

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08902

研究課題名(和文) 遺伝子発現解析で漢方理論を科学する

研究課題名(英文) Identification of Scientific evidence for Traditional Kampo theory by gene expression analysis

研究代表者

済木 育夫 (Saiki, Ikuo)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員

研究者番号：80133776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：「経験に基づく理論(経験知)が根幹を成している漢方薬」に「科学的根拠」を与えるため、漢方薬とその構成生薬に着目して研究を行った。  
特に細胞内シグナルに及ぼす効果の網羅的解析により、生薬・漢方薬に使用されていた経験的分類(清熱燥湿薬、辛温解表薬、辛涼解表薬)が科学的に証明できる可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Kampo medicine has not enough scientific evidences yet. To identify the evidences of Kampo theory, we focused on the herbal medicines, which are contained in Kampo medicines.  
We determined that the crude drugs/herbs belonging to the same category in traditional Kampo theory share a common effect on intracellular signaling activity in vitro.

研究分野：腫瘍生物学、内科学(一般)

キーワード：漢方薬 生薬 漢方理論

1. 研究開始当初の背景

漢方薬は、いくつかの構成生薬を組み合わせて処方して作られる。構成生薬は、それぞれ五行論的あるいは経験的に帰経(肝・心・脾・肺・腎)という概念があり、また漢方薬においても「気」「血」「水」という概念が存在する。気血双補剤である十全大補湯は、「気を補う」四君子湯(補気剤)と「血を補う」四物湯(補血剤)に桂皮、黄耆を加えた10種の構成生薬からなる漢方薬であり、我々の研究室ではこれまでに十全大補湯さらには四物湯が、「血」に関係する宿主免疫(マクロファージ、T細胞)を活性化することでがんの転移を抑制することを報告している。

そこで今回は特に十全大補湯に着目し、1)「五臓」「補気」「補血」の漢方理論に科学的根拠を与えること、を目的とする。さらに、in vitroで細胞内シグナルへの効果が十全大補湯と類似していた黄蓮解毒湯と半夏瀉心湯について、2)漢方薬リポジショニングの可能性を検証する、ことを目的とする。

2. 研究の目的

(1)生薬の経験に基づく分類に科学的根拠を明らかにする。

3. 研究の方法

① 生薬水抽出エキスの調製

それぞれの生薬は、8倍量(vol/vol)の水を加え、とろ火で50分沸騰させ抽出した。その後フィルターで不溶物を除去し、凍結乾燥させた。

② 細胞培養

ヒト肺がん細胞株 A549 は American Type Culture Collection (ATCC) から入手し、RPMI-1640 メディウムにて培養した。

③ プラスミド作製

10種の転写因子(CREB, ERSF, HIF1 $\alpha$ , IRFs, MYC, NF- $\kappa$ B, p53, SMADs, SOX2, TCF/LEF)結合部位をそれぞれ pGL4.26 にサブクローニングした。

④ Dual-Luciferase Assay

A549細胞に転写因子結合部位を含むそれぞれの pGL4.26 レポーターベクターと pRL-CMV renilla control ベクターを共トランスフェクションした。その後、100  $\mu$ g/ml の生薬水抽出エキスを加え、48時間後に Passive Lysis Buffer にて細胞破壊し、Dual-luciferase Reporter Assay(Promega)の試薬を用いて、luciferase 活性をそれぞれ測定した。Relative luciferase 活性は、それぞれ renilla luciferase 活性で、firefly luciferase 活性を補正した値を用いた。

