

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390181

研究課題名(和文) 病理学の最新テクノロジーを応用した漢方薬の薬効・機能解析法の確立

研究課題名(英文) New analytical technology in the field of pathology clarified effectiveness of Kampo formula

研究代表者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10293341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は漢方薬や生薬、天然薬物に注目し、メタボリックシンドローム(MetS)や、その肝表型である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に対する有効性をエビデンスに基づいて検証した。まず、ヒトの病態解析にトランスレート可能な新しいMetS・NASHモデル動物を開発し(TSODマウス、DIAR-MSGマウス等)、in vivoでの病態解析に、新たな物質局在解析技術であるイメージング質量分析を応用した。その結果、漢方薬(桂枝茯苓丸、防己黄耆湯等)や生薬(紅麹)、天然薬物(スピルリナ、コーヒー等)の予防的投与の有効性が証明され、有効成分(GABA等)や、作用機序の一端も明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with metabolic syndrome (MetS) and its liver phenotype, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) were rapidly increased in all over the world, however no heroic drug was established. We noted to Kampo formula, medicinal herb and natural products to cure of MetS and/or NASH. We firstly established new animal models of MetS/NASH which is mimic to human disease process and pathology. For the analysis of effectiveness and function, we induced imaging mass spectrometry which is a new analytical technology of pathology. We examined several Kampo formula and so on, and succeeded to make clarify the effectiveness of Keishi-bukuryo-gan, Boi-ohgi-to, red yeast rice, spirulina, daily coffee intake against MetS/NASH. We also highlighted their ingredients, phycocyanin and GABA, which showed unique physiological function. Activation of macrophages is one of a key events to exert their function.

研究分野：実験病理学

キーワード：メタボリックシンドローム NASH 動物モデル 漢方薬 質量顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝障害 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) はアルコール非摂取者で肥満、糖尿病、高脂血症、代謝疾患といったメタボリックシンドローム (MetS) を背景として出現する肝障害である。無症状のうちに肝硬変や肝癌に進展する頻度も高く、我が国の成人の 14-21% が NAFLD とされ、その 15% が進行性の重篤な病態 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) を発症し、NASH の 20% が 10 年以内に肝硬変に進行すると試算されている。NAFLD/NASH は **21 世紀の肝臓病**とも呼ばれており、その対策が急務となっている。現時点では、いわゆる“予備軍”を発症させない方策こそが、最も有効な NAFLD/NASH 対策と考えられているが、未だ発症していない患者に対する積極的な投薬・治療には限界があり、食事制限や運動の奨励などの生活指導に主眼が置かれているのが現状である。我々は安全性が高く、予防的に長期投与が可能な薬物として**漢方薬や生薬**に注目した。

生薬や漢方薬の科学的研究では、我が国は世界をリードする情報基盤を整備しており、有効成分の化学的情報や薬理学的情報、漢方方剤の種々の臨床利用に関する情報などがすでにデータベース化されて公開されている。しかしながら、漢方薬や生薬は複合薬物であり、単一化合物のデータベースの情報がダイレクトに薬効解析に繋がらないという問題を抱えている。漢方薬・生薬の薬効をエビデンスに基づいて明らかにし、その作用機序を科学的に解明して、世界にその有用性をアピールするためには、ヒトに近い経過をとる疾患モデル動物を用い、複合薬物を投与した際の total output を疾患モデル動物で *in vivo* でエビデンスに基づく薬効を明らかにする必要がある。さらに、漢方薬に含まれる主要な有効成分を同定し、生体内での作用機序を明らかにするための方法を確立するこ

とが重要である。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトに近い経過で発症進展する MetS/NASH 病態モデル動物を新たに開発し、それらに解析対象とする漢方薬や生薬、天然薬物などを投与し、血液や臓器、組織の変化を詳細に解析する事で、薬効の有無やその病態機序を、病理形態学的な視点から明らかにする事を目的としている。病理形態学的な解析には、従来の HE 染色や免疫染色などの手法に加えて、新しいテクノロジーである質量顕微鏡解析を応用し、物質の局在とそれを取り巻く周囲の微小環境を細胞レベルで明らかにする事を目指すものである。

3. 研究の方法

上記目的を遂行するために、以下の 3 つのステップで研究を行った。

(1) ヒトに近い経過を示す MetS/NASH モデル動物の開発

既存の MetS や NASH モデル動物は代謝に重要な遺伝子の改変や特殊な食事で誘導するものが殆どであり、その病態進展はヒトと大きく異なるものが殆どであった。本研究では肥満や 2 型糖尿病、高脂血症を発症する既存のモデル動物を長期間詳細に観察し、ヒトの NASH に類似する肝疾患を発症するモデル動物を抽出した。さらに、それらに投与する餌を工夫し、よりヒトに近い病理組織像を呈するモデル動物の開発を試みた。

(2) 生薬等に含まれる物質の局在を細胞レベルで可視化する新技術 (質量顕微鏡) の確立

単一化合物である西洋薬とは異なり、複合薬物である漢方薬は有効成分の特定や作用機序の解明が大きな課題であった。最近、質量分析 (MS) のデータを二次元でイメージングする新しい技術として質量顕微鏡 (MS イメージング) が開発・実用化された。共同研究

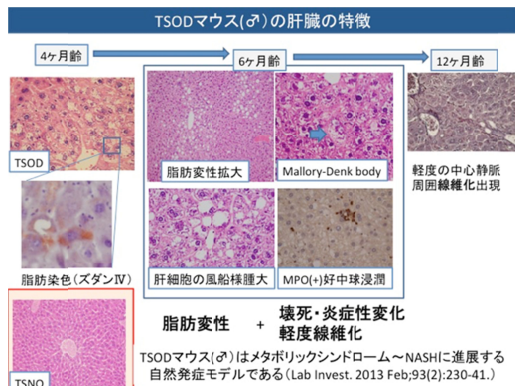
者(平)は質量顕微鏡の開発に携わった当該分野の第一人者であり、生薬(人参)中に含まれる有効成分(ジンセノサイド群)の局在可視化にも世界に先駆けて成功した実績を有していた。平らが独自に開発したナノ粒子を質量分析に用いた Nano-Particle Assisted Laser Desorption/Ionization (Nano-PALDI 法)は、低分子化合物の解析や代謝産物の局在解析を可能とする新技術であり、漢方薬や生薬に含まれる有効成分やその標的細胞の同定を可能にする新技術と期待された。そこで、平らと共同で、ナノ粒子の種類などを選定し、病理組織切片中での物質の局在を質量顕微鏡で効率良く観察する方法の確立に取り組んだ。

(3) 上記モデル動物を用いて、漢方薬や生薬、天然薬物の有効性を in vivo 実験モデルで解析

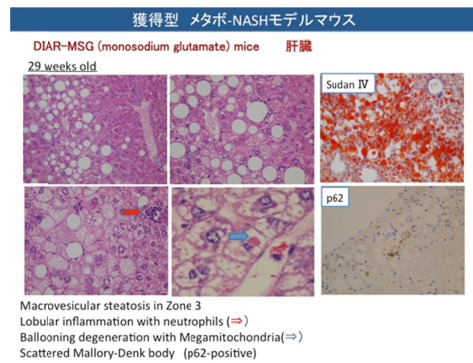
独自に開発したヒトに近い経過で発症進展する MetS/NASH モデル動物を用い、種々の漢方薬や生薬、天然薬物を投与する実験系をデザインし、病理形態学的手法に、生化学的、分子生物学的な解析手法、さらに、新しい解析技術であるイメージング質量分析による局在解析を加え、エビデンスに基づく多角的な解析結果の獲得に取り組んだ

