確認

中枢神経系における NMDA 受容体の活性は長期増強 (LTP) の誘発と連係しており、誘発された LTP は学習 (learning) と記憶 (memory) の増進に最も重要な役割を果たすものと知られており (Rezvani AH., In: Levin ED, Buccafusco JJ, editors. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2006. Chapter 4)、前述したように、ジントニンは NMDA 受容体活性増加作用を誘導することが確認された。よって、本発明では、マウスを用いて、ジントニンが記憶に及ぼす影響を確認するために、受動的回避反応実験 (passive avoidance test) およびモリス水迷路実験 (morris water maze test) を行った。

【0096】

12 - (1) 受動的回避反応実験による長期記憶力向上テスト

オリエンタル社 (Seoul, Korea) から購入し、韓国の建国大学の動物管理ガイドラインに準じて飼育した雄 ICR マウス ($25 \sim 28 \text{g}$) を、Yang などの方法 (Yang et al., *Biol Pharm Bull* 32, 1710-1715, 2009) に準じて記憶維持力の損傷およびジントニンによる記憶損傷抑制作用を受動的回避実験で測定した。

この際、測定器具は、2つの同一サイズ ($20 \times 20 \times 20 \text{cm}$) の明るい部屋と暗い部屋から構成し (Germini Avoidance System, San Diego, USA)、底部には電気衝撃を与えることが可能な金属棒を格子状に設置し、2つの部屋の間には自動的に動くギロチン型の小さい門 ($5 \times 5 \text{cm}$) を設置した。

【0097】

1) 学習セッション

まず、習得試験 (acquisition trial) のために、門を閉じた状態でマウスを明るい部屋に位置させ、10秒の適応期間の後、2つの部屋の間の門が自動的に開くようにした。マウスが暗い所を好む習性によって、明るい所を回避して暗い部屋に入ると、自動門が閉となり、3秒間 0.5mA の電気衝撃を加えた。門が開いた時点から暗い部屋に入るまでの待ち時間 (latency time) を測定した。実験開始 120 分の前にジントニン (25 、 50 、 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 、p.o.) を投与し、陽性対照群にはタクリン (tacrine; $10 \text{mg}/\text{kg}$ 、p.o.) を投与した。ジントニン或いは

10

20

30

40

50

タクリン投与30分後、スコポラミン (scopolamine) (0.9 mg/kg、i.p.) を投与して記憶障害を誘導し (Araujo et al., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29, 411-422, 2005)、これに対する対照群には生理食塩水を投与した。スコポラミン投与30分後に実験を開始した。180秒の実験時間内に白いマウスが暗い部屋に入らない場合に実験から除外させた。

【0098】

2) テストセッション

学習セッション24時間後、ジントニン投与なしで実験を行った。マウスをさらに明るい部屋に位置させ、10秒の適応期間の後に門を開き、門の開時点からマウスが暗い部屋に入るまでの待ち時間 (latency time) を測定して記録した。

10

受動的回避反応実験によって、スコポラミンで誘導した長期記憶 (long-term memory) 障害に対するジントニン効果を測定した。受動的回避反応実験における待ち時間は図16に示した。スコポラミン投与群の獲得試験においては、グループ間の待ち時間の差異は観察されなかったが、ジントニンはスコポラミンによって減少した待ち時間をジントニン濃度依存的に増加させるものと確認された。

すなわち、スコポラミン単独投与群は 23.07 ± 1.95 s であったが、ジントニン投与群は25、50および100 mg/kg でそれぞれ 78.24 ± 7.83 s、 169.22 ± 12.97 s、 183.43 ± 10.89 s であって、待ち時間を投与濃度別に増加させるものと確認された。

上記の結果より、ジントニンは、スコポラミンにより誘導される長期記憶障害 (損傷) から脳神経系を保護する効果があることを確認することができた。

20

【0099】

12 - (2) . モリス水迷路実験による空間認知記憶向上テスト

モリス水迷路実験 (Morris water maze) は、内部がのっぺりしている円形のプール (直径90 cm、深さ45 cm) を用いて、プールの内部に500 mLの牛乳入り水 (20 ± 1) を30 cmの負荷さに満たした後、照明が暗くて防音処理が施された実験室に多様な視覚信号 (various visual cues) と共に置いた。前記プールを4つのクワドラント (quadrant) に分け、白色のプラットフォーム (直径6 cm、高さ29 cm) を4つのクワドラントのうちいずれか一つに位置させた。この際、前記プラットフォームは水面から1 mの下に沈んでいて見えない。

30

初日の実験はプラットフォームのない状態でマウスに60秒間の水泳訓練のみ行った。次に、4日間プラットフォームのある状態でマウスに1日4回のテストを行った。マウスはプラットフォームに上がると、10秒だけ留まることができるようにし、もしマウスが60秒内にプラットフォームに到達しなければ、10秒間プラットフォームにのせておいた。マウスをさらに元のケージに移し、赤外線ランプの下でマウスに体を乾かす時間を与え、試験間の時間間隔を30秒とした。

【0100】

それぞれのテストの間、隠されたプラットフォームを探すのにかかる時間を video camera-based Ethovision System (Noldus, Wageningen, The Netherlands) で記録した。

40

それぞれの訓練テストにおいて、マウスをプールの4つのクワドラントのうちいずれか一つを向かうようにしてプールの水中に入れ、毎日マウスの位置を変え、最後の訓練試験セッションの翌日にマウスを検証した。このために、プラットフォームをプールから除去し、マウスが60秒間プラットフォームを探して泳ぐことができるようにした。さらに、マウスがプールの4つのクワドラントのうち、プラットフォームが位置していたクワドラント側で泳ぐ時間を記録した。生理食塩水に溶かしたジントニン (25、50 或いは100 mg/kg、p.o.)、または陽性対照群としてのタクリン (10 mg/kg、p.o.) を毎日試験1時間前に投与した。マウスの記憶障害はジントニン投与30分後にスコポラミン (0.9 mg/kg、i.p.) で誘導した。対照群には生理食塩水のみを投与した。

50

【 0 1 0 1 】

1) 潜時

ジントニン濃度別 (2 5、5 0 および 1 0 0 m g / k g) の空間学習能力に対する影響はモリス水迷路実験によって測定した。生理食塩水を投与した対照群の場合、水面の下に置かれたプラットフォームの位置を非常に速く習得した。その結果、実験 1 日 ~ 4 日まで潜時が著しく減少したことを確認することができた (1 7 a 参照)。これとは対照的に、スコポラミン投与群の潜時 (L a t e n t t i m e) は 4 日間若干の変化を誘導するものと確認された。スコポラミン処理群は対照群に比べて相対的に長い潜時を訓練日 (t r a i n i n g d a y) 全般にわたって示した (図 1 7 a 参照)。ジントニン処理はスコポラミン処理によって増加した潜時を統計学的に有意に減少させ、ジントニンによる潜時の増加は濃度依存的であるものと確認された (図 1 7 a 参照)。

言い換えれば、ジントニン処理群において潜時が初日から 4 日まで引き続き減少したことからみて、ジントニンが、スコポラミンによって誘導された空間認知記憶損傷を顕著に抑制および防御することを確認することができた。

【 0 1 0 2 】

2) 単純空間認知記憶

マウスの単純空間認知記憶を試験するためにプラットフォームがない状況で、もともとプラットフォームがあったクワドラントにおける水泳時間 (s w i m m i n g t i m e) を測定した。

その結果は、図 1 7 b に示すように、逃避台があったクワドラントにおける水泳時間の場合、すなわち、スコポラミン単独投与群は 13.47 ± 1.86 s であったが、ジントニン投与群は 2 5、5 0 および 1 0 0 m g / k g でそれぞれ 21.33 ± 3.13 s、 24.53 ± 3.91 s、 25.17 ± 4.3 s であって、水泳時間を投与濃度別に増加させるものと確認された。

すなわち、ジントニン処理群が対照群と比較してジントニン投与依存的に著しく高い値を持つことからみて、ジントニンは単純空間認知記憶を増加させることを確認することができた (図 1 7 b 参照)。

