

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16395

研究課題名(和文)漢方薬で糖尿病性サルコペニアを予防する～漢方薬による筋萎縮抑制作用の検討～

研究課題名(英文)Prevention of diabetic sarcopenia using traditional Herbal medicine

研究代表者

石田 智晃(Ishida, Tomoaki)

高知大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：90792010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性サルコペニア治療薬となり得る漢方処方を選抜するために、*in vitro*試験を用いてSirtuin1(Sirt1)転写活性を指標とした1次スクリーニングを実施し、さらに、選抜された漢方処方を糖尿病肥満モデルマウスであるKKAyマウスを用いて筋萎縮抑制効果について評価した。その結果、柴胡桂枝乾姜湯と十全大補湯に筋萎縮抑制効果があることが分かった。さらに、十全大補湯においては老化促進マウス(SAMP8)に対しても筋萎縮抑制効果を示した。以上のことから、柴胡桂枝乾姜湯及び十全大補湯に糖尿病性サルコペニアに対する予防効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、サルコペニアに対する有効な予防薬や治療薬は存在せず開発が急務となっている。

その中で、本研究では、漢方薬に筋萎縮抑制効果を見いだした。通常、新薬には長い開発期間を要するが、漢方薬は既に豊富な使用経験があり、臨床応用までの期間が短期で済む可能性が高い。また、漢方薬は複数の化合物が含有される多成分系であり、その中にはサルコペニア治療薬の候補となる未知化合物が含まれている可能性も多分にある。今後、漢方薬中に含まれる有効成分の同定を行うことで、サルコペニア治療の新薬として新薬開発にも貢献できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to find kampo medicines that could be a potential therapeutic agent for sarcopenia in diabetic patients. First, a primary screening was conducted using *in vitro* assays with Sirtuin1 (Sirt1) transcriptional activity in C2C12 cells. Next, the selected herbal medicines were evaluated effect on muscle atrophy using KKAy mice, a diabetic-obese model mouse. As a result, it was found that saikokeishikankyoto and jumentaihoto alleviates muscle atrophy in KKAy mice. Furthermore, jumentaihoto also alleviated an inhibitory effect on muscle atrophy in senescence-accelerated mice (SAMP8). These results suggest that saikokeishikankyoto and jumentaihoto may have preventive effects against sarcopenia in diabetic patients.

研究分野：医療薬学

キーワード：漢方薬 KKAy SAMP8 十全大補湯 柴胡桂枝乾姜湯 糖尿病 サルコペニア 筋萎縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは運動機能を低下させるだけでなく転倒、骨折のリスクを上げ、要介護状態への移行、生活の質の低下につながる。サルコペニアは特に糖尿病患者において発症リスクが高く、予防的治療の確立が求められるが、有効な予防薬や治療薬は存在せず開発が急務となっている。予防治療を開発するにあたり、糖尿病患者の多くは腎機能障害を併発する症例が多く、医薬品の使用に制限が出ることに気づいた。そこで、以下に述べる漢方薬の特性を活かして漢方薬を予防治療に使用しようと考えた。漢方薬は腎機能による投与量の制限がなく使用でき、予防的な長期運用も可能である。また、一般用医薬品として販売されており、未病の段階でセルフメディケーションを目的とした使用が可能である。また、漢方薬は複数の化合物が含有される多成分系であり、その中にはサルコペニア治療薬の候補となる未知化合物が含まれている可能性もある。そのため、漢方薬中に含まれる有効成分の同定を行うことで、サルコペニア治療の新薬として漢方薬自体のエビデンス構築だけでなく新薬開発にも貢献できる。

### 2. 研究の目的

本研究は漢方薬を用いて糖尿病患者、糖尿病予備軍に対するサルコペニア予防治療薬を開発することを最終目標としている。そのために先ず、スクリーニング系を用いて糖尿病性サルコペニア予防に利用できる処方を選抜することをめざした。また、本研究ではさらに、選抜された漢方薬に含まれる薬理活性成分の同定を目指した実験を行い、サルコペニア治療の新薬候補になる成分を見出すための検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### <概要>

