

19. 漢方薬の作用機序を探る

横山 悟

富山大学 和漢医薬学総合研究所 病態生化学分野

Key words : 生薬, 漢方薬, 細胞内シグナル

緒 言

「漢方薬はなぜ効くか？」我々は、この長年にわたる研究課題に挑戦するため、漢方薬の構成生薬である天然薬物による細胞内シグナルへの効果に着目してきた。漢方薬は、いくつかの構成生薬を組み合わせ、処方して煎じることにより、効能を発揮する。また漢方薬が長年臨床で用いられていることから、その効能についての十分な知識の積み重ねがある（経験知）。一方、漢方薬の効果発現の作用機序についての科学的証拠（科学知）は、まだまだ十分とは云えないのが現状である。すなわち東洋医学的知識と西洋医学的知識の交点となるような研究が必要であると考えられる。またこれまでは、研究者が一つ一つの漢方薬、構成生薬およびそれらの成分化合物などの生理活性について検討するという天然物化学あるいは天然物薬理学的研究手法が用いられてきたが、多成分系からなる漢方薬の複雑な作用機序を理解するには、既存の手法とは異なる網羅的アプローチが必要である。そこで、経験知に基づく漢方薬の効能・分類についての科学的情報を得ること、さらには漢方薬の作用機序を明らかにするための新規情報を得ることを目的に、当研究所が所有する和漢薬ライブラリー（生薬水抽出物 112 種、以下生薬エキス）を用いて、細胞内シグナルへの影響を検討した。これは、漢方薬のヒトへの効能を、生薬エキスの細胞内シグナルへの影響と置き換えたものである。また、細胞内シグナルの変化が必ず遺伝子発現の変化を伴うことから、遺伝子発現変化に重要な「転写調節」に着目し、研究を遂行した。具体的には、「転写」を調節する転写因子に対する応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミド 10 種を構築し、それらを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイは、ある特定の転写因子の活性をルシフェラーゼの酵素活性として測定でき、感度も高く、簡便であることから、今回のような試料の種類が多い（112 種の生薬エキス）実験に適したものである。

方法および結果

1. 10 種の転写因子への効果による生薬 112 種の分類

ヒト非小細胞肺癌細胞である A549 細胞を使用した。培地は FCS (10%)、L-グルタミン (1%, GIBCO, USA)、ペニシリン (penicillin, 0.1 mg/mL, 明治製菓株式会社) 及びストレプトマイシン (streptomycin, 0.1 mg/mL, 明治製菓株式会社) を添加した RPMI (GIBCO) を滅菌したものをを使用した。細胞は CO₂ インキュベーター (37 °C、5% CO₂) によって培養した。

pGL4.26 (Promega) に CREB、ERSF、HIF-1 α 、IRFs、MYC、NF- κ B、p53、SMAD、SOX2、TCF/LEF のそれぞれの転写因子結合配列をタンデムに結合させた 10 種のレポータープラスミドを構築した。

ヒト非小細胞がん細胞 A549 に、レポータープラスミドを遺伝子導入し、その後 112 種の生薬エキス (100 μ g/ml)、または漢方薬 (100 μ g/ml) をそれぞれ加え、48 時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。生薬エキスのルシフェラーゼ活性への効果を数値化し、その後 Spearman rank-correlation coefficient and Ward linkage 法を用いてクラスタリングを行った。

生薬は経験的に 22 種に分類されることが知られているが、今回のクラスタリングの結果より、清熱燥湿薬、辛温解表薬、辛涼解表薬と呼ばれる生薬群が、それぞれ有意にクラスターを形成していた (図 1)。

