

筋肉減少症の予防・改善作用を有する漢方方剤の 探索と有効性の解析

申請代表者	井上 誠	愛知学院大学薬学部薬用資源学	教授
所外共同研究者	田邊 宏樹	愛知学院大学薬学部薬用資源学	講師
所内共同研究者	渡辺 志朗	拠点事業推進室 / 栄養代謝学分野 (現 病態制御部門栄養代謝学分野)	准教授

【報告セミナー要旨】

高齢者における筋量及び筋力の低下は、高齢期における身体的虚弱の主要な原因となり、転倒による骨折、寝たきりのリスクを高めるばかりでなく、基礎代謝量を低下させて高脂血症、糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病を引き起こす可能性が指摘されている。また、筋萎縮は加齢だけでなく各種の疾患や薬剤の副作用としても起こり、その過度な進行は日常生活において大きな支障をきたす。現在、筋萎縮の発症機序が精力的に研究されているが、筋萎縮の予防・改善に使用できる薬剤は開発されていない。筋萎縮の病態の性質を考えた場合、新薬に比べ長期服用可能な複合製剤である漢方方剤は予防・改善薬候補として有望であると考えられる。そこで我々は、細胞レベルにおいて、筋萎縮改善作用を有する生薬の探索を、核内受容体のひとつPPAR δ のアゴニスト探索を実施することで検討した。また、筋萎縮の動物モデルを用いて、漢方方剤「加味四物湯」における筋萎縮改善作用の検討を実施した。

核内受容体PPAR δ の活性化は骨格筋細胞のミトコンドリアの分裂・増殖や脂肪酸燃焼系に関与する遺伝子群を誘導し、骨格筋の機能を活性化するとともに、糖・脂質の代謝を改善し肥満や糖尿病などを予防、改善することが知られている。そこで、我々はPPAR δ に着目して、漢方方剤常用生薬（約100種類）及び関連生薬（約50種類）を用いて、PPAR δ アゴニストをスクリーニングした。その結果、カロニン、インチンコウ、イレイセンなどいくつかの生薬抽出液に高い活性を見出した。これらのスクリーニングデータは今後筋萎縮改善に有効な漢方方剤を探索するために重要なデータになると考えられる。

細胞レベルの研究と並行して、骨格筋萎縮のモデル動物を用いた漢方方剤の有効性の評価を実施した。筋萎縮モデルには、デキサメタゾン誘発筋萎縮モデルを、使用した漢方方剤は、肢体が萎えて運動障害が生じた状態で使用される加味四物湯を用いた。その結果、加味四物湯は、デキサメタゾン投与による膝下筋肉及び体重量の減少を用量依存的（250, 500 mg/kg）に抑制した。さらに、筋萎縮の改善作用の機序を骨格筋蛋白質の合成と分解に関与するシグナル伝達系に焦点をあて解析した結果、蛋白質分解に関与している筋特異的ユビキチンリガーゼである muscle atrophy F-box/atrogen-1 を muscle ring finger-1 遺伝子の mRNA 発現レベルを抑制する傾向がみられた。次に蛋白質合成のシグナル伝達系で重要な役割を果たしているリン酸化酵素Aktの活性に及ぼす影響を検討したところ、加味四物湯は下肢筋肉のAktのリン酸化を亢進させており、蛋白質合成系が活性化されていることが示唆された。今後、更なる解析を進め、加味四物湯の筋萎縮抑制作用の機序解析と、他の漢方方剤に関しても検討を行う予定である。

■背景・目的

高齢者における筋量及び筋力の低下は、高齢期における身体的虚弱の主要な原因となり、転倒による骨折、寝たきりのリスクを高めることになる。また、生体内において一日に消費されるエネルギーの大半が筋肉で行われている点を考えてみると筋量及び筋力の低下は、基礎代謝量を低下させて高脂血症、糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病を引き起こす可能性が考えられる。しかしながら、筋萎縮は加齢以外にも、ベットレストやギブス固定状態のような不活動状態や、各種疾患（がん、糖尿病、エイズ、敗血症など）、除神経、低栄養、薬物（デキサメタゾン）の副作用などによっても認められており、その過度な進行は日常生活において大きな支障をきたすこととなる。

現在、筋萎縮の発症機序が精力的に研究されているが、筋萎縮の予防・改善に使用できる薬剤は開発されていない。筋萎縮の病態の性質を考えた場合、新薬に比べ長期服用可能な複合製剤である漢方方剤は予防・改善薬候補として有望であると考えられる。そこで我々は、細胞レベルにおいて、筋萎縮改善作用を有する生薬の探索を、核内受容体のひとつPPAR δ のアゴニスト探索を実施することで検討した。また、筋萎縮の動物モデルを用いて、漢方方剤「加味四物湯」における筋萎縮改善作用の検討を実施した。

■結果・考察

核内受容体PPAR δ の活性化は骨格筋細胞のミトコンドリアの分裂・増殖や脂肪酸燃焼系に関与する遺伝子群を誘導し、骨格筋の機能を活性化するとともに、糖・脂質の代謝を改善し肥満や糖尿病などを予防、改善することが知られている。そこで、我々はPPAR δ に着目して、漢方方剤常用生薬（約100種類）及び関連生薬（約50種類）を用いて、PPAR δ アゴニストをスクリーニングすることとした。PPAR δ 発現プラスミド、PPAR応答配列を有するルシフェラーゼレポータープラスミド、 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドをリン酸カルシウム法にて、ヒト胎児腎細胞であるHEK293細胞に遺伝子導入し、8時間後にDNA-リン酸カルシウム複合体を洗浄後、被検薬を含有した培地に置換し、48時間後に細胞内タンパク質を抽出し、ルミノメーターを用いて誘導されたルシフェラーゼタンパク質量をその酵素活性を測定する事で検討した。また、各well間の誤差を修正するため、同じく細胞内タンパク質に発現している β -ガラクトシダーゼの酵素活性を測定し、測定されたルシフェラーゼ活性を補正した。Vehicleとして使用したDMSOを添加したwellのルシフェラーゼ活性を基準にして、各試験薬のルシフェラーゼ活性をRelative luciferase activity (RLA)として表した。各生薬メタノール抽出物100 μ g/mLを添加した場合のRLA値を図1に示した。

その結果、カロニン、インチンコウ、イレイセンなどいくつかの生薬抽出液に高い活性を見出した。これらのスクリーニングデータは今後筋萎縮改善に有効な漢方方剤を探索するために重要なデータになると考えられる。

さらに、最も活性の高かったカロニンについてhexane - 90%MeOHによる液液分配、さらに90%MeOH相を濃縮乾固後、AcOEt - H₂Oにて液液分配して得られた各相についてレポーターアッセイをした結果、AcOEt相に活性が濃縮されていたことから、AcOEt相から活性本体の単離同定を試みた。活性を指標に各種カラムクロマトグラフィーとHPLCを用いて分画を進めた結果、単一の化合物を単離することができた。各種スペクトルデータから、図2に示すような、分子量310、二重結合を2つ、水酸基とカルボニル基を1つずつ持つ不飽和水酸化脂肪酸であることが推定できた。

