

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390180

研究課題名(和文)性ホルモン作用に基づく漢方薬の作用機序解明：抗老化薬の開発へ向けて

研究課題名(英文) Investigation into functional mechanisms of herbal medicines with attention to sex hormonal effects - towards the development of anti-ageing drugs -

研究代表者

秋下 雅弘 (Akishita, Masahiro)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00261975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では性ホルモン様作用を有する漢方薬の成分を用いて血管、神経、乳癌、前立腺癌の細胞に対する作用を検討し、臓器別作用を網羅的に解析・分類した。具体的に、乳癌細胞ではエストロゲンと類似した細胞増殖能をもつ生薬成分と似た成分で分類できた。前立腺癌細胞ではテストステロンと類似した細胞増殖能をもつ成分はなかった。血管ではすべての生薬成分が平滑筋細胞の石灰化を性ホルモンと同様に抑制する効果があった。神経細胞ではginsenoside Rb1がアポトーシスによる細胞傷害を保護する作用があった。このような成果からホルモン補充療法の代替薬として新規薬剤の開発へつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, for a comprehensive understanding and classification of Kampo, we used components of Kampo with sex hormone-like actions and examined their effects on various tissues including vessel, neuron and cancer. In breast cancer cells, one component had proliferative actions like estrogen, whereas the others did not. All of components did not have proliferative actions, whereas testosterone had in prostate cancer cells. Furthermore, in vessel, calcification of smooth muscle cells were inhibited by all of components and this inhibition was also seen by both estrogen and testosterone. In neuronal cells, ginsenoside Rb1, especially had protective effects on apoptosis-induced cell damage. With these results, exploitation of novel medicine as a substitute of hormone replacement could be expected.

研究分野：老年医学

キーワード：東洋医学 エストロゲン アンドロゲン 老化

1. 研究開始当初の背景

老化現象の中でも性ホルモン分泌の加齢変化は顕著である。特に閉経後女性のエストロゲン分泌の枯渇は様々な疾患の誘因となる。男性では加齢に伴うアンドロゲンの低下が性欲低下・勃起障害のみならず肥満、高血圧、動脈硬化性疾患などの生活習慣病、骨粗鬆症や認知症などの老年疾患と関係し、さらにアンドロゲン濃度の低い高齢男性は早死にであるという疫学研究も相次ぎ (Arch Intern Med 2006, Circulation 2007, J Clin Endocrinol Metab 2008 など)、Late-onset hypogonadism (LOH) という疾患概念が提唱されている。女性でもアンドロゲンは生理的役割を有し、特に閉経後女性で意欲や認知機能の維持、生活習慣病に関係することがわかってきた。また、ホルモンと老年疾患との関係を説明する機序として、性ホルモンの抗老化作用が様々な研究で示されている。このような背景から、性ホルモンの加齢変化が老化、老年疾患と関係することは明らかであり、エストロゲンないしはアンドロゲンを用いたホルモン補充療法により老化、疾病さらには障害を防ぎ、健康長寿を達成できるかどうか注目されている。しかし、閉経後女性に対するエストロゲン療法の効果を検討した米国の大規模試験 Women's Health Initiative では、動脈硬化性疾患を抑えず、乳癌と認知症のリスクは増加することが示された。その後、閉経後早期のエストロゲン療法は冠動脈疾患の予防に効果があるかもしれないというサブ解析の結果が報告されたものの (JAMA 2007)、高齢女性に対するエストロゲン療法はやはり推奨されない。高齢男女に対するアンドロゲン補充療法については、研究代表者 (J Am Geriatr Soc 2010, Geriatr Gerontol Int 2010) らによる認知機能障害の改善効果など小規模研究の報告があるものの、大規模介入試験は行われていない。そもそも、アンドロゲンには優れた薬剤がなく、日本では数十年前に上梓されたテストステロン注射薬が一つあるのみである。このようなホルモン補充療法の現状から、その代替薬が求められている。一方、古来使われる生薬、特に漢方薬成分には性ホルモン様作用を有するものが多くあることからその代替薬として注目されている。しかし、他の多くの漢方薬と同様、その明確な作用機序はわかっていないのが現状である。

