

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590657

研究課題名（和文）防風通聖散および大柴胡湯の肝発癌・肝線維化抑制効果の研究

研究課題名（英文）Both Herbal medicine Bofu-tsusho-san (TJ-62) and Dai-saiko-to (TJ-8) prevent liver fibrosis and hepatocarcinogenesis in rat liver cirrhosis.

研究代表者

内田 耕一 (UCHIDA KOUICHI)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80397992

研究成果の概要（和文）：防風通聖散（TJ-62）の非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）に対する治療効果の検討のため、ラットコリン欠 TJ-62 投与群は肝線維化および、肝発癌を有意に改善した。またマクロファージ系のサイトカインの抑制が認められた。これより、TJ-62 はマクロファージを介した間接的な肝線維化抑制効果をもつことが示唆された。また大柴胡湯（TJ-8）についても同様の実験を行い、肝線維化及び肝発癌抑制効果を持つことを実証した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate whether both Dai-saiko-to (TJ-8) and Bofu-tsusho-san (TJ-62) have any influence on the development of preneoplastic lesions as well as liver fibrosis.

*Results:* After 12 weeks, both TJ-8 and TJ-62 prevented fibrosis in a dose-dependent manner by Azan, Sirius Red,  $\alpha$ SMA expression ( $p < 0.05$ ). Hydroxyproline level in liver was decreased (mean value: CDAA+TJ-8 6.3 vs CDAA only 13.4  $\mu\text{mol/Wg}$   $P < 0.05$ . CDAA+TJ62 3.9 vs CDAA only 13.4  $\mu\text{mol/Wg}$   $P < 0.05$ ). And administration of TJ-62 also significantly reduced serum alanine aminotransferase (AST) (mean value: CDAA+TJ62 381.6 vs CDAA only 548.0 IU/l  $P < 0.01$ ). With 2-week experiment, administration of TJ-8 and TJ-62 significantly decreased invasion of inflammatory cells in liver lobule.

*Conclusion:* Our results indicate that Both Herbal medicine decreased liver fibrosis and preneoplastic lesions. The inflammation of liver was also improved. These results suggested that both agent will be a new candidate drug for liver fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：漢方薬、非アルコール性脂肪肝炎、肝線維化。

## 1. 研究開始当初の背景

近年生活様式の欧米化に伴い、生活習慣病が増加し、肥満が問題視されている。さらに、肥満に高頻度に合併する**脂肪肝特に非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)**は肝線維化、肝硬変の原因として注目され、NASHからの肝発癌も報告されている。近年肥満改善薬として漢方薬である**防風通聖散(TJ-62)**が注目され始めている。臨床的にも脂肪肝を改善することが報告されているが詳細なメカニズムについてはわかっていない。

これらの臨床効果に対して個々の生薬効果を、ラット、マウスに比べ薬剤のスクリーニングに適しているメダカを用いた脂肪肝モデルを用いて検討したい。これにより生薬の組み合わせを検討し、あらたにNASHに効果のある薬剤の開発が可能であると考えます。

## 2. 研究の目的

近年肥満改善薬として漢方薬である**防風通聖散(TJ-62)**が注目され始めている。多くの基礎研究から褐色脂肪細胞の機能低下が肥満の成因の一つとされているが、防風通聖散はこの褐色脂肪組織での熱産生を促進して体脂肪を低下させ肥満を改善すると考えられている。また、臨床的にも脂肪肝を改善することが報告されているが詳細なメカニズムについてはわかっていない。

以上より、脂肪肝、NASHのメカニズムの解明および、防風通聖散の脂肪肝改善の詳細な解明を行うため、本申請期間中に防風通聖散の各生薬における肝脂肪化抑制についてまず検討する。そして作用の強いものからそのメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

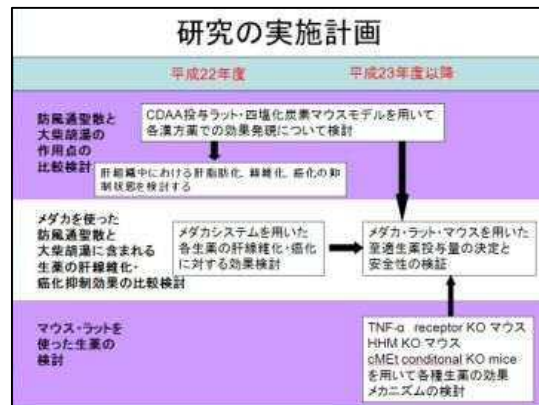
(平成22年度)

防風通聖散の効果検討：ラット脂肪肝モデルを用いて、防風通聖散の効果を検証する。実験1.ラット脂肪肝モデルを用いて防風通聖散の脂肪化抑制効果を検討する。実験2.防風通聖散の効果検討2：cMet conditional KOマウスでの防風通聖散の肝脂肪化、肝線維化、発癌の阻害効果について

(平成23年度)

計画1：防風通聖散と大柴胡湯の作用点の比較検討 肝線維化・発癌モデルである高脂

肪食モデル・コリン欠乏食 CDAA 投与ラットに対して防風通聖散・大柴胡湯投与を行った肝臓を用いて検討する。組織学的に肝線維化が両群において抑制され、前癌性病変の発生が抑制されていた。これらのサンプルを用いて DNA Chip を利用し、両群における遺伝子発現の動態について検討する。さらに Protein assay を用いてサイトカインの発現について検討している。これらのデータをも



とに漢方薬の効果発現にどのような因子が関連しているかを検討する。特にこれまでのデータでは、免疫系に関連するマクロファージや筋線維芽細胞(肝星細胞)関連サイトカインが発現している知見が得られている。こうした漢方薬と肝類洞壁細胞との関連を検討するため、個々の生薬の肝臓での発現についても検討する予定である。