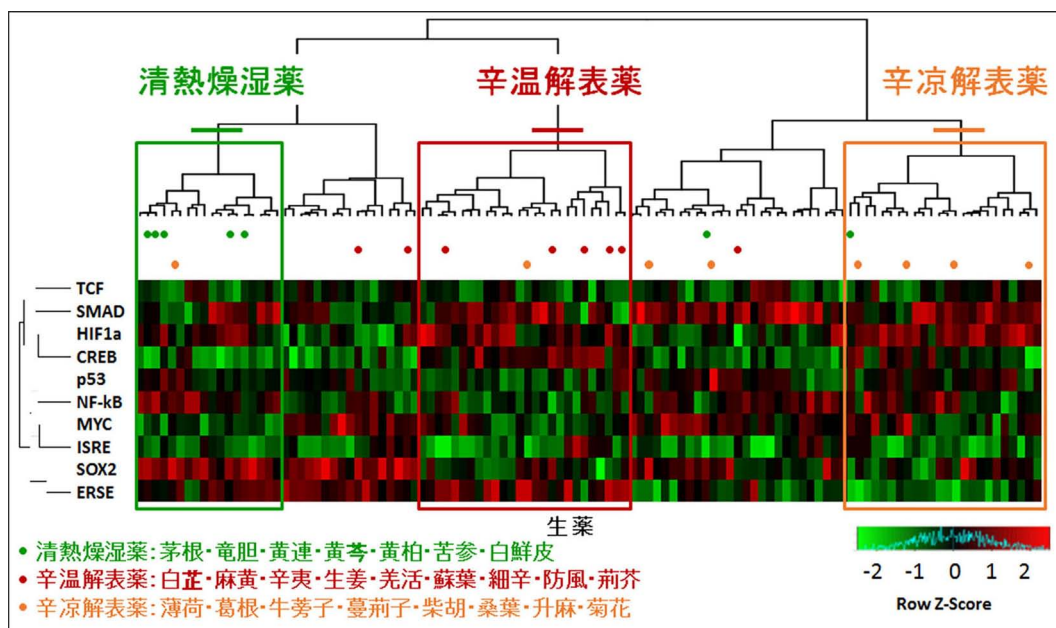


図1. 細胞内シグナルへの効果による生薬 112 種のクラスタリング

生薬 112 種について、それぞれ 10 種の転写因子に対する効果をルシフェラーゼアッセイにて測定し、その結果を用いてクラスタリングを行った。

2. 解表薬に着目した検討

解表薬は経験的な分類により、辛温解表薬・辛凉解表薬の二つに分類される。それら 2 種の生薬群が図 1 でクラスターを形成したことから、解表薬に着目した。図 1 のデータを詳細に検討した結果、解表薬とその他の生薬群においては CREB の転写活性化能が異なり (図 2A)、また辛温解表薬、辛凉解表薬の比較により、ERSF の転写活性化能が異なることが示された (図 2B)。このことから、CREB・ERSF に関わるシグナル経路が、辛温解表薬、辛凉解表薬の効能に重要である可能性が示唆された。

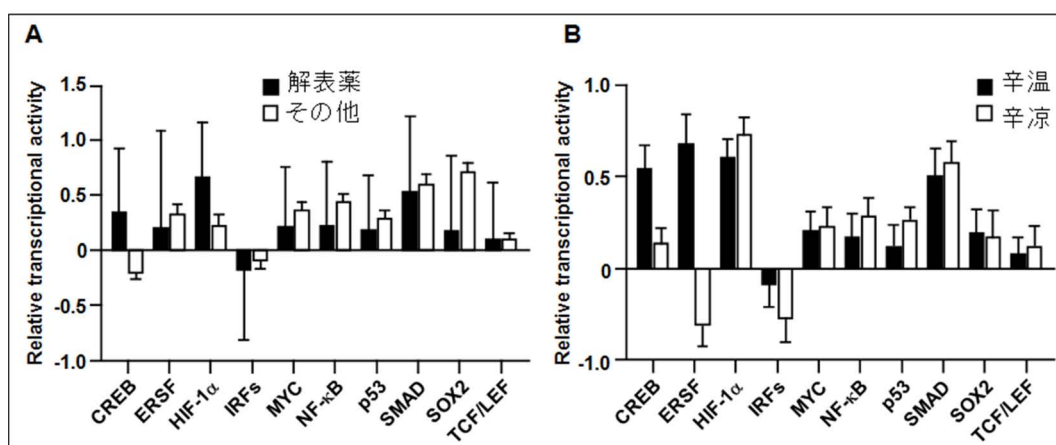


図2. 解表薬 (辛温・辛凉) における特徴的シグナリング

図 1 のデータより (A) 解表薬とその他の生薬、(B) 辛温解表薬と辛凉解表薬、のそれぞれのクラスターのデータを抽出し、再解析した。

そこで CREB と ERSF の標的遺伝子に着目し、蘇葉 (辛温解表薬) と柴胡 (辛凉解表薬) を用いて、*NR4A1* (CREB の標的遺伝子)、*HSP90B1* (ERSF の標的遺伝子) の発現レベルを qRT-PCR により検出した (図 3)。その結果、ルシ

