

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590666

研究課題名(和文)漢方薬の分子基盤の構築と臨床応用

研究課題名(英文)Construction of molecular basis and clinical application of Kampo medicine

研究代表者

新井 信 (ARAI, Makoto)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30222722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ダイオウ含有培養液で寿命延長を認めた線虫を用い、未処理線虫との間でみられる遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析で検討し、ダイオウ投与で発現レベルが10倍以上変化した遺伝子を単離し(ダイオウ感受性遺伝子)、ヒトホモログが存在する6種類のヒト遺伝子を同定した(ダイオウ感受性ヒト遺伝子)。ダイオウ投与マウスの投与期間と発現レベルの変化をウエスタンブロットで検討し、2週間ダイオウ投与マウスでタンパク質発現変化を示す候補Nhe1遺伝子を同定できた。また、ダイオウを動物実験に用いるため、瀉下作用を有するセンノシドのみを減じ、他の主要成分をほとんど保持した減センノシドダイオウを調製する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Kampo crude drug, daio (Rhei rhizoma) is frequently used as a purgative for a long time. We previously reported the extending life span of nematode treated with daio, however, its biological response by administration of daio remains unclear. In this study, to clarify the molecular mechanisms on life extension by daio in nematode, we screened the genes upregulated by administration of daio using microarray analysis. We obtained six genes transcriptionally activated more than 10 times by daio and their mammalian homologues were characterized in mice. By 2-week oral administration, expression of Nhe1, one of the six candidate genes, in kidney was upregulated similarly to that in nematode. These findings suggest that the Nhe1 encoding Na⁺/H⁺ exchanger protein plays an important role in maintaining kidney structurally and functionally.

To use daio in animal experiments, we have also developed a method for preparing sennoside-reduced daio, which maintains most of other major components.

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：ダイオウ バイオマーカー 抗加齢 寿命延長 線虫 マウス センノシド

1. 研究開始当初の背景

漢方治療の役割は第一義的には自覚症状を改善することである。古来漢方では「腎虚」と呼ばれる加齢に伴う諸症状の概念や、不老延年を念頭においた「上薬」という薬物分類が確立されていることから、漢方治療の本質は健康を増進して天命を全うすることだと考えられる。しかし2000年以上の歴史を持つ漢方が現代医学の中に広まったのは最近わずか30年であるため、この本質の迫る研究はいまだ行われていない。

我々はまず寿命30日間の線虫 (*C. elegans*) を実験モデルとし、主な漢方薬および生薬について個々の寿命延長効果を網羅的に解析した。その結果、生薬として汎用されている大黃 (ダイオウ) にのみ線虫の寿命を延長させる効果が認められた (Yamaguchi *et al.*, 2008, <http://kampo.med.u-tokai.ac.jp/details/topix.htm> 参照)。そこで、線虫で寿命延長させたダイオウ薬効メカニズムが、ヒトと線虫とで高度に保存されているならば、ヒトでも線虫でも同様な薬理活性が発揮され、ヒトで確認されているダイオウ薬効の一部が線虫を用いた実験モデルで解明できるのではないかと考えた。さらに、今後ダイオウを人為的に調節するシステムを開発すれば、様々な臨床事例に展開できる可能性がある。しかし、ダイオウの瀉下作用の主要成分であるセンノシドには強い瀉下活性があり、ダイオウに瀉下活性以外の薬効を期待した場合、臨床現場では瀉下作用が障害となって十分量のダイオウを投与することができないことが多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、漢方薬による自覚症状の改善が健康増進に結びつくという概念の分子メカニズムを線虫およびマウスの基礎的研究により解明し、最終的には漢方薬の薬効発現予測に役立つ臨床で有用な新しい診断システムを確立することである。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレー解析によるダイオウ感受性遺伝子の単離

線虫寿命を延長させたダイオウ薬効メカニズムを解明するため、寿命延長したダイオウ投与線虫で引き起こされる遺伝子発現変化をマイクロアレー解析により検討し、ダイオウ投与線虫で発現誘導される遺伝子を網羅的にスクリーニングした。

