

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590873

研究課題名(和文) リピドミクス解析による漢方薬の新しい脂質代謝制御活性の検出

研究課題名(英文) Detection of novel actions of kampo medicines for lipid metabolism by lipidomic analysis

研究代表者

渡辺 志朗 (Shiro, Watanabe)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：00222406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：防己黄耆湯(BOT)の投与はコール酸添加食によって誘導される肝傷害を軽減した。BOTの投与は肝臓におけるコレステロールエステルの増加には影響しなかったが、減少したトリグリセリド(TG)を有意に増加させた。またこのとき、一価不飽和脂肪酸(MUFA)含量の増加とステアリン酸CoA不飽和化酵素(SCD1)の発現量の上昇が伴っていた。以上の結果から、BOTによるコール酸誘発肝傷害の軽減には、肝臓でのSCD1によるMUFA合成とそれに起因するTG合成の増加が関わっていると示唆された。本研究は、リピドミクス解析が漢方薬の新しい脂質代謝制御活性を検出するのに有効な手法であることを示した初めての事例である。

研究成果の概要(英文)：The administration of Boiogito (BOT) was shown to ameliorate liver injury in the mice fed a cholate (CA)-supplemented diet. This effect was associated with a partial restoration of the reduction in liver triglyceride (TG) content. The levels of gene and protein of stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1) were lowered in the mice fed the CA-supplemented diet, which were elevated by BOT administration. These results suggest that the amelioration of CA-induced liver injury by BOT administration may be due to the restoration of reduced synthesis of liver TG through the facilitation of desaturation of saturated fatty acids, which is required in the efficient TG synthesis in liver. Alternatively, the reduction in liver TG levels might be a consequence of the amelioration of CA-induced liver injury by BOT administration. Thus, our lipidomic analysis revealed a novel mechanism involved in the modulation of lipid metabolism by a kampo medicine during bile acid-induced steatohepatitis in the mice.

研究分野：脂質生化学

科研費の分科・細目：内科系一系臨床医学・内科系一般

キーワード：胆汁酸 トリグリセリド 一価不飽和脂肪酸 ステアリン酸CoA不飽和化酵素1

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病治療薬としての漢方薬への期待がますます高まる一方で、その有効性の証明や、その作用機構の解明などの科学的解析が進んでいないのが現状である。漢方薬は複数の化合物から構成されるために、従来の単一成分の薬理作用を解析する手法では、漢方薬の薬効を検出したり、作用機序を解析したりすることが困難である。このことが、漢方薬の科学研究が遅れている理由の一つであろう。しかしながら、漢方薬の薬理活性を検出するに適した解析技術や理論が確立されることにより、これまでに未知であった漢方薬の新しい作用機構や作用点を見出すことにつながる。それにはこれまでに試されたことのない新しい手法を積極的に導入して、それが漢方薬の効果を検出するために有用であるか否かを検証する必要がある。

近年、アルコールの摂取とは無関係に起こる脂肪肝による肝炎(非アルコール性脂肪性肝炎:NASH)と診断される人が増えてきた。この疾患の背景には、肥満や糖尿病などの生活習慣病が深く関わっていることが明らかになってきた。すなわち、糖尿病や肥満に伴う脂質代謝異常が、脂肪肝を誘発し、それがNASHに至ると考えられている。最近我々は、胆汁酸であるコール酸およびそれを主成分とする牛由来胆汁をマウスに与えることによって誘導されるNASHモデルの血液および肝臓について、**リポドミクス解析**を行った。すなわち血液ならびに肝臓中の脂質成分に含まれる脂肪酸を網羅的に分析した。その結果、本モデルマウスの血液および肝臓中コレステロールエステル(ChoE)の濃度が著しく高くなっていることを見出した。さらにこの脂質成分に含まれるオレイン酸の割合が高くなっており、逆に飽和脂肪酸の割合が低くなっていることも明らかにした。

### 2. 研究の目的

われわれは生体試料中の脂質成分を網羅的に分析する“**リポドミクス解析**”が、漢方薬の脂質代謝制御活性を検出するために有効であると考えに至った。そこでマウスの胆汁酸誘導脂肪性肝炎モデルに対して、生活習慣病に有効と考えられている漢方薬を投与したときに起こる脂質成分の変化を、リポドミクス解析により調べることを目的として、本研究を計画した。漢方薬の投与により起こる有意な脂質成分の変化が見出されれば、それに関わる酵素やタンパク性因子の発現量ならびに活性の評価を行う。この一連の解析により、漢方薬の新しい脂質代謝制御活性の検出を目指した。陽性対照薬として、NASH やそれにおける脂質代謝異常に対する改善作用を示すと報告されているエイコサペンタエン酸(EPA)を使用した。

### 3. 研究の方法

6週齢の雌性ICRマウスに正常群として

高カロリー飼料(日本クレア社製 QuickFat ; 粗脂肪含量 13.6%、コレステロール含量 0.24%)を与える。一方、脂肪性肝炎群として上記飼料に 0.4%のコール酸ナトリウムを添加したものを与える。脂肪性肝炎群をそれぞれ6匹からなるコントロール群(薬物無添加)および防風通聖散、大柴胡湯および防己黄耆湯の低および高用量を添加した群、および2%のEPAを添加した群の4群に分割する。これらの漢方薬の影響は、陽性対照薬であるエイコサペンタエン酸エチルエステル(EPA)の影響と比較した。4週間後に麻酔下でマウスより血液および肝臓を採取した。血液はトランスアミナーゼ活性の測定およびリポドミクス解析に使用した。また肝臓は組織学的評価、炎症反応の評価、およびリポドミクス解析のために用いた。

### 4. 研究成果

研究計画初年度においては、各種漢方方剤のコール酸添加高脂肪食(CAHF食)によって誘導される肝傷害ならびに脂質代謝変動に及ぼす影響を明らかにするために陽性対照薬として用いるエイコサペンタエン酸(EPA)の影響を、予備的に評価することから開始した。EPAをCAHF食に添加してマウスに4週間に渡って与えたとき、予想したようにこのマウスに特徴的にみられるChoEの蓄積が明らかに抑制された。このときChoEには一価不飽和脂肪酸が最も大きく増加しており、それがEPAの投与によって軽減することを、リポドミクス解析より明らかにすることができた。しかしながら血清トランスアミナーゼ活性(図1)およびそれに伴う肝臓での炎症関連タンパク質のmRNAの発現量(図2)がむしろ増加していた。これを反映して、肝臓に白血球の浸潤が高頻度に見られた。したがって、CAH食によって誘導される肝臓への脂質蓄積を改善しても、肝傷害は軽減されないばかりか、むしろ悪化することが判明した。この研究結果は、J. Toxicol. Sci.に掲載した。これを受けて以後の研究では、各種漢方薬の影響をEPAの影響と比較しないこととした。

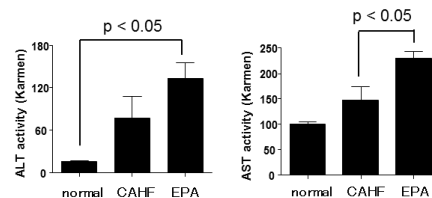


図1. 血清トランスアミナーゼ活性

次に防風通聖散(BTS)がCAHF食によって誘導される肝傷害ならびに脂質代謝変動に及ぼす影響を検討した。BTSの投与は肝臓の脂質組成にわずかな影響を及ぼしたものの、肝傷害の程度に対しても有意な影響を及ぼさなかった。第2年度においても、引き続き同肝傷害モデルに対する防己黄耆湯(BOT)の影響を検討した。その結果、肝傷害の指標である血清トランスアミナーゼ活性の上昇が

