

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08003

研究課題名(和文)糖代謝異常疾患における医療用漢方製剤の有用性に関する研究

研究課題名(英文)Evaluation of Kampo Prescriptions as Therapeutic Agents for Glucose Metabolism Disorders

研究代表者

小池 一男 (KOIKE, Kazuo)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：30130363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は糖代謝異常疾患の分子標的を用いて全ての経口用医療用漢方製剤に対して網羅的評価を行った。その結果、インスリン抵抗性糖尿病の分子標的であるプロテインチロシンホスファターゼ1B (PTP1B)に対して大黃甘草湯、麻子仁丸、桃核承気湯、桂麻各半湯および調胃承気湯に高い阻害活性を示した。糖尿病性合併症の分子標的advanced glycation end products (AGEs)およびaldose reductase(AR)に対して、辛夷清肺湯と治打撲一方にそれぞれ高い生成阻害活性を示した。更に、抗酸化試験においては、通導散、大柴胡湯および麻子仁丸には最も高い活性を示した。

研究成果の概要(英文)：The study comprehensively evaluated the effects of all oral Kampo preparations on the molecular targets in glucose metabolism disorders. As a result, Daiokanzoto, Masiningan, Tokakujokito, Keimakakuhanto and Chojokito exhibited the highest inhibitory activity against protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), a molecular target for insulin-resistant type 2 diabetes mellitus. On the other hand, Shin'iseihaito and Jidabokuippo showed inhibitory activity against advanced glycation end products (AGEs) and aldose reductase (AR) for diabetic complications, respectively. Furthermore, Tsudosan, Daisaiko and Masiningan showed the strongest antioxidant activity.

研究分野：生薬学

キーワード：医療用漢方製剤 糖代謝異常疾患 麻子仁丸 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

糖尿病をはじめとする糖代謝異常疾患の罹患者数は増加の一途を辿っており、国際糖尿病連合は世界の糖尿病患者数は2012年で3億7千万人まで達したと報告した。糖尿病は慢性的な高血糖を呈する疾患であり、高血糖状態の持続は更に代謝異常を引き起こし、合併症を発症させ患者のQOLを著しく低下させる。糖尿病は生体内の糖代謝が正常に制御されなく、発症機構が複雑なために根治薬はまだ存在しておらず、その治療は食事と運動療法が基本とされる。治療薬として西洋薬を中心にチアゾリジン系薬などが臨床に用いられるが、副作用、毒性そしてノンレスポンスの存在等の課題が残されており、新たな治療薬の創製は常に社会から求められている。

一方、高齢化や医療費高騰などの社会背景下、未病の段階からアプローチが可能である医療用漢方製剤は現在148処方がある日本の国民健康保険に適用され、日本漢方生薬製剤協会の2011年の調査において医師の89%が漢方製剤を使用するという報告が行われた。しかし、実際の使用は消化器や精神疾患領域の数種類に限られており、多くの漢方製剤は漢方専門医以外に使用し難いことは事実である。これは現代医学においては疾患の観点から治療戦略を取るのに対し、漢方製剤は「証」など古典的な医学理論に基づいて処方されるために理解し難い事が大きい理由に挙げられる。これを克服するアプローチの一つは現代医学の観点から医療用漢方製剤の有用性エビデンスを取得することにある。

現代医学の観点から漢方製剤の臨床効果を完全に理解するには一つ一つの漢方製剤に対し多岐にわたる研究を行う必要があり、莫大な時間と労力が必要とされる。ゆえに、効率よく医療用漢方製剤の臨床有用性を明らかにすることはその有効利用に極めて重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は糖代謝異常疾患の分子標的を用いて全ての経口用医療用漢方製剤に対して網羅的スクリーニングを行うことにより、糖代謝異常疾患に有用な医療用漢方製剤をシーズとして見出し、医療用漢方製剤の糖代謝異常疾患への有用性を基礎科学的に明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 医療用漢方製剤抽出物ライブラリーの作製：本研究では全147処方の経口医療用漢方製剤を使用した。各漢方製剤は日本漢方生薬製造協会の定める処方番号順に番号をふり、外用剤の紫雲膏を除外した。漢方製剤のサンプル濃度は臨床投与量を考慮し、添付文書に定めた1日投与量を1 Unit (U)と定め、最終濃度0.1mU/mLになるよう水抽出し、バイオアッセイのサンプル試料とした。