【 0 1 0 3 】

実施例 1 3 . ジントニンによる白色ラット副腎 (r a t a d r e n a l g l a n d) からのカテコールアミンの分泌 (s e c r e t i o n) に対する影響の確認

カテコール基を含み且つアミン基が付いたカテコールアミンは、ドパミン、エピネフリンおよびノルエピネフリンの総称であって、中枢神経系および抹消神経系から主に放出されるホルモンとして知られている。

中枢神経系では、意識を維持しかつ意識を明瞭にし、ヒトや動物が覚めているようにして集中力を発揮せしめる作用をする。中枢神経系にカテコールアミンが足りない場合、注意欠陥過活動性障害 (A t t e n t i o n D e f i c i t H y p e r a c t i v i t y D i s o r d e r、ADHD) およびうつ病 (d e p r e s s i o n) が現れる。または、カテコールアミンは外部からの各種ストレスに対抗して、ヒトを含む動物の身体恒常性の維持に寄与する。

【 0 1 0 4 】

副腎などの抹消神経系から放出されるカテコールアミンは、主にエピネフリンから構成されており、運動、ストレス或いは危険に処したとき、交感神経系が興奮する場合、副腎髄質 (a d r e n a l m e d u l l a) のクロム親和性細胞 (c h r o m a f f i n c e l l s) に存在する G タンパク質共役受容体の活性によってカテコールアミンが血液に放出されるものと知られている (Currie, Cell Mol Neurobiol. 8, 1201-1208, 2010)。放出されたカテコールアミンは、運動やストレスの際に貯蔵された糖または脂肪の分解を促進し、身体に必要なエネルギーを提供して運動力の向上、ストレス克服およびストレスによる疲労の回復に役立てることに重要な役割を果たす。また、ストレスの下で抹消血管を収縮させて血圧を維持し、血液循環を増加させて低血圧を予防および治療する役割を果たす (Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthon

10

20

30

40

50

y-Samuel LaMantia, James O. McNamara, and Leonard E. White (2008). Neuroscience. 4th ed. Sinauer Associates. pp. 137-138)。

本発明では、ジントニンの白色ラット副腎からのカテコールアミン放出に対する影響を次のとおり確認した。

【0105】

13 - (1) . 実験動物の準備

200 ~ 300 g の雄白色ラット (Sprague - Dawley rats、200 ~ 300 g) にチオペンタールナトリウム (thiopental sodium) (50 mg / kg m) を腹腔内に注入して麻酔させた後、Wakade および Woo などの方法によって分離した (Wakade, J Physiol. 313, 463-480, 1981; Woo et al., Korean J Physiol Pharmacol., 12, 155-164, 2008)。

簡単に説明すると、分離された副腎を灌流するために、カニューレ (cannula) を図 18 に示すように挿入し、ヘパリン (400 IU / mL) を、カニューレ挿入中に血液の凝固を防ぐために大静脈 (vena cava) に注入した。その後、副腎をラットのボディから分離してルーサイトチャンバー (lucite chamber) に移し、 37 ± 1 を保持した。

【0106】

13 - (2) . 副腎の灌流

副腎は、蠕動ポンプ (peristaltic pump; ISCO^(R) pump、WIZ Co. U. S. A) を用いて 0.33 mL / min の速度で灌流 (perfusion) した。灌流に用いられた溶液は Krebs - bicarbonate solution であり、その組成は次のとおりである (mM) : NaCl、118.4; KCl、4.7; CaCl₂、2.5; MgCl₂、1.18; NaHCO₃、25; KH₂PO₄、1.2; グルコース、11.7。

灌流溶液は持続的に 95% O₂ + 5% CO₂ を含むガスを用いて泡が立つようにし、溶液の pH 7.4 ~ 7.5 を維持した。また、灌流溶液はカテコールアミンの酸化を防ぐために EDTA (10 mg / mL) およびアスコルビン酸 (100 mg / mL) を添加した (Woo et al., Korean J Physiol Pharmacol., 12, 155-164, 2008)。

【0107】

13 - (3) . ジントニンおよび薬物の投与

ジントニン (1 ~ 10 μg / mL) 或いはシクロピアゾン酸 (cyclopiazonic acid; 10 μM) を 4 分間灌流しながら処理し、アセチルコリン (5.32 mM) は三方活栓 (three-way stopcock) を用いて 50 μL を単回注入した。

【0108】

13 - (4) . カテコールアミンを含んでいる灌流液の収集

まず、カテコールアミンの分泌を刺激する物質を処理する前に先立ち、刺激なしで自発的に放出されるカテコールアミンが一定の水準、すなわち背景 (background) 或いは基底レベル (basal level) となるまで 5 ~ 10 分間待った後、ジントニン或いは他の薬物を副腎に灌流して処理し、副腎を介して出てくる灌流液 (perfusate) を 4 分間隔で収集した。薬物刺激で放出されたカテコールアミンの量は、背景或いは基底レベルから、測定されたカテコールアミンの量を差し抜いたものと計算した (Woo et al., Korean J Physiol Pharmacol., 12, 155-164, 2008)。

また、ジントニンが自発的に放出されるカテコールアミンに対する影響、および他のカテコールアミン放出刺激薬物投与の際に放出されるカテコールアミンに対するジントニンの影響を確認するために、副腎を、ジントニンを含み或いはジントニンおよび他の薬物と共に含有されている Krebs solution で 90 分間灌流し、放出されたカテコールアミンの量が背景レベルとなるまで灌流液を収集した。収集された副腎灌流液は、4 を維持するチューブに保管した。

【0109】

13 - (5) . 放出されたカテコールアミンの定量

灌流液に含有されているカテコールアミンの定量は、Anton、SayreおよびLimの方法に従って蛍光法 (Fluorometric Method) で蛍光分光光度計 (fluorospectrophotometer; Kontron Co., Milano, Italy) を用いて行った。この際、灌流液は0.2 mLを使用した(Woo et al., Korean J Physiol Pharmacol., 12, 155-164, 2008)。

【0110】

13 - (6) . 統計分析

各グループ間に放出されたカテコールアミンの量に対する統計学的分析は、Student's t-testおよびANOVA testを施し、P値が0.05以下となるときに有意性があるものとした。

その結果、図19に示すように、ジントニンを分離された白色ラットの副腎に15分間隔で灌流する場合、ジントニンは投与濃度別に副腎からのカテコールアミンの放出を持続的に促進させることが確認された。

また、図20に示すように、予めアセチルコリン5.32 mMを処理した後、ジントニンを濃度別に処理すると、ジントニン1 µg/mLを処理する場合には全く効果がなく、ジントニン3 µg/mLを処理する場合には持続的にカテコールアミンの放出を促進させるものと確認された。ジントニンを10 µg/mLに増加させる場合、初期(0~4分)にはカテコールアミンの放出を維持するが、その後にはカテコールアミンが放出されないことからみて、初期アセチルコリン処理によるムスカリン性 (muscarinic) またはニコチン性 (nicotinic) アセチルコリン受容体の活性はジントニン10 µg/mLでの反応性を抑制するものと確認された。これは、2つの受容体の間で交差脱感作 (cross desensitization) 作用が誘発されることを示している (図20参照)。

このような結果より、本発明のジントニンが副腎からのカテコールアミンの放出を促進させ、放出されたカテコールアミンはエネルギー代謝の活性、精神神経系の活性、集中力の維持などに活用可能であることが分かる。

【0111】

実施例14 . ジントニンによる、血管に存在するBK_{Ca}K⁺イオン通路活性の確認

Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BK_{Ca}) は、K⁺イオン通路中の一つであって、ミオサイト (myocyte) を除いた、主にヒトおよび動物の血管を構成する血管平滑筋細胞 (vascular smooth muscle cells) に存在する。主要機能は血管緊張 (vascular tone) を調節して血管の収縮後に弛緩が正常的に行われるようにする役割を果たす(Eichhorn et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 376, 145-1551, 2007)。

