

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590704  
 研究課題名（和文） メタボリックシンドロームが惹起する心血管疾患の予防・治療を目指した漢方方剤の創製  
 研究課題名（英文） Creation of novel Kampo medicines to prevent or treat coronary vascular diseases elicited by metabolic syndrome  
 研究代表者  
 井上 誠（INOUE MAKOTO）  
 愛知学院大学・薬学部・教授  
 研究者番号：50191888

## 研究成果の概要：

メタボリックシンドロームにより惹起される動脈硬化症を予防・治療するために、動脈硬化形成に關与する細胞群の各種機能調節作用を有する生薬を網羅的に探索し、有効性が見出された生薬より新規漢方方剤を創製した。本方剤は、動脈硬化モデルマウスにおいて病変形成を抑制する作用を示し、今後さらに、構成生薬の組合せ、用量等を検討することにより、動脈硬化症の予防・治療に優れた効果を持った漢方方剤を創製できる可能性が示された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：生薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：漢方方剤、生薬、生活習慣病、動脈硬化症、核内受容体、レチノイン酸受容体、レチノイド X 受容体、PPARs

## 1. 研究開始当初の背景

肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧症やこれらのリスクファクターの集簇によって起こる心血管疾患は、現在我が国において大きな医療問題になっている。メタボリックシンドロームに分類される人々は、心筋梗塞をはじめとした動脈硬化疾患の危険性が極めて高く、積極的な医療介入は緊急の課題である。

メタボリックシンドロームの治療は生活習慣の改善が第一であるが、薬物による総合的な予防・治療も重要である。しかし、薬物による予防・治療には、長期間の投薬が余儀

なくされるので、安全性の高い、副作用を持たない多様な薬物の開発が必要である。これまでに、メタボリックシンドロームの最も初期の原因とされている肥満、それに引き続く、インスリン抵抗性に対する治療薬の開発が精力的に行われてきた。しかし、最終的にはそれらは重篤な副作用を示す可能性があるために、臨床現場での使用、あるいは、開発が中止されている。このような状況下で、多くの患者が抱えるメタボリックシンドロームの病態の改善、心血管障害の予防・治療に有効な薬物の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームは漢方医学の観点から考えると、複数の原因から構成される未だ病にならざる「未病」に相当する。すなわち、この様な病態を改善する薬物として、漢方方剤は非常に適しており、第一の候補と考えられる。しかし、臨床現場で使用されている漢方方剤は漢方医学の理論に基づいて作製されたものであり、科学的理論に基づいた漢方方剤の効果、作用機序の理解が必要である。さらに、発症機序が複雑な慢性疾患が増える中で、単剤の合成医薬品による治療には限界があり、漢方方剤を代表とする複合製剤の有効性に注目が集まっている。そこで、本研究では、メタボリックシンドロームが惹起する心血管疾患の予防・治療をめざし、動脈硬化発症・進展に密接に関連しているマクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞などの細胞群の各種機能を修飾・調節できる作用を持った生薬を網羅的に探索し、得られた科学的エビデンスに基づき生薬を組み合わせることにより新規漢方方剤の創製を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 核内受容体(レチノイン酸受容体 RAR、レチノイド X 受容体 RXR、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 PPAR、その他)リガンド活性を示す生薬、および、その有効成分を酵母 Two hybrid 法およびルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて探索した。  
(2) 血管平滑筋細胞の増殖を選択的に抑制する生薬、および、その有効成分を細胞培養系を用いて探索した。  
(3) 一酸化窒素産生促進作用を有する生薬を血管内皮細胞を使用して探索した。  
(4) エストロゲン作用を有する生薬をルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いて探索した。  
(5) C57BL/6j マウスの左頸動脈を結紮した動脈硬化モデルマウスを作製し、新規漢方方剤の病変形成に及ぼす効果を調べることにより動脈硬化症に及ぼす効果を検討した。  
(6) (1)~(4)において活性を示した生薬より、天然物化学の手法により有効成分を単離し、機器分析装置を使用した定法により構造決定をした。

## 4. 研究成果

(1) 95 種類の生薬エキスをスクリーニングにかけた結果、RAR リガンド活性を持つ生薬として、ソウジュツ、ガイヨウ、コウカ、サイシン、チンピを同定した。そして、ソウジュツより RAR リガンドとしてアトラクチロジノールを単離同定した。*All-trans* レチノイン酸の皮膚・肝毒性、催奇形性、高脂血症、レチノイン酸シンドロームなどの副作用を持たない RAR リガンドとして、*all-trans* レ

チノイン酸をリード化合物として多くの誘導体が合成されているが、未だ有効性が確立されたものはない。また、*all-trans* レチノイン酸以外の天然由来 RAR リガンドは殆ど知られておらず、今回見出した化合物の RAR 活性化の詳細な機序解析が望まれる。

(2) RXR リガンド活性を持つ生薬としてコウボクを同定した。そして、コウボクより RXR リガンドとしてホーノキオール、マグノロールを単離同定した。天然由来 RXR は 9-*cis*-レチノイン酸の他に、フィト酸、ドコサヘキサンエン酸が報告されているが、その転写活性化能についての詳細な検討はされておらず、ホーノキオールのような有用性が見出された化合物は知られていない。さらに、ホーノキオールが RXR リガンドとして、核内受容体を活性化する機序を詳細に検討した所、ホーノキオールは、RXR/LXR、RXR/PPARs を単独で活性化できること、RXR/RAR は RAR リガンドの存在下で、相乗的に活性化できることを見出した。

(3) ホーノキオールはマクロファージの ATP-binding cassette transporter A1、および、アポ E の mRNA 発現を増加させ、さらに、アポ A<sub>1</sub> によるマクロファージからの<sup>3</sup>H コレステロールの引き抜きを増加させた。これらの作用から、ホーノキオールは粥状動脈硬化病変形成の初期段階の病変として知られている大動脈内皮下に浸入したマクロファージの酸化 LDL の過剰取り込みによる泡沫化を抑制する可能性が示唆された。今後、核内受容体の活性化調節作用を詳細に調べることにより、代謝性疾患の予防・治療薬の候補になると考えられる。

(4) PPAR $\gamma$  リガンド活性を持つ生薬として、ヨクイニン、インチンコウ、キクカ、ケイガイを同定した。そして、インチンコウより PPAR $\gamma$  リガンドとして数種類の水酸化不飽和脂肪酸を単離し、その中で、9-hydroxy-(10*E*,12*D*)-octadecadienoic acid に最も強い活性を見出した。本化合物の立体構造異性体がほ乳類細胞内で PPAR $\gamma$  を活性化することにより抗炎症作用を示すことが報告されており、本化合物の薬理作用のさらなる解析が望まれる。さらに、ヨクイニンより数種類の水酸化モノ不飽和脂肪酸を単離同定し、それらは PPAR $\gamma$  リガンドとしてだけでなく、PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  に対してパンアゴニストとして作用することが明らかになった。本来、モノ不飽和脂肪酸は、PPARs のリガンド活性は全く示さないにも拘わらず、それらが水酸化されることにより、かなり強い PPAR リガンド活性を示すようになるという大変興味深い現象を見出した。今後、これらの *in vivo* にお

けるインスリン抵抗性の改善作用、肥満予防作用について調べる必要がある。

(5) これまで当研究室では、オウレンに平滑筋細胞選択的細胞増殖抑制活性を見出し、その有効成分としてアルカロイドのコパチシンを単離同定し、その詳細な機序を解析している。さらに、植物エストロゲン活性を示す生薬としてカンゾウを同定している。この様にこれまでに当研究室で得られている結果、および、今回得られた結果に基づき、動脈硬化の発症に関与する細胞群の機能を調節する作用を持つ生薬として、オウレン、コウボク、ソウジュツ、ヨクイニン、チンピ、コウカ、インチンコウ、カンゾウ、ショウキョウを選別した。そして、これらの生薬を基本に、様々な組合せを考え、オウレン(2g)、コウボク(8g)、ソウジュツ(6g)、チンピ(4g)、コウカ(2g)、ヨクイニン(10g)、カンゾウ(2.5g)、タイソウ(6g)、ショウキョウ(2g)、よりなる新規漢方方剤を作り出した。

本新規漢方方剤を左頸動脈結紮動脈硬化モデルマウスに投与し、動脈硬化病変形成に及ぼす効果を組織学的に検討した。その結果、頸動脈の(新生内膜+中膜)/血管面積比を減少させる作用が観察された。今後、さらに、構成生薬の検討、用量の検討、各種動脈硬化モデル動物での検討を加えることで、動脈硬化の予防・治療に有用な漢方方剤が創製できると考える。

#### 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2件)

1. Hiroshi Yokoi, Hajime Mizukami, Akito Nagatsu, Takamasa Ohno, Hiroki Tanabe, Makoto Inoue. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands isolated from Adlay seed (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* STAPP.). Biol. Pharm. Bull. (査読有り), 32(4), 735-740 (2009).
2. Akira Matsumoto, Hajime Mizukami, Satoshi Mizuno, Keizo Umegaki, Jun-ichi Nishikawa, Koichi Shudo, Hiroyuki Kagechika, Makoto Inoue.  $\beta$ -Cryptoxanthin a novel RAR ligand, induced ATP-binding cassette transporters in macrophages. Biochem. Pharmacol. (査読有り), 74(2), 256-264 (2007).

[学会発表](計6件)

1. 井上 誠: Coptisine の平滑筋細胞選択的増殖抑制活性の機序解析(4)、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 平成 20

年 12 月 13 日(神戸)

2. 井上 誠: 天然由来 RXR リガンドによる核内受容体の機能調節作用、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 平成 20 年 12 月 12 日(神戸)
3. 井上 誠: Coptisine の平滑筋細胞選択的増殖抑制活性の機序解析(3)、日本生薬学会第 55 回年会、平成 20 年 9 月 20 日(長崎)
4. 井上 誠: 漢方方剤成分による核内レセプターを介した慢性疾患の予防治療 第 25 回和漢医薬学会学術大会、平成 20 年 8 月 30 日(大阪)
5. 井上 誠: ヨクイニンに含まれる PPAR リガンドの探索、日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 27 日(横浜)
6. 井上 誠: 天然由来 RAR・RXR リガンドによるマクロファージ ABCA1 の発現誘導、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、平成 19 年 12 月 12 日(横浜)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: レチノイン酸受容体アゴニスト剤、レチノイン酸受容体アゴニスト剤を含有する食品、生薬又はその抽出物の使用、レチノイドX受容体アゴニスト剤、レチノイドX受容体アゴニスト剤を含有する食品及びコウボク又はその抽出物の使用

発明者: 井上 誠、小谷仁司、水上 元

権利者: 井上 誠

種類: 特許権

番号: 2007-189528

出願年月日: 2007 年 7 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: 細胞選択的セレクトイブPPAR $\gamma$ モジュレーター

発明者: 井上 誠、大野高政、田邊宏樹、高橋二郎、大木史郎、山下栄次、西田光徳

権利者: 井上 誠、大野高政、田邊宏樹、高橋二郎、大木史郎、山下栄次、西田光徳

種類: 特許権

番号: 2008-58065

出願年月日: 2008 年 3 月 7 日

国内外の別: 国内

[その他]

1. 井上 誠: 薬事日報、科学的証拠に基づいた動脈硬化治療の新規漢方方剤の

開発、2008年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 誠 (INOUE MAKOTO)  
愛知学院大学・薬学部・教授  
研究者番号：50191888

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

大野 高政 (OHNO TAKAMASA)  
愛知学院大学・薬学部・講師  
研究者番号：80345777  
田邊 宏樹 (TANABE HIROKI)  
愛知学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：10415606  
水上 元 (MIZUKAMI HAJIME)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：30128219