

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07149

研究課題名(和文)サルコペニア予防に適した牛車腎気丸製剤の開発

研究課題名(英文)Development of goshajinkigan products for the prevention of sarcopenia

研究代表者

牧野 利明(Toshiaki, Makino)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：80326561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：漢方薬である牛車腎気丸の骨格筋萎縮抑制作用を担う成分を、muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) の転写抑制作用を指標にマウス横紋筋由来株化細胞であるC2C12細胞を用いて探索し、ブシの熱水抽出エキスにその活性があることを見いだした。さらにそこから有効成分の分離を試み、ヒゲナミンとサルソリノールを単離し、それぞれのIC50値は0.49 μM と50 μM であった。日本で市販されているブシ製剤中のこれらの含量には、大きなバラツキを認めた。ブシを筋萎縮に使用する時には、これらの化合物の含量が高いブシを選択することで、より高い効果が期待できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方薬、牛車腎気丸が、高齢に伴う筋肉の萎縮を主な症状とするサルコペニアに対して有用であることの科学的根拠を示すとともに、その有効成分としてブシの役割を明らかにした。また、ブシに含まれる有効性を担う化合物としてヒゲナミンとサルソリノールを単離、同定し、それら化合物の含量がブシまたは牛車腎気丸の有効性を保証する指標成分として、製剤の品質を管理する際に利用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：A Kampo medicine Goshajinkigan is effective for muscle atrophy. The objective is to explore the active ingredients from Goshajinkigan. Using dexamethazone-induced induction of muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) in C2C12 cells derived from mouse striated muscle, I found that the hot water extract of Processed aconite root, one of the components in Goshajinkigan has the suppressive effects. Furthermore, I isolated higenamine and salsolinol as the active ingredient from processed aconite root with their IC50 values 0.49 μM and 50 μM , respectively. There was a large variation in their contents in the preparations of processed aconite root marketed in Japan. It is suggested that when processed aconite root is used for muscular atrophy, a higher effect can be expected by selecting aconite root with higher contents of these compounds.

研究分野：生薬学、漢方薬物学

キーワード：ブシ サルコペニア ユビキチンリガーゼ ヒゲナミン サルソリノール

1. 研究開始当初の背景

わが国での急速な高齢化社会の到来に伴い、老年症候群への対応が求められてきている。その代表的な疾患として、骨格筋量と骨格筋力の進行的な低下であるサルコペニアがある。サルコペニアの発症には、加齢に伴って変化する身体活動低下のほか、栄養摂取量・ホルモン・炎症反応など様々な要因が関与している。わが国の65才以上のサルコペニア罹患率は約7.5%、80歳以上では約40%と高値であり、サルコペニアが生じると易転倒・転落、骨折、体動制限にさらなる症状の悪化という悪循環を呈し、寝たきり状態を誘発、わが国では2025年には寝たきりの高齢者が230万人に達すると推計されるなど、対応が迫られている。しかし、サルコペニアの予防や治療法は栄養・運動療法が主であり、有用な薬物療法はまだない。

これまで、老化促進モデルマウス (senescence accelerated mouse, SAM) P8 における骨格筋萎縮が牛車腎気丸により顕著に改善することを見いだされている (Kishida Y., Hagihara K., et al. *Phytomed.* 22(1): 16-22, 2015)。その知見をもとに、筆者らは牛車腎気丸と、その構成生薬の一部からなる六味丸を SAMP8 に投与し、有効性を担っている生薬を探索したところ、サルコペニア改善作用は見られなかった。このことから、牛車腎気丸の老化に伴う筋萎縮予防作用には、その構成生薬のうちケイヒ、ブシ、ゴシツ、シャゼンシが貢献していることが明らかになった。

そして、ミオシンを特異的にユビキチン化するユビキチンリガーゼの一種であり、骨格筋の萎縮に強く関与している Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF1) の転写抑制作用を指標に、マウス横紋筋由来株化細胞である C2C12 細胞を用いて牛車腎気丸構成生薬の各エキスを作作用させたところ、ブシとシャゼンシの各エキスに有意な活性を認めた。以上の作用は、それぞれの生薬の指標成分であるベンゾイルメサコニン、プランタゴグアアニジン酸には認められなかった。

2. 研究の目的

本研究は、サルコペニアに対する牛車腎気丸の有用性を担う生薬ブシについて取り上げ、①それら有効成分を製剤の指標成分として品質管理に利用し、それらの含量の高い生薬を原料とすることで、より有用性の高い牛車腎気丸製剤を開発すること、②得られた成分の作用機序を明らかにすることにより牛車腎気丸を臨床で利用する際の基礎的なエビデンスを与え、製剤の利便性を高めることを目的とする。

3. 研究の方法

マウス横紋筋由来 C2C12 細胞を筋肉細胞様に分化させ、MuRF1 転写調節領域とルシフェラーゼを含むプラスミドを一過性に導入し、レポーター遺伝子アッセイ系を構築した。その後、デキサメタゾンで MuRF1 転写を誘導し、同時に生薬エキスまたはその分画物を作用させることにより、その転写抑制活性をルシフェラーゼ活性により評価した。その活性を指標に、ブシ熱水抽出エキスを各種溶媒で分配、各種クロマトグラフィーにより分画していき、その活性を担う化合物を単離、同定した。

その後、MuRF1 および類似ユビキチンリガーゼである MAFbx/atrogen1 と casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b)、筋肉の収縮機能と関連する troponin、筋肉の損傷と関連する branched-chain amino acid aminotransferase 2 (BCAT2)、細胞のオートファジーと関連する Bcl-2 binding and pro-apoptotic protein3 (Bnip3) と、ミオシン重鎖 (MyHC) およびインスリン様成長因子 (IGF1) の mRNA 発現を、リアルタイム RT-PCR 法により評価した。

4. 研究成果

デキサメタゾンは、分化した C2C12 細胞で 1 μ M で MuRF1 プロモーターの発現を誘導した。これは、ブシ熱水抽出物のメタノール可溶性部分によって濃度依存的に抑制され、IC₅₀ 値は 1.5 mg/ml であった。この力価は、後根神経節ニューロンにおけるオキサリプラチン誘発性の神経突起伸長の減少に対する PA 沸騰水抽出物の効果 (有効濃度、0.1 mg/ml) よりも低かった。なお、MTT 法により細胞毒性を確認し、ブシ熱水抽出液は、2.0 mg/ml の濃度でも細胞毒性は観察されなかった。

続いて、ブシ熱水抽出エキスに含まれる有効成分の分離を試みた。ブシ熱水抽出エキスから酸性下酢酸エチル層、アルカリ性下酢酸エチル層、BuOH 層、および水層に分離し、デキサメタゾンが誘導する MuRF1 プロモーターの発現に対するそれらの抑制活性を評価したところ、その活性は BuOH 層に移行した。ブシの有効成分として知られているアコニチン型ジテルペンアルカロイドは、アルカリ性下酢酸エチル画分に移行することから、ブシの本活性成分はそのような化合物ではなく、より水溶性の高い化合物であることが推測された。

BuOH 層をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムを使用した分取 HPLC により、サルソリノールを分離および同定した。サルソリノールはブシに含まれる既知成分であり、ブシ

にはその類似化合物としてヒゲナミンを含むことが知られている。両化合物とも試薬が市販されているため、それらを使って活性を評価したところ、ヒゲナミンとサルソリノールは分化した C2C12 細胞でデキサメタゾン誘導 MuRF1 プロモーター発現に対して濃度依存的な抑制を示し、それらの IC₅₀ 値はそれぞれ 0.49 μM と 50 μM であった。

ヒゲナミンはよく知られている β₂-アドレナリン受容体アゴニストであり、世界アンチ・ドーピング機構 (WADA) の禁止物質および方法のリストに登録されている。ヒゲナミンには、大動脈に対して血管拡張作用と抗炎症作用、血小板に対する抗凝集活性および低酸素誘発性脳損傷に対する抗アポトーシス作用、虚血/再灌流障害による心臓損傷の保護作用、コラーゲン誘発関節炎に対する保護作用、β₂ アドレナリン受容体およびホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) / プロテインキナーゼ B (AKT) シグナル伝達経路の活性化を介する糖尿病時における胃平滑筋細胞でのアポトーシス保護作用が知られている。一方、抗狭心症薬であるトリメタジジンは、C2C12 細胞におけるデキサメタゾン誘発性骨格筋萎縮および PI3K および AKT のリン酸化を有意に抑制し、デキサメタゾンが PI3K/AKT シグナル伝達経路の抑制によって骨格筋萎縮を誘発することから、ヒゲナミンは、β₂ アドレナリン受容体および PI3K/AKT シグナル伝達経路を活性化することにより、デキサメタゾン誘発性筋萎縮を抑制した可能性がある。