4. 研究成果

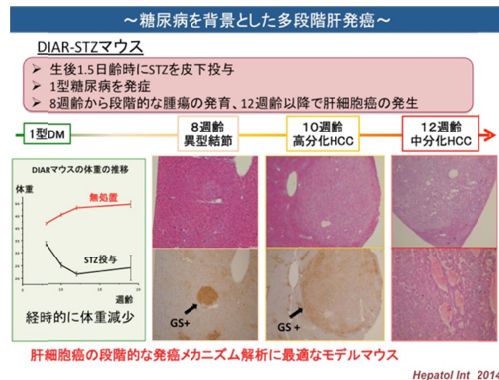
(1) 自然発症 MetS モデルマウス(TSOD マウス)が、約6ヶ月齢でNASHを発症し、10ヶ月齢以降、高率に肝腫瘍も出現する事を欧文誌に報告した。



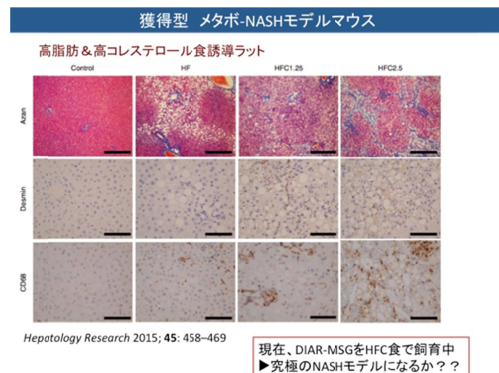
新生児期のDIARマウスにグルタミン酸ナトリウムを投与して作成するDIAR-MSGマウスが、肥満や糖尿病、高脂血症を背景に、約6ヶ月齢でNASHを発症し、10ヶ月齢以降、高率に肝腫瘍も出現する事を欧文誌に報告した。



新生児期のDIARマウスにストレプトゾトシンを投与して作成するDIAR-nSTZマウスを普通食で飼育すると、1型糖尿病を背景に、NASHを経ずに高率に肝細胞癌が出現する事を欧文誌に報告した。

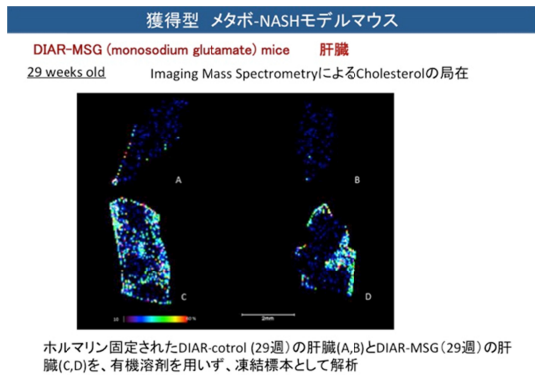


高脂肪食に高コレステロールを添加する事で、マウスに高率に肝線維化が生じる事を報告し、欧文誌に報告した。

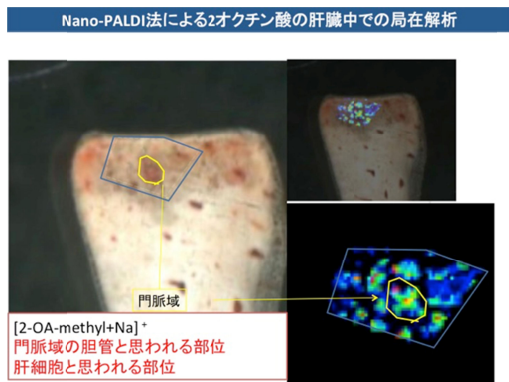


(2) ナノ粒子を工夫し、臓器中のコレ

ステロールの局在を質量顕微鏡で観察する方法を確立し、欧文誌に報告した。



イオン化補助に用いるナノ粒子を工夫し、低分子 Xenobiotics である 2 オクチン酸の組織中の局在を質量顕微鏡で観察する方法を確立し、日本肝臓学会で報告した。