2. 研究の目的

性ホルモン様作用がある漢方生薬成分を様々な系統の細胞とアッセイを用いて分子・細胞レベルで網羅的に検討・解析し、癌増殖などの有害作用がなく、臓器特異的に好ましい作用をもたらす生薬成分を選択抽出し、動物実験を用いて臓器特異的作用を検証する。さらに、有効生薬成分を用いた臨床介入研究へと発展させ、新規ホルモン受容体調節薬の開発、性ホルモン様作用から有効性の

ある漢方薬を見出すことが本研究の目的である。

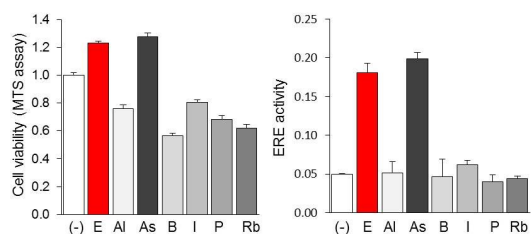
3. 研究の方法

本研究では生薬成分の中、ステロイド骨格を有する黄耆 (オウギ) の astragaloside (As) と人参 (ニンジン) の ginsenoside Rb1 (Rb)、また、ステロイド骨格がない芍薬 (シャクヤク) の paeoniflorin (P) と albiflorin (Al)、当帰 (トウキ) の butylidene phthalide (B)、淫羊藿 (インヨウカク) の icariin (I) を用いて性ホルモン作用を様々な細胞で検討した。具体的には血管、神経、乳癌、前立腺癌などの細胞でエストロゲン (E)、テストステロン (T) 作用を検討し、エストロゲン受容体 (ER α および β)、アンドロゲン受容体 (AR) の刺激ないしは拮抗作用が生薬成分にあるかを調べた。ホルモン作用を検討するための主なアッセイとしては細胞増殖、ER および AR の応答配列に対する転写活性 (ルシフェラーゼアッセイ) の測定を行った。血管においてはヒト大動脈由来平滑筋細胞を用いて高リン刺激 (2.6 mM) による血管石灰化病態を誘導し、カルシウム沈着量を定量的に評価した。神経細胞では 1-Methyl-4 phenylpyridinium (MPP+) 添加による神経障害であるアポトーシスに対する生薬成分の作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 乳癌および前立腺癌細胞における生薬成分の作用と分類: 代表的な ER α 陽性乳癌細胞株 MCF-7 と AR 陽性前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて性ホルモン作用を検討した。MCF-7 細胞において E は細胞増殖を誘導する一方、6 種類の生薬成分の中、ステロイド骨格を有する黄耆 (オウギ) の As は細胞増殖能が認められたものの、他の 5 種類の生薬成分では増殖能が認められなかった。さらに、ER 応答配列に対する転写活性を測定した結果、細胞増殖と同様な結果がえられた (図 1)。また、細胞増殖能が認められなかった生薬成分において、ER の拮抗作用があるかについても検討した結果、拮抗作用は認められなかった。

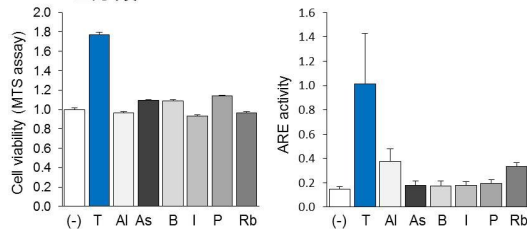
図 1. ヒト乳癌細胞における生薬成分の作用と分類



LNCaP 細胞においては、T により細胞増殖が誘導されたが、6 種類の生薬成分では細胞増殖能が認められなかった。さらに、AR 応答配列に対する転写活性を測定した結果でも

