

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460922

研究課題名(和文)六君子湯の食欲亢進作用の細胞内メカニズムの解明

研究課題名(英文)Rikkunshito increased hypothalamic SIRT1 activity

研究代表者

武田 宏司 (TAKEDA, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60261294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：六君子湯は複数の機序によりグレリンシグナルを増強し、食欲不振を改善する。本研究では、グレリンの細胞内エフェクターであるAMPKおよびSIRT1の関与について検討を行った。グレリン受容体(GHSR1a)を発現している培養細胞に六君子湯を添加したところ、SIRT1蛋白量の増加およびSIRT1活性の上昇が認められた。また、六君子湯を投与したICRマウスにおいて心臓のSIRT1蛋白量増加と視床下部SIRT1活性の上昇が認められた。さらに、六君子湯を長期間連日投与したマウスでは、コントロールと比較して有意な寿命の延長が認められた。六君子湯は食欲改善作用に加えて抗加齢作用を有する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：To examine the roles of SIRT1 and AMPK in the orexigenic effect of rikkunshito, a ghrelin signaling potentiator, in vitro experiments using ghrelin receptor(GHSR1a)-expressing HEK293 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were done. The elevated SIRT1 activity and protein expression through cAMP-CREB pathway was observed after ghrelin and rikkunshito treatment in these cells. Rikkunshito increased hypothalamic SIRT1 activity and SIRT1 protein expression of the heart in ICR mouse. Furthermore, rikkunshito prolonged survival in aged ICR mice. The potentiation of ghrelin signaling by rikkunshito not only acts as appetite stimulator but may provide a novel approach for the improvement of both health- and life-span in aging societies.

研究分野：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：六君子湯 食欲

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは、growth-hormone secretagogue receptor 1a(GHSR1a)の内因性リガンドとして発見された 28 個のアミノ酸よりなるペプチドホルモンであり、3 番目のセリンにオクタン酸がアシル結合したアシルグレリンが活性体とされている。グレリンは主に胃より分泌され、迷走神経求心路末端および視床下部に発現する GHSR1a を介して、視床下部弓状核 AgRP/NPY ニューロンを活性化し、強力な食欲亢進作用と消化管運動の亢進作用を引き起こす。

最近の研究から、グレリンによる AgRP/NPY ニューロンの活性化には、細胞内 AMPK および SIRT1 の活性化が必須であることが明らかにされた (Andrews ZB et al, Nature 2008, Lopez M et al, Cell Metab 2008, Velasquez DA et al, Diabetes 2011)。グレリンは同ニューロンにおいて細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させ、カルモジュリンキナーゼキナーゼ(CaMKK)を介して AMPK の 172Thr をリン酸化することによりその活性を増加させ、摂食量を増加する。一方、Velasquez らの報告では、グレリンは視床下部の SIRT1 活性化を介して摂食を亢進することが示されている。

六君子湯は虚証の患者に使用される代表的な方剤であり、機能性ディスぺプシアに対して使用される。申請者は、六君子湯のもつ食欲不振改善作用に着目し、小動物を用いて食欲不振モデルを作成し、その作用機序を検討してきた。

シスプラチンをラットに投与した食欲不振モデルにおいて、チンピに含まれるフラボノイドが、セロトニン 2B および 2C 受容体に拮抗することによりグレリン分泌を促進することを見いだした (Takeda H et al. Gastroenterology 2008)。次に、高齢動物では六君子湯がホスホジエステラーゼ III を阻害することでグレリンシグナルの異常を改善することを明らかにした (Takeda H et al. Endocrinology 2010)。さらに、新奇環境ストレス時には、六君子湯がセロトニン 2C 受容体拮抗作用により摂食を改善することを明らかにした (Saegusa Y, Takeda H, et al. AJP 2011)。六君子湯に含まれる 10-gingerol が、グレリン代謝酵素であるカルボキシエステラーゼおよびブチルコリンエステラーゼを阻害することを明らかにした (Sadakane C et al. BBRC 2011)。