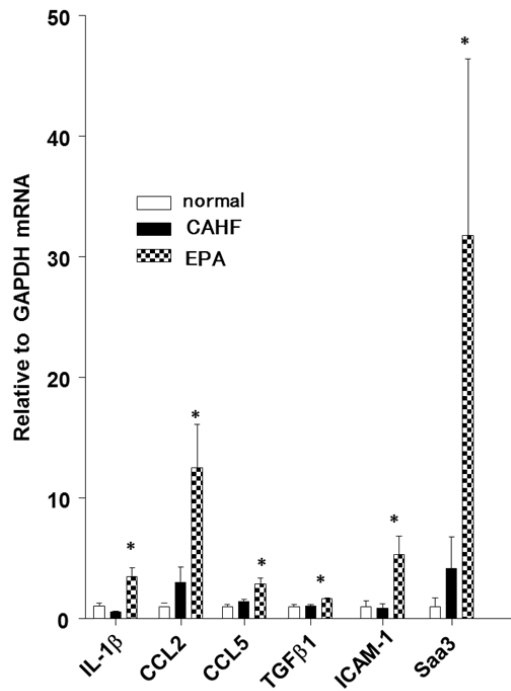


図2. 肝臓における炎症関連タンパク質の mRNA 発現量

有意に低下することが判明した。しかしながら、CAHF 食によって肝臓において増加した ChoE 含量に対しては、BOT は有意な影響を及ぼさなかった。このとき肝臓でのトリグリセリド濃度は、BOT の投与で増加する傾向にあることが観察された。以上のことから、CAHF 食によって誘導される肝傷害およびその BOT による改善には、ChoE の蓄積よりも TG 含量がより密接に関与するのではないかと考えた。そこでこのことに着目して、この年度において検討を続けた。

脂肪を添加していないコール酸のみを添加した飼料によっても、マウスにおいて肝傷害ならびにコレステロールエステルを主体とする肝臓への脂質蓄積が起こることがわかった。ただしこの条件では、肝臓におけるトリグリセリド(TG)含量が著しく低下していた。ちなみに以前用いていた CAHF 食では、肝臓中の TG 含量が低下しなかったのは、元来 CA によって低下していた TG が食餌由来の脂肪(牛脂)によって高くなっていったものと考えられる。結果として BOT の投与は、コール酸のみの添加によって誘導される肝傷害を軽減(図3)するとともに、肝臓でのケモカイン mRNA の上昇を有意に低下させることを明らかにした(図4)。さらにこの肝臓で著しく低下した TG 含量が、BOT の投与によって部分的に回復することもわかった(図5)。