(2) 糖代謝疾患のバイオマーカーにおけるバイオアッセイ：本研究は糖代謝異常疾患の

バイオマーカーとして、インスリン抵抗性糖尿病の創薬分子標的であるプロテインチロシンホスファターゼ1B(PTP1B)阻害活性、糖尿病性合併症の創薬分子標的 advanced glycation end products (AGEs)生成阻害活性およびaldose reductase(AR)阻害活性を選択した。更に糖代謝疾患に深く関わる抗酸化活性も取り入れ、活性酸素吸収能評価試験(ORAC法)、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性測定試験(SOD法)、およびDPPHラジカル捕捉活性測定試験(DPPH法)を用いた。各バイオアッセイは多数のサンプルを同時に評価できる96-wellマイクロプレート上で行われるHigh-throughputアッセイ系を用いた。

(3) PTP1B阻害活性解析：高いPTP1B阻害活性を示す医療用漢方製剤について、各サンプル濃度および基質濃度を用いて酵素反応速度を測定して作成したLineweaver-Burk plotより阻害様式を検討した。PTP1B酵素阻害選択性はVHR、TC-PTP、SHP-1およびSHP-2の4種のPTPを用いて検討した。細胞内インスリンシグナル伝達に対する作用を、Aktのリン酸化を指標として評価した。Aktリン酸化活性はHepG2細胞を用い、インスリン刺激0分と5分後にウェスタンブロット法より測定した。PTP1Bとの結合様式を分子ドッキングシミュレーションにて検討した。

(4) 麻子仁丸のPTP1B阻害活性成分解析：麻子仁丸水抽出物をDiaion HP-20カラムにて分画し、PTP1B活性を示すメタノール溶出画分およびアセトン溶出画分について逆相分取HPLCにおいて、更に分画をし、活性ピークを同定した。活性ピークを指標として、麻子仁丸メタノール抽出物を用いて、各種カラムクロマトグラフィーおよびHPLCにより、活性化合物を単離し、化学構造はNMR、MSなどスペクトル解析により決定した。

(5) 抗酸化作用解析：高い抗酸化活性を示した医療用漢方製剤について、ヒト肝癌由来細胞株HepG2細胞を用いて、ROS蛍光プローブであるDCFH-DAを用いた細胞内イメージングにより抗酸化活性を評価した。*In vivo*試験については漢方薬を5週齢ICR系雄性マウスに1日2回、2日間連続で経口投与(2.5g/kg/1回)した後、血清を採取し、血清抗酸化力(Biological Antioxidant Potential: BAP)を測定した。

4. 研究成果

(1) 糖代謝疾患のバイオマーカーにおける医療用漢方製剤147処方の網羅的評価：経口医療用漢方製剤147処方のPTP1B阻害活性を*in vitro*アッセイで網羅的に評価した結果、22処方が最終濃度0.1mU/mLにおいて、PTP1B活性を完全に阻害した。これら処方はいずれも濃度依存的にPTP1B活性を阻害し、大黃甘草湯、麻子仁丸、桃核承氣湯、桂麻各半湯、調胃承氣湯に特に高い阻害活性を示した。糖尿病性合併症の創薬分子標的 advanced glycation end products (AGEs)生成阻害活

性および aldose reductase (AR) 阻害活性を評価した結果、辛夷清肺湯に高い AGEs 生成阻害活性、治打撲一方に高い AR 阻害活性が認められた。抗酸化試験においては、ORAC 法では通導散、麻子仁丸、および大柴胡湯が最も高い ORAC 値を示した。SOD 法では、大柴胡湯、治打撲一方、および通導散が最も高いスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉活性を示した。DPPH 法では麻子仁丸、通導散、および大柴胡湯が、最も高い DPPH ラジカル捕捉活性を示した。

(2) 医療用漢方製剤の PTP1B 阻害作用解析：高い PTP1B 阻害活性を示す大黃甘草湯、麻子仁丸および桃核承気湯について、酵素反応速度論より阻害様式を検討した結果、大黃甘草湯と桃核承気湯は非競争型様、麻子仁丸は競争型様の阻害様式で PTP1B を阻害することを明らかにした。PTPs に対する阻害選択性を検討した結果、各漢方製剤は PTP1B を完全阻害した濃度において、VHR と TC-PTP に対しては中程度の阻害活性を示したが、SHP-1 と SHP-2 に対しては弱い阻害活性しか認めなかった。酵素阻害試験の結果に基づいて、大黃甘草湯、麻子仁丸、桃核承気湯、桂麻各半湯および調胃承気湯について、細胞内インスリンシグナル伝達に対する作用を、Akt のリン酸化を指標として評価した。その結果、5 処方内、麻子仁丸のみ Akt リン酸化活性が促進された。

(3) 麻子仁丸の PTP1B 阻害活性成分解析：麻子仁丸水抽出物を Diaion HP-20 カラムにて分画し、それぞれ PTP1B 活性を測定した結果、メタノール溶出画分およびアセトン溶出画分は活性を示した。メタノール溶出画分は逆相-分取 HPLC において、更に分画をし、最も活性を示した M13b を活性ピークとして同定した(化合物 1)。一方、アセトン溶出画分は逆相-分取 HPLC にて分画を行ったところ、A14 は最も高い PTP1B 阻害活性を示し、活性ピークとして同定した(化合物 2)。活性ピークを指標として、麻子仁丸メタノール抽出物を用いて、各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC により、活性化化合物 1 と 2 を単離した。化学構造は NMR、MS などスペクトル解析を行った結果、化合物 1 は厚朴由来のネオリグナン成分 magnolol、2 は大黃由来成分のアントラキノン成分 chrysophanol と同定した。活性化化合物について、更に PTP1B 阻害活性評価した。化合物 1 と 2 は濃度阻害依存的に PTP1B を阻害し、 IC_{50} はそれぞれ $24.6\mu\text{M}$ および $12.3\mu\text{M}$ であった。Lineweaver-Burk plot においては、化合物 1 は非競争型 ($K_i: 52.6\mu\text{M}$)、化合物 2 は競争型 ($K_i: 13.3\mu\text{M}$) の阻害様式を示した。一方、PTP1B の競争型阻害剤である化合物 2 について、PTP1B との結合様式を分子ドッキングシミュレーションにて検討した。化合物 2 は PTP1B の活性部位のアミノ酸残基 Tyr46、Asp48、Cys215、Ala 217 と Gln262 に対する安定な結合が認められ、酵素反応速度論の結果を支持した。阻害選択性について

は、化合物 1 と 2 は PTP1B を完全阻害した濃度において、4 種の PTP (SHP-1、SHP-2、VHR および TC-PTP) に対して、何れも 40%未満の阻害率を示し、高い PTP1B 特異性を示した。さらに、化合物 1 と 2 は HepG2 細胞において、細胞毒性を示さない濃度で、共に Akt リン酸化活性を促進し、細胞内インスリンシグナル伝達増強作用を認めた。

(4) 医療用漢方製剤の PTP1B 阻害作用解析：高い *in vitro* 抗酸化活性を示した通導散、大柴胡湯および麻子仁丸について、細胞内イメージングによる抗酸化活性評価を行った。共焦点顕微鏡を用い、 H_2O_2 刺激による DCFH-DA 前処理ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞内の ROS 産生の解析を行った結果、通導散、大柴胡湯および麻子仁丸は何れも最終濃度 $10\mu\text{Unit/mL}$ にて経時的な蛍光の増強を有意に抑制した。この 3 種の医療用漢方製剤は更に ICR 系雄性マウスに 1 日 2 回、2 日間連続で経口投与して生体内の抗酸化能変化について血清抗酸化力 (Biological Antioxidant Potential: BAP) を解析した。その結果、通導散に有意な BAP の上昇が認められた。

(5) 漢方医学的考察：今回の研究において、147 処方の医療用漢方製剤の中、麻子仁丸は糖代謝疾患の分子マーカーに対して、特に優れた活性を示した。麻子仁丸は漢方医学の「気」症状を改善する承気湯類に分類される。糖尿病は漢方医学的に「気滞」の状態であり、承気湯類は糖尿病の治療に良い。高い PTP1B 阻害活性を示す 5 処方内、4 処方は便秘に使われ、大黃甘草湯、桃核承気湯および調胃承気湯は実証に使われることに対し、麻子仁丸は高齢者や虚証である人に使われる。2 型糖尿病は中高年に多く発現し、中高年者は肉体的に虚証を呈することが多いことを考慮すると、麻子仁丸は糖代謝疾患における薬効解明により、更なる有効利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Toshihisa Onoda, Wei Li, Tatsunori Sasaki, Megumi Miyake, Koji Higai, Kazuo Koike: Identification and evaluation of magnolol and chrysophanol as the principle protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory compounds in a Kampo medicine, Masiningan. Journal of Ethnopharmacology, 186, 84-90 (2016). 査読有.
DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.063

[学会発表](計 2 件)

小松加奈、栗山典子、李巍、小池一男: 四塩化炭素誘発急性肝障害モデルマウスにおける大柴胡湯及び治打撲一方の抗酸化作用の評価. 日本生薬学会第 64 回年会(千

葉), 2017 年.

竹内未央、佐藤直子、小野田稔久、桧貝孝慈、李巍、小池一男: 医療用漢方製剤 147 処方の抗酸化活性に関する研究. 日本生薬学会第 63 回年会(富山), 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 一男 (KOIKE, Kazuo)
東邦大学・薬学部・教授
研究者番号: 3 0 1 3 0 3 6 3

(2) 研究分担者

李 巍 (LI, Wei)
東邦大学・薬学部・准教授
研究者番号: 9 0 3 2 8 6 3 3

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()