BK_{Ca}K⁺イオン通路の機能異常は、高血圧 (hypertension) を誘発するうえ、運動失調 (ataxia) および膀胱機能異常を引き起こし、特に高血圧、勃起不全 (erectile dysfunction) および膀胱機能異常による尿失禁 (urinary incontinence) をもたらすとよく知られている(Ledoux et al., Physiol. 21, 69-78, 2006)。

また、BK_{Ca}K⁺イオン通路は、血管平滑筋が脱分極により収縮 (constriction) する過程でカルシウムが細胞内に入り込むと、活性化されて血管収縮から血管の弛緩、陰茎海綿体の弛緩および膀胱平滑筋の弛緩を誘導する重要なイオン通路であるため(Eichhorn et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 376, 145-1551, 2007)、BK_{Ca}K⁺イオン通路を活性化させる薬物 (BK_{Ca}K⁺イオン通路 opener) は、高血圧、勃起障害 (erectile dysfunction) および尿失禁などの症状を治療する目的で活用されている(Ledoux et al., Physiol. 21, 69-78, 2006)。

本発明では、ジントニンによって、血管に存在するBK_{Ca}K⁺イオン通路が活性化されるか否かを確認するために、次のとおり、Xenopus laevis oocyte

10

20

30

40

50

sにおけるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性を測定した。

【0112】

14 - (1) . Oocyteの準備

Xenopus I (Ann Arbor, MI, USA) から得た Xenopus laevis を最上の規格指針に従って保管および処理し、oocytes (卵子) を分離するためにカエルを3-アミノ安息香酸エチルエステル (3-amino benzoic acid ethyl ester) の通気溶液 (aerated solution) で麻酔させて手術した後、コラゲナーゼ (collagenase) で処理し、しかる後に、82.5 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、5 mMのHEPES、2.5 mMのピルビン酸ナトリウム (sodium pyruvate)、100 units/mLのペニシリンおよび100 μg/mLのストレプトマイシンが含まれたカルシウム遊離 (Ca²⁺ free) 培地で2時間攪拌して分離した。

V-VI段階の卵子を収集して50 μg/mLのゲンタマイシン (gentamicin) を追加したND96 (96 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのMgCl₂、1.8 mMのCaCl₂、および5 mMのHEPES; pH 7.4) で保管し、前記卵子を含む溶液は連続的に軽く振盪しながら18に維持し、毎日交換した。

【0113】

14 - (2) . BK_{Ca}K⁺イオン通路の測定

二電極式ボルテージクランプ (two-electrode voltage clamp) 記録は、小型のプレキシガラス (plexiglass) ネットチャンバー (5 mL) に置かれた個別的な卵子から得た。電気生理学実験 (electrophysiological experiments) は3 MのKClで満たしたマイクロ電極 (抵抗: 0.2 ~ 0.7 MΩ) と卵子固定増幅器 (Oocyte Clamp amplifier; OC-725C, Warner Instrument, CT, USA) を用いて室温でBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性を記録した (Choi et al., Mol Cells 31, 133-140, 2011)。BK_{Ca}K⁺イオン通路の活性に対する電気生理学的記録のために、まず、oocytesはCl⁻およびCa²⁺イオンがない溶液 (96 mMのNaOH、2 mMのKOH、8 mMのMg-glucuronate、5 mMのHEPES、5 mMのEGTA、pH 7.4 with methanesulfonic acid) に内因性Cl⁻ channelsを抑制するためにCl⁻ channel blockerたる500 μM anthracene-9-carboxylic acidを添加した (Lu et al., J. Biol. Chem. 265, 16190-16194, 1990)。Oocytesは-80 mVの保持電位 (holding potential) で固定 (clamp) し、膜電圧を10間隔で+40 mVで400 ms間脱分極させた後、生成された外向き電流 (outward current) を記録した。

【0114】

図21のAに示すように、BK_{Ca}K⁺イオン通路を発現させたXenopus oocytesにおいて、ジントニンは投与濃度別にBK_{Ca}K⁺イオン通路を活性化させ、ED₅₀は0.71 ± 0.08 μg/mLであることが確認された (図12のB参照)。また、ジントニンは、電流電圧曲線 (current-voltage relationship) から分かるように、膜電圧に依存的に (voltage-dependent manner) BK_{Ca}K⁺イオン通路を活性化させることが確認された (図示せず)。また、ジントニンを繰り返し処理する場合、BK_{Ca}K⁺イオン通路の活性に対する効果が減少した。すなわち、脱感作 (desensitization) が起こるものと確認された (図示せず)。

一方、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用は、Xenopus oocytesに内因性に存在するLPA1受容体 (Kimura et al., J Biol Chem. 276, 15208-15215, 2001) の活性によるGタンパク質-PLC-IP₃-Ca²⁺経路というシグナル伝達経路を介して行われていることを示している。よって、LPA受容体拮抗剤を処理する場合、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用が遮断されるかを確認した

10

20

30

40

50

。その結果、図22のAに示すように、LPA1とLPA3受容体拮抗剤であるKi16425 (10 μM) を処理する場合(Ohta et al., Mol Pharmacol 64, 994-1005, 2003)、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用が遮断されることからみて、ジントニンはLPA受容体を活性化させてBK_{Ca}K⁺イオン通路を活性化させることが確認された(図22のB参照)。

【0115】

また、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用に対するシグナル伝達過程を確認した。

活性PLC (active phospholipase C) 抑制剤であるU73122 (1 μM) の処理はジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用を遮断するが(図23のAおよびC参照)、不活性PLC (inactive phospholipase C) 抑制剤であるU73343 (1 μM) の処理はジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用を遮断する作用がないことが確認された(図23のBおよびD参照)。ところが、ジンセノサイドRg3は、活性PLC抑制剤であるU73122 (1 μM) の処理によって抑制されていないことからみて、ジントニンとは異なる経路を介して作用することが分かった(Choi et al., Mol Cells. 31, 133-140, 2011)。

【0116】

また、IP₃受容体拮抗剤である2-APB (100 μM) を処理する場合にも、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用を遮断し(図24のAおよびC参照)、細胞質内カルシウムキレート剤であるBAPTA-AM (100 μM) を処理する場合にも、BK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用を遮断することが確認された(図24のBおよびD参照)。よって、ジントニンは、Xenopus oocytesに内因性に存在するLPA1受容体(Kimura et al., J Biol Chem. 276, 15208-15215, 2001)を活性化させ、PLC-IP₃-Ca²⁺経路というシグナル伝達経路を介してBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性に作用するが、ジンセノサイドRg3は、2-APBおよびBAPTA-AM処理によって抑制されておらず、ジントニンとは異なる経路を介して作用することが分かった(Choi et al., Mol Cells. 31, 133-140, 2011)。

また、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用に対するPKC (protein kinase C) の関連性を確認するために、本発明では、PKC活性剤であるPMAがジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性に及ぼす影響を確認した。

図25に示すように、PMA (1 μM) を前処理する場合、ジントニンによるBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性作用が消滅するが、ジンセノサイドRg3の作用は維持されることからみて、これらの両成分はBK_{Ca}K⁺イオン通路の活性経路が異なることが分かった。すなわち、PKCの活性はジントニン作用に関与していることを示している。

【0117】

実施例15. HUVECを用いたジントニンの創傷治癒効果の確認

HUVECsにはLPA1とLPA3受容体が内因性に存在すると知られている(Lin et al., BBRC 363, 1001-1008, 2007; Lin et al., Cellular Signalling 20, 1804-1814, 2008)。

本発明では、ジントニンの創傷治癒効果を確認するために、HUVECを加熱不活性化した(heat-inactivated) 20% FBS、3 ng/mLの塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor)、5 units/mLのヘパリン(heparin)、ストレプトマイシン(streptomycin)およびペニシリン(penicillin)を添加したM199培地を用いて5% CO₂ / 95% 酸素培養器で培養した。

【0118】

HUVEC (2.5 × 10⁵ / ウェル) を24ウェルプレートに分注して24時間培養した後、さらに1% FBS含有M199培地で6時間培養した。200 μLのピペットチップで、細胞が成長した各ウェルの中央に線を描いて傷付けた後、浮き上がった細胞を除

