

アンチエイジング漢方薬，生薬の探索とその成分の解析

申請代表者	下川 功	長崎大学大学院医歯薬総合	教授
所外共同研究者	千葉 卓哉	長崎大学大学院医歯薬総合	准教授
〃	田中 隆	長崎大学大学院医歯薬総合	准教授
所内共同研究者	柴原 直利	臨床科学部門 漢方診断学分野	教授

■背景・目的

カロリー制限 (CR), 成長ホルモン (GH) 抑制は実験動物の老化や疾患を抑制し, 寿命を延長する。特に, CR はヒトの老化や疾患の制御に応用可能であると考えられているが, ヒトにおいて, 長期的に摂食を制限することは困難である。よって, 摂食を制限することなく CR の効果を模倣する化合物の開発が注目されている。

我々 (下川, 千葉) は, CR, GH 抑制によって発現が上昇する遺伝子群 (特にエネルギー代謝やストレス応答に関連する遺伝子) のプロモーター領域に, 共通にみとめられる特異的配列 (Dwarfism-Calorie restriction-Response Element, DFCR-RE) を同定し, その活性化を利用したスクリーニングシステムを開発した (図 1 : CRISP: CR Imitating anti-aging chemicals Searching Platform)。特異配列の下流にレポーター遺伝子 (分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP)) を挿入し

CRISP: CR Imitating anti-aging chemicals Searching Platform

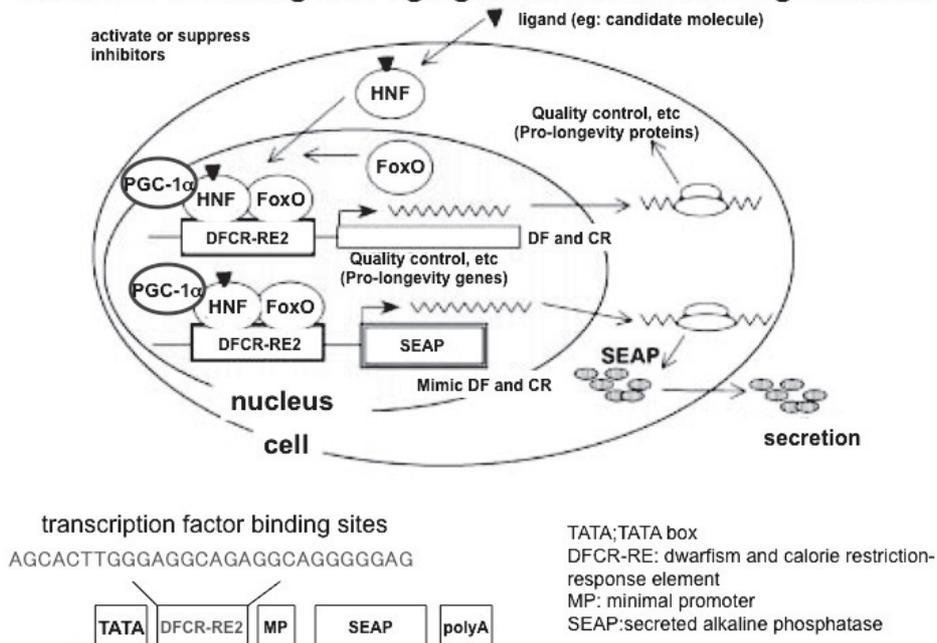


図1 スクリーニングシステム (CRISP) 概略: カロリー制限 (CR), 成長ホルモン (GH) 抑制によって発現が上昇する遺伝子群のプロモーター領域に共通にみとめられる特異配列 (Dwarfism-Calorie restriction-Response Element, DFCR-RE) の下流にレポーター遺伝子 (分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP)) を挿入したプラスミドを導入した培養細胞による in vitro アッセイシステム。何らかの刺激 (候補化合物) によって転写因子が活性化すれば, SEAP が分泌される。PGC-1a/HNF/FoxO は CR によって活性化される転写因子群で, このシステムが働くことが確認されている (Chiba T 他, 2010)。