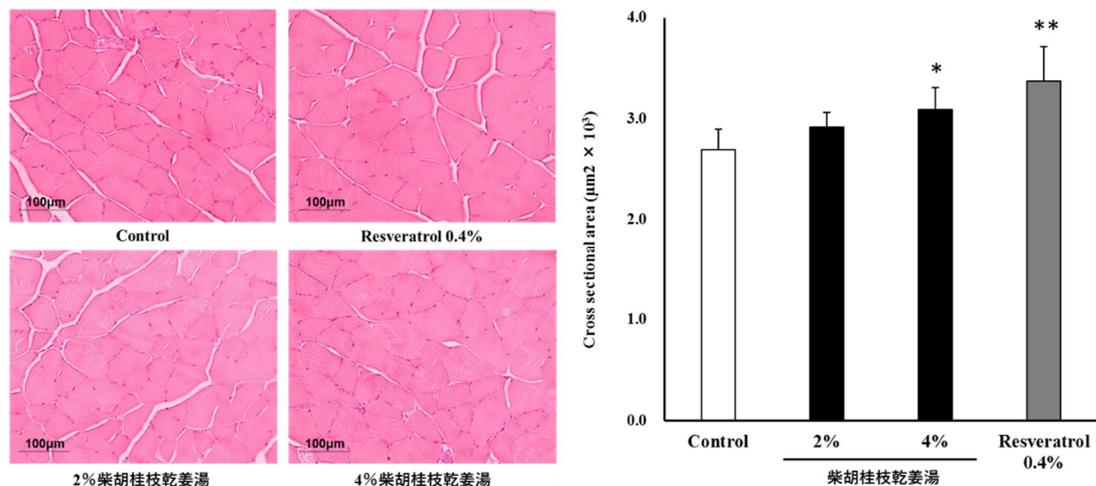
先ず、糖尿病性サルコペニア治療薬となり得る漢方処方を選抜するために、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞における Sirtuin1(Sirt1)転写活性を指標とした 1 次スクリーニングを実施した。Sirt1 は、インスリン感受性、炎症、酸化ストレスを改善することが知られており、糖尿病性サルコペニアの治療標的になり得ると考えた。次に、糖尿病肥満モデルマウスである KKAY マウスに対して、スクリーニングにおいて見いだされた漢方処方を予防的に投与し、筋萎縮抑制効果について検討した。さらに、モデルマウスに対して筋萎縮抑制作用が確認された漢方処方について Sirt1 転写活性を指標として、有効成分の探索を行った。

**細胞実験：**62 種類の漢方薬の熱水抽出物のメタノール可溶部を使用した。マウス骨格筋由来 C2C12 細胞に pCMV-LacZ、pTA Luc-Sirt1-promoter を導入し、24 時間後、62 種類の漢方エキスを混合した培地に交換した。12 時間反応させ、細胞を回収後、ルシフェリンの蛍光量を測定して Sirt1 の転写量を測定した。また、pCMV-LacZ により産生された  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を内部標準として用いた。

**動物実験：**KKAY マウスに通常餌 (CE-2) 又は 2%、4% (w/w) 柴胡桂枝乾姜湯混合餌を、42 日間投与した。また、陽性対照群には 0.4% (w/w) レスバトール混合餌を与えた。SKK 投与開始日から 42 日目に下大静脈より全血液を採取し、ELISA 法にて血中の炎症性サイトカインである TNF を測定した。また、腓腹筋を摘出し、10%ホルマリンで固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い筋線維の断面積を計測した。さらに、腓腹筋から全 RNA を採取し、定量 PCR 法にて Sirt1、MuRF1、Atrogin1 の mRNA 発現量を比較した。

### 4. 研究成果

Sirt1 転写活性を指標とした1次スクリーニングの結果、62種類の漢方薬の中で柴胡桂枝乾姜湯が Sirt1 の転写活性を最も強く誘導することが明らかになった。さらに、KKAy マウスに柴胡桂枝乾姜湯を投与することにより、骨格筋の萎縮が抑制され、Sirt1 の mRNA の発現が増加された。また、柴胡桂枝乾姜湯の投与により、炎症性サイトカイン TNF の発現が抑制され、ユビキチンリガーゼである MuRF1、Atrogin1 の mRNA の発現が減少した。



図：KKAy マウスの腓腹筋における筋繊維断面積に対する柴胡桂枝乾姜湯の筋萎縮抑制効果

また、我々は過去に1型糖尿病モデルマウスに対する十全大補湯の筋萎縮抑制効果を報告しているが、こちらも同様に KKAy マウスに投与したところ、筋萎縮抑制効果と Sirt1 の mRNA 発現量上昇が確認された。さらに、十全大補湯においては老化促進マウス (SAMP8) に対しても筋萎縮抑制効果を示した。