フェラーゼアッセイの結果と同様に、蘇葉（辛温解表薬）と柴胡（辛凉解表薬）どちらにおいても、CREBの標的遺伝子である *NR4A1* の発現レベルは上昇し、また ERSF の標的遺伝子である *HSP90B1* の発現は、蘇葉（辛温解表薬）で上昇し、柴胡（辛凉解表薬）では低下した。

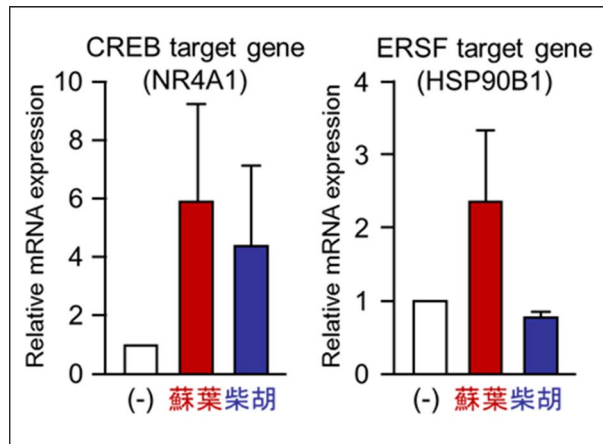


図3. 解表薬（辛温・辛凉）における遺伝子発現への効果

蘇葉（辛温解表薬）と柴胡（辛凉解表薬）を用いて、*NR4A1*（CREBの標的遺伝子）、*HSP90B1*（ERSFの標的遺伝子）の発現レベルをqRT-PCRにより検出した。

3. 辛温解表薬である葛根湯による効果

生薬エキスで確認された辛温解表薬の効果が漢方薬でも同様であるかを検討する目的で、辛温解表薬である葛根湯を用いて、CREB、ERSFの転写活性への効果をルシフェラーゼアッセイにて検討した。

その結果、生薬で見られたものと同様に、CREB・ERSFどちらの転写因子においても転写活性化が認められた（図4）。

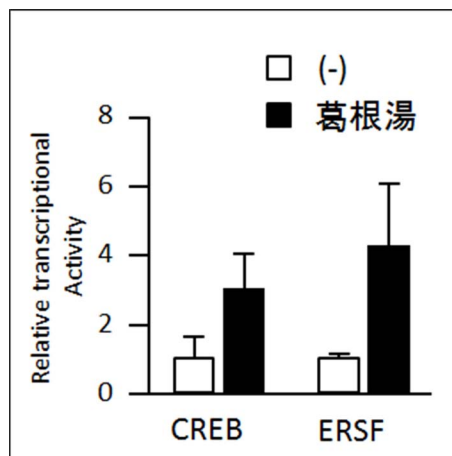


図4. 葛根湯も生薬エキスと同様に、CREB・ERSFの転写活性化を誘導する

CREBとERSFの転写活性化能への葛根湯の効果をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

考 察

今回の研究は、生薬・漢方薬に使用されていた経験的分類（清熱燥湿薬、辛温解表薬、辛凉解表薬）を、細胞内シグナルに及ぼす効果の網羅的解析により、科学的に証明することができる可能性を示したものである¹⁾。また、経験的分類がその生薬・漢方薬の効能に基づくと考えられることから、この新規手法を用いることで生薬・漢方薬の作用機序との

関連性を明らかにできる可能性がある。さらに、生薬・漢方薬による細胞内シグナルへの効果を明らかにしたことで、漢方薬の新規適応症を同定することも可能である。今後は、多くの生薬エキスに加え、臨床で用いられている漢方薬による細胞内シグナルへの効果を検討し、データを蓄積することにより、漢方薬の効能との関連を科学的に証明していく。

共同研究者

本研究の共同研究者は、富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学分野の済木育夫、早川芳弘、新潟大学工学部情報工学科の阿部貴志である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Eshima S, Yokoyama S, Abe T, Hayakawa Y, Saiki I. Multi-pathway cellular analysis on crude natural drugs/herbs from Japanese Kampo formulations. PLoS One. 2015 Jun 2;10(6):e0128872. doi: 10.1371/journal.pone.0128872. PMID: 26035432