たプラスミドを構築し、培養細胞に導入し、in vitro アッセイシステムを確立した。薬剤等の刺激によって、この配列に転写因子群が結合すれば、SEAPが発現する (Chiba T, 他, 2010)。同じく、マウスで過剰発現する系も作成し、現在、トランスジェニックマウスコロニーを確立しつつある。これらを利用すれば、CRあるいはGH抑制による抗老化、寿命延長に関連する代謝、ストレス応答遺伝子を活性化する化合物をスクリーニングできる。このスクリーニングシステムを応用して、CR、GH抑制を模倣する生薬エキスおよびその成分を同定し、生薬のアンチエイジング薬剤としての可能性を探るとともに、老化や生活習慣病の進行を遅延する新たな薬剤の開発を目指す。

一方、CRの抗老化作用は、長期的なエネルギー制限に対する神経内分泌系の適応反応の過程から生じると予測されている。この神経内分泌系の適応には、血中ホルモンであるInsulinやIGF-1、Leptinの低下、Ghrelinの増加にともなう、視床下部弓状核に存在するNeuropeptide Y (NPY) 神経細胞を活性化が重要な役割を果たすことが示唆されている (Shimokawa I 他, 2008)。すでに開始した予備実験によって、漢方方剤「六君子湯」がCRの神経内分泌系の変化を部分的に模倣することを確認した。よって、六君子湯 (RKT) に含まれる生薬エキス、その成分が有効性を示す可能性が高い。

本研究では、1) RKTとCRの効果の類似性を検討する、2) RKTもしくはその成分がCRISPで同定できるかを確認する、3) RKT以外の漢方方剤、生薬成分をCRISPでスクリーニングすることを目的とした。以下に本研究年度に行ったRKTとCRの類似性に関する結果を示す。2, 3については、動物コロニーの確立が遅れたために、本研究年度内には結果が得られなかったが、今後継続して研究を行う予定である。

■結果・考察

(1) 六君子湯 (RKT) の体重増加効果

生後10週のおスC57BL6/JマウスにRKTを含む飼料 (1, 2, 3g/100g飼料) を与え、24週まで観察した。摂食量に有意な差はなかった。RKT-1g, RKT-2g群は対照群 (RKT-0g) に比べ、体重増加率が有意に高かった (図2)。RKT-3g群は対照群と同程度であった。RKT量と体重増加には完全な用量-効果関係はみとめられなかったが、1, 2%含有飼料で有意な効果があると推測された。

(2) RKTの視床下部神経ペプチドの発現に対する影響

CRは、視床下部のneuropeptide Y (NPY) の発現を増加させ、逆にproopiomelanocortin (POMC) の発現を抑制する。この神経ペプチドの変化がCRに対する神経内分泌系の適応を促し、結果的に抗老化作用や長寿命を誘導すると考えられている (Shimokawa I 2008)。

RKT投与群、対照群マウスを生後24週で屠殺し、視床下部を切り出し、RNAを抽出した、これを用いて、NPY-mRNA, POMC-mRNAの発現をRT-PCRによって計測した。NPY-mRNAの発現量は、RKTの投与量に従って増加していた。POMC-mRNAの発現には有意な変化はなかった (図3)。よって、RKT投与によって、CRと類似した神経ペプチドの変化が起こっていることが確認された。

(3) RKT投与群とCR群の類似性

1, 2の結果に基づいて、RKT-2g群とCR群における体重、体脂肪、血中ホルモン (Ghrelin, Leptin)、酸化ストレスに対する応答を比較し、その類似性を検討した。

