

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08002

研究課題名(和文) 抗老化を目指した天然資源の探索研究

研究課題名(英文) Searching for natural medicines aiming for anti-aging

研究代表者

高松 智 (TAKAMATSU, Satoshi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：30236351

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)：酸化ストレスと老化・寿命は密接に関わっており、細胞外レベル、細胞内レベルの抗酸化効果、および老化モデルの線虫(*C. elegans*)を用いた個体レベルにおける寿命への影響を評価する系を用いて天然由来の化合物の探索を開始した。抗酸化活性を示した生薬トウドクカツ(セリ科、*Angelica pubescens*の根)より7種のクマリン誘導体を単離し、これらの化合物には哺乳類の寿命遺伝子SIRT1を活性化することを見出した。また、漢方薬の抗老化作用の網羅的な解析の一環として、補剤やお血剤を中心に線虫を用いた抗老化効果の評価を開始し、これまでに補中益気湯が線虫の寿命を約20%延長することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is closely related to aging and lifespan. We developed the screening method for antioxidant with combination of extracellular, intracellular, and an individual level using aging animal *C. elegans*. In the course of search for antioxidant, we found that the root extract of *Angelica pubescens* MAXIM (Umbeliferae) showed antioxidant effect on extracellular and intracellular level. But it did not show a life-extending effect on *C. elegans*. Interestingly, the extract led to activation of human longevity genes SIRT1. As results of active guided fractionation, seven coumarins were isolated as activators of SIRT1. In the course of exhaustive research for Kampo medicines as anti-aging, we found that several formulations for ki (energy) and formulations for oketu (stagnation of blood circulation) extended longevity of *C. elegans*. Among them, Hochuekkito led to 20% longer lifespan of *C. elegans*.

研究分野：天然物化学

キーワード：老化 活性酸素 漢方 生薬 線虫

1. 研究開始当初の背景

近年、老化の機構を遺伝子の面から捕らえようとする研究が活発になっている。特に老化の原因として活性酸素が注目され、これに関わる遺伝子と老化の関係を調べる研究が行われるようになり、遺伝学が確立している線虫 (*C. elegans*) が老化研究においても注目されるようになった。従来は *in vitro* の評価系のみで天然由来の抗老化物質の探索が行われていたが、線虫などの個体レベルの評価系での探索はまだ積極的に行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

酸化ストレスと老化・寿命は密接に関わっており、天然資源由来のポリフェノールの一種であるレスベラトロールが抗酸化作用を示すこと、そして長寿遺伝子産物 Sir2 の活性化により線虫の寿命を延長させることが最近明らかとなった。その後、哺乳類においても、Sir2 の相同体 Sirt1 の活性化による寿命の延長効果が報告されている。本研究ではヒト由来の培養細胞を用いた抗酸化活性測定と寿命測定モデルとして確立されている線虫を用いた2つの評価系を組合せ、生薬由来の抗老化天然物質の探索を行う。また、血管内皮の老化に対し、見出された化合物の保護作用についても評価すると共に、生薬の新たな利用法の分野を切り開き、老後の QOL の向上に役立てることを目的としている。

3. 研究の方法

スクリーニング用サンプルは各生薬の 70%メタノール抽出エキス、漢方においては駆瘀血剤や補剤を中心に評価した。生薬サンプルは、化学的にラジカルを発生させる DPPH 法、細胞内の過酸化物を検出する DCFH-DA 試験であらかじめ抗酸化作用の比較的強いものを選び、線虫の寿命測定に供した。NAD 依存性 SIRT1 活性の測定は SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit (BIOMOL) を用いた。抗酸化試験として、DCFH-DA 法(ヒト急性前骨髄性白血病細胞 HL-60 内の過酸化物)の測定は高松らの方法を用いた (*Phytother Res*, 17, 963, 2003)。DPPH フリーラジカル消去試験は Xie らの方法に従い実施した (*BioSci Biotechnol Biochemi*, 69, 2326, 2005)。線虫の寿命測定は、山口らの方法を一部改変して行った (*AATEX*, 13, 1, 2008)。線虫の餌となる大腸菌 *E. coli* OP50 を加えた寿命測定用の液体培地に、約 2000 匹の孵化した線虫(変異株 *fer-15*)の L1 幼虫を加え、25.5、100 rpm で振とう培養した。L1 幼虫を 1 日目とし、成虫になる 4 日目にアンピシリンとサンプルを添加し、5 日目から隔日毎に約 100 匹あたりの生存率を求めた。陽性対照としてレスベラトロールを用いた。

4. 研究成果

(1) 抗酸化活性物質のスクリーニング

一次スクリーニングとして、peroxide 感受性の蛍光色素とヒト骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞を用いた DCFH-DA 法と DPPH 法を併用し、96 種の生薬エキスについて抗酸化活性を測定した。スクリーニングを開始した当初では両測定法でいずれも陽性対照のアスコルビン酸(DPPH IC₅₀ 6.5 μg/mL、DCFH-DA IC₅₀ 74.0 μg/mL) や α -トコフェロール誘導体 trolox(DPPH IC₅₀ 4.7 μg/mL) と同等の抗酸化作用を示す生薬エキスは見出されなかった。そこで、直接寿命遺伝子産物の SIRT1 の活性測定を一次スクリーニングと併行して実施した。その結果、トウキ、トウドクカツ、ロートコンエキスが、SIRT1 を活性化(コントロールに対し2倍以上の活性化が見られたもの)することが観測された。特にトウドクカツとロートコンエキスは 0.5 mg/mL でそれぞれ 5.96 倍、5.50 倍(陽性対象:レスベラトロールは 22.7 μg/mL で 1.8 倍)の SIRT1 の活性化をそれぞれ示した(図 1)。

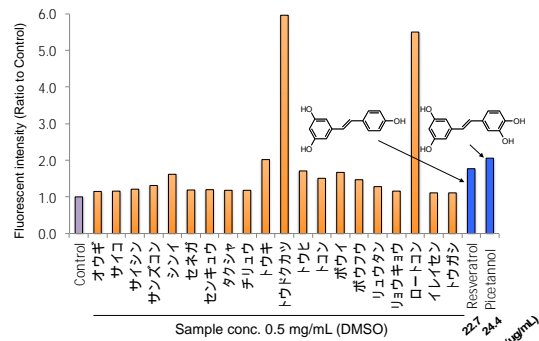


図 1. 生薬エキスの SIRT1 活性

まず、トウドクカツ (100 g) の 70%メタノールエキスを調製した後、極性の異なるヘキサン、クロロホルム、*n*-ブタノールで順次分配し、活性が比較的強かった、クロロホルム画分について、活性成分の分離を進めた。これまでに 7 種の化合物を単離し、それらの構造を、xanthotoxin や osthol をはじめとするクマリン誘導体を同定した(図 2)。

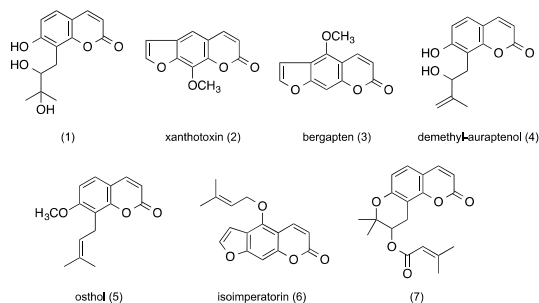


図 2. 単離されたクマリン誘導体(1)-(7)

化合物(1)-(7)は 100 μg/mL で 1.3~1.7 倍の SIRT1 の活性化を示したが、陽性対照のレスベラトロールと比較して約 1/4 程度の活性であった(表 1)。

表 1. クマリン誘導体(1)-(7)の SIRT1 活性

化合物	濃度 $\mu\text{g/mL}$	蛍光強度比(コントロール)
(1)	100	1.32
(2)	100	1.50
(3)	100	1.39
(4)	100	1.60
(5)	100	1.72
(6)	100	1.35
(7)	100	1.62
レスベラトロール	22.7	1.8

(2) 抗酸化活性物質のスクリーニング
スクリーニングを継続している過程で、DPPH ラジカルと細胞内活性酸素のいずれも減少させる生薬エキスも 10 種ほど確認した。しかし、そのほとんどが $20.8 \mu\text{g/mL}$ で細胞毒性(細胞増殖率が 50%以下)を示すものであった。そこで、DCFH-DA 法において陽性対照の Trolox と同程度の抗酸化能を示し、かつ細胞毒性を示さなかった($20.8 \mu\text{g/mL}$ で細胞増殖率が 80%以上)のとして、生薬アシタバ(セリ科アシタバ *Angelica keiskei* の葉)とガイヨウ(キク科ヨモギ *Artemisia princeps* 又はオオヨモギ *A. montana* の葉や枝先)を選び、これらの 2 種の生薬について線虫の寿命に対する影響を観測した(図 3,4)。

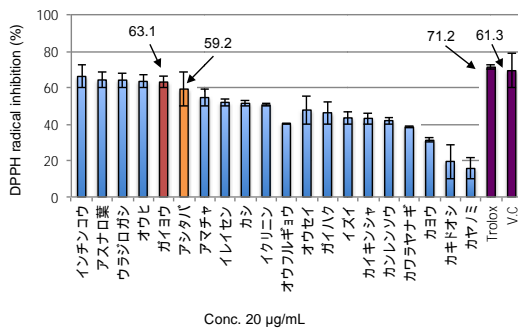


図 3 生薬エキスの抗酸化試験：DPPH 法

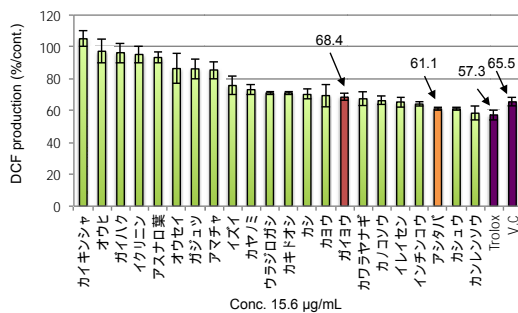
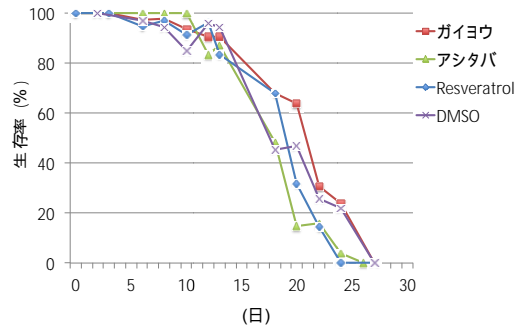


図 4 生薬エキスの抗酸化試験：DCFH-DA 法

しかし、期待に反し、いずれの生薬も $20 \mu\text{g/mL}$ で線虫の寿命延長効果は示さなかった(図 5)。



生薬試料	平均寿命	延長率 (%)
アシタバ	27	0
ガイヨウ	27	0
Resveratrol	29	7.0
control	27	0

図 5 アシタバとガイヨウの線虫の寿命に対する効果

しかし、一次スクリーニングを実施せず、直接線虫の寿命を延長する生薬も予備的検討から見ついている。今後はスクリーニングを継続するとともに、抗酸化能以外にも寿命に影響を及ぼす因子もあることから、異なる作用機序も考慮し、新たなスクリーニングの構築も検討している。

(3) 漢方薬の線虫に対する寿命延長効果

天然の医薬品の抗老化作用の網羅的な解析の一環として、生薬より構成される漢方薬に着目し、線虫の寿命に対する影響を調べた。まず、漢方薬の適用を考慮し、体力回復に用いられる補剤、あるいは血液循環や血管の老化にも関与する瘀血に着目して、6 種の漢方薬を選定した。

今回は代表的な血剤(芎帰膠艾湯、加味帰脾湯、大黃牡丹皮湯)及び補益強壯剤(十全大補湯、補中益気湯、人參養榮湯)について検討した。

まず、線虫の寿命延長効果を検討したところ、いずれの漢方薬にも延長効果がみられた。その中でも補中益気湯が最も長く、線虫の寿命を約 20%も延長した(図 6,7 表 2)。

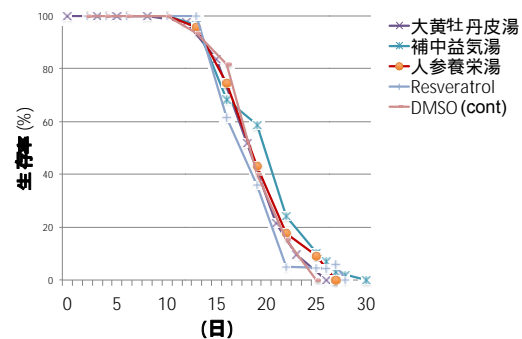


図 6 漢方エキス添加時の線虫の寿命曲線(1)

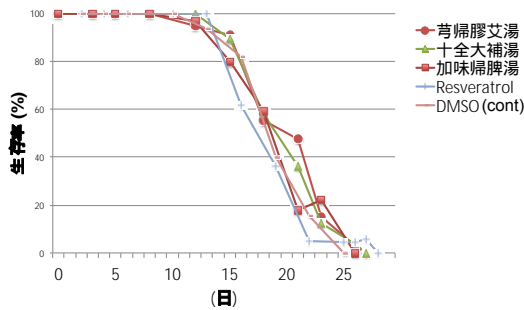


図7 漢方エキス添加時の線虫の寿命曲線(2)

表2 漢方エキスによる線虫の寿命延長効果

漢方試料	平均寿命	延長率 (%)
十全大補湯	25	8.0
加味帰脾湯	26	4.0
大黃牡丹皮湯	26	4.0
補中益気湯	30	20
人參養栄湯	27	8.0
Resveratrol	28	12
control (DMSO)	25	-

一方で、DPPH ラジカル法や細胞内の過酸化物を検出する DCFH-DA 法ではいずれの漢方薬にも顕著な抗酸化能は見られなかった(図 8,9)。

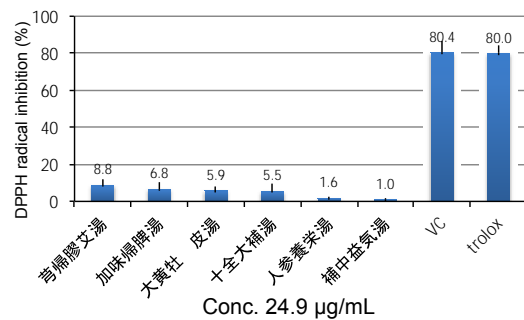


図8 漢方薬の抗酸化活性：DPPH 法

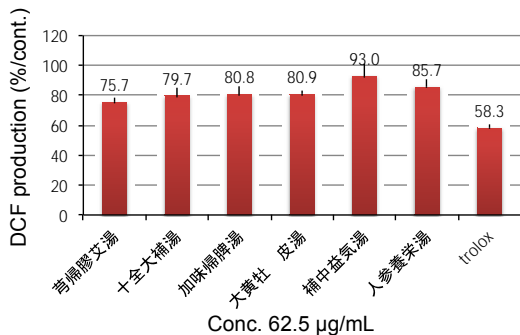


図9 漢方薬の抗酸化活性：DCFH-DA 法

次に、最も線虫の寿命を延長した補中益気湯を構成する 10 種の生薬についての抗酸化能を検討した。DPPH 試験ではショウキョウ、カ

ンゾウ、オウギに 24.9 µg/mL で約 20%の抗酸化活性が観察された(図 10)。

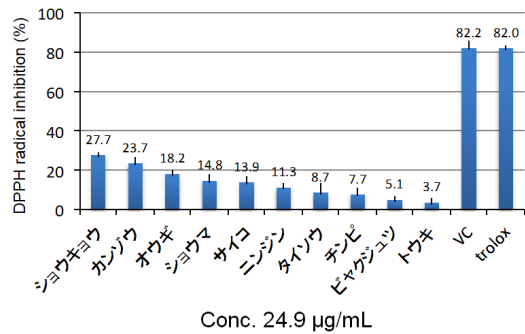


図10 補中益気湯の構成生薬の抗酸化活性 (DPPH 法)

DCFH-DA 試験においては、ショウマやサイコなどに 62.5 µg/mL で 30-40%の抗酸化活性が観察された(図 11)。

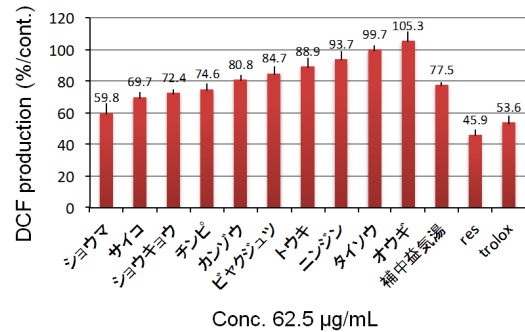


図11 補中益気湯の構成生薬の抗酸化活性 (DCFH-DA 法)

以上の結果より、細胞の内外で抗酸化活性を示す生薬がバランスよく補中益気湯に配合されていることが示唆された。このことは構成生薬を一つずつ除いて調製した補中益気湯(一味抜き)の抗酸化試験結果からも支持された(データ未提示)。

このように漢方薬の構成生薬を網羅的に解析することにより、ショウキョウ、カンゾウ、オウギ、ショウマやサイコのような抗酸化作用の鍵となる生薬を含むものを抗老化作用の期待できる漢方薬として分類の指標になりうるものと考えられる。

これまでも約 50 種もの漢方薬について、抗酸化活性の網羅的な評価は行われてきたが、いずれも ORAC 法¹⁾、ESR 法²⁾といった *in vitro* における化学反応ベースのものであり、今回我々が使用した細胞ならびに個体レベルの抗酸化能の指標の一つにすぎない。今後、抗老化作用も含めて新たな漢方薬の作用が明らかになることにより、古典には記載の無い新たな漢方薬の用途が見出され、現代医療の新たな切口として貢献できると期待している。

<引用文献>

- 1) K.Nishimura *et al.*, Evaluation of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Kampo Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2011: 812163. Published online 2011 May 26.
- 2) 平山 暁 他, 多種ラジカル消去活性測定 (MULTIS)による漢方製剤抗酸化能の再評価 -先端スピン応用医学の東西医学への展開 4-. 筑波技術大学テクノレポート. 2015 Dec; 23 (1): 181-182.

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4件)

高松 智、米野 真織、小谷野 響子、林 真雪、荒川 菜々恵、岡田 麗、保谷 実咲、小池 佑果、福村 基徳、川添 和義、「抗老化を目指した漢方薬の評価」、アグリバイオ、査読無、第2巻 3月号 No.3、p.93~99 (2018)

高松 智、宮崎 悠、矢作 忠弘、松崎 桂一、安田 佳代、石井 直明、北中 進、「抗老化を目指した天然資源の探索研究」、アグリバイオ、査読無、第1巻 12月号 No.13、p.70~76 (2017)

高松 智、宮崎 悠、大根谷 章浩、安田 佳代、石井 直明、北中 進、「抗老化を目指した生薬及び漢方薬の評価」、月刊細胞、査読有、第49巻 10月号 No.12、p.44~48 (2017)

高松 智、宮崎 悠、矢作 忠弘、松崎 桂一、安田 佳代、石井 直明、北中 進、「抗老化を目指した天然資源の探索研究」、月刊細胞、査読有、第49巻 9月号 No.10、p.32~36 (2017)

[総説](計1件)

Satoshi Takamatsu, "Naturally occurring cell adhesion inhibitors", *Journal of Natural Medicines*, 2018, May 19. doi: 10.1007/s11418-018-1220-z. [Epub ahead of print].

[学会発表](計8件)

高松 智、米野 真織、小谷野 響子、林 真雪、小池 佑果、福村 基徳、安田 佳代、

石井 直明、川添 和義、「抗老化を目指した生薬及び漢方薬の評価」、日本薬学会第138年会(金沢)講演要旨集 (2018 3/26~28).

高松 智、荒川 菜々恵、岡田 麗、保谷 実咲、館野 正寛、田中 雄基、林 理子、増田 由妃、小池 佑果、福村 基徳、安田 佳代、石井 直明、川添 和義、「抗老化を目指した生薬及び漢方薬の評価」、日本生薬学会第64回年会(千葉)講演要旨集、p. 272 (2017 9/9~10).

小池 佑果、片山 頌子、福村 基徳、高松 智、川添 和義、「オウギに含まれる血液凝固線溶系に影響を与える成分の探索」、和漢医薬学第34回学術大会(福岡)講演要旨集、p.103 (2017 8/26~27).

小池 佑果、福村 基徳、高松 智、「シャジンに含まれる血液凝固線溶系に影響を与える成分の探索」、日本生薬学会第63回年会(富山)講演要旨集(2016 9/24~25).

小池 佑果、村木 惇人、福村 基徳、高松 智、「サンソウニンに含まれる血液凝固線溶系に影響を与える成分の探索」、日本生薬学会第63回年会(富山)講演要旨集 (2016 9/24~25).

矢作 忠弘、山中 康平、松井 彩香、吉田 裕樹、米山 達朗、高松 智、榊原 巖、北中 進、松崎 桂一、「*Saussura amara* (L.) DC.のマクロファージ活性化抑制成分の探索研究(5)」、日本薬学会第136年会(横浜)講演要旨集 (2016 3/27~29).

山中 康平、松井 彩香、矢作 忠弘、吉田 裕樹、米山 達朗、古川 めぐみ、高松 智、榊原 巖、松崎 桂一、「*Saussura amara* (L.) DC.のマクロファージ活性化抑制成分の探索研究(4)」、第59回日本薬学会関東支部大会(千葉)講演要旨集 (2015 9/11~12).

高松 智、「微生物及び薬用植物資源を活用した創薬シーズの探索研究」、日本生薬学会第62回年会(岐阜)講演要旨集、p. 32 (2015 9/11~12).

[図書](計2件)

高松 智 監修、月刊ファインケミカル 2017年、第46巻6号、【特集】生薬・薬用植物研究が明らかにする漢方の実力、シーエムシー出版 (ISSN 0913-6150)、小池 佑果、「漢方概念に基づいた天然資源からの創薬シーズ探索と研究」p.6-12.

高松 智 監修、生薬・薬用植物研究の最新動向、シーエムシー出版 (ISSN 978-4-7813-1264-4)、2017年8月24日、

小池 佑果、「第10章 古典から考える天然資源の利用と新たな創薬シーズの探索」、p.83-86

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

講演（計 1 件）

高松 智、シーエムシー出版 FORUM セミ
ナー生薬・薬用植物の効果と美容・健康食
品分野への応用展開、「抗老化を目指した
生薬・漢方の利用」2017 年 9 月 22 日、東
京都千代田区内神田 1-3-1 (株)シーエムシ
ー出版 FORUM 会場

研究成果データベース

昭和大学学術業績リポジトリ

<https://meta.lititory.showa-u.ac.jp/search/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 智 (TAKAMATSU Satoshi)
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号：30236351

(2) 研究分担者

福村 基徳 (FUKUMURA Motonori)
昭和大学・薬学部・講師
研究者番号：00407529

小池 佑果 (KOIKE Yuka)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：10644479

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

()