10

20

30

40

50

去するために1% FBS含有M199培地で2回洗浄した。細胞にジントニン(30 µg/mL)を処理して培養し、各ウェルのジントニン処理前と後の細胞模様をInverted Fluorescence microscope (AxioVert 200; Carl Zeiss、ドイツ)で観察し、写真撮影して(100×)、ジントニンを処理していない細胞と比較した。

ピペットチップで傷付けた部分における細胞成長程度分析のために、AxioVision (AxioVision 4、Carl Zeiss、ドイツ)を用いて、細胞が回復されていない傷部位面積を測定した(図26のA参照)とともに、掻き傷(scratching wound)部位にジントニンが存在していない状態とジントニンが存在する状態における、傷により空いている部位が充填される時間過程(図25のB参照)、およびジントニンが存在するときと存在しないときの傷部位の面積をパーセントとして表して比較した(図26のCおよびD参照)。

10

【0119】

実施例16. HUVECを用いたジントニンの血管形成促進効果の確認

16-(1). HUVECsにおけるジントニンによる細胞増殖に及ぼす影響の確認

BrDUは、細胞増殖過程で新しいDNAが合成される時、DNAに挿入されるものと知られている(Porstmann et al. Immunol. Methods 82, 169-179, 1985)。

本発明では、HUVEC (human umbilical vein endothelial cell)を用いてジントニンの細胞増殖に対する効果を確認するために、BrDU assay方法(Won et al., J Pharmacol Sci 108, 372-379, 2008; Chen et al., Cell Physiol Biochem 22, 307-314, 2008)に従ってBrDU細胞増殖ELISAキット(BrDU cell proliferation ELISA kit; Roche, Germany)を用いて、細胞に挿入されたBrDUの相対量を測定した。

20

【0120】

ジントニン処理の前日、細胞を96ウェルプレートに各ウェルあたり 3×10^3 ずつ分注し、24時間後に1% FBS含有M199培地で交換して6時間培養した後、さらに培地を新しい1% FBS含有M199培地で取り替えてジントニンを処理し、24時間培養した。細胞にBrDUラベリング(labeling)試薬を入れ、さらに24時間培養した後、細胞の培地を除去し、10% FBS含有M199で洗浄して固定液で固定した後、抗-BrDU-過酸化剤(anti-BrDU-peroxidase)抗体と光度計(luminometer; Veritas, Turner Biosystems, USA)を用いて、細胞内に入り込んだBrDUの相対的な量を定量した。

30

その結果、ジントニンは、処理濃度に依存的にBr-DUのHUVECsの混成(incorporation)を増加させて細胞の増殖を刺激するものと確認された(図27のA参照)。

【0121】

16-(2). HUVECsにおけるジントニンによる細胞移動に及ぼす影響の確認

細胞移動(cell migration)効果を測定するために、Boyden chamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA)を使用する方法を用いた(Kim et al. Biol Pharm Bull 30: 1674-1679, 2007; Lee et al. Am J Physiol Cell Physiol 278:C612-C618, 2000)。

40

Boyden chamber (48ウェル)の下端のウェルに、M199培地(0.1% BSA含有)に溶かしたジントニンを入れ、その上に、コラーゲンでコートしたポリカーボネートメンブレイン(polycarbonate membrane, 8 µm pores)をのせた後、チャンバーを組み立てた。そして、チャンバーの上端のウェルにはHUVEC懸濁液(5×10^4 セル/ウェル)を入れた後、37°Cで70~80分間培養し、移動細胞がメンブレインの上方から下方に移動するようにした。その後、チャンバーを解体して、メンブレインにある細胞をDiff Quik (Sysmex, Kobe, Japan)で固定および染色し、メンブレインに付いているままでスライド上に付着させた後、移動していない細胞を拭き取って除去し、光学顕微鏡を用いて、移動した細胞

50

の数を数えて比較した(倍率×200)。

その結果、図27のBに示すように、ジントニンは処理濃度に依存的に細胞移動を促進させることを確認することができた。

【0122】

16-(3). ジントニンによる血管チューブ(Tube)形成の確認

ジントニンの血管形成に対する効果があるかどうかを確認するために、マトリゲル(Matrigel)上におけるチューブ様構造の形成効果を比較した(Kim et al. Biol Pharm Bull 30: 1674-1679)。

細胞の培地をM199培地(1%FBS)で交換して6時間培養した後、トリプシンで処理してM199培地(1%FBS)に懸濁し、しかる後に、成長因子の量を減らしたマトリゲル(250 μ L/ウェル)で予めコートした24ウェルプレートに分注した(2 \times 10⁵セル/ウェル)。

細胞を、M199培地(1%FBS)に溶かしたジントニン(30 μ g/mL)で処理し、37 $^{\circ}$ Cで4時間培養した後、チューブ形成を顕微鏡(Inverted Fluorescence microscope; AxioVert 200, Carl Zeiss)を用いて観察し、撮影して比較した結果(倍率×100)、ジントニンは処理血管チューブ形成を促進させるものと確認された(図27のC参照)。

【0123】

実施例17. ジントニンの抗癌剤投与による下痢および粘膜炎抑制効果の確認

胃腸管消火器にもLPA受容体が分布していると知られており、これら受容体の活性は放射線(radiation against cancer)および抗癌剤(chemotherapy against cancer)による消火器内皮細胞死滅(radiation-induced apoptosis)作用を抑制するものと報告された(Deng et al., Gastroenterology 123, 206-216, 2002; Deng et al., Gastroenterology 132, 1834-1851, 2007)。

一方、血液系癌の治療に使用する抗癌剤であるブスルファン(Busulfan)は、投与の際に人に現れる様々な副作用の中でも下痢と粘膜炎を誘発するものと知られている(Escal n et al., Bone Marrow Transplant. 44, 89-96. 2009)。

本発明では、ジントニンが抗癌剤の投与による下痢および下痢による粘膜炎誘発抑制作用を確認するために、マウスを用いて、ブスルファン投与後に誘発される下痢(diarrhea)および粘膜炎(mucositis)に対するジントニンの予防および治療効果を観察した。

【0124】

具体的に、ジントニンはブスルファン投与3日前から口腔で100mg/kgを投与し、ブスルファン(40mg/kg)投与群はジントニンの代わりに生理食塩水を投与した。3日後にブスルファン(40mg/kg)を腹腔内に投与し、10日間下痢および粘膜炎の誘発有無を観察した。

下痢の場合、全体実験群15匹にブスルファンを処理したとき、8匹から下痢が観察されて53.5%であったが、ジントニンを前処理する場合には3匹(20%)のみから観察され、約30%以上ブスルファンによる下痢を抑制することが確認された。

また、粘膜炎の場合も、全体実験群15匹にブスルファンを処理したとき、7匹から肛門周囲に粘膜炎が観察(46.7%)されたが、ジントニンを前処理する場合には2匹(13.3%)のみから観察され、ブスルファンによる肛門周囲の粘膜炎を33.4%抑制することが確認された(下記表2参照)。

【0125】

10

20

30

40

【表 2】

表 2 抗癌剤投与による下痢および粘膜炎の誘発に対するジントニンの効果

症状	ブスルファン	ジントニン+ブスルファン
下痢	8 / 15	3 / 15
粘膜炎	7 / 15	2 / 15

【 0 1 2 6 】

以上、本発明の内容の特定部分を詳細に記述したが、このような具体的記述は好適な実施形態に過ぎないもので、本発明の範囲を限定するものではないことは、当該分野における通常の知識を有する者にとって明白であろう。よって、本発明の実質的な範囲は添

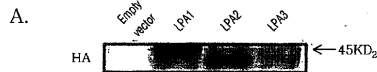
10

【 図 1 】

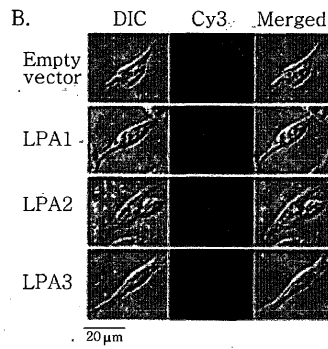
[Fig. 1]