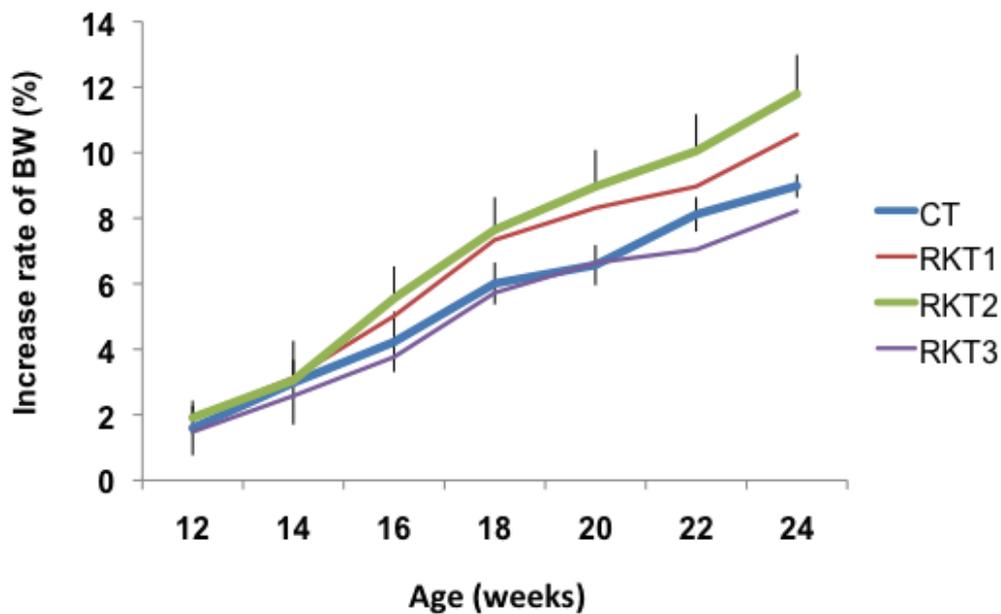


図2 六君子湯 (RKT) の体重増加効果: CT (対照飼料), RKT1, RKT2, RKT3 はそれぞれ、対照飼料 100g に 1, 2, 3g の RKT を含む。Mean \pm SD (n = 3 or 5)

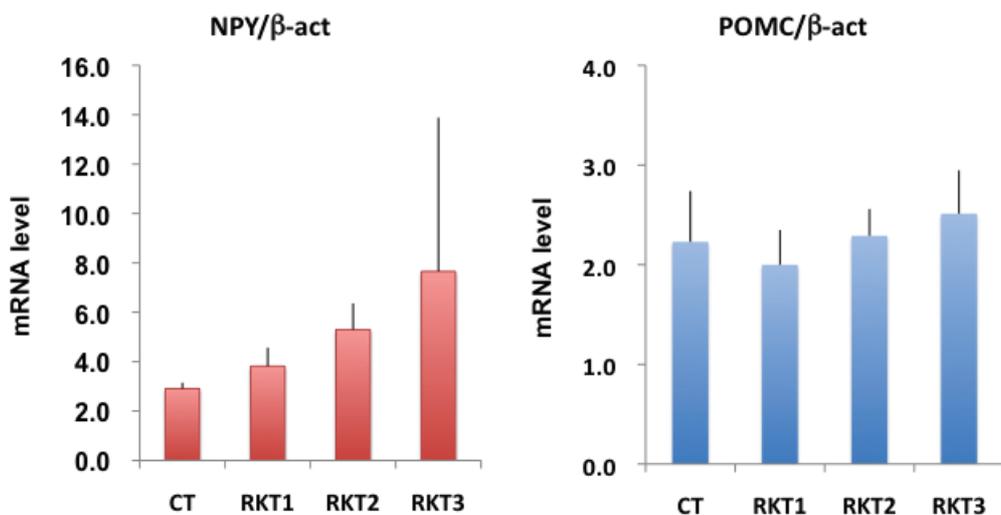


図3 視床下部における Neuropeptide Y (NPY), Proopiomelanocortin (POMC)-mRNA の発現レベル。 β -actin-mRNA によって標準化した。Mean \pm SD (n = 3 or 6)

1) RKT 投与による体重の変化: 投与年齢の影響

RKT をアンチエイジング剤として用いる場合、若年時よりも中年あるいは老年期に開始することが予測される。よって、生後 10 週のマウスと生後 14 ヶ月から 18 ヶ月のマウスを用いて、RKT に対する摂食量や体重の変化を検討した。

摂食量は若年マウス、中年マウスとも対照群と差はなかった。体重は、若年時では、RKT-2g 群が対照群よりも増加していたが、中年群では RKT-2g 群と対照群の差はなかった (図 4)。この結果は、RKT 投与に対する反応性に年齢差があることを示唆している。

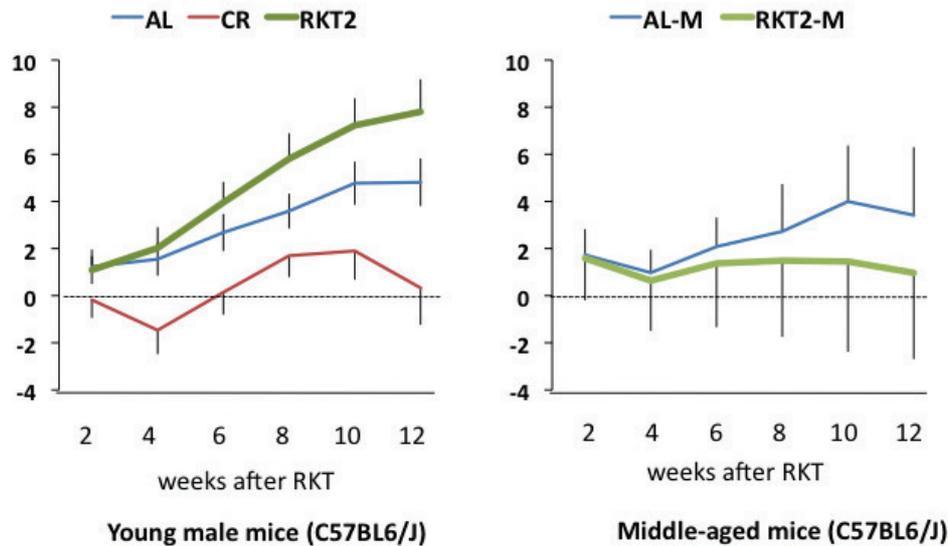


図4 六君子湯（RKT）投与による体重の変化：投与年齢の影響。AL：対照飼料，自由摂食群，CR：30%カロリー制限群，RKT2：RKT-2g群。Young mice：生後10週マウスを用いた。Middle-aged mice：生後14ヶ月～18ヶ月のマウスを用いた。Mean \pm SD (n = 3 - 8)。

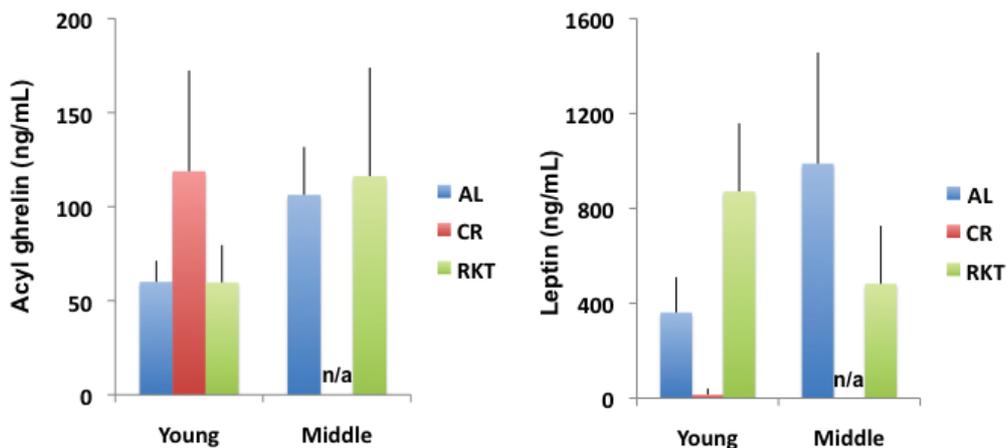


図5 血中グレリン，レプチン濃度。略語は図4参照。Mean \pm SD (n = 3 or 6)。

RKTは血中グレリンを増加させ、視床下部のNPY神経細胞群を活性化する。NPY神経細胞群の活性化は、エネルギー消費を低下させることによって体内脂肪の増加や体重の増加を来すと考えられている。よって、中年時期には、すでにグレリン耐性を来していることが示唆された。今後、RKTを中高年期に投与する際、考慮すべき問題と考えられる。