(2) ダイオウ経口投与マウスを用いたダイオウ感受性遺伝子の発現解析

近交系マウスである成熟した C57BL/6J マウス (8-12 週齢) を用い、ダイオウ水溶液 (2-20 mg/ml) を2週間毎日1回経口投与した (最終投与量 160 mg/kg)。ダイオウ投与マウスより採材した臓器のうち、今回は特にダイオウ薬効を発揮する腎臓に着目し、マイクロアレーで明らかな発現レベルの上昇

が認められた6クローンのマウスホモログの発現動態について検討した。

(3) 減センノシド大黃の作製と瀉下作用調節の試み

ダイオウ中のセンノシドのみを選択的に減ずる方法として、オートクレーブ処理を検討した。ダイオウ末を0分 (コントロール)、20分、60分、120分間オートクレーブ処理 (121℃、加湿加圧条件) し、マウスに経口投与して瀉下作用を観察した。さらに、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) により各オートクレーブ処理ダイオウの試料分析を行った。続いて、センノシド含有量の低下を認めたダイオウ試料を C57BL/6J マウスに経口投与し、予め墨汁を含ませた砂糖水の腸管移動を指標としてオートクレーブ処理によるダイオウの瀉下作用調節について検討した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレー解析によるダイオウ感受性遺伝子の単離

マイクロアレー解析の結果を示す (図1)。ダイオウ投与した線虫を培養し、培養1日目で2倍以上発現増加した遺伝子 1185 クローン (図1、右上の領域) から、明らかに発現レベルが上昇しヒトおよびマウスのホモログ遺伝子の存在が確認できた6種類の遺伝子を単離することができた (表1)。

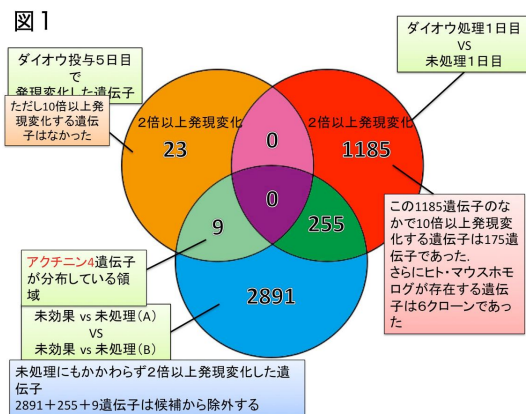


表1 ダイオウ感受性遺伝子 (線虫およびヒトホモログ)

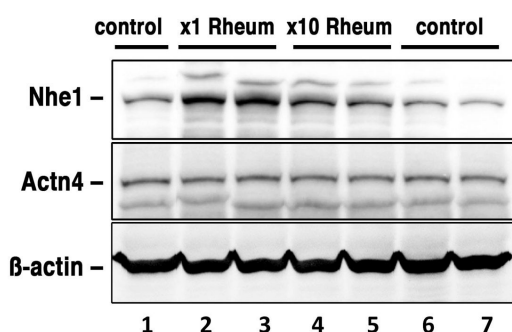
線虫遺伝子	ダイオウ投与の効果	ヒトホモログ	遺伝子機能
ced-4	発現レベル10倍上昇	CED4	Initiation of apoptosis
pbo-4	発現レベル11倍上昇	NHE	Na ⁺ /H ⁺ ion exchanger
ptr-17	発現レベル15倍上昇	PTCHD3	?
dlc-1	発現レベル16倍上昇	DNYL1	?
dpr-1	発現レベル17倍上昇	DPR1	?
ZK550.1	発現レベル25倍上昇	MBOAT1	O-acyl transferase

(2) ダイオウ経口投与マウスを用いたダイオウ感受性遺伝子の発現解析

ダイオウ投与マウス腎臓での Nhe1 タンパク質の発現レベルが高くなっていることをウエスタンブロット解析により明らかとした (図2)。2 mg/ml ダイオウ (x1 Rheum, lane

