

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659348

研究課題名(和文) 漢方薬の作用機序を探る

研究課題名(英文) How do Kampo formulations work?

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・教授

研究者番号：80133776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：漢方薬は、いくつかの構成生薬を組み合わせることで処方して作られる。構成生薬には、主として植物由来、動物由来、鉱物由来のものがあり、それらを煎じることにより、相互作用、総合的な力として効果を発揮すると考えられている。また漢方薬がすでに臨床に用いられていることから、*in vivo*でのマウスを用いた研究が主として行われている。しかし、*in vitro*の研究の積み重ね無くして、漢方薬の作用機序を明らかにすることは困難である。そこで、申請者らは、生薬エキスによる細胞内シグナルへの効果に着目し、経験的な生薬の分類に科学的根拠を与えるという画期的な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Kampo formulations comprise a number of crude natural drugs/herbs as constituents. The crude drugs/herbs have been traditionally classified by their traditional classifications or efficacies in Kampo medicines; however, it has been difficult to establish the scientific link between experimental evidence and traditional classifications in Kampo medicine. Considering our results supported by the grant, the traditional categories of crude drugs/herbs in Kampo medicine may be positively associated with the effects on intracellular signaling using reporter assay unless there are significant differences in their botanical origin and active constituents. Alternatively, our results imply that the crude drugs/herbs belonging to the same category in Kampo medicine share a common effect on intracellular signaling activity *in vitro*.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：漢方薬 構成生薬 細胞内シグナル

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で処方して作られる。構成生薬には、主として植物由来、動物由来、鉱物由来のものがあり、それらを煎じることにより、相互作用、総合的な力として効果を発揮すると考えられている。また漢方薬がすでに臨床に用いられていることから、*in vivo*でのマウスを用いた研究が主として行われている。しかし、*in vitro*の研究の積み重ね無くして、漢方薬の作用機序を明らかにすることは困難である。

最近、申請者らは、漢方薬の構成生薬である「五味子」に含まれる Gomisin N が HeLa 細胞で NF-kB シグナルを阻害することで、TNF- α 誘導性のアポトーシスを増強するということを明らかにした(Waiwut, Saiki et al., 2011, Mol Cell Biochem、右図参照)。また、Gomisin N が TRAIL 誘導性のアポトーシスを増強するという予備的結果を得ている。五味子は、小青竜湯、人參養榮湯などに含まれる構成生薬であるが、五味子ががんの成長阻害という新規薬理作用を示したことから、構成生薬の機能解析が漢方薬の新規適応症を発見しうることを示した。

2. 研究の目的

今回の研究課題では、構成生薬(申請者らが水抽出エキス126種)による細胞内シグナルへの効果を検討し、漢方薬の作用機序を理解することを目的とする。

(1) 桂皮エキスによる上皮間葉転換の抑制
十全大補湯は、がん転移を抑制することが知られている。しかし、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで、十全大補湯の構成生薬が、がん転移に関わる上皮間葉転換を抑制するののかについて検討した。

(2) Piperine による triple-negative 乳がん細胞の TRAIL への感受性の増強効果
triple-negative 乳がんは、最も悪性度の高

いタイプの乳がんであり、ホルモン療法に耐性を示すことが知られている。また、tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL)は、魅力的な治療法の一つとして注目されている分子であることから、申請者らは、天然由来化合物 55 種のスクリーニングを行い、TRAIL の殺細胞効果を増強する化合物の探索を行った。

(3) 細胞内シグナルに及ぼす効果による生薬分類

漢方方剤や生薬は経験に基づく効能や味などで分類されており、これらの分類を科学的に理解することは、漢方方剤の効能、作用機序を理解することに繋がると考えられる。そこで、生薬が細胞内シグナルに与える効果に着目し、112 種の生薬が 10 種の転写因子へ及ぼす効果を網羅的に検討した。

3. 研究の方法

(1) 桂皮エキスによる上皮間葉転換の抑制 Western Blot

細胞抽出タンパク質をアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、各種抗体を用いて、タンパク質の発現を検討した。