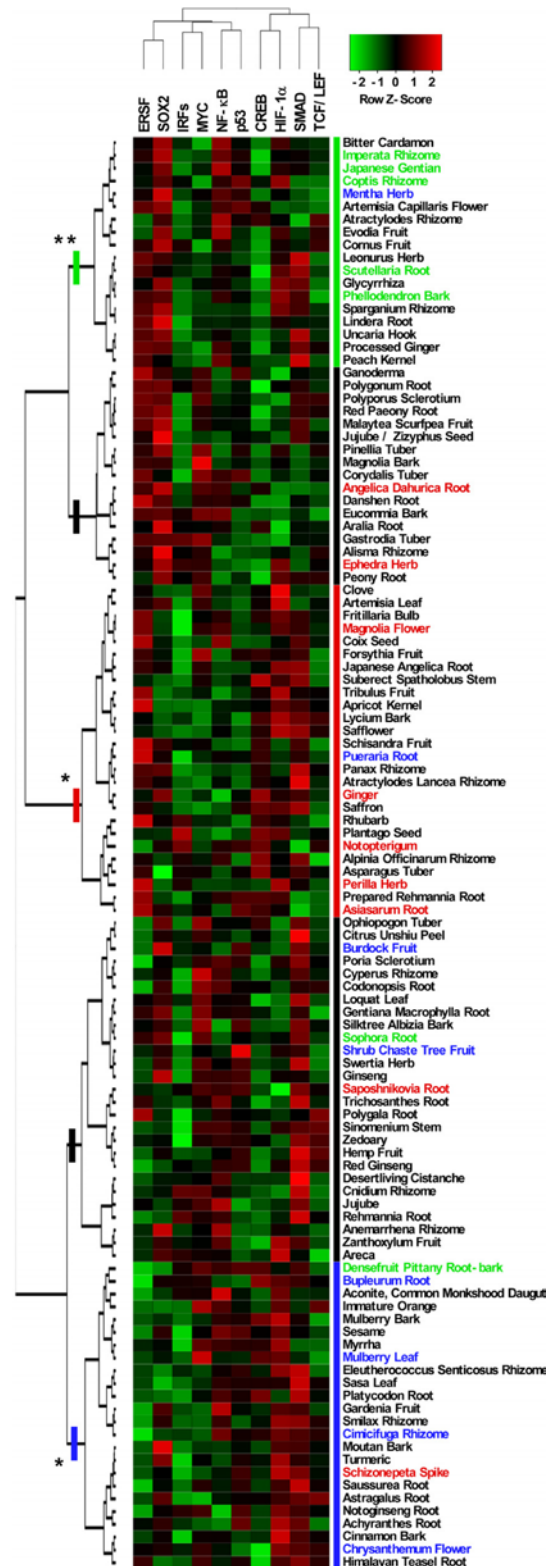
⑤ Data 解析

Relative Luciferase 活性を用いて、Spearman

rank-correlation coefficient and Ward linkage 法にてクラスタリングを行なった。その結果をヒートマップにて視覚化した。

4. 研究成果

(1)生薬の経験に基づく分類(清熱燥湿薬(黄連など)、辛温解表薬(生姜など)、辛涼解表薬(薄荷など))が細胞内シグナルへの効果で分類可能であることを示した(下図)。



以上の結果は、漢方医学的な経験に基づいた生薬・漢方方剤の分類・効能を、細胞内シグナルへの効果を検討することで科学的に証明できる可能性が示唆された。本研究では、1種の細胞、10種のレポーターベクターのみにおける検討だったが、さらに多くのデータを集積することで、より詳細な解析が可能であると考えられる。また、今回の方法を用いる試みは、経験知と科学知をつなぐ重要な研究になると考えられるとともに、新規薬効についても予測応用できる可能性があると考えられる。