計画2：メダカを使った生薬の評価

肝臓に特異的生薬の発現量が多い場合、その生薬が key drug になる可能性が高いため、その生薬を用いてさらに作用機序について検討するため、当科で行っているメダカを使ったスクリーニングテストを行う予定である。メダカに対して高脂肪食やコリン欠乏食(CDAA)を投与すると通常4週目から脂肪化が始まっている。計画1において得られた、防風通聖散あるいは大柴胡湯の構成生薬のうち、肝線維化・発癌抑制効果の可能性のあるものを検討する。その上で生薬を単独あるいは複合配合し、多数のメダカで脂肪化抑制効果がどのようにおこってくるのかを検討する。メダカはランニングコストが安く、スペース的に小さいため一度に多種の実験系が組めること、また匹数のコントロールを行いやすいというメリットがある。またラット、マウスに比し早期に脂肪化し易いため、評価をする時間が短いという最大メリットがある。組織学的検討が終了後抗脂肪化効果・抗線維化効果の最も有意に改善した組み合わせ

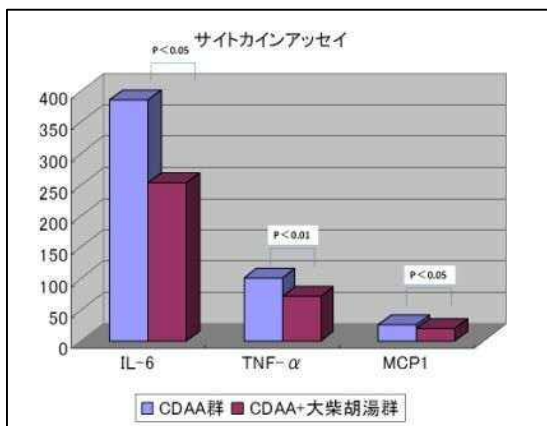
せについて DNA-Chip による遺伝子群の解析を行い検討する予定である。

(平成24年度)

ラット、マウスを用いた脂肪肝抑制効果、安全性の確認。

#### 4. 研究成果

NASH モデルであるコリン欠乏食(CDAA)誘発肝硬変ラットに防風通聖散または大柴胡湯を投与し、それらの肝線維化抑制効果及び前癌性病変の発生について検討した。全ての群に CDAA 食を 12 週間投与し、防風通聖散投与群、大柴胡湯投与群、コントロール群の 3 群にわけた。投与 12 週後に犠牲死させ、サンプリングを行った。Azan 染色、Sirius red 染色ではコントロール群では完成した肝硬変像を認めたが、防風通聖散群、大柴胡湯群ではともに肝線維化が有意に抑制された。肝星細胞活性化のマーカーである  $\alpha$ SMA 染色ではコントロール群に比し両群で有意に抑制された。また前癌性病変である GSTP 染色では大柴胡湯群において有意に低下が認められ、防風通聖散群でも低下傾向を認めた。血液生化学的検査では両群ともにアルブミン、総ビリルビン、AST、ALT、ヒアルロン酸の有意な改善を認めた。DNA チップを用いた肝組織中の遺伝子の発現ではコラーゲン 1、TGF- $\beta$ 、TIMP-1 がコントロール群に比し両群において有意に低下した。またサイトカインアッセイでは大柴胡湯群においてマクロファージ関連サイトカインの有意な抑制を認めた。防風通聖散および大柴胡湯は CDAA 投与ラット肝硬変モデルにおいて肝線維化を改善し、また前癌性病変発生を抑制した。今後 NASH に伴う肝線維化抑制の新しい治療薬となる可能性が示唆された。



#### 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)

[学会発表] (計 5 件)

①内田耕一、寺井崇二、岡本健志、橋本真一、坂井田 功 防風通聖散による NASH モデルにおける基礎的検討ならびに臨床的効果について 第 33 回日本肥満学会 2012 年 10 月 11 日 京都 ホテルグランピア京都

②内田耕一、寺井崇二、坂井田功 防風通聖散(TJ-62)は NASH に対するマクロファージ系の炎症制御効果を持つ治療薬になる 第 39 回日本肝臓学会西部会 2011 年 12 月 10 日 岡山 岡山コンベンションセンター

③内田耕一、寺井崇二、浦田洋平、在津潤一、岡本健志、橋本真一、桑代紳哉、大石俊之、松永尚治、坂井田 功 当科における肥満症患者に対する治療の取り組み 第 32 回日本肥満学会 2011 年 9 月 23 日 兵庫 淡路夢舞台国際会議場

④内田耕一、山本直樹、桑代紳哉、大石俊之、寺井崇二、坂井田功 漢方薬(防風通聖散・大柴胡湯)による肝脂肪化・肝線維化抑制効果について 第 31 回日本肥満学会 2010 年 10 月 1 日 群馬 前橋テルサ

⑤内田耕一、山本直樹、寺井崇二、桑代紳哉、大石俊之、山崎隆弘、坂井田功 防風通聖散・大柴胡湯によるコリン欠乏食誘発ラット肝硬変モデルにおける肝線維化抑制及び前癌性病変発生抑制効果についての検討 第 46 回日本肝臓学会総 2010 年 5 月 27 日 山形 ホテルメトロポリタン山形

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内田 耕一 (UCHIDA KOUICHI)  
山口大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80397992

##### (2) 研究分担者

寺井 崇二 (TERAI SYUJI)  
山口大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00332809

山本 直樹 (YAMAMOTO NAOKI)  
山口大学・大学教育機構・講師  
研究者番号：90448283

高見 太郎 (TAKAMI TARO)  
山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 60511251

飯塚 徳男 (IIZUKA NORIO)  
山口大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号 : 80332807

坂井田 功 (SAKAIDA ISAO)  
山口大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 80263763