

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07332

研究課題名(和文) 八味地黄丸の代謝作用解明に基づく肥満症治療薬としての意義の確立

研究課題名(英文) Hachimijiogan is beneficial for the treatment of obesity and its related metabolic disorders.

研究代表者

香川 正太 (Kagawa, Syota)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30463201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：八味地黄丸(HJG)の抗肥満作用および肥満によって誘導される代謝性疾患の抑制作用について検討を行った。その結果、HJGの投与は高脂肪食(HFD)摂餌によって誘導された体重増加、脂肪肝およびインスリン抵抗性の発症を有意に抑制した。加えて、HFD摂餌で惹起された高レプチン血症を抑制したことから、HJGの抗肥満作用の機序として、レプチン抵抗性の改善が示唆された。また、HJGメタノール抽出物のn-ブタノール分画は、 $\beta$ 3アドレナリン受容体刺激下で3T3L1脂肪細胞の脱共役タンパク質(Ucp)1の遺伝子発現を亢進させたことから、HJGの作用は白色脂肪細胞に直接的に作用する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、HJGの元来持つ代謝亢進作用から派生する抗肥満作用を証明できたことは、HJGの肥満症治療薬としての基礎研究の基盤を確固たるものにすることができた点で、学術的意義は大きいと思われる。加えて、「ドラッグリポジショニング」の観点から、HJGが、未だ普及が不十分である肥満症治療薬の1つの候補として、臨床利用にシフトできるポテンシャルを証明できたことは、今後も増加するであろう肥満症患者の抑止に大きく貢献できる意味で、本研究の社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I investigated the anti-obesity effects of Hachimijiogan (HJG) and the suppression of metabolic disorders induced by obesity. The results showed that HJG administration significantly suppressed weight gain, hepatic steatosis, and insulin resistance induced by a high-fat diet (HFD). In addition, HJG suppressed hyperleptinemia induced by HFD feeding, which suggested the improvement of leptin resistance might be the mechanism on the anti-obesity effect of HJG. The n-butanol fraction of HJG methanol extract also upregulated gene expression of Uncoupling protein 1 in 3T3L1 adipocytes under  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonism, indicating that HJG may act directly on white adipose tissues.

研究分野：漢方医学

キーワード：八味地黄丸 肥満 代謝 レプチン

### 1. 研究開始当初の背景

肥満および肥満に伴う代謝性疾患の罹患人口は近年、急激に増加している。肥満はそれ自体が病態であり、それだけでなく2型糖尿病、脂質異常症、脂肪肝といった糖・脂質代謝の異常を招くことで動脈硬化を惹起し、最終的には脳梗塞、心筋梗塞の発症により、患者のQOLを著しく低下させる。よって、肥満症治療薬の開発、臨床応用への移行は喫緊の課題である。

一方で、これら薬剤の開発を考えるうえで、明確な作用機序を考える必要があるが、近年の肥満抑制に関わる様々な研究において、「エネルギー代謝に関わる褐色脂肪の機能亢進」と「皮下白色脂肪の褐色化に伴う白色脂肪内での脂質代謝亢進」という2点が重要であるとの報告が後を絶たない。褐色脂肪は生体の中で主に熱産生に関わる組織であり、脱共役たんぱく質1(UCP1)の発現亢進と脂質代謝(酸化・脂質分解)に伴い産生されるエネルギーを熱量に変換する組織である。白色脂肪(皮下・内臓脂肪)は過剰に取り入れられた脂質を貯蔵し、必要時に脂質代謝を促進する組織である。白色脂肪の「褐色化」という現象は、褐色脂肪同様に、白色脂肪内にUCP1発現亢進が認められ、エネルギー代謝が亢進する変化であり、様々な要因(寒冷刺激・薬剤誘導など)で褐色化が認められている。

漢方薬である「八味地黄丸(HJG)」は漢方医学において、「冷え」およびその随伴症状の改善に用いられている。すなわち、生体の熱量を増加させ、基礎代謝を改善・亢進することで様々な症状を改善することが、HJGの作用機序として考えられる。よって、代謝改善・亢進が認められるHJGは、生体のエネルギー代謝に影響を与える可能性も示唆できる。しかし、生体の代謝改善に大きく影響を与えるであろうHJGの「エネルギー代謝」に与える影響に関して、また、この着想から派生する脂質代謝亢進および肥満抑制作用については一切の報告はない。