(3) MetS における漢方薬(桂枝茯苓丸)の有効性と作用機序を明らかにし、欧文誌に報告した。

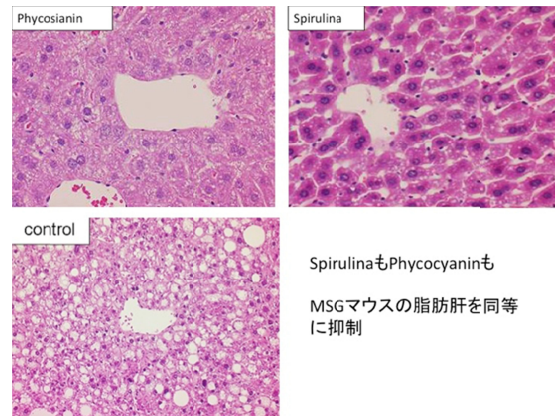
MetS における漢方薬(防己黄耆湯)の有効性を検証し、マクロファージの活性化を主とする作用機序を明らかにし、欧文誌に報告した。

MetS-NASH における生薬(紅麹)の有効性を明らかにし、主成分であるモノコリン K に加え、GABA の有効性を新たに明らかとし、欧文誌に報告した。

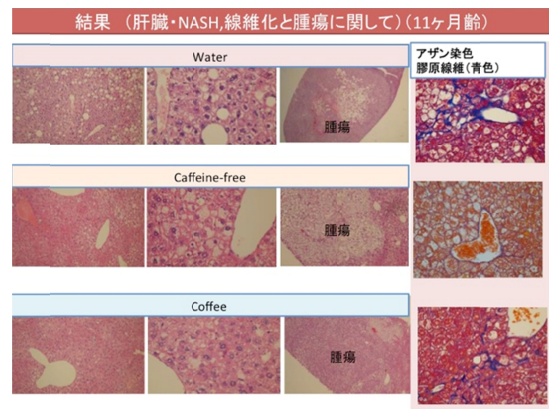
MetS における生薬(熊胆、牛胆、豚胆)の有効性と作用機序を検討し、コール酸による肝細胞障害機序を見出し、欧文誌に報告した。

MetS-NASH における天然薬物(スピ

ルリナ・フィコシアニン)の有効性と作用機序を検討し、フィコシアニンによる抗酸化作用が MetS 諸症状の改善に有効である事を見出し、欧文誌に報告した。



MetS-NASH における食(コーヒー)の有効性と作用機序を検討し、カフェインとクロロゲン酸が協働してアンチメタボ効果を発揮する事を国際学会(アジア太平洋肝臓会議)で報告した。



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 89 件)
- Gao F, Yokoyama S, Fujimoto M, Tsuneyama K, Saiki I, Shimada Y, Hayakawa Y. Comparison of two Kampo medicines in a diet-induced mouse obesity model. Traditional & Kampo med. 2015, in press (査読有)
 - Ichimura M, Hatanaka M, Tsuneyama K, Kato S, Omagari, K. An SHR/ND mcr-cp rat model of non-alcoholic steatohepatitis

with advanced fibrosis induced by a high-fat, high-cholesterol diet. *J Obes Weight Loss Ther*, 2015, in press(査読有)

3. Gao F, Yokoyama S, Fujimoto M, Tsuneyama K, 他 (7人中4番目). Effect of keishibukuryogan on genetic and dietary obesity models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;2015:801291. doi: 10.1155/2015/801291. (査読有)

4. Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, Sakaki M, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tamaru S, Kato S, Tsuneyama K, Omagari K. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol Res*. 2015 Apr;45(4):458-469. doi: 10.1111/hepr.12358. (査読有)

5. Tsuneyama K, Nishida T, Baba H, Taira S, Fujimoto M, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakajima T, Sutoh M, Oda E, Hokao R, Imura J. Neonatal monosodium glutamate treatment causes obesity, diabetes, and macrovesicular steatohepatitis with liver nodules in DIAR mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Sep;29(9):1736-1743. doi: 10.1111/jgh.12610. PubMed PMID: 24730643. (査読有)