2) 血中グレリン，レプチンへの影響

CRは、血中アシルグレリン（活性化型）を有意に増加させた（図5）。血中レプチンは、有意に低下させた。RKT-2g群では、血中アシルグレリンは対照群と同程度で、レプチンが逆に増加した。

今回の実験では、RKT-2g群マウスを自由摂食させたため、視床下部NPYはCRと同じように増加したが、それにともないエネルギー代謝が減少したため、体内白色脂肪が増加し、結果的にホルモン動態は、肥満と類似したものとなったと考えられる。

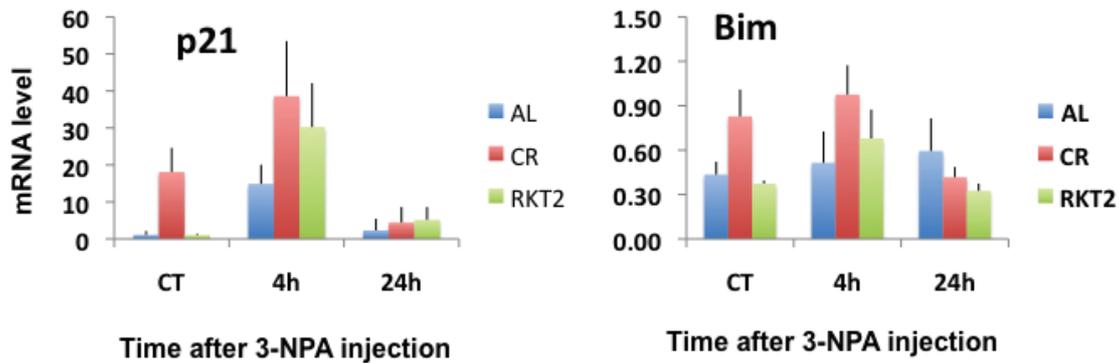


図6 酸化ストレスに対する応答:3-nitropropionic acid (30 mg/ kg body weight)を投与後、4、24時間で屠殺し、組織を採取した。肝臓における p21-, Bim-mRNA の発現レベルを RT-PCR 法にて定量した。CT: 対照群、生理食塩水を投与し屠殺した。Mean + SD (n = 3 - 5)。

3) 酸化ストレスに対する応答

CR の特徴は酸化ストレスを含む様々なストレスに対して特有な反応（多くはストレス耐性）を示す。我々は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の選択的阻害剤である 3-nitropropionic acid (3NPA) を投与して、ストレス応答に関連するいくつかの遺伝子の発現を肝臓において検討した。

CR 群では、酸化ストレス後、cell cycle arrest を引き起こす p21 およびアポトーシスを引き起こす Bim 遺伝子の発現レベルが一過性に増加した(図6)。RKT-2g 群においても類似した結果を示した。

以上の結果は、RKT 投与によって CR のストレス耐性がある程度模倣できることを示唆している。

■結論

今回の実験では、RKT 投与は、NPY-mRNA の増加やストレス応答など CR と類似した変化を引き起こしたが、投与群を自由摂食下で飼育したために、結果的に、白色脂肪の増加や体重の増加という肥満と同じ状態を引き起こした。しかしながら、RKT 群の摂食量を 5 - 10% 制限することによって、これらの問題は回避できると考える。つまり、通常 CR では、30-40% 摂食量を制限するが、RKT を加えることによって、制限量を 10% 程度に減弱できると予測できる。このことは、RKT を補助的に用いることによって、ヒトの摂食量を過度に制限することなく CR の効果を模倣できることを示唆している。

今後、RKT の研究をさらに進めるとともに、CRISP を用いたスクリーニングを開始する。

■文献

Chiba T, Shimokawa I, et al. Development of a bioassay to screen for chemicals mimicking the anti-aging effects of calorie restriction. BBRC 2010 401 (2):213-8.

Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, Komatsu T. Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. Mol Cells. 2008;26 (5):427-35.