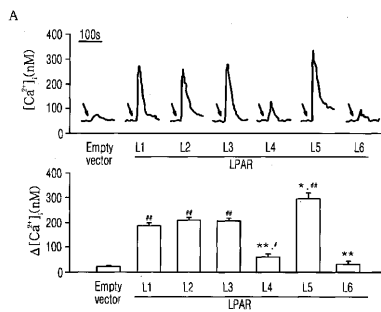
【 図 2 A 】



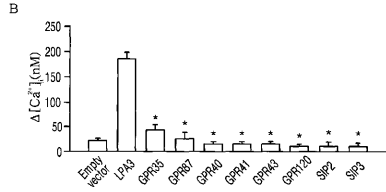
【 図 2 B 】



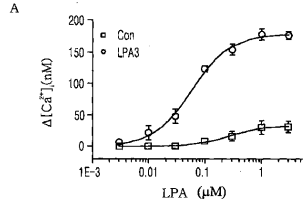
【 図 3 A 】



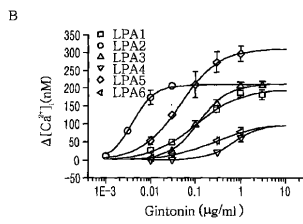
【 3 B 】



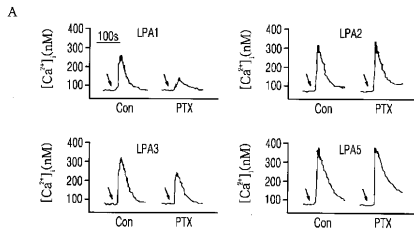
【 4 A 】



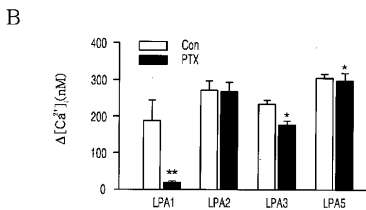
【 4 B 】



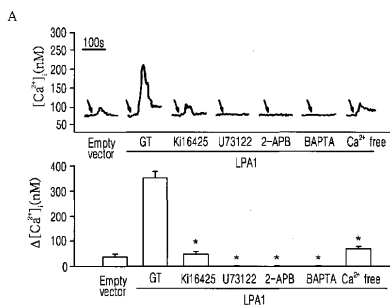
【 6 A 】



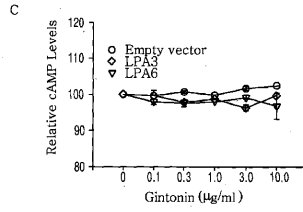
【 6 B 】



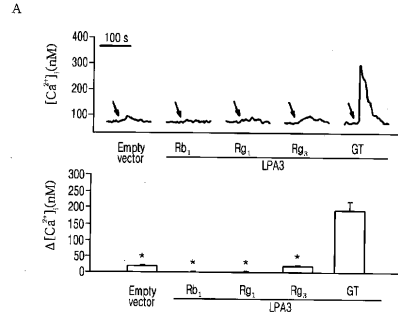
【 7 A 】



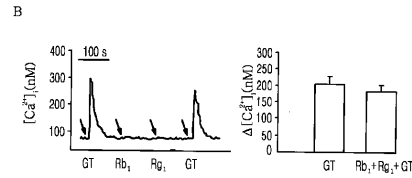
【 4 C 】



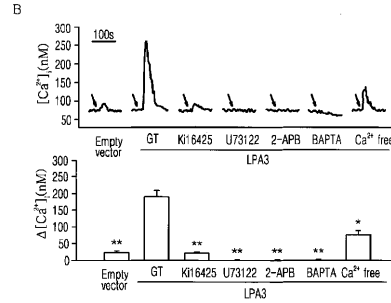
【 5 A 】



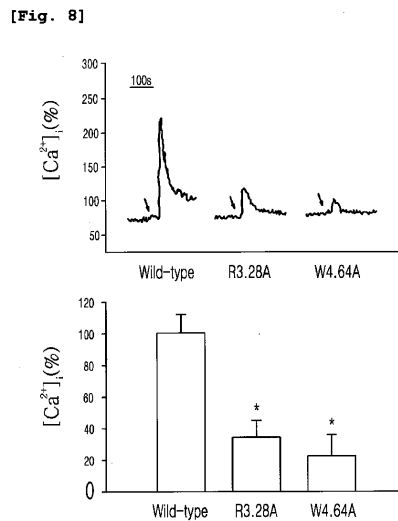
【 5 B 】



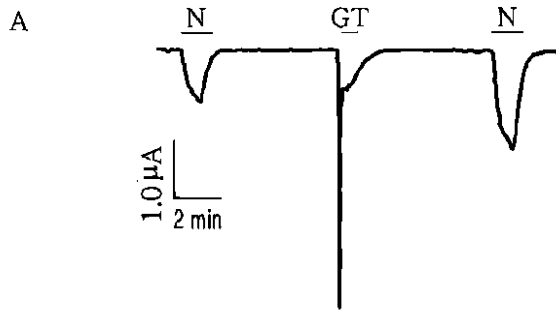
【 7 B 】



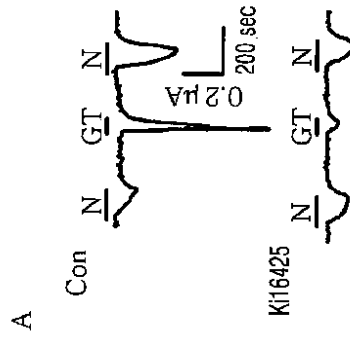
【 8 】



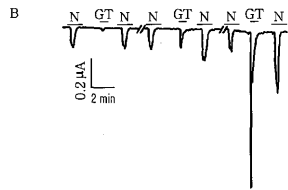
【 9 A 】



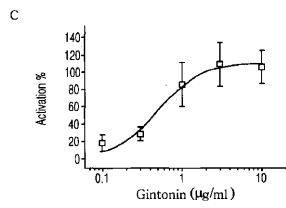
【 10 A 】



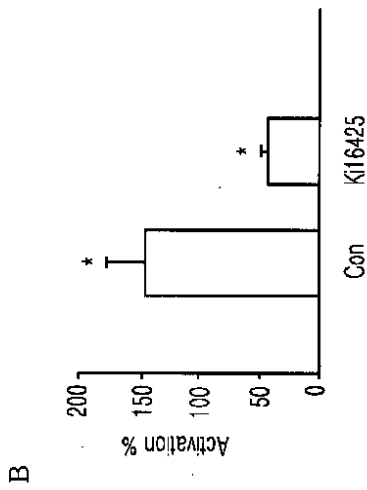
【 9 B 】



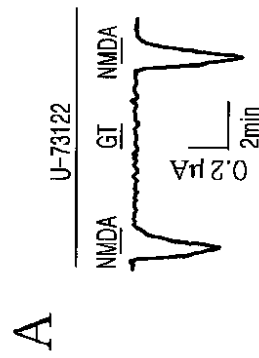
【 9 C 】



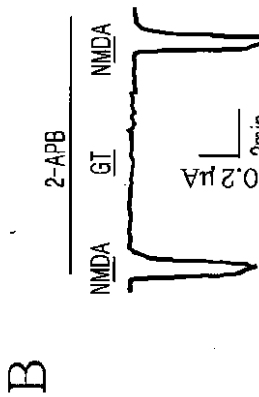
【 10 B 】



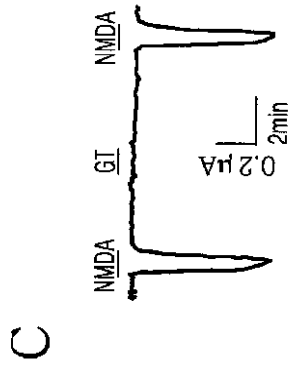
【 11 A 】



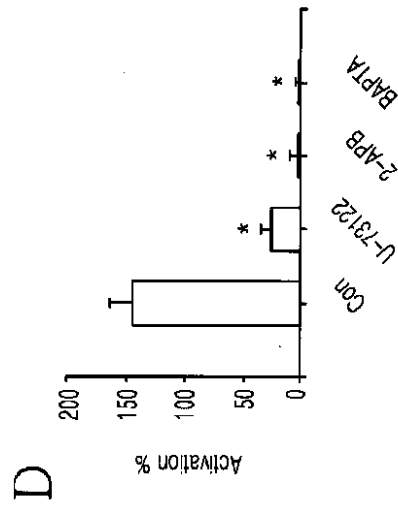
【 11 B 】



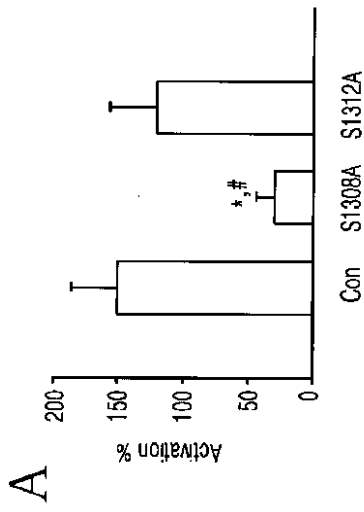
【 1 1 C 】



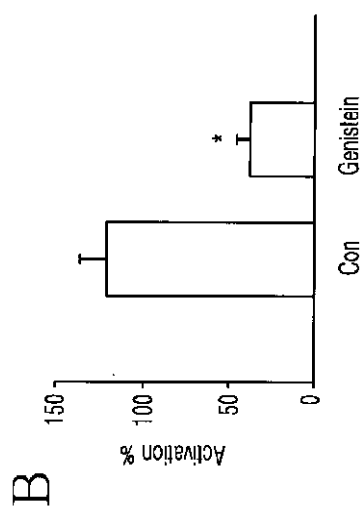
【 1 1 D 】



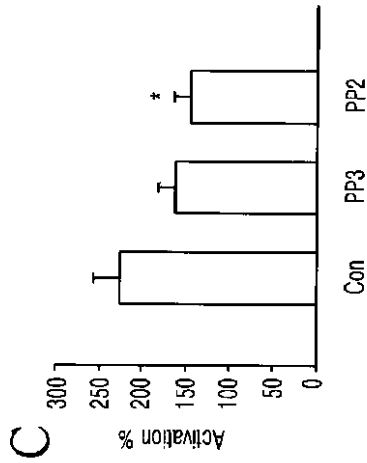
【 1 2 A 】



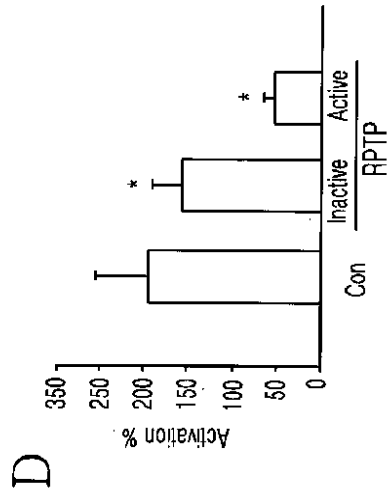
【 1 2 B 】



【 1 2 C 】

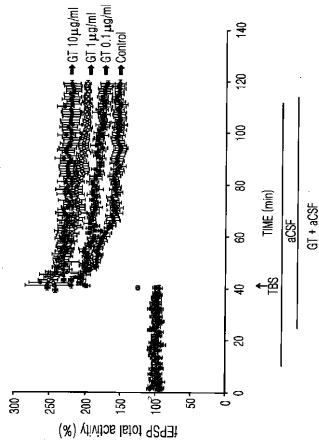


【 1 2 D 】



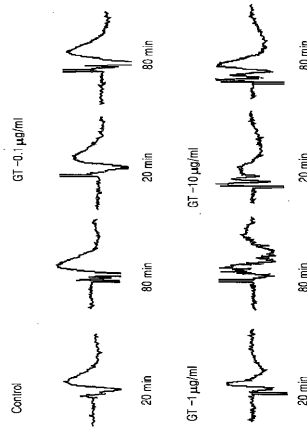
【 1 3 】

【Fig. 13】



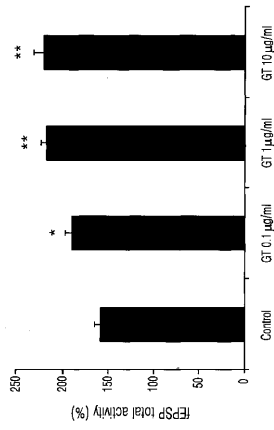
【 1 4 】

【Fig. 14】



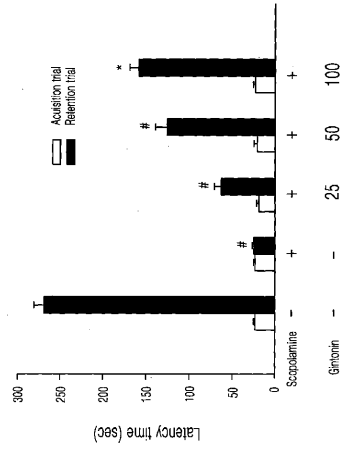
【 15 】

[Fig. 15]



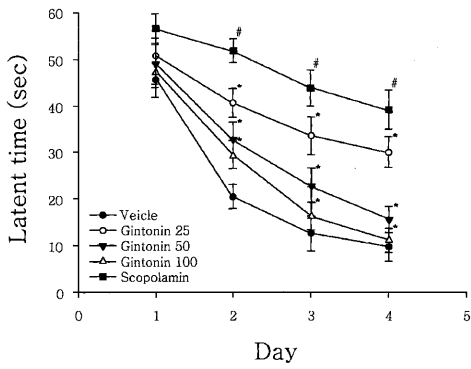
【 16 】

[Fig. 16]



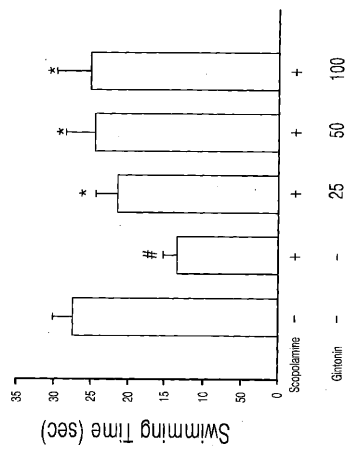
【 17 a 】

[Fig. 17a]



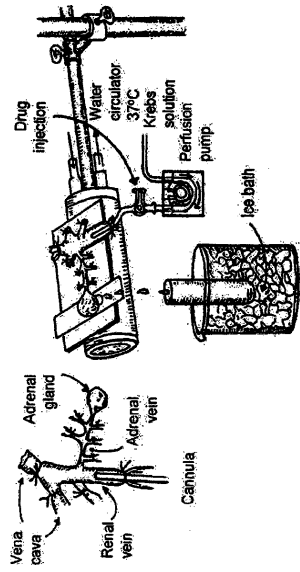
【 17 b 】

[Fig. 17b]



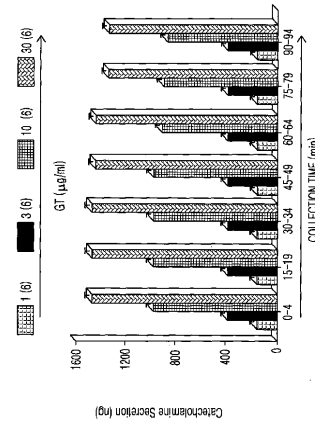
【 18 】

[Fig. 18]



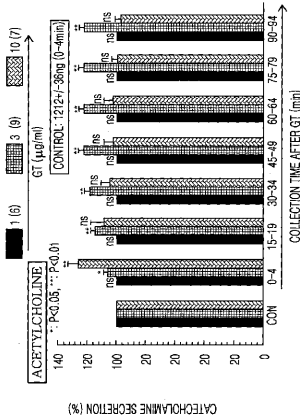
【 19 】

[Fig. 19]