6. Baba H, Tsuneyama K, Nishida T, Hatta H, Nakajima T, Nomoto K, Hayashi S, Miwa S, Nakanishi Y, Hokao R, Imura J. Neonatal streptozotocin treatment causes type 1 diabetes and subsequent hepatocellular carcinoma in DIAR mice fed a normal diet. *Hepatol Int*, 2014 8:415-424, doi: 10.1007/s12072-014-9541-9 (査読有)

7. Fujimoto M, Tsuneyama K, 他 (14人中2番目). A dietary restriction influences the progression but not the initiation of

MSG-Induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food*. 2014 Mar;17(3):374-383. doi: 10.1089/jmf.2012.0029. (査読有)

8. Kikuchi K, Tsuneyama K, 他 (12人中2番目). Splenic lymph follicles generate immunoglobulin M-producing B cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res*. 2014 Oct;44(10):E253-E256. doi: 10.1111/hepr.12231. (査読有)

9. Tsuneyama K, 他 (13人中1番目) Autoimmune features in metabolic liver disease: a single-center experience and review of the literature. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 Aug;45(1):143-148. doi: 10.1007/s12016-013-8383-x. (査読有)

10. Ichimura M, Kato S, Tsuneyama K, 他 (11人中3番目). Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr Res*. 2013 May;33(5):397-405. doi: 10.1016/j.nutres.2013.03.006. (査読有)

11. Watanabe S, Tsuneyama K. Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate-supplemented high-fat diet. *J Toxicol Sci*. 2013;38(3):379-390. (査読有)

12. Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, 他 (11人中6番目). Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 2013 Jun;56(6):1403-1412. doi: 10.1007/s00125-013-2885-1. (査読有)

13. Fujimoto M, Tsuneyama K, 他 (9人中2番目). Study of the effects of monacolin k and other constituents of red yeast rice

on obesity, insulin-resistance, hyperlipidemia, and nonalcoholic steatohepatitis using a mouse model of metabolic syndrome. Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:892697. doi:

10.1155/2012/892697. (査読有)

14. Nishida T, TsuneYama K, 他 (16人中2番目). Spontaneous onset of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in a mouse model of metabolic syndrome. Lab Invest. 2013 Feb;93(2):230-241. doi:

10.1038/labinvest.2012.155. (査読有)

15. Nomoto K, Nishida T, Nakanishi Y, Fujimoto M, Takasaki I, Tabuchi Y, TsuneYama K. Deficiency in galectin-3 promotes hepatic injury in CDAA diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. ScientificWorldJournal. 2012;2012:959824. doi:

10.1100/2012/959824. (査読有)

16. Fujimoto M, TsuneYama K, 他 (6人中2番目) Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. Dig Liver Dis. 2012 Sep;44(9):767-774. doi: 10.1016/j.dld.2012.02.002. (査読有)

[学会発表](計21件)

1. TsuneYama K, et al. Daily moderate coffee intake inhibits pancreatic beta-cell damage and nonalcoholic steatohepatitis without improving obesity in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome. The 24th Conference of the APASL. 2015.3.12-2015.3.15, Istanbul, Turkey
2. 常山幸一、他. Nano-PALDI イメージング質量分析を用いた低分子 Xenobiotics(2オクチン酸)検出法の開発 J-DDW 2014, 2014.10.23-2014.10.26, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
3. 常山幸一、井村穰二. イメージング MS の病理診断学への応用と展開. 第41回 BMS コンファレンス 2014.7.7-2014.7.9, 能

登ロイヤルホテル(石川県・志賀町)
[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:
出願年月日:
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

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 10293341

(2) 研究分担者

藤本 誠 (FUJIMOTO, Makoto)
富山大学・大学病院・講師
研究者番号: 30377337

(3) 連携研究者

平 修 (TAIRA, Shu)
福井県立大学・生物資源学部・准教授
研究者番号: 30416672