2 and 3) と 10 倍濃度の 20 mg/ml ダイオウ (x10 Rheum, lane 4 and 5) を比較すると、ダイオウ未投与群 (control, lane 1, 6 and 7) より Nhe1 発現レベルは両者とも増加しているものの、低濃度のダイオウ投与の Nhe1 発現レベルが高くなっていった。以上のことから、ダイオウの Nhe1 発現効果は促進・抑制の相反する 2 相性の動態を示す可能性とともに、ダイオウに含まれる遺伝子発現阻害効果が高濃度ダイオウで発揮された可能性が予想された。

図2 The Nhe1 protein upregulates in kidneys of the Rheum-administrated mice



(3) 減センノシド大黃の作製と瀉下作用調節の試み

HPLC の結果、20 分間オートクレーブ処理 (121 °C、加湿加圧条件) したダイオウにおいて、センノシド以外の成分を比較的保持しつつ、センノシド A および B を最も効率的に減ずることができた (表 2)。また、20 分間オートクレーブ処理したダイオウを用いて、マウスの腸管蠕動運動に及ぼす効果を検討したところ、作成した減センノシド大黃でマウスに対する瀉下効果が明らかに減弱することが示された。

表 2 オートクレーブ処理ダイオウの HPLC 分析結果

大黃 5 g 中の含量	control	20 min	60 min	120 min
1: (-)-catechin	55.0 mg	36.0 mg	17.0 mg	9.0 mg
2: (-)-epicatechin	19.3 mg	17.4 mg	10.0 mg	8.1 mg
3: sennoside B	1.4 mg	trace	trace	trace
4: (-)-epicatechin gallate	15.9 mg	14.0 mg	7.6 mg	5.2 mg
5: sennoside A	2.1 mg	trace	trace	trace
6: rhein	1.4 mg	1.4 mg	1.4 mg	1.4 mg
7: emodin	trace	trace	trace	trace

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

Oshima Y (3/3): Development of Diversity-enhanced Extracts of *Curcuma zedoaria* and Their Unprecedented Sesquiterpene-like Compounds. *Org Lett* 16: 1916-1919, 2014 査読有 DOI: 10.1021/o15004324
大島 吉輝 (2/2): 多様性拡大抽出物を

利用した天然化合物ライブラリーの構築. *MEDCHEM NEWS* 24(2): 45-51, 2014 査読有 (日本薬学会医薬化学部会発行)

Arai M (1/5), Arai K (2/5), Hioki C (3/5): Evaluation of Kampo education with a focus on the selected core concepts. *Tokai J Exp Clin Med* 38(1): 12-20, 2013 査読有

Arai M (1/7), Arai K (2/7), Hioki C (3/7): Evaluation of medical students using the "qi, blood, and fluid" system of Kampo medicine. *Tokai J Exp Clin Med* 38(1): 37-41, 2013 査読有

Kajiwara K (5/7): Selective over-expression of Comt in prefrontal cortex rescues schizophrenia-like phenotypes in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. *Transl Psychiatry* 2: e146, 2012 査読有

Ishii N (8/8): Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 5780-5787, 2012 査読有 DOI: 10.1167/iovs.12-9573

木村 穰 (5/5): シックハウス症候群スクリーニングを視野に入れたマウス・ラット眼球運動研究の応用. *臨床環境医学* 21: 1, 2012 査読有

Oshima Y (9/10): Labdane-type Diterpenes and Flavones from *Dodonaea viscosa*. *Fitoterapia* 83: 859-863, 2012 査読有

Oshima Y (9/9): Stigmastane Derivatives from the Roots of *Vernonia guineensis* and Their Antimicrobial Activity. *Phytochemistry Lett* 5: 596-599, 2012 査読有

Oshima Y (9/9): Phenolic Compounds and Terpenoids from *Hypericum lanceolatum*. *Rec Nat Prod* 6: 94-100, 2012 査読有

Kajiwara K (2/2): Pain Assessment for Designing a Painless Microneedle. *Cyber Therapy & Rehabilitation* 2: 38-39, 2011 査読有

Kimura M (1/4), Kajiwara K (4/4): Production Technique and Design for Painless Injection Needle.