比較的活性が高かったヒゲナミンの MuRF1 mRNA 発現に対する抑制効果をさらに評価した。ヒゲナミンは、分化した C2C12 細胞の正常な状態では MuRF1 mRNA の発現を阻害せず、あくまでデキサメタゾンによって誘発される MuRF1 mRNA の発現を有意に抑制した。また、ヒゲナミンは 3 μM の濃度で、デキサメタゾン誘発性 MAFbx/atrogen1、Cbl-b、BCAT2、Bnip3 の mRNA 発現を有意に抑制したが、正常状態の C2C12 細胞ではそれらの作用は見られなかった。デキサメタゾンは、MyHC および IGF1 の mRNA 発現を有意に抑制したが、ヒゲナミンはこれらの抑制に対して有意な効果を示さなかった。

日本で市販されている 13 種類のブシ製剤と 1 種類の未修治トリカブト根 (ウズ) 製品それぞれの熱水抽出物中のヒゲナミンとサルソリノールの含有量を HPLC で測定した。MuRF1 プロモーター発現抑制活性の評価で使用したブシの熱水抽出液中には、それぞれ 0.10 および 15 μg/ml のヒゲナミンとサルソリノールが含まれていました。14 のブシ関連製品の熱水抽出液中のそれぞれの化合物の含量の平均は、0.12 ± 0.12 および 14 ± 9 μg/ml で、変動係数 (CV) 値はそれぞれ 97% と 63% であった。ブシを製剤化する際の品質評価の指標として使用される成分は、アコニチン型ジテルペンアルカロイドの一つであるベンゾイルメサコニンであることから、ヒゲナミンとサルソリノールの市販のブシ製剤中の含量に変動が見られることは、必然とも言える。漢方医学における腎の機能不足に対するブシの有効性を決定する化合物として、ヒゲナミンとサルソリノールが上げられることから、これらの化合物はブシ製剤の品質を管理する際の指標成分として利用できることが示唆された。

ウサギにヒゲナミン (50 mg/kg) を経口投与した場合、投与 10 分後の最大血中濃度は 2.9 μg/ml であった。本研究で使用したブシ 3 g を 60 ml の水で煎じた場合、約 24 μg のヒゲナミンが煎液中から収集でき、ヒトでの投与量は 0.48 μg/kg と計算される。この投与量とウサギでの薬物動態研究の結果により、ヒトがブシ 3 g を摂取した場合のヒゲナミンの最大血中濃度は 28 pg/ml と計算される。このヒゲナミンの推定血中濃度は、本研究での IC₅₀ 値 (0.10 μg/ml) よりもはるかに低いものであった。このことから、筋萎縮の予防に対するブシの有効成分としてのヒゲナミンの寄与は臨床においては高くはなく、他の有効成分が含まれる可能性が示唆された。

以上の研究成果は、以下の論文として公表した。

Kondo T, Ishida T, Ye K, Muraguchi M, Tanimura Y, Yoshida M, Ishiuchi K, Abe T, Nikawa T, Hagihara K, Hayashi H, Makino T. Suppressive effects of processed aconite root on dexamethasone-induced muscle ring finger protein-1 expression and its active ingredients. *J. Nat. Med.* (in press) DOI: 10.1007/s11418-022-01606-5.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kondo Taishi, Ishida Tomoaki, Ye Ke, Muraguchi Marin, Tanimura Yohei, Yoshida Masato, Ishiuchi Kan'ichiro, Abe Tomoki, Nikawa Takeshi, Hagihara Keisuke, Hayashi Hidetoshi, Makino Toshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppressive effects of processed aconite root on dexamethasone-induced muscle ring finger protein-1 expression and its active ingredients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	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） 10.1007/s11418-022-01606-5	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------