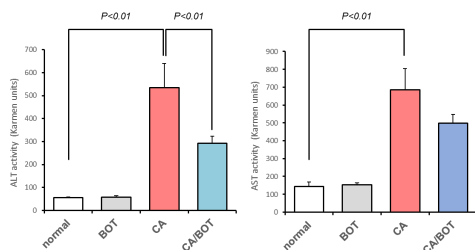


図3 血清トランスアミナーゼ活性

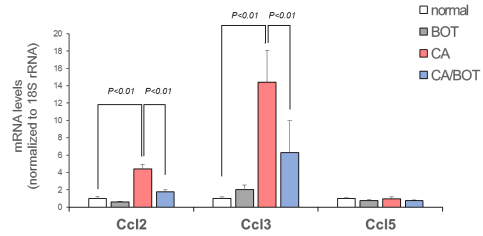


図4 ケモカイン mRNA 発現量

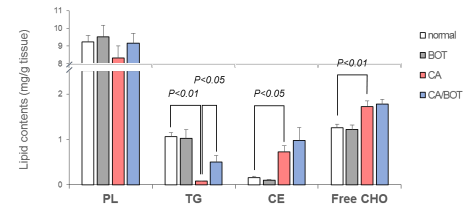


図5 肝臓の脂質含量

表1 肝臓 TG 中の脂肪酸構成

	normal	BOT	CA	CA/BOT
16:0	432.3±35.3	417.9±69.5	44.5±6.2	181.3±46.0
16:1n9	16.6±1.8	16.1±1.7	6.2±0.8	12.0±1.5
16:1n7	22.0±2.9	19.0±4.2	1.2±0.1	12.7±3.9
18:0	38.4±6.3	24.2±5.6	7.2±0.6	20.2±3.6
18:1n-9	294.4±31.2	234.6±53.8	11.6±3.1	139.2±44.5
18:1n-7	29.1±4.5	20.8±5.5	1.2±0.2	15.3±5.0
18:2n-6	226.7±19.2	295.0±58.8	8.0±2.3	120.4±40.1

またこれには一価不飽和脂肪酸の増加(表1)とステアリン酸 CoA 不飽和化酵素(SCD1)の mRNA ならびにタンパク質量の増加が伴っていた(図6, 7)。コール酸の投与によって、肝臓中の抱合型コール酸の含量が著しく増加していたが、これに対して BOT の投与は有意な影響を及ぼさなかった。以上の結果から、BOT によるコール酸誘発肝傷害の軽減には、肝臓での SCD1 を介する一価不飽和脂肪酸合成ならびにそれによる TG 合成の増加が関わっていると示唆された。また逆に肝臓でのこのような脂質代謝変動は、同肝傷害が BOT によって軽減された結果として起こっている可能性もある。一方当初の計画において本年度において検討する予定であった大柴胡湯のコール酸添加高脂肪食による肝傷害ならびに脂質レベルの変動に対する影響を検討した。しかしながら大柴胡湯の有意な影響は確認することはできなかった。

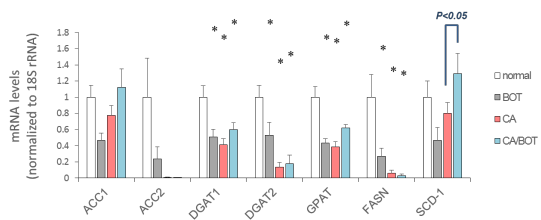


図6 肝臓中の脂肪合成に関わる遺伝子の発現量

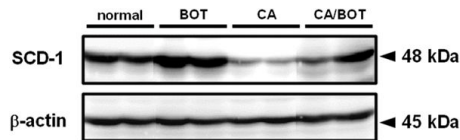


図7 肝臓中の SCD1 のタンパク質発現量

本研究において、漢方薬、特に BOT に胆汁酸誘発肝傷害に対する軽減効果を明らかにすることができた。またリポミクス解析を用いることによって、その漢方薬の特徴的な脂質代謝制御活性を示すことができた。すなわちこの研究計画における目標をほぼ達成できたといえる。

#### 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5件)

Yamawaki H., Mihara H., Suzuki N., Nishizono H., Uchida K., Watanabe S., Tominaga M., Sugiyama T.: Role of transient receptor potential vanilloid 4 activation in indomethacin-induced intestinal damage. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, doi: 10.1152/ajpgi.00105.2013. 査読あり

Watanabe S., Fujita K.: Pig bile reduces hepatic triglyceride content in mice. *J. Trad. Med.*, 30: 190-197, 2013. 査読あり

Watanabe S., Tsuneyama K.: Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate-supplemented high-fat diet. *J. Toxicol. Sci.* 38: 379-390, 2013. 査読あり

Watanabe S., Tsuneyama K.: Cattle bile but not bear bile or pig bile induces lipid profile changes and fatty liver injury in mice: mediation by cholic acid. *J. Toxicol. Sci.* 37: 105-121, 2012. 査読あり

Ishikawa H., Watanabe S. Cattle bile aggravates diclofenac sodium-induced small intestinal injury in mice. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, doi: 10.1155/2011/315858, 2011. 査読あり

[学会発表](計15件)

田中謙、李峰、渡辺志朗、川原信夫：ケイヒの LC-MS による網羅的成分分析と産地特有のマーカ化合物の同定。第 30 回和漢医薬学会学術大会，2013，8，31-9，1. 金沢。

牛一民、稲田千香子、趙キ、李峰、渡辺志朗、岡淳一郎、松本欣三：

Exogenous/endogenous substances detected in the plasma and brain after chitosan treatment in mice. 第 30 回和漢医薬学会学術大会，2013，8，31-9，1. 金沢。

田邊宏樹、水野弘樹、井上未央里、森智一、中島健一、渡辺志朗、林忠紘、中島賢治、和田篤敬、井上誠：加味四物湯のサルコペニア（筋肉減少症）改善作用の検討（2）第 30 回和漢医薬学会学術大会，2013，8，31-9，1. 金沢。

李峰、渡辺志朗、手塚康弘、田中謙：Phytochemical study on the root of *Dipsacus asper*, a Kampo medicine. 日本生薬学会第 59 回年会，2012，9，17-18，千葉。

渡辺志朗：コール酸/高脂肪添加食によって誘導される脂肪性肝炎様症状に及ぼすエイコサペンタエン酸の影響。日本脂質栄養学会第 21 回大会，2012，9，7-8，麻布。

渡辺志朗、李峰、米山惇志、湖間戸俊輔：豚胆の脂質低下作用。第 29 回和漢医薬学会学術大会，2012，9，-12，東京。

渡辺健一、石川千裕、桑原弘、佐藤公彦、小室勢津子、中川徹也、野村成章、矢吹昌司、渡辺志朗：A new methodology for simultaneous quantification of total-A<sub>x</sub>, A<sub>x-38</sub>, A<sub>x-40</sub>, and A<sub>x-42</sub> by column-switching-LC/MS/MS. 日本薬物動態学会第 27 回年会，2012，11，20-22，東京

Shiro Watanabe: Eicosapentaenoic acid supplementation attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury in mice fed a fat- and sodium cholate-supplemented diet in mice. The 1st International Conference on Pharma and Food, November 15-16, 2012, Shizuoka.

渡辺志朗：胆汁酸添加高脂肪食によって誘導される脂肪性肝炎様症状に及ぼすエイコサペンタエン酸の影響，胆汁酸研究会，2012，12，1，名古屋

渡辺志朗，常山幸一：牛胆は一価不飽和脂肪酸含有コレステロールエステルの優位な蓄積を伴う脂肪肝を誘導する、日本薬学会第 131 年会、2011、3、28-31、静岡。

澤田啓介、根橋佳奈、大藏直樹、渡辺志朗、厚味巖一：脂肪細胞でのトランス脂肪酸によるインスリン抵抗性に関する解析、日本薬学会第 131 年会、2011、3、28-31、静岡。

渡辺志朗、牛胆の投与によって誘導される脂肪性肝炎様症状に伴う脂質代謝変化の解析第 12 回 Pharmaco-hematology Symposium, 2011, 6, 20, 富山。

渡辺志朗、吉田康彦、湖間戸俊輔、浜田

雄大、常山幸一：エイコサペンタエン酸がコール酸添加高脂肪食により誘導される脂肪性肝炎様症状に及ぼす影響、第84回日本生化学会，2011，9，21-24，京都。

大嶋利之、澤田啓介、根橋佳奈、大蔵直樹、渡辺志朗、厚味巖一：トランス脂肪酸は脂肪細胞のインスリン応答性を低下させる、第84回日本生化学会，2011，9，21-24，京都。

渡辺志朗：牛胆によって誘導される脂質代謝変化と脂肪性肝炎様症状における胆汁酸の役割，第33回胆汁酸研究会，2011，11,17，大阪。

〔図書〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

渡辺 志朗 (WATANABE, Shiro)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授  
研究者番号：00222406

### (2)研究分担者

常山 幸一 (TSUNEYAMA, Koichi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授  
研究者番号：10293341

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：