細胞運動能。

細胞運動は、トランズウェルチャンバーを用いた migration assay にて検討した。

成分分析

産地・Lot の異なる桂皮について、HPLC を用いて、成分分析を行った。

(2) Piperine による triple-negative 乳がん細胞の TRAIL への感受性の増強効果

細胞を天然物由来化合物、TRAIL で 24 時間から 24 時間処理し、WST-1 試薬を加え、1 時間後に吸光度を測定した。

アポトーシスアッセイ

Annexin-V/7-AAD を用いて細胞を染色し、フローサイトメーターを用いて、アポトーシス細胞の定量を行った。

Cell cycle 解析

細胞を 70%エタノールで固定後、PI 染色でフローサイトメーターを用いて、細胞周期の解析を行った。

マウスへの乳がん移植実験

BALB/c マウスの乳房に 4T1-luc マウス乳がん細胞 (ルシフェラーゼ安定発現細胞株) を移植し、in vivo imaging system を用いて、腫瘍増殖について検討した。Piperine は 50mg/kg/day で経口投与し、また抗 DR-5 agonistic 抗体 (DR-5 は TRAIL 受容体である) は 14 日後、16 日後に 2 回投与した。

(3) 細胞内シグナルに及ぼす効果による生薬分類

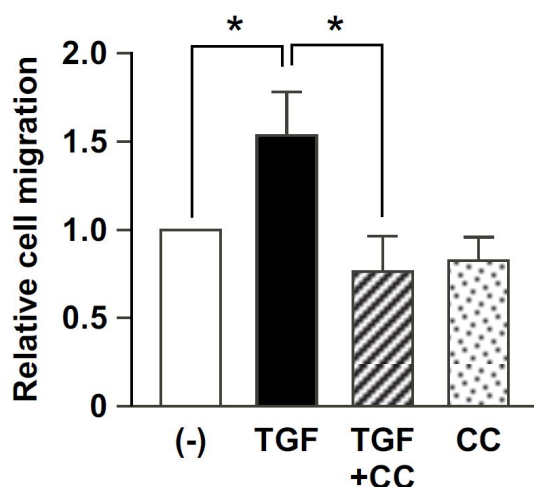
Dual-luciferase 法

肺がん細胞株 A549 にレポータープラスミドと内因性コントロールとなるプラスミド 2 種を遺伝子導入し、生薬エキス (100 µg/ml) を加え、48 時間後に luciferase 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 桂皮エキスによる上皮間葉転換の抑制

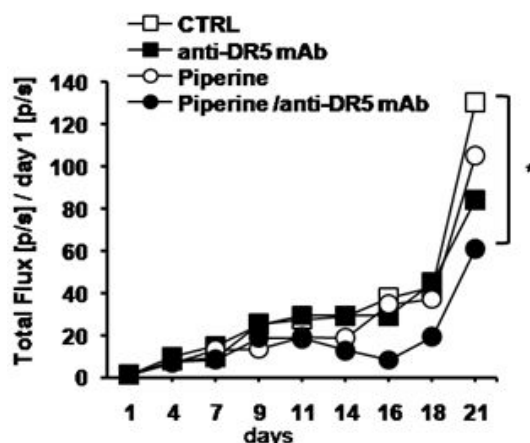
十全大補湯に含まれる構成生薬の中で、桂皮のみが上皮間葉転換を抑制することが明らかとなった。また、桂皮の成分分析の結果、Procyanidin C1 に上皮間葉転換の抑制活性があることが明らかとなった。図は、桂皮 (CC) による TGF-beta 誘導性の細胞運動の抑制の結果である。



(2) Piperine による triple-negative 乳がん細胞の TRAIL への感受性の増強効果

55 種の天然物由来化合物をスクリーニングした結果、piperine に TRAIL による殺細胞効果を増強する作用を見出した。また piperine の効果は、p65 のリン酸化の抑制・survivin の発現抑制を介したものであった。また、in vivo でのマウスを用いた実験により、Piperine と抗 DR-5 agonistic 抗体を併用することにより、強い抗腫瘍効果が見られた。

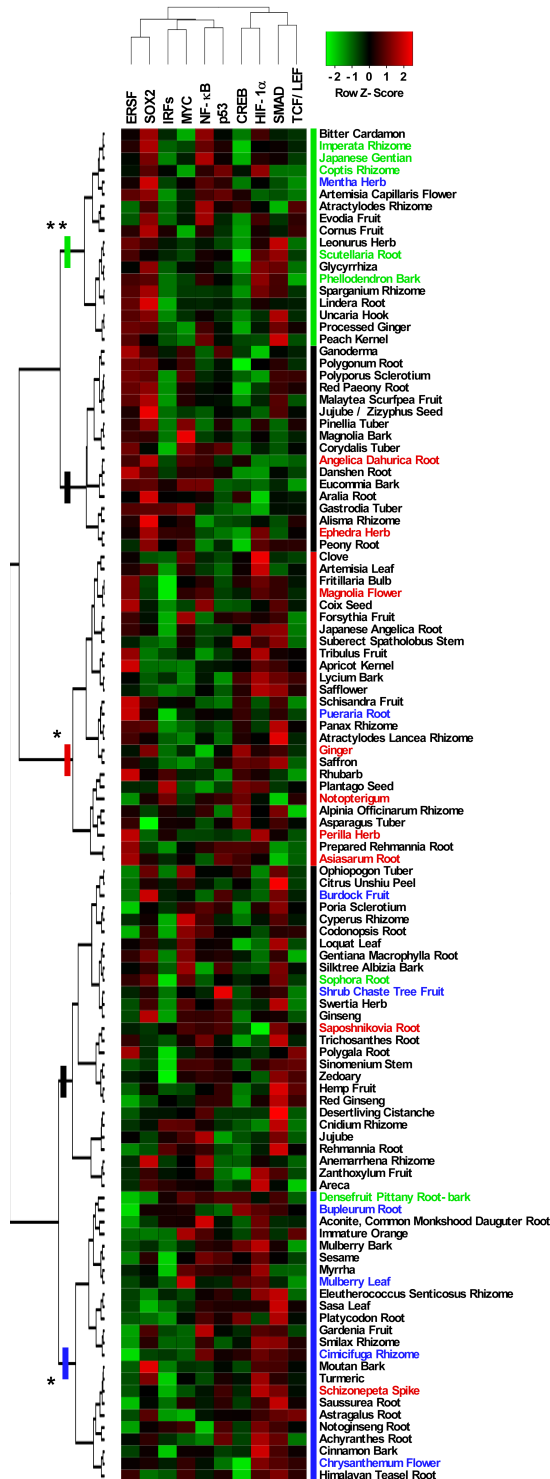
図は、in vivo における Piperine と抗 DR-5 agonistic 抗体の併用による抗腫瘍効果の増強を示す結果である。



(3) 細胞内シグナルに及ぼす効果による生薬分類

112 種の生薬によるデュアルルシフェラーゼアッセイの結果をクラスタリングした結果、辛涼解表薬、辛温解表薬、清熱燥湿薬に分類される生薬が、同じクラスターに有意に集合した。さらに、辛涼解表薬、辛温解表薬について比較検討を行った結果、辛温解表薬は CREB と ERSF の転写活性を上昇させることが示され、辛温解表剤として知られている葛根湯においても同様の効果が確認された。また、CREB もしくは ERSF の下流遺伝子の発現変化も、ルシフェラーゼアッセイの結果と同様であった。今回の結果より、漢方医学的な経験に基づいた分類・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。1種の細胞、10種のレポーターベクターのみにおいての検討だったが、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、今回の研究は新規薬効の予測や生薬の品質管理などに応用可能であると考えられる。



図は、112種の生薬エキスをクラスタリン

グした結果である。緑の線で示されたグループは清熱燥湿薬、赤の線で示されたグループは辛温解表薬、青の線で示されたグループは辛涼解表薬が、それぞれ有意に集合した。

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48件)

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

doi: 10.1371/journal.pone.0128872

Abdelhamed S, Yokoyama S, Refaat A, Ogura K, Yagita H, Awale S, Saiki I. Piperine enhances the efficacy of TRAIL-based therapy for triple-negative breast cancer cells. Anticancer Res. 2014, 34, 1893-1899.

Kin R, Kato S, Kaneto N, Sakurai H, Hayakawa Y, Li F, Tanaka K, Saiki I, Yokoyama S. Procyanidin C1 from Cinnamomi Cortex inhibits TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in the A549 lung cancer cell line. 2013, 43, 1901-1906. doi: 10.3892/ijo.2013.2139.

[学会発表](計63件)

江島 静、横山 悟、早川 芳弘、阿部 貴志、濱木 育夫 漢方シグナルパネルの構築とその応用 第31回和漢医薬学会総会 2014年8月30日 31日 幕張メッセ(幕張・千葉)

Abdelhamed S, Yokoyama S, Refaat A, Ogura K, Awale S, Saiki I. Piperine enhances the efficacy of trail-based therapy for triple-negative breast cancer

cells. 第73回 日本癌学会総会 2014年9月25日-27日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

金 諒英、加藤 真一郎、兼頭 直希、櫻井 宏明、早川 芳弘、李 峰、田中 謙、済木 育夫、横山 悟 桂皮由来のProcyanidin C1によるTGF-beta依存性上皮間葉転換を抑制する機能解析 第30回和漢医薬学会総会 2013年8月31日-9月1日 金沢大学(金沢・石川)

〔図書〕(計 1件)

済木 育夫 南山堂 「がん漢方」2012
12ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.inm.u-toyama.ac.jp/pb/gyoseki/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・教授

研究者番号：80133776

(2) 研究分担者 横山 悟

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