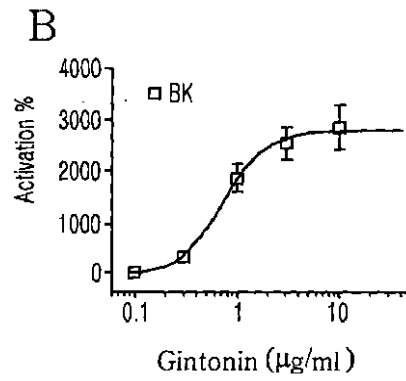


【 20 】

[Fig. 20]

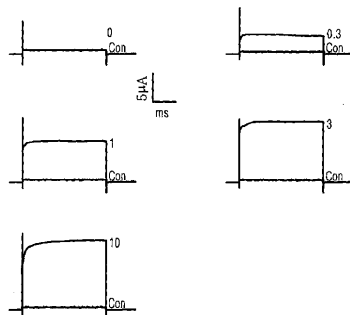


【 21 B 】

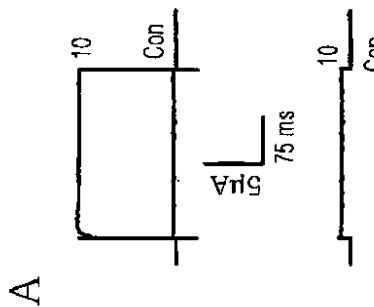


【 21 A 】

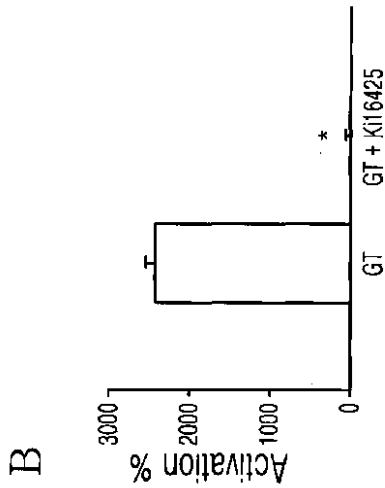
A



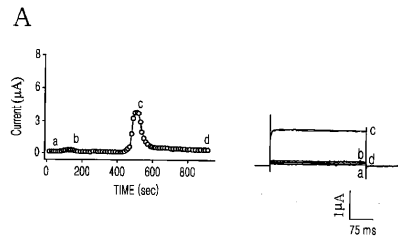
【 22 A 】



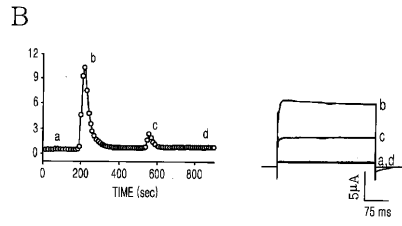
【 2 2 B 】



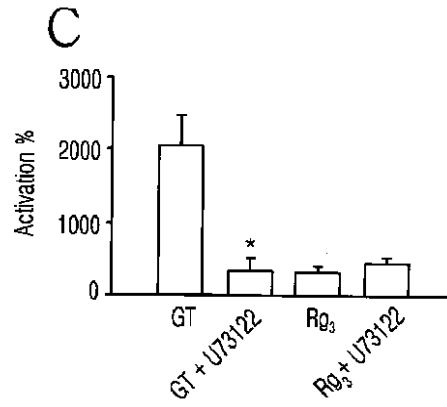
【 2 3 A 】



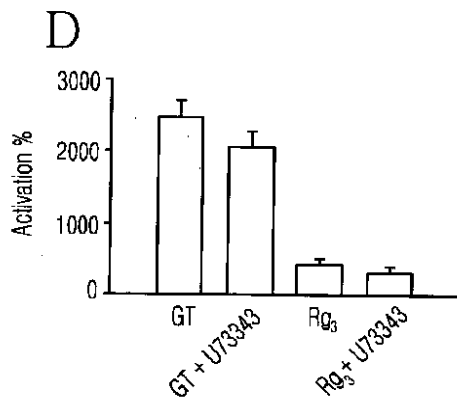
【 2 3 B 】



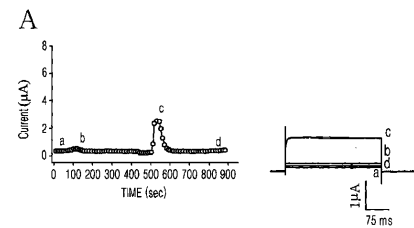
【 2 3 C 】



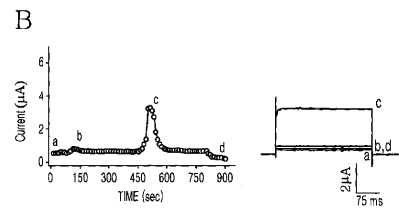
【 2 3 D 】



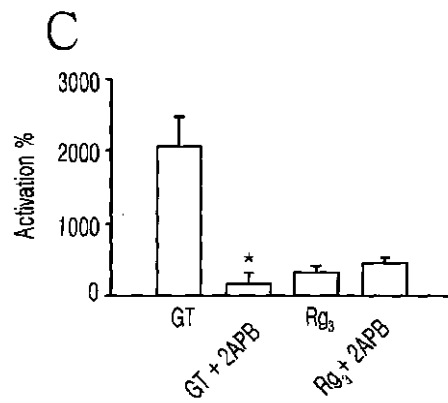
【 2 4 A 】



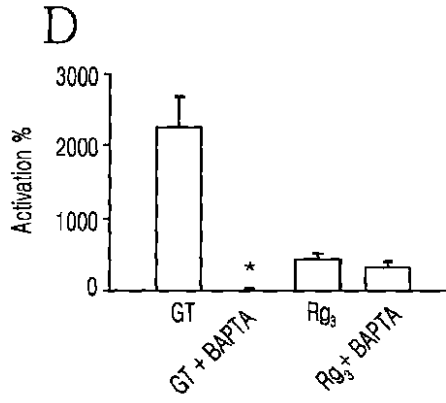
【 2 4 B 】



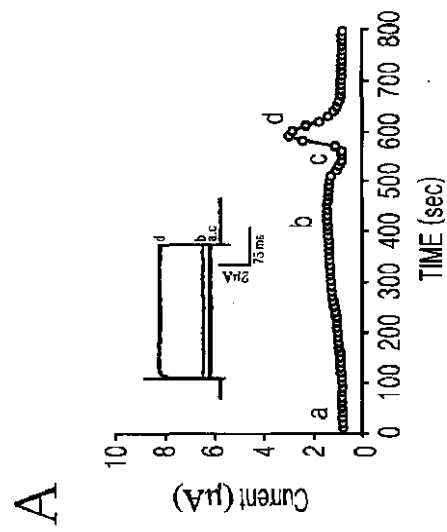
【 2 4 C 】



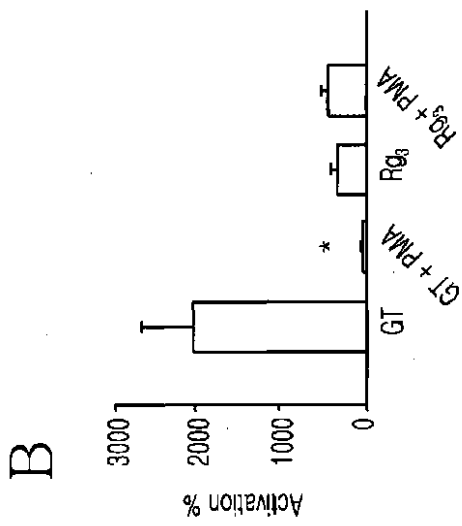
【 2 4 D 】



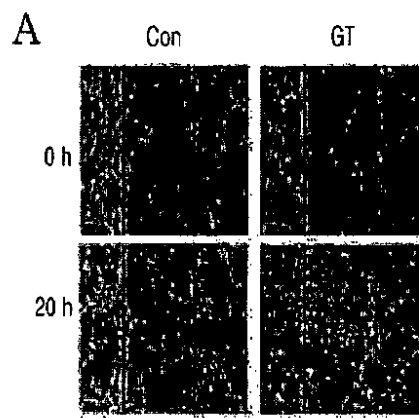
【 2 5 A 】



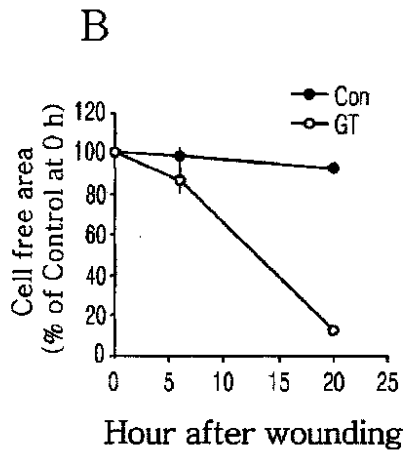
【 2 5 B 】



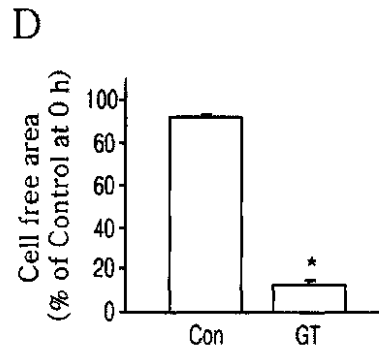
【 2 6 A 】



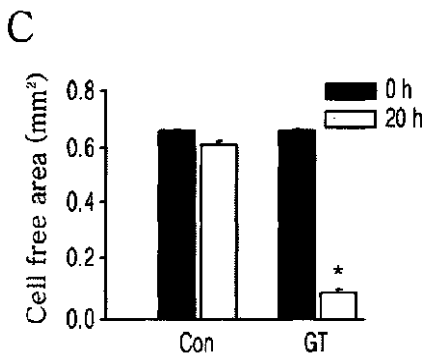
【 2 6 B 】



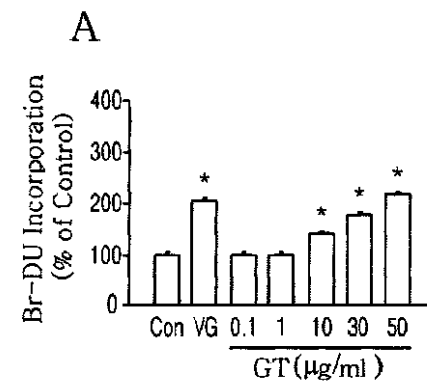
【 2 6 D 】



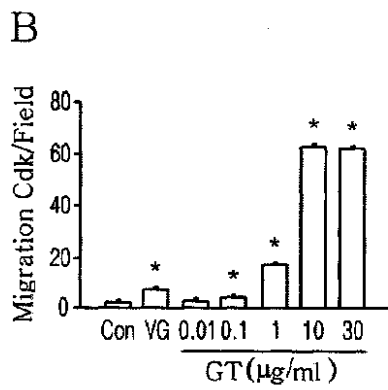
【 2 6 C 】



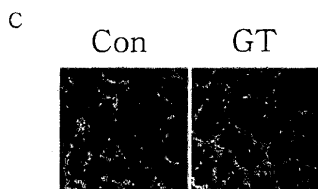
【 2 7 A 】



【 2 7 B 】



【 2 7 C 】



【配列表】

0005899321000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K 36/25	(2006.01)	A 6 1 K	36/25	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/533	(2006.01)	G 0 1 N	33/533	
G 0 1 N 21/78	(2006.01)	G 0 1 N	21/78	C
G 0 1 N 21/64	(2006.01)	G 0 1 N	21/64	F
C 0 7 K 19/00	(2006.01)	G 0 1 N	21/64	E
C 0 7 K 14/415	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 0 7 K	14/415	
		C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 ハン, ソン ヒ
大韓民国, 431-080 ギョンギ-ド, アンヤン-シ, トンアン-グ, ホギェ-ドン, 111
6ボンジ, サエムマウル アパンアパトゥ, 504ドン101ホ
- (72)発明者 シン, タエ ジュン
大韓民国, 137-070 ソウル特別市, ソチョ-グ, シンドンアアパト, 2ドン701ホ
- (72)発明者 チョエ, ソン ヒエ
大韓民国, 134-872 ソウル特別市, カンドン-グ, チョンホ2ドン414ボンジ, ドウサ
ンウォブ センティム 706ホ

審査官 小森 潔

- (56)参考文献 国際公開第2011/062354(WO, A1)
韓国公開特許第10-2011-0066400(KR, A)
国際公開第99/024569(WO, A1)
Journal of Ginseng Research, 2011年 6月, Vol. 35
, No. 2, p209-218

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 38/00 - 38/58
A 6 1 K 36/25
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	从胡萝卜中分离鉴定糖脂蛋白gintonin作为天然配体衍生植物配体		
公开(公告)号	JP5899321B2	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	JP2014531713	申请日	2012-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	海螺单击大学工业合作裴雷化的Co-op		
申请(专利权)人(译)	Konkuku大学工业Kopereishon小屋		
当前申请(专利权)人(译)	Konkuku大学工业Kopereishon小屋		
[标]发明人	ナスンヨル ハンソンヒ シンタエジュン チョエソンヒエ		
发明人	ナ,スン ヨル ハン,ソン ヒ シン,タエ ジュン チョエ,ソン ヒエ		
IPC分类号	A61K38/00 A61P43/00 A61P17/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61K36/25 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/533 G01N21/78 G01N21/64 C07K19/00 C07K14/415 C12N15/09		
CPC分类号	A61K35/28 A61K36/258 A61K38/14 A61P3/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/02 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/28 A61P29/00 A61P43/00 C07K14/415 G01N33/5041		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61P43/00.111 A61P17/02 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61K36/25 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/533 G01N21/78.C G01N21/64.F G01N21/64.E C07K19/00 C07K14/415 C12N15 /00.A		
优先权	1020110094194 2011-09-19 KR 1020120102419 2012-09-14 KR		
其他公开文献	JP2014532048A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 本发明涉及由人参分离和鉴定的糖脂蛋白gintonin，作为作用于LPA1（溶血磷脂酸；1-或2-酰基-sn-甘油-3-磷酸），LPA2，LPA3，LPA1的天然药用植物来源的配体，LPA4和LPA5受体，其功效通过与EDG（内皮分化基因）中的子受体[LPA1（edg-2），LPA2（edg-4），LPA3（edg-7），LPA4，PLA5]家族存在于包括人在内的动物的细胞膜中的G蛋白偶联受体（GPCR）中。由于本发明的gintonin与LPA受体相互作用以激活由于钙离子浓度降低和各种生理活性和依赖于钙的药物活性而引起的各种疾病的预防和治疗，一系列信号传递过程并暂时诱导细胞质中游离Ca ²⁺ 的增加，并且细胞内钙浓度的暂时增加导致各种器官中细胞内钙浓度的临时增加，其中尤其包括表达LPA受体的神经系统，心血管系统，内分泌系统，生殖系统，消化系统和免疫系统，并表现出生理活性。	(21) 出願番号	特願2014-531713 (P2014-531713)	(73) 特許権者	514069023
	(86) (22) 出願日	平成24年9月19日 (2012.9.19)	(74) 代理人	110001416
	(65) 公表番号	特表2014-532048 (P2014-532048A)	(72) 発明者	ナ, スン ヨル
	(43) 公表日	平成26年12月4日 (2014.12.4)		大韓民国, 135-230 ソウル特別市, カンナム-グ, イルウォン-ドン, サエムトマウル, 105ドン306ホ
	(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/007505		
	(87) 国際公開番号	W02013/042943		
	(87) 国際公開日	平成25年3月28日 (2013.3.28)		
	審査請求日	平成26年3月19日 (2014.3.19)		
	(31) 優先権主張番号	10-2011-0094194		
	(32) 優先日	平成23年9月19日 (2011.9.19)		
	(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
	(31) 優先権主張番号	10-2012-0102419		
	(32) 優先日	平成24年9月14日 (2012.9.14)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)			