生薬成分6種類すべてにおいて転写活性を上昇させるものはなかった(図2)。

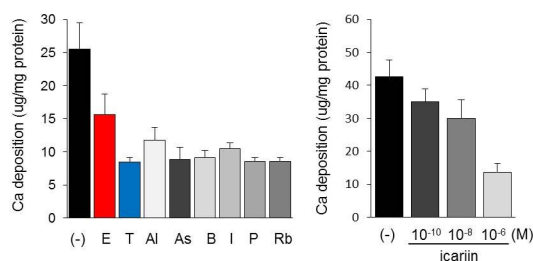
図2. ヒト前立腺癌細胞における生薬成分の作用と分類



(2) 血管内皮細胞および平滑筋細胞における生薬成分の作用と分類: ヒト大動脈由来内皮細胞におけるEおよびTの保護作用について研究代表者は細胞膜に局在するそれぞれの受容体 ER α と AR を介して PI3K/Akt、さらに eNOS を non-genomic 作用により活性化することを報告した (Endocrinology 2010)。さらに詳細な作用機序として Fura-4 を蛍光指示薬として用い、T による細胞内 Ca $^{2+}$ の変化を検討したところ、100nM の生理的な濃度の刺激条件下、約3分で立ち上がり4~5分にピークをもつ急峻な上昇を認めた。AR拮抗薬および siRNA によりこの反応は抑制された。T による eNOS リン酸化反応との関係を検討すると Ca チャンネルブロッカでは抑制されず、細胞内 Ca $^{2+}$ をフリーにすることで eNOS のリン酸化が抑えられたことから T による小胞体からの Ca $^{2+}$ 遊離が eNOS 活性に関与していることを明確にした。

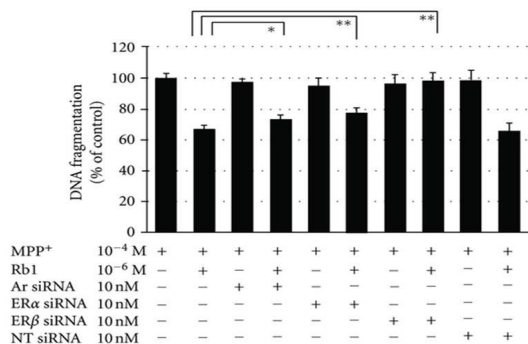
ヒト大動脈由来平滑筋細胞においては高リン刺激(2.6 mM)により石灰化を誘導し、性ホルモンの作用とともに生薬成分の作用を検討した。E は平滑筋細胞の石灰化を生理的な濃度の範囲で濃度依存的に抑制する効果があった。さらに ER α を介してカルシウム沈着およびその分子機序であるアポトーシスを抑制することが分かった。E と T (JBC 2010) の血管石灰化の抑制作用を確認したうえで6種類の生薬成分を用い、血管石灰化に対する作用を検討した。その結果、6種類のすべての生薬成分において性ホルモンと同様の石灰化抑制効果があった。特に、Rb1、I、As においてはその抑制効果が濃度依存的なものであった(図3)。

図3. ヒト大動脈平滑筋細胞の石灰化における生薬成分の作用と分類



(3) 神経細胞における生薬成分の作用: 神経系細胞株の PC12 を用いて 1-Methyl-4 phenylpyridinium (MPP+) 添加により生じる神経細胞のアポトーシスにおいて生薬成分 Rb1 の作用を主に検討した。Rb1 は MPP+ による神経細胞のアポトーシスを抑制する作用があった。さらに siRNA を用いた各受容体のノックダウンで Rb1 の保護作用は ER α および β を介した作用であり、AR の関与はなかったことを明らかにした。また、その作用機序として ERK1/2 シグナル経路の活性および JNK, p38MAPK のシグナル経路の抑制を明らかにして報告した(図4、論文5)。

図4. 神経細胞のアポトーシスにおける生薬成分の性ホルモン様作用



これらの研究結果から生薬成分の細胞特異的な作用が明らかになり癌細胞の増殖作用がなく、臓器保護作用を持つ成分の分類および選択ができ、性ホルモン補充療法の代替薬として老年疾患の予防と治療につながる事が期待できる。

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6件)

- Brand JS, Rovers MM, Yeap BB, Schneider HJ, Tuomainen TP, Haring R, Corona G, Onat A, Maggio M, Bouchard C, Tong PC, Chen RY, Akishita M, Gietema JA, Gannagé-Yared MH, Undén AL, Hautanen A, Goncharov NP, Kumanov P, Chubb SA, Almeida OP, Wittchen HU, Klotsche J, Wallaschowski H, Völzke H, Kauhanen J, Salonen JT, Ferrucci L, van der Schouw YT. Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome in men: an individual participant data meta-analysis of observational studies. PLoS One. 査読有、2014; 9:e100409.
- Ishii S, Tanaka T, Akishita M, Ouchi Y, Tuji T, Iijima K. Metabolic syndrome, sarcopenia and role of sex and age: cross-sectional analysis of Kashiwa cohort study. PLoS One 査読有、2014; 9:e112718.
- Ishii S, Miyao M, Mizuno Y, Tanaka-Ishikawa M, Akishita M, Ouchi Y. Association between

serum uric acid and lumbar spine bone mineral density in peri- and postmenopausal Japanese women. *Osteoporosis Int* 査読有、2014;25:1099-105.