International Conference on Micro-Manufacturing. *ICOMM*: 469-473, 2011 査読有

Ishii N (13/14): Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell Metabolism* 13: 505-516, 2011 査読有 DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.017

Ishii N (5/5): A mutation in a

mitochondrial dehydrogenase/reductase gene causes an increased sensitivity to oxidative stress and mitochondrial defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes to Cells* 16: 1022-1034, 2011 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01547
新井 信: 消化器疾患と漢方治療. 日本消化器病学会雑誌 107(10): 1577-1585, 2010 査読有
石井 直明: 線虫、*C. elegans* から始まった寿命決定の分子メカニズム研究. 放射線生物研究 45: 249-267, 2010 査読無
Oshima Y (5/5): Xanthenes and a Benzophenone from the Roots of *Pentadesma butyracea* and Their Antiproliferative Activity. *Phytochemistry Letters* 3: 104-107, 2010 査読有
Oshima Y (11/15): KSRP/FUBP2 is a Binding Protein of GO-Y086, a Cytotoxic Curcumin Analogue. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1: 273-276, 2010 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

梶原 景正(1/6)、石井 直明(4/6)、木村 穰(5/6)、新井 信(6/6): 線虫寿命モデルの網羅的解析を用いたダイオウ薬効に関わるヒト分子メカニズムの解明、第 30 回和漢医薬学会学術大会、2013 年 8 月 31 日、金沢
梶原 景正(2/3)、新井 信(3/3): 減センノシド大黃作成の試み、第 64 回日本東洋医学会学術総会、2013 年 6 月 2 日、鹿児島
石井 直明: 寿命決定のメカニズムを探る、日本コエンザイム Q 協会 2012 年度年会(招待講演)、2013 年 2 月 1 日、東京
Kajiwara K (1/4)、Kimura M (4/4): *Sez12*, the Murine Homolog of *DGCR2* Gene Laid within the Microdeletion of 22q11.2 Deletion Syndrome, Functions in the Endochondral Ossification, 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡
Arai M: Textbooks of traditional Japanese medicine ~ Attempt to standardization of Kampo medicine. ICOM 2012, 2012 年 9 月 15 日, Seoul, South Korea
梶原 景正(1/7)、木村 穰(5/7)、石井 直明(6/7)、新井 信(7/7): 線虫を用いたダイオウ薬効に関わるヒト分子メカニズムの網羅的解析、第 29 回和漢医薬学会学術大会、2012 年 9 月 2 日、東京
石井 直明: 分子生物学的見地からみた放射線(電離放射線)とその健康影響、第 21 回日本臨床環境医学会総会(招待講演)、2012 年 6 月 2 日、新潟

梶原 景正(1/3)、木村 穰(3/3): 顎顔面領域の形態形成に関わる *Dgcr2* ホモログ *Sez12* と *Tbx1* との比較解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、神奈川
石井 直明: 線虫はなぜ放射線に強いのか?、放射線影響学会第 54 回大会、2011 年 11 月 18 日、神戸
石井 直明: 加齢性疾患におけるミトコンドリアから生じる酸化ストレスの役割、分子生物学学会・生化学会合同学会、2010 年 12 月 10 日、神戸

〔図書〕(計 1 件)

石井 直明(執筆者 94 名)、老年医学系統講義テキスト、西村書店(編集 日本老年医学会)、2013 年、327 ページ (p.43-47 寿命遺伝子)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kampo.med.u-tokai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 信 (ARAI, Makoto)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 3 0 2 2 2 7 2 2

(2) 研究分担者

梶原 景正 (KAJIWARA, Kagemasa)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 0 0 2 0 4 3 9 7

石井 直明 (ISHII, Noaki)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 6 0 0 9 6 1 9 6

日置 智津子 (HIOKI, Chizuko)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 5 0 3 9 3 1 9 5

荒井 勝彦 (ARAI, Katsuhiko)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 6 0 4 3 9 7 3 4
(2010~2011)

大島 吉輝 (OSHIMA, Yoshiteru)
東北大学・薬学部・教授
研究者番号: 0 0 1 1 1 3 0 2

木村 穰 (KIMURA, Minoru)
東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