以上の背景を踏まえ、本研究では、HJGが個体の熱産生を亢進させ、エネルギー代謝を促進することで、肥満を抑止し、その作用機序として褐色脂肪の活性化や白色脂肪の褐色化が挙げられる可能性について、検討を行う必要性に触れ、以下のことを目的と定めた。

### 2. 研究の目的

本研究は、HJGの抗肥満薬としての臨床応用を念頭におき、HJGが生体の熱産生およびエネルギー代謝を亢進することで、HJGの肥満症治療薬としての可能性を検討し、その作用点としての褐色脂肪の機能および白色脂肪の褐色化を精査することを目的とした。

新規薬と比較して安全性が確認されている既存薬の「ドラッグリポジショニング」を念頭に置き、本研究の成果は、HJGの未だ数少ない肥満症治療薬への臨床応用に直結できるという意味で重要な位置づけとなり、HJGの「冷え」に対する薬効を「熱産生の増加」と解釈を変えることで、HJGの新たな薬効として「肥満症治療薬」を与えることを目的としている。

さらに近年の研究成果で見出された「褐色脂肪」と「白色脂肪」の2種類の相反する機能を持つ脂肪組織の機能的変化に着目し、HJGの作用機序を明確にすることも重要な目的の1つとなっている。

### 3. 研究の方法

以下の方法にて、検討を行った。

(1) 普通食および普通食+HJG混餌を4週間、C57BL/6Jマウスに自由摂餌し、毎週体重測定を行った。その際、摂餌量の測定も同時に検討した。飼育後、マウスを安楽死させたのちに解剖し、皮下白色脂肪組織、内臓白色脂肪組織および褐色脂肪組織を採取した。採取した組織はUcp1遺伝子発現およびUCP1タンパク発現を測定するため、RNAおよび全タンパク質を抽出し、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットを用いた各方法で検討を行った。組織を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に浸し、組織を固定後、薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、脂肪浸潤の程度および白色脂肪細胞の大きさを測定した。

(2) 普通食、高脂肪食(HFD)およびHFD+HJG混餌を作成し、4週間、C57BL/6Jマウスに自由摂餌し、毎週体重測定を行った。その際、摂餌量の測定も同時に検討した。4週間後、各群のマウスの4時間絶食後にインスリンを腹腔内に1U/kgとなるように投与し、投与前、投与後30分、60分、90分および120分後の血糖値を測定した(インスリン負荷試験)。飼育後、マウスを安楽死させたのちに解剖し、血清、肝、皮下白色脂肪組織、内臓白色脂肪組織および褐色脂肪組織を採取した。採取した血清、各組織を用いて、以下の方法で測定を行った。血清を用いて血中レプチン濃度をELISA法で定量した。組織を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に浸し、組織を固定後、薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色を行い、肝および褐色脂肪組織内への脂肪浸潤の程度および白色皮下脂肪組織および白色内臓脂肪組織における脂肪滴の大きさを測定した。肝は改良したFolch法を用いて肝中の脂質を抽出したのち、キット(酵素法)を用いて肝含有中性脂肪量を定量した。Ucp1を含む白色脂肪の褐色化に関わる遺伝子群の発現およびUCP1タンパク発現を測定するため、RNAおよび全タンパク質を抽出し、リアルタイムPCRおよびウエスタンブロットを用いた各方法で検討を行った。

(3)(2)では、HJGの肥満予防作用を検討したが、ここでは先にすべてのC57BL/6JマウスにHFDを4週間摂餌し、食餌性肥満を誘導したのちに普通食、HFDおよびHFD+HJG混餌をさらに4週間摂餌し、体重測定による体重変化を観察した。加えて、インスリン負荷試験の実施、皮下白色脂肪組織、内臓白色脂肪組織および褐色脂肪組織の形態観察および血清を用いたレプチン濃度の測定を実施した。

(4)レプチンの作用がHJGの抗肥満作用の機序になる可能性を検討するため、レプチンが欠損したob/obマウスに普通食および普通食+HJG混餌を10週間自由摂餌し、体重測定を毎週行った。また、一昼夜絶食後に1U/kgのインスリンを投与したマウスの血糖を経時的に測定することでインスリン負荷試験を実施した。加えて、マウスを安楽死後に解剖し、肝を採取し、肝含有中性脂肪量の定量を検討した。