加齢、糖尿病における筋萎縮の原因の一つとして、炎症性サイトカインの発現増加とそれに伴う酸化ストレスの増加、ユビキチンリガーゼの増加が挙げられる (J Mol Med (Berl). 2008; 86, 1113-1126)。一方、Sirt1 は、TNF などの炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗酸化酵素の発現を増加させ、ユビキチンリガーゼの産生を抑制し、骨格筋の萎縮を抑制することが知られている (J Biol Chem. 2013; 288, 30515-30526)。本研究では、柴胡桂枝乾姜湯及び十全大補湯が腓腹筋の Sirt1 の発現を誘導する一方で、血中の炎症性サイトカイン及びユビキチンリガーゼの発現量を減少させたことから、これらの漢方処方 Sirt1 を介して筋萎縮抑制効果を示した可能性があると考えている。

また、柴胡桂枝乾姜湯及び十全大補湯における活性成分の同定を目指して、それぞれの処方を構成する生薬のエキスについて Sirt1 転写活性を指標として評価した結果、桂皮、甘草、黄ごん、黄耆において Sirt1 の転写を促進する作用があることが分かった。現在、これらの生薬に Sirt1 の発現を誘導する成分が含有される可能性があると考え、さらに検討を進めている。

以上の結果から、Sirt1 の発現量を指標としたスクリーニングにより、柴胡桂枝乾姜湯及び十全大補湯に糖尿病性サルコペニアに対する予防効果があることが示唆された。今後、さらに研究を進め、サルコペニア治療のための漢方薬のエビデンスの蓄積が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Morita Yasuyo, Ishida Tomoaki, Morisawa Shumpei, Jobu Kohei, Ou Yanglan, Fujita Hiroko, Hanazaki Kazuhiro, Miyamura Mitsuhiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Juzentaihoto Suppresses Muscle Atrophy and Decreased Motor Function in SAMP8 Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 32 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ou Yanglan, Jobu Kohei, Ishida Tomoaki, Morisawa Shumpei, Fujita Hiroko, Kawada Kei, Yoshioka Saburo, Miyamura Mitsuhiro	4. 巻 76
2. 論文標題 Saikokeishikankyoto extract alleviates muscle atrophy in KKAY mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 379 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-021-01590-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Tomoaki, Jobu Kohei, Morisawa Sumpei, Kawada Kei, Yoshioka Saburo, Miyamura Mitsuhiro	4. 巻 in press
2. 論文標題 Juzentaihoto suppresses muscle atrophy in KKAY mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田靖代, 石田智滉, 森沢惇平, Yanglan Ou, 川添哲嗣, 川田敬, 藤田博子, 常風興平, 門田亜紀, 宮村充彦
2. 発表標題 フレイル予防に有用な天然資源由来物質の探索 (第10報), - 十全大補湯エキスによる加齢性骨格筋萎縮予防効果の検討 -
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yanglan Ou , 石田智滉, 石田七生, 川添哲嗣, 川田敬, 森沢惇平, 飯塚美知郎, 藤田博子, 常風興平, 森田靖代, 宮村充彦
2. 発表標題 フレイル予防に有用な天然資源由来物質の探索 (第8報) - 糖尿病性肥満マウスに対する柴胡桂枝乾姜湯エキス の骨格筋萎縮予防効果 -
3. 学会等名 第59日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田靖代, 石田智滉, 森沢惇平, Yanglan Ou, 川添哲嗣, 川田敬, 藤田博子, 門田亜紀, 常風興平, 宮村充彦
2. 発表標題 フレイル予防に有用な天然資源由来物質の探索 (第9報) - 老化促進マウスを用いた十全大補湯エキス の骨格筋萎縮予防効果の検討 -
3. 学会等名 第59日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yanglan Ou, 石田智滉, 森沢惇平, 飯塚美知郎, 藤田博子, 門田亜紀, 常風興平, 森田靖代, 宮村充彦
2. 発表標題 フレイル予防に有用な天然資源由来物質の探索 (第6報) - 糖尿病性サルコペニアに対する補剤による予防・治療法の検討 -
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮村充彦, 常風興平, 石田智滉, 藤田博子, 森沢惇平
2. 発表標題 サルコペニアモデルマウスに対する漢方薬の改善効果
3. 学会等名 第31回 外科漢方フォーラム学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アンチエイジング剤	発明者 石田智晃、森田靖 代、常風興平、宮村 充彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-181364	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 協力者	川田 敬  (Kawada Kei)	高知大学・医学部附属病院・薬剤師  (16401)	
連携 研究者	常風 興平  (Jobu Kohei)  (70635250)	高知大学・医学部附属病院・薬剤師  (16401)	
連携 研究者	宮村 充彦  (Miyamura Mitsuhiko)  (70464378)	高知大学・教育研究部医学系臨床医学部門・教授  (16401)	

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
---------	---------