最近、他施設より、六君子湯に含まれる atractylodin が、GHSR1a に対するアシルグレリンの結合および細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを増強する、との報告もなされている (Fujitsuka N et al. Trans Psychiatry 2011)。このように、六君子湯は、生薬に含まれる複数の成分が、グレリンシグナルを中心とした複数の標的に作用して食欲を改善させることが次第に明らかとなってきている。しかしながら、これまでのところ、GHSR1a の細胞

内エフェクター分子である AMPK および SIRT1 に対する六君子湯の作用は検討されていない。

申請者は、予備的検討を行い、GHSR1a を発現しているヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC において、六君子湯が SIRT1 蛋白を増加させ、また、AMPK 活性を増加させることを見出したため、今回の研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

申請者は本研究において、六君子湯およびその成分が、GHSR1a の細胞内エフェクター分子である AMPK および SIRT1 の活性を増加させることを示し、六君子湯の食欲亢進作用に関する新規機序であることを明らかにすることにより、食欲を制御する新しい薬剤の開発に寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 六君子湯の AMPK および SIRT1 活性におよぼす影響

### 六君子湯処理が SIRT1 活性に及ぼす効果の解析

本研究では、GHSR1a を発現している培養細胞 (HUVEC、安定的に GHSR1a を発現させた HEK293 細胞: GHSR1a-HEK293 細胞) を六君子湯処理した場合の細胞内の SIRT1 活性に及ぼす影響を解析した。SIRT1 活性測定には、CycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay kit (CycLex Co., Ltd) を用いた。さらに SIRT1 の脱アセチル化酵素活性を、SIRT1 の基質である p53、PGC-1 のアセチル化状態を比較することにより評価した。アセチル化 p53 に関しては、p300 を強制発現させた GHSR1a-HEK293 細胞に六君子湯処理を行い、アセチル化 p53 特異的抗体を用いて western blotting を行った。アセチル化 PGC-1 に関しては、GCN-5 を強制発現させた GHSR1a-HEK293 細胞に六君子湯処理を行い、抗 PGC-1 抗体を用いた免疫沈降により PGC-1 を精製し、抗アセチル化リジン抗体による western blotting を行った。CREB リン酸化の評価は pCREB 抗体を用いた western blotting によって行った。

### 六君子湯処理が AMPK シグナルに及ぼす効果の解析

AMPK シグナルの活性化は、AMPK サブユニットのリン酸化および AMPK の基質である Acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化を指標に評価した。培養細胞に六君子湯処理を行った後、細胞のライゼートを調製し、抗 p-AMPK 抗体および抗 p-ACC 抗体による western blotting を行った。

### 六君子湯処理が SIRT1 の発現に及ぼす影響の解析

SIRT1 活性は、細胞内 NAD/NADH 比の変動のみならず、SIRT1 自体の遺伝子発現レベルの増減によっても調節されている (Noriega et al. EMBO Rep., 2011)。六君子湯が SIRT1 発現に影響を及ぼす可能性を検討するため、培

養細胞を六君子湯処理した場合の SIRT1 蛋白質量を western blotting および特異的 ELISA (AdipoGen : Sirtuin 1 Intracellular ELISA Kit) により解析し、SIRT1 mRNA の変動をリアルタイム PCR により定量的に評価した。

#### GHSR1a の関与の検討

～ で得られた結果に関して、GHSR1a の関与があるかどうかを GHSR1a GHSR1a アンタゴニスト D-Lys : [D-Lys-3]-GHRP-6 を用いて検証した。

(2) マウス視床下部 AMPK および SIRT 活性に対する六君子湯投与の効果

#### マウス視床下部 AMPK、SIRT1 の mRNA および蛋白質量の検討

16-18 週齢の雄性 ICR マウスに六君子湯 (1,000mg/Kg) を 4 日間経口投与し、視床下部および末梢臓器 (心臓等) を摘出する。Total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA へ逆転写した後、リアルタイム PCR にて SIRT1、AMPK の mRNA を定量した。凍結された視床下部および末梢臓器の SIRT1 蛋白質量は、特異的 ELISA (AdipoGen : Sirtuin 1 Intracellular ELISA Kit) にて確認を行った。

#### マウス視床下部 AMPK 活性および SIRT1 活性の検討

視床下部 SIRT1 の活性測定には、CycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay kit (CycLex Co., Ltd) を用いた。

#### 4. 研究成果

まず、グレリン受容体 (GHSR1a) を発現している培養細胞 (HUVEC、安定的に GHSR1a を発現させた HEK293 細胞) に六君子湯を添加したところ、SIRT1 蛋白質量の増加および SIRT1 活性の上昇が認められた。HAT (p300 もしくは GCN-5) を強制発現させた GHSR1a-HEK293 細胞への六君子湯添加により、SIRT1 の基質である p53、PGC-1 のアセチル化の減少が認められた。さらに、六君子湯は GHSR1a 依存的、かつグレリンと相乗的に細胞内 cAMP 上昇および CREB リン酸化をきたすことが明らかとなった。以上より、六君子湯は cAMP-CRE 経路の活性化を介して SIRT1 蛋白質を増加させる可能性が示唆された。また、六君子湯が AMPK および ACC のリン酸化を促進し、SIRT1 蛋白質が AMPK 活性化剤 (AICAR) で増加、AMPK 阻害剤 (Compound C) で減少したことから、六君子湯による SIRT1 蛋白質増加には AMPK の活性化も関与している可能性が示唆された。

次に、16~18 週齢の雄性 ICR マウスに六君子湯 (1,000mg/Kg) を 4 日間経口投与し、視床下部および末梢臓器を摘出し、SIRT1 蛋白質量およびその活性を、特異的 ELISA および SIRT1 活性測定キットを用いて測定を行った。その結果、心臓の SIRT1 蛋白質の増加と視床下部における SIRT1 活性の有意な上昇が認められた。さらに、六君子湯 (420 mg /kg/日および 850 mg /kg/日) を長期間連日投与した

マウスでは、コントロールと比較して有意な寿命の延長が認められた。以上の結果は、Molecular Psychiatry (2016) に掲載された。

#### 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 14 件)

1. Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Nijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A. (2016) Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. Mol Psychiatry. doi: 10.1038/mp.2015.220 査読あり
2. Ohnishi S, Takeda H. (2015) Herbal medicines for the treatment of cancer chemotherapy-induced side effects. Front Pharmacol, Feb 10;6:14. doi: 10.3389/fphar.2015.0001 査読あり
3. Yamada C, Sadakane C, Nahata M, Saegusa Y, Nakagawa K, Okubo N, Ohnishi S, Hattori T, Takeda H. (2015) Serotonin 2C receptor contributes to gender differences in stress-induced hypophagia in aged mice. 査読あり Psychoneuroendocrinology, 55:81-93.
4. Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Takeda H. (2015) Influence of Aging and Gender Differences on Feeding Behavior and Ghrelin-Related Factors during Social Isolation in Mice. PLoS One. 10:e0140094. doi: 10.1371/journal.pone.0140094. 査読あり
5. Saegusa Y, Hattori T, Nahata M, Yamada C, Takeda H. A New Strategy Using (2015) Rikkunshito to Treat Anorexia and Gastrointestinal Dysfunction. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:364260. doi: 10.1155/2015/364260. 査読あり
6. Hayakawa M., Ono Y., Wada T., Yanagida Y., Sawamura A., Takeda H., Gando S. (2014) Effects of Rikkunshito (traditional Japanese medicine) on enteral feeding and the plasma ghrelin level in critically ill patients: a pilot study. J Intensive Care. 2:53. doi: 10.1186/s40560-014-0053-4. 査読あり
7. Nahata M., Saegusa Y., Sadakane C., Yamada C., Nakagawa K., Okubo N.,

- Ohnishi S., Hattori T., Sakamoto N., Takeda H. (2014) Administration of exogenous acylated ghrelin or rikkunshito, an endogenous ghrelin enhancer, improves the decrease in postprandial gastric motility in an acute restraint stress mouse model. *Neurogastroenterol Motil.* 26:821-831. 査読あり
8. Sakata Y., Tominaga K., Kato M., Takeda H., Shimoyama Y., Takeuchi T., Iwakiri R., Furuta K., Sakurai K., Odaka T., Kusunoki H., Nagahara A., Iwakiri K., Furuta T., Murakami K., Miwa H., Kinoshita Y., Haruma K., Takahashi S., Watanabe S., Higuchi K., Fujimoto K., Kusano M., Arakawa T.; G-PRIDE study group. (2014) Clinical characteristics of elderly patients with proton pump inhibitor-refractory non-erosive reflux disease from the G-PRIDE study who responded to rikkunshito. *BMC Gastroenterol.* 14:116. doi: 10.1186/1471-230X-14-116. 査読あり
9. Hattori T., Yakabi K., Takeda H. (2013) Cisplatin-induced anorexia and ghrelin. *Vitam Horm.* 92:301-317. 査読あり
10. Nahata M., Muto S., Nakagawa K., Ohnishi S., Sadakane C., Saegusa Y., Iizuka S., Hattori T., Asaka M., Takeda H. (2013) Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice. *Psychoneuroendocrinology.* 38:2051-2064. 査読あり
11. Nahata M., Saegusa Y., Harada Y., Tsuchiya N., Hattori T., Takeda H. (2013) Changes in ghrelin-related factors in gastroesophageal reflux disease in rats. *Gastroenterology Research and Practice:* 50481. 査読あり
12. Tominaga K., Kato M., Takeda H., Shimoyama Y., Umegaki E., Iwakiri R., Furuta K., Sakurai K., Odaka T., Kusunoki H., Nagahara A., Iwakiri K., Furuta T., Murakami M., Miwa H., Kinoshita Y., Haruma K., Takahashi S., Watanabe S., Higuchi K., Kusano M., Fujimoto K., Arakawa T., and the G-PRIDE study group. (2013) A randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of rikkunshito for patients with non-erosive reflux disease refractory to proton-pump inhibitor: the G-PRIDE study. *J Gastroenterol.* 49:1392-1405. 査読あり
13. Yamada C., Saegusa Y., Nakagawa K., Ohnishi S., Muto S., Nahata M., Sadakane C., Hattori T., Sakamoto N., Takeda H. (2013) Rikkunshito, a Japanese Kampo Medicine, Ameliorates Decreased Feeding Behavior via Ghrelin and Serotonin 2B Receptor Signaling in a Novelty Stress Murine Model. *BioMed Research International.* 792940. 査読あり
14. Takeda H., Nakagawa K., Okubo N., Nishimura M., Muto S., Ohnishi S., Sakamoto N., Hosono H., Asaka M. (2013) Pathophysiologic Basis of Anorexia: Focus on the Interaction between Ghrelin Dynamics and the Serotonergic System. *Biol Pharm Bull.* 36:1401-1405. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. 武田宏司 食欲不振に対する六君子湯の可能性 -基礎研究からの提言- 第32回和漢医薬学会学術大会(ランチョンセミナー)2015年8月22日 富山国際会議場(富山県富山市)
2. Ohnishi S, Nakagawa K, Okudo N, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto, N, Takeda H : The hypophagia after psychological stress in aged male mice is mediated by an interaction of activation of estrogen receptor with serotonin 2C receptor. (口頭) Digestive Disease Week 2015, 2015年5月16日、ワシントンDC(米国)
3. Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Okudo N, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Sakamoto, N: Different response to chronic isolation stress between young and aged mice. (口頭) Digestive Disease Week 2015, 2015年5月16日、ワシントンDC(米国)
4. 武藤修一、大西俊介、武田宏司 セロトニンによるグレリン分泌の調節機構(シンポジウム)第101回日本消化器病学会総会 2015年4月23日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
5. 大西俊介、武藤修一、武田宏司 ストレスによる老齢動物の摂食低下には性差が存在する(シンポジウム)第101回日本消化器病学会総会 2015年4月23日 仙台国際センター(宮城県仙台市)
6. 武田 宏司 グレリンシグナルからみた六君子湯の作用メカニズム(漢方セミナー)第56回日本平滑筋学会総会 2014年8月8日 新横浜プリンスホテル(神奈川県横浜市)
7. 武田宏司, 武藤 修一, 大西 俊介 栄養応答シグナルの解明と疾患治療への応用 グレリンシグナルおよびセロトニン2C受容体の意義 第14回日本抗加齢

- 医学会総会 2014年6月6日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
8. Takeda H, Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto, N. The Possibility of Rikkunshito As a Treatment for Anorexia: a Proposal From a Basic Research Perspective. Digestive Disease Week 2014, 2014年5月6日、シカゴ(米国)
  9. Takeda H, Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto, N. Association of abnormal ghrelin dynamics with delayed gastric emptying in acute restraint-stressed mice. Digestive Disease Week 2014, 2014年5月5日、シカゴ(米国)
  10. Muto S, Ohnishi S, Nakagawa K, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto, N, Takeda H. Rikkunshito, a Traditional Japanese Kampo Medicine, Ameliorates the Decrease in Feeding Behavior in Aged Mice Exposed to Stress via Enhancement of Endogenous Ghrelin Production. Digestive Disease Week 2014, 2014年5月6日、シカゴ(米国)
  11. Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto N, Takeda H. Gender Difference Influences Food Intake Under an Emotional Stress via 5-HT2CR Activation in Aged Mice. Digestive Disease Week 2014, 2014年5月4日、シカゴ(米国)
  12. 武藤 修一, 大西 俊介, 武田 宏司 ストレスによる胃機能異常にはグレリンシグナルの異常が関与する(ワークショップ)第100回日本消化器病学会総会2014年4月24日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)
  13. 武田 宏司 脳腸相関からみた六君子湯の食欲改善作用(WS「脳腸相関の新展開」)第50回日本東洋心身医学研究会2014年3月1日 品川インターシティーホール(東京都品川区)
  14. Yamada C, Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Sakamoto N, Takeda H. Gender differences in the mechanisms of action of rikkunshito on the improvement in food intake after exposure to a novel environmental stress in aged mice. 7th Cachexia Conference. 2013年12月10日 ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
  15. Takeda H, Nakagawa K, Ohnishi S, Muto M, Yamada C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Sakamoto N.

- Rikkunshito improves cisplatin-induced anorexia. 7th Cachexia Conference, 2013年12月10日 ポートピアホテル(兵庫県神戸市)
16. 大西俊介、武藤修一、武田宏司 ストレスによる老齢動物の摂食低下には5-HT2C受容体の機能亢進が関与するJDDW2013(シンポジウム)2013年10月10日グランドプリンスホテル新高輪他(東京都港区)
  17. 武田宏司 急性拘束ストレスによる胃排出遅延にはグレリンシグナル伝達障害が関与する第55回日本平滑筋学会総会2013年8月7日 旭川市大雪クリスタルホール(北海道旭川市)
  18. Takeda H, Muto S, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Yamada C, Hattori T, Asaka M. Activation of Corticotropin-Releasing Factor 2 and Melanocortin-4 Receptors Mediates the Persistent Loss of Appetite Induced by Stress Loading in Advanced Age Mice. Digestive Disease Week 2013, 2013年5月20日、オランダ(米国)
  19. Muto S, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Yamada C, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Serotonin 2C Receptor Antagonism Improves Stress-Induced Anorexia in Aged Mice. 2013年5月20日、オランダ(米国)
  20. Ohnishi S, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Yamada C, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Involvement of Ghrelin Signaling Dysfunction in Acute Restraint Stress-Induced Delayed Gastric Emptying. 2013年5月19日、オランダ(米国)

〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/byoutai/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

武田 宏司 (TAKEDA, Hiroshi)  
北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号: 60261294

##### (2)研究分担者

無

##### (3)連携研究者

無