4. Yu J, Akishita M, Eto M, Koizumi H, Hashimoto R, Ogawa S, Tanaka K, Ouchi Y, Okabe T. Src kinase mediates androgen receptor-dependent non-genomic activation of signaling cascade leading to endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有、2012;424:538-43.

5. Hashimoto R, Yu J, Koizumi H, Ouchi Y, Okabe T. Ginsenoside Rb1 prevents MPP(+)-induced apoptosis in PC12 Cells by stimulating estrogen receptors with consequent activation of ERK1/2, Akt and inhibition of SAPK/JNK, p38 MAPK. *Evid Based Complement Alternat Med* 査読有、2012;2012:693717, 8 pages

6. Nagai K, Akishita M, Shibata S, Kobayashi Y, Yamada Y, Kimura S, Machida A, Toba K, Kozaki K. Relationship between testosterone and cognitive function in elderly men with dementia. *J Am Geriatr Soc* 査読有、2012;60:1188-89.

〔学会発表〕(計16件)

1. 秋下雅弘(特別講演):性差から考えるフレイルの予防と治療. 日本老年医学会東北地方会, 福島, 2014.10.11.

2. Akishita M (Symposium): Mechanism of vascular aging: role of Sirt1 and androgen. Seoul National University Bundang Hospital Geriatric Center Symposium. Seoul, Korea, 2013.10.12.

3. Akishita M (Symposium): Androgen is the key to ameliorate frailty. Congress of the European Union Geriatric Medicine Society, Venice, Italy, 2013.10.4.

4. 秋下雅弘(イブニングセミナー)二次性脂質異常. 閉経後女性の脂質異常症の管理. 日本動脈硬化学会学術集会, 東京, 2013.7.19.

5. 秋下雅弘(パネルディスカッション): Cardiovascular Effects of Sex Hormones and Hormone Replacement Therapy. 日本循環器学会学術集会, 横浜, 2013.3.15.

6. 秋下雅弘(教育講演): Aging male and female: 将来を見捉えて. 医学は男性のQOLを救えるか. 日本性機能学会学術総会, 東京, 2012.9.21.

7. 秋下雅弘(シンポジウム): 心・血管病の性差. 動脈硬化の性差: 性ホルモンの影響. 日本動脈硬化学会総会・学術集会, 福岡, 2012.7.20.

8. 秋下雅弘(シンポジウム): 改めて女性ホルモン補充療法の功罪を考える—HRTガイドラインの改訂へ向けて. 循環器の観点から. 日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2012.6.22.

9. 秋下雅弘(クリニカルアワー): 性ステロイドと血管内皮機能. 日本内分泌学会学術集会, 名古屋, 2012.4.21.

〔図書〕(計1件)

秋下雅弘. 監修: 男性ホルモンの力を引き出す秘訣. (株)大泉書店・東京, 2013.6.21

秋下雅弘. II 適応: 2. 冠攣縮および微小血管狭心症の既往とは? 3. コントロール不良な糖尿病とは? 水沼秀樹, 高松潔 編著: 今日からできるホルモン補充療法—HRT 実践マニュアル: p.10-18. (株)中外医学社・東京, 2013.7.20.

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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

秋下 雅弘 (AKISHITA MASAHIRO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 00261975

(2) 研究分担者

江頭 正人 (ETO MASATO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 80282630

小川 純人 (OGAWA SUMITO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 20323579

大田 秀隆 (OTA HIDETAKA)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号: 20431869

岡部 哲郎 (OGABE TETSURO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 80169135

諭 静 (YU SEI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 40431845

柴崎 孝二 (SHIBAJAKI KOUJI)
東京大学・医学部附属病院・特任臨床医
研究者番号: 20625735