(5)最後に、HJGの白色脂肪細胞への直接的な影響を検討するために、3T3L1脂肪細胞を用いた検討を試みた。HJGエキス末のメタノール抽出物を酢酸エチル/水で分配し、水分画を再びn-ブタノール/水で分配した。酢酸エチル分画およびn-ブタノール分画をそれぞれ分化した3T3L1脂肪細胞に処置し、 $\beta$ 3アドレナリン受容体刺激薬であるCL316243で刺激したのちにRNAを抽出した。そのRNAを用いたリアルタイムPCR法にて、Ucp1遺伝子発現を検討した。

#### 4. 研究成果

各方法から得られた結果を以下に示した。

(1)普通食および普通食+HJG混餌を4週間、C57BL/6Jマウスに自由摂餌した結果、摂餌量には変化がなく体重にも有意な変化は認められなかった。一方で、皮下白色脂肪組織および内臓白色脂肪組織の脂肪滴は縮小していることが分かった。加えて、皮下白色脂肪組織および褐色脂肪組織ではUcp1をはじめとする様々な白色脂肪褐色化に関わる遺伝子群および褐色脂肪の機能亢進に関わる遺伝子群の有意な発現亢進と各組織でのUCP1タンパク質の発現増加を確認した。以上の結果は、HJGが褐色脂肪組織および白色脂肪組織の形態および機能を変化させ、エネルギー利用を促進する作用を有する可能性が示唆された。

(2)次に、高脂肪食によって誘導される肥満を予防するにあたり、HJGの作用を検討した。結果として、高脂肪食によって誘導された体重増加をHJGは有意に抑制し、抗肥満作用を有することが明らかとなった。インスリン負荷試験の結果、高脂肪食によって増悪したインスリンによる血糖降下作用の障害は、HJG投与で有意に改善し、インスリン作用を部分的に回復させることができた。血清を用いたレプチン濃度の測定において、高脂肪食によって惹起された高レプチン血症はHJG投与で低下し、個体におけるレプチン感受性を改善できた可能性が示唆された。高脂肪食負荷に伴って観察された褐色脂肪組織への脂肪浸潤は劇的に改善され、各白色脂肪組織の脂肪滴の大きさも有意に縮小した。これらの観察と相関して、白色脂肪組織内でのUcp1を含む褐色化に関わる遺伝子群の発現を検討すると、高脂肪食群に比べ、HJG混餌群において有意な増加を認めただけでなく、UCP1タンパク質の発現も亢進していた。肝中性脂肪含量は高脂肪食負荷で有意に増加したが、HJG投与ではその増加がキャンセルされた。以上の結果から、HJGは食餌性肥満を予防し、肥満に伴った様々な代謝性疾患を改善できることが判明しただけでなく、その作用機序の1つとして、白色脂肪や褐色脂肪におけるエネルギー代謝の増強が挙げられる可能性が示唆された。

(3)また、食餌性肥満がすでに誘導されたマウスにHJGを投与した際の影響として、体重変化を測定したところ、部分的には体重増加を抑制したものの、(2)における体重増加の著しい抑制効果までは認められなかった。しかし、インスリン負荷試験の結果では、明らかなインスリン抵抗性の改善を認め、白色脂肪組織および褐色脂肪組織での脂肪滴増大および脂肪浸潤は抑制されていた。血中レプチン濃度は、体重増加抑制と相関しており、(2)におけるレプチン増加の著しい抑制までには至らなかったが、肥満に伴った高レプチン血症は部分的に抑制された。これらの結果は、肥満に伴ったレプチン作用の障害に相関して、HJGは体重増加抑制作用を発揮している可能性が考えられた。

(4)(3)の結果を踏まえ、ob/obマウスを用いたHJGの抗肥満作用を検討したところ、興味深いことに、レプチンが欠損しているマウスでは、体重増加抑制作用は見出されなかった。一方で、肝中性脂肪含量には変化がなかったものの、インスリン負荷試験の結果、ob/obマウスで認められるインスリンの血糖値低下作用の障害をHJGは回復された。この結果は非常に重要であり、レプチン作用がない状況下では、HJGは抗肥満作用を発揮できないこと、そして、HJGのインスリン抵抗性改善作用は、抗肥満作用とは別の機序で惹起されていることが判明した。

(5)培養白色脂肪細胞にHJGの各抽出物を処置したところ、 $\beta$ 3アドレナリン受容体刺激下において、Ucp1遺伝子発現への影響は酢酸エチル分画では認められなかったが、興味深いことにn-ブタノール分画処置では有意なUcp1遺伝子発現亢進が認められた。この結果は、HJGのある

成分が、白色脂肪細胞に直接的に作用している可能性も示唆しており、レプチン作用だけでなく、HJG の作用機序の一端として考慮する必要があることが考えられた。

上記以外にも、白色脂肪組織における脂肪分解のマーカーとして、ホルモン感受性リパーゼのリン酸化をウエスタンブロット法で検討したところ、高脂肪食に HJG を混餌したマウスの白色脂肪組織ではリン酸化が有意に亢進しており、脂肪燃焼だけでなく、脂肪分解の著しい亢進が、白色脂肪組織の肥大を抑制するという機序も考えられ、HJG の抗肥満作用は、レプチン作用に伴うエネルギー代謝作用・脂肪分解作用、そして白色脂肪組織への直接的な作用といった様々な作用機序を考慮し、引き続き、HJG の抗肥満作用の機序を検討していく必要性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimura Ikuko, Kagawa Syota, Tsuneki Hiroshi, Tanaka Kaori, Nagashima Fumihiro	4. 巻 235
2. 論文標題 Multitasking bamboo leaf-derived compounds in prevention of infectious, inflammatory, atherosclerotic, metabolic, and neuropsychiatric diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacology&Therapeutics	6. 最初と最後の頁 108159 ~ 108159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pharmthera.2022.108159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kagawa Syota, Tanabe Katsuya, Hiromura Makoto, Ogawa Kakuyou, Koga Takayuki, Maeda Takahiro, Amo-Shiinoki Kikuko, Ochi Hiroyuki, Ichiki Yui, Fukuyama Shogo, Suzuki Saori, Suizu Natsuki, Ohmine Takaaki, Hamachi Sakurako, Tsuneki Hiroshi, Okuya Shigeru, Sasaoka Toshiyasu, Tanizawa Yukio, Nagashima Fumihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Hachimijiogan, a traditional herbal medicine, modulates adipose cell function and ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2023.1167934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 香川正太、田部勝也、廣村信、古賀貴之、椎木幾久子、鈴木早織、水津菜月、大嶺貴亮、濱地桜子、奥屋茂、木村郁子、谷澤幸生、長島史裕
2. 発表標題 漢方薬「八味地黄丸」の抗肥満作用に対する脂質代謝の影響
3. 学会等名 日本薬学会年会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 香川正太、大嶺貴亮、濱地桜子、佐伯敦輝、田原青空、當山雄介、藤森大樹、長島史裕
2. 発表標題 漢方薬「六味丸」および「八味地黄丸」の肥満抑制作用への影響と各構成生薬の寄与について
3. 学会等名 2022年度日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木早織、香川正太、田部勝也、廣村 信、古賀貴之、椎木幾久子、水津菜月、大嶺貴亮、濱地桜子、奥屋 茂、木村郁子、谷澤幸生、長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸は個体における熱産生を亢進し、抗肥満作用を有する
3. 学会等名 日本薬学会年会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香川正太、田部勝也、廣村信、古賀貴之、椎木幾久子、鈴木早織、水津菜月、大嶺貴亮、濱地桜子、奥屋茂、木村郁子、谷澤幸生、長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸は熱産生を亢進し、抗肥満作用を有する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 香川正太、田部勝也、廣村 信、古賀貴之、椎木幾久子、鈴木早織、水津菜月、大嶺貴亮、濱地桜子、奥屋 茂、木村郁子、谷澤幸生、長島史裕
2. 発表標題 漢方薬「八味地黄丸」は熱産生作用および抗肥満作用を有する
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤森大樹、香川正太、當山雄介、明石羽菜、横山真子、長島史裕
2. 発表標題 漢方薬「六味丸」は肝糖代謝および骨格筋のインスリン感受性を制御することで、肥満に伴う耐糖能異常を改善する
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 當山雄介、香川正太、藤森大樹、明石羽菜、横山真子、小川鶴洋、長島史裕
2. 発表標題 新規漢方処方「八味地黄丸去附子」の肥満および代謝性疾患改善効果の解明
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 香川正太、當山雄介、藤森大樹、明石羽菜、横山真子、小川鶴洋、長島史裕
2. 発表標題 八味地黄丸の抗肥満作用に寄与する構成生薬の同定
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------