#### 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 25 件)

1. Xu X, Yokoyama S, Hayakawa Y, Saiki I. Coptidis Rhizoma induces intrinsic apoptosis through BAX and BAK activation in human melanoma. *Oncol Rep*. 2017, 38:538-544.
2. Managit C, Sakurai H, Saiki I. Ethanolic extract of *Thevetia peruviana* flowers enhances TNF- $\alpha$  and TRAIL-induced apoptosis of human cervical cancer cells via intrinsic and extrinsic pathways. *Oncol Lett*. 2017, 13, 2791-2798.
3. Awale S, Tawila AM, Dibwe DF, Ueda JY, Sun S, Athikomkulchai S, Balachandran C, Saiki I, Matsumoto K, Esumi H. Highly oxygenated antiausterity agents from the leaves of *Uvaria dac*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017, 27:1967-1971.
4. Ma H, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. Chemosensitizing Effect of Saikosaponin B on B16F10 Melanoma Cells. *Nutr Cancer*. 2017, 69:505-511.
5. Matsuo K, Koizumi K, Fujita M, Morikawa T, Jo M, Shibahara N, Saiki I, Yoshie O, Nakayama T. Efficient Use of a Crude Drug/Herb Library Reveals Ephedra Herb As a Specific Antagonist for TH2-Specific Chemokine Receptors CCR3, CCR4, and CCR8. *Front Cell Dev Biol*. 2016, 4:54.
6. Lou C, Yokoyama S, Abdelhamed S, Saiki I, Hayakawa Y. Targeting the ataxia telangiectasia mutated pathway for effective therapy against hirsutine-resistant breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2016, 12:295-300.
7. Takeno N, Inujima A, Shinohara K, Yamada M, Shibahara N, Sakurai H, Saiki I, Koizumi

K. Immune adjuvant effect of Juzentaihoto, a Japanese traditional herbal medicine, on tumor vaccine therapy in a mouse model. *Int J Oncol*. 2015, 47:2115-22.

8. Eshima S, Yokoyama S, Abe T, Hayakawa Y, Saiki I. Multi-pathway cellular analysis on crude natural drugs/herbs from Japanese Kampo formulations. *PLoS One*. 2015, 10:e0128872.

9. Gao F, Yokoyama S, Fujimoto M, Tsuneyama K, Saiki I, Shimada Y, Hayakawa Y. Effect of keishibukuryogan on genetic and dietary obesity models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015, 2015:801291.

10. Muhammad JS, Zaidi SF, Shaharyar S, Refaat A, Usmanhane K, Saiki I, Sugiyama T. Anti-inflammatory effect of cinnamaldehyde in *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation. *Biol Pharm Bull*. 2015, 38:109-15.

11. Lou C, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. Selective anticancer activity of hirsutine against HER2-positive breast cancer cells by inducing DNA damage. *Oncol Rep*. 2015, 33:2072-6.

12. Kee JY, Inujima A, Andoh T, Tanaka K, Li F, Kuraishi Y, Sakurai H, Shibahara N, Saiki I, Koizumi K. Inhibitory effect of Moutan Cortex aqueous fraction on mast cell-mediated allergic inflammation. *J Nat Med*. 2015, 69:209-17.

[学会発表] (計 43 件)

1. Xiaou Xu, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa, Ikuo Saiki: Coptidis Rhizoma induces intrinsic apoptosis through BAX and BAK activation in human melanoma, The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2017. 9. 28-30, Yokohama.
2. 岩上雄亮、横山悟、早川芳弘、済木育夫:メラノーマにおける脱ユビキチン化酵素 PSMD14 の細胞増殖および転移に対する効果、第 26 回 日本がん転移学会、2017. 7. 27-28、大阪
3. 横山悟、早川芳弘、櫻井宏明、済木育夫: COP9 シグナルソーム 5 (COPS5) は転写因子 SNAIL を脱ユビキチン化することにより肺がんの転移を制御する、第 21 回 日本がん分子標的治療学会、2017. 6. 14-16、福岡
4. 横山悟、早川芳弘、済木育夫: 没薬による免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現抑制、第 33 回 和漢医薬学会学術大会、

2016. 08. 27-28、東京.

〔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

濟木育夫 (Saiki, Ikuo)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・研究員  
研究者番号：80133776

### (2) 研究分担者

横山 悟 (Yokoyama, Satoru)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教  
研究者番号：90613498

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )