

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月20日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790620

研究課題名（和文）漢方薬「六君子湯」のカロリー制限模倣薬としての可能性を検証する

研究課題名（英文）Research the possibility of the traditional Japanese medicine “Rikkunshito” as the calorie restriction mimetic drug.

研究代表者

小松 利光（KOMATSU TOSHIMITSU）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・技術専門職員

研究者番号：70380962

研究成果の概要（和文）：

本研究では、漢方薬「六君子湯」の短期投与が血中のグレリン濃度を上昇させ、視床下部 NPY の発現を介して摂食を亢進するメカニズムが、カロリー制限（CR）で見られる現象と類似している点に着目し、六君子湯（RKT）のカロリー制限模倣薬としての可能性を検証した。その結果、六君子湯の長期投与は CR と同様にグレリン濃度を上昇させ、酸化ストレス耐性を増強させる傾向にあるが、CR のように寿命を延長する効果は見られなかった。一方、六君子湯を中/老齢期から投与した場合、脂肪重量を減少させる効果があることが明らかになった。このことは、今後より詳細なメカニズムや投与条件を検討する必要があるが、肥満治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Short term treatment of traditional Japanese medicine “Rikkunshito (RKT)” increases plasma acyl-ghrelin, and stimulates food intake via hypothalamic NPY expression. This mechanism is similar to that of calorie restriction (CR). In this study, we investigated the possibility of RKT as the calorie restriction mimetic drug. Chronic RKT treatment increased acyl-ghrelin level, and enhanced oxidative stress resistance like the effect of CR. However, chronic RKT treatment could not extend lifespan. Interestingly, chronic RKT treatment from middle or old age significantly decreased white adipose tissue mass. Although it is necessary to clear more detail condition and molecular mechanisms of RKT treatment at the old age model, it is expected to apply anti-obesity drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1400,000	420,000	1820,000
2011年度	1000,000	300,000	1300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

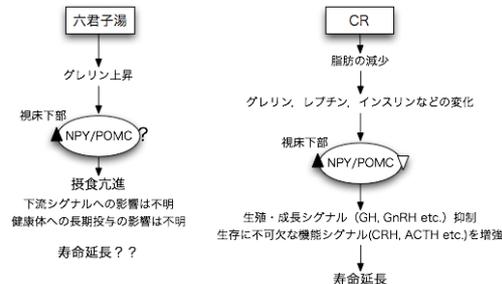
キーワード：東洋医学、カロリー制限、抗老化

1. 研究開始当初の背景

摂取カロリーを適度に抑制すると（Calorie restriction, CR）、加齢に伴う

様々な病気の発生を抑制あるいは遅延させ、寿命を延長する。この効果は酵母からげっ歯類、サルなど広範な種で確認されている。

これらの事実は、カロリー制限の効果が進化的に保存されており、ヒトにおいてもその効果が期待できることを示している。しかしながら、ヒトの生活において、摂食量を長期に抑制することは、現代の生活環境や肥満者の減量とリバウンドからもわかるように、困難な場合が多い。従って、摂食量を余り減らすことなく、カロリー制限の効果を模倣する方法が求められる。



カロリー制限の寿命延長メカニズムの特徴として、摂取カロリー低下に対する視床下部の神経内分泌系の適応が挙げられる(図参照)。視床下部弓状核には摂食とエネルギー代謝において相互に拮抗的な作用を持つ2種類の神経細胞集団 NPY(neuropeptide Y)/AGRP(agouti-related peptide)ニューロンと POMC(proopiomelanocortin)/CART(cocaine and amphetamine-regulated transcript)ニューロンが存在する。摂取カロリーが低下すると NPY/AGRP ニューロンは活性化し、POMC/CART ニューロンは抑制される。これらのニューロンはインスリン、アディポネクチン、レプチン、グレリンなど摂食やエネルギー代謝を制御するホルモンの受容体を発現しており、摂取カロリーの変動によってこれらのホルモンがエネルギー状態のシグナルとして作用し、抗老化、寿命延長作用に関連するエネルギーの再配置を引き起こすと考えられる。そこで本研究では、このようなカロリー制限による神経内分泌系の変化を模倣するような薬剤として「六君子湯」に注目した。

漢方薬「六君子湯」は、外科手術後やがん治療に伴う食欲不振を改善する効果が示され、臨床応用が進められている。報告されている六君子湯の作用機序は、摂食亢進ホルモンであるグレリンの血中濃度を上昇させ、視床下部のグレリン受容体が増加し、グレリンシグナルを活性化させ、NPYも増加させる(図参照)。一方、CR動物においても、グレリンの上昇及び視床下部 NPY の上昇が報告されている。また、NPY の過剰発現ラットは、寿命を延長しストレス応答を増強することが報告されている。このように六君子湯の作用機序は、CR の特徴と類似していることから、

六君子湯がカロリー制限の模倣薬として機能することが期待される。

2. 研究の目的

漢方薬「六君子湯」の摂食亢進作用機序がカロリー制限の寿命延長メカニズムに類似していることから、カロリー制限模倣薬としての可能性について、主に下記の項目を検証する。

- (1) 若齢マウスへの六君子湯長期投与が、カロリー制限と同様に酸化ストレス耐性を増強するか検証する。
- (2) CR の寿命延長効果に特異的な配列と分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を組み合わせたコンストラクトを導入したトランスジェニックマウス (CRISP マウス) に六君子湯を長期投与し、CR と同様に SEAP 活性が上昇するかどうか調査し、模倣薬の評価を行う。
- (3) 老齢マウスへの六君子湯長期投与が、カロリー制限と同様に寿命延長作用をもたらすか検証する。また、NPY が六君子湯のそれらの効果に寄与するかどうか、NPY ノックアウトマウスを用いて検証する。

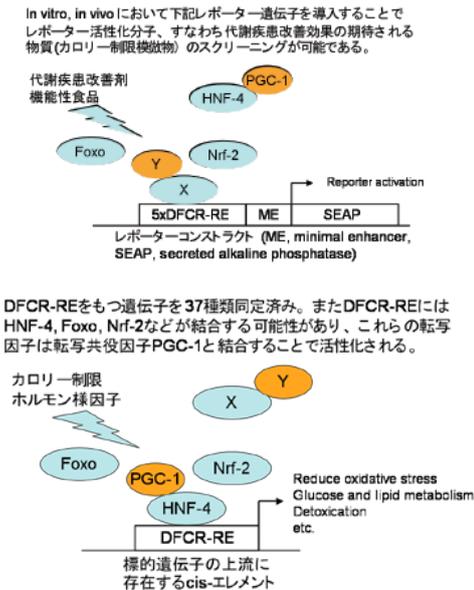
3. 研究の方法

- (1) 実験動物: ICR マウス、C57BL/6J マウス、CRISP マウス、NPY KO マウスを用いる。生後12週齢より自由摂食群 (AL)、六君子湯群 (RKT、通常食に対して六君子湯を2%配合)、カロリー制限群 (CR、ALに対して30%摂食量をカットする) に分ける。六君子湯投与を老齢期から開始する場合、生後16ヶ月齢あるいは24ヶ月齢からとし、それまでは全て自由摂食群として飼育する。六君子湯投与期間は12週間以上とする。六君子湯は原末試料をツムラ (株) から提供して頂く。これを通常粉末飼料と混合し、毎日給餌する。飼育中は、経時的に体重、摂食量をモニターする。実験終了時に安楽死させ、海馬、皮質、視床・視床下部、肝臓、内臓脂肪、血漿を採取する。
- (2) 酸化ストレス負荷試験: 12週間六君子湯を投与後、57BL/6j マウス (オス) に、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 II を阻害して活性酸素を発生させる 3-NPA (3-nitropropionic acid) を 100mg/kgBW 腹腔内投与し、4時間後、24時間後に安楽死させ、肝臓、内臓脂肪、脳 (海馬、視床・視床下部、皮質)、血漿を採取する。対照群には生理食塩水を投与し、4時間後に安楽死させる。Total RNA を抽出後、リアルタイム PCR 法にて

酸化ストレス応答遺伝子群の発現を測定する。また、ICR マウス（オス、各群 7-10 匹）に 3-NPA 100 mg/kgBW を毎日腹腔内投与して、生存率を観察する。

- (3) レポーターアッセイ系を用いた CR 模倣薬としての評価：

長崎大学探索病理学の千葉卓哉准教授（当時）が開発した図に示すコンストラクトをもつトランスジェニックマウス（CRISP、メス）に生後 18 週齢から六君子湯を 15 週間投与する。3 週間に一度



眼窩採血により血漿を採取し、血中の SEAP 活性を測定して模倣薬として作用するか判定する。六君子湯の摂食亢進効果による食べ過ぎを防ぐため、過不足ない食餌量となるよう RKT 投与群には AL と比較して約 5% 食餌量をカットして与える。実験群としては、AL、95%、95%+2%RKT、CR の四群に分けて行う。15 週目で安楽死させ、各種臓器を採取する。

- (4) 寿命集団の作製：16 ヶ月齢の NPY ノックアウトマウス（オス、KO）及び野生型マウス（WT）に六君子湯を毎日経口投与し、寿命を観察する。実験群として、WT-CT（95%の食餌量）、WT-RKT（95%+2%RKT）、KO-CT、KO-RKT を作製した。投与開始後 12 週まで 4 週ごとに眼窩採血により血漿を採取し、活性型グレリン濃度をモニターする。一部を投与開始後 12 週目で安楽死させ、各種臓器を採取する。

4. 研究成果

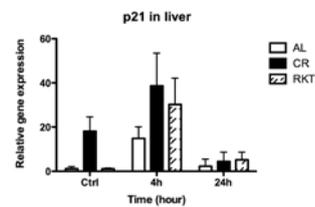
- (1) 六君子湯長期投与の神経内分泌ホルモンと体重に与える影響

C57BL/6J オスマウスを用いた実験では、RKT 群は AL より有意に体重が増加し、脂肪重量が有意に増加していた。血中の活性型グレリン濃度は、CR では有意に上昇したが、RKT では AL と変わらなかった。

RKT 群の脳における NPY、AGRP、POMC、CART の mRNA 量は、CR とは異なり、有意な変化がなかった。本実験では、グレリン及び神経内分泌系の遺伝子発現の変化を捉えることはできなかったが、若齢における六君子湯長期投与が脂肪蓄積を引き起こすことが明らかになった。しかしながら、24 ヶ月齢の老齢マウスへの投与では、若齢マウスと同様に、グレリン濃度、神経内分泌系遺伝子群の変化はなかったが、若齢期でみられた体重増加と脂肪蓄積は観察されず、逆に脂肪重量は減少傾向にあった。このことは、メカニズムは不明であるが年齢によって六君子湯への反応が異なることを示している。また興味深いことに、摂食亢進作用による食べ過ぎを抑える目的で、若齢 C57BL/6J マウスに摂食量を AL と比較して 5% カットした RKT 食を 12 週間与えた場合、活性型グレリン濃度の上昇が認められた。この結果は、極僅かなカロリー制限に RKT を補助的に加える事で、CR と同様の効果を期待できることが示唆された。

- (2) 六君子湯の長期投与と酸化ストレス耐性への影響

図 1



六君子湯の長期投与が、CR と同様に酸化ストレス耐性を誘導するか評価するため、オスの C57BL/6J マウスに 3-NPA を腹腔内投与し、4 時間後、24 時間後の肝臓におけるストレス応答遺伝子の発現を定量した。CR 群の p21 mRNA レベルが投与後 4 時間で AL 群よりも有意に上昇した。また RKT 投与群も CR と同様の発現パターンを示したことから、六君子湯長期投与が酸化ストレス耐性を誘導している可能性が高い（図 1）。また、ICR 雄マウス（n=7-10）に 3-NPA（100mg/kgBW）を毎日投与して、生存率を観察する予備的な生存試験を行った。その結果、RKT 投与群が AL 群よりも生存率が高い結果を示したが、有意差は検出できなかった。六君子湯長期投与が酸化ストレス耐性を確実に増強するかどうかは、さらなる検討が必要と考えられる。

(3) 六君子湯は、DFCR 配列を介した CR の寿命延長効果メカニズムには関与しない
 図 2

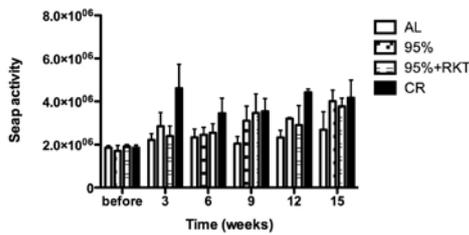
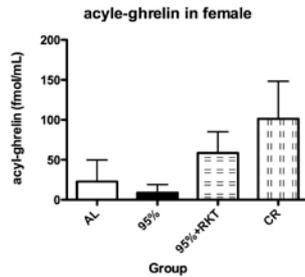


図 3



CRISP マウスは、CR に応答する転写因子の DNA 結合配列 (DFCR) を分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 活性によって検出できる。血漿中の SEAP 活性は、投与開始後 9 週目で 95%、95%+RKT、CR の各群で有意に上昇した。しかしながら、95% 群と 95%+RKT 群の間に有意な差は検出できなかった (図 2)。活性型グレリン濃度は、95%+RKT 群が 95% 群よりも高値を示した (図 3)。体重は CR 群が AL に比べ有意に低い、AL、95%、95%+RKT 群では有意差はなかった。これらのことから、少なくとも六君子湯は、CR と同様にグレリン濃度を上昇させるが、この CR 応答性転写因子の活性を介さないことを示している。また、脳の NPY mRNA レベルに有意差はなかったが、摂食抑制ペプチド CART mRNA レベルが RKT 投与群で CR 群と同様に有意に抑制されていた。長期の六君子湯投与の効果は、従来考えられていた NPY を介してではなく、摂食抑制ペプチド CART を介している可能性がある。

(4) 老齢マウスへの六君子湯長期投与は寿命に影響を与えない

老齢マウスへの六君子湯長期投与が、寿命延長・抗老化作用をもたらすか検証した。WT-RKT 群の寿命は対照群と有意差がなく、六君子湯の長期投与は寿命には影響を与えなかった (図 4)。活性型グレリン濃度は、投与開始後 12 週で WT-RKT 群で有意に上昇した。よって、六君子湯の投与効果はあったと考えられる。また、NPY ノックアウトマウスへの六君子湯投与群の寿命も、対照群と比較して統計的な有意差はなかった (図 5)。以上のことから、六君子湯 (2%) の長期経口投与は、CR のように寿命を延長すること

ができないことが示された。しかしながら、興味深いことに投与後 12 週目の RKT 群では脂肪重量が有意に減少していた (図 6)。これは、(1) の老齢マウスへの六君子湯投与の結果と一致する。

図 4

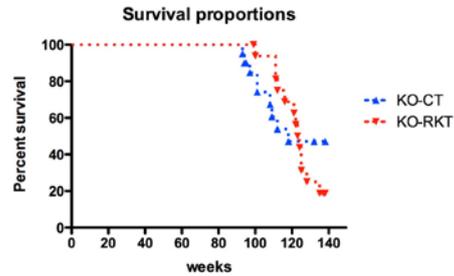


図 5

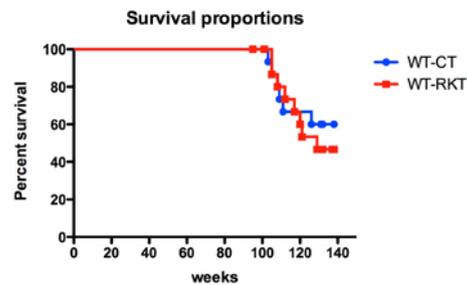
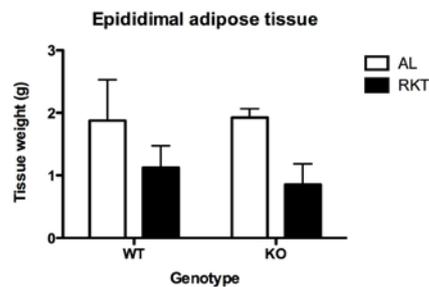


図 6



(5) 総括

(1) ~ (4) の結果から、六君子湯の長期投与は酸化ストレス耐性を増強する可能性を示唆したが、寿命延長効果はないことを明らかにした。また、六君子湯は年齢によってその生理的反応が異なること、特に脂肪に影響を与えることが明らかになった。中・老年期に投与した場合、脂肪重量を減少させるため、肥満解消の選択肢として期待できる。今後は、投与量、投与時期、副作用の有無、作用機序などについてより詳細な検討が必要である。

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 5 件)

1. Hayashida T, Komatsu T, et al. Modest inhibition of the growth hormone axis does not affect mitochondrial reactive oxygen species generation or redox state, unlike calorie restriction. *Geriatr Gerontol Int.* 2011, 11(4): 496-503. 査読有り (著者数 9 名、2 番目)
2. Komatsu T, Trindade LS, et al. Acute stress response modified by modest inhibition of growth hormone axis: a potential machinery of the anti-aging effect of calorie restriction. *Mech Ageing Dev.* 2011, 132(3): 103-109. 査読有り (著者数 8 名、1 番目)
3. Chiba T, Tsuchiya T, Komatsu T, Mori R, Hayashi H, Shimokawa I. Development of calorie restriction mimetics as therapeutics for obesity, diabetes, inflammatory and neurodegenerative diseases. *Curr Genomics.* 2010, 11(8):562-567. 査読あり
4. Chiba T, Tsuchiya T, Komatsu T, et al. Development of a bioassay to screen for chemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction. *Curr Genomics*, 2010, 401(2)213-218. 査読有り (著者数 8 名、3 番目)
5. Yamaza H, Komatsu T, et al. FoxO1 is involved in the antineoplastic effect of calorie restriction. *Aging Cell*, 2010, 9: 372-382. 査読有り (著者数 11 名、2 番目)

[学会発表] (計 3 件)

1. Taisuke Kasuya, Toshimitsu Komatsu: Does a traditional Japanese medicine “Rikkunshito” promote stress resistance like calorie restriction? The 1st Nagasaki-Pusan Joint seminar on aging Research. Feb 18-19, 2011, Fukuoka, Japan.
2. Yuko Nagatomi, Toshimitsu Komatsu: Does a traditional Japanese medicine “Rikkunshito” mimic effects of calorie restriction? The 1st Nagasaki-Pusan Joint seminar on aging Research. Feb 18-19, 2011, Fukuoka, Japan.

3. Isao Shimokawa: Modulators of neuropeptide Y; potential dietary restriction mimetics. The 2nd Pusan-Nagasaki Joint Seminar on Aging Research. Feb 17, 2012, Busan, South Korea.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 利光 (Komatsu Toshimitsu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・技術専門
職員
研究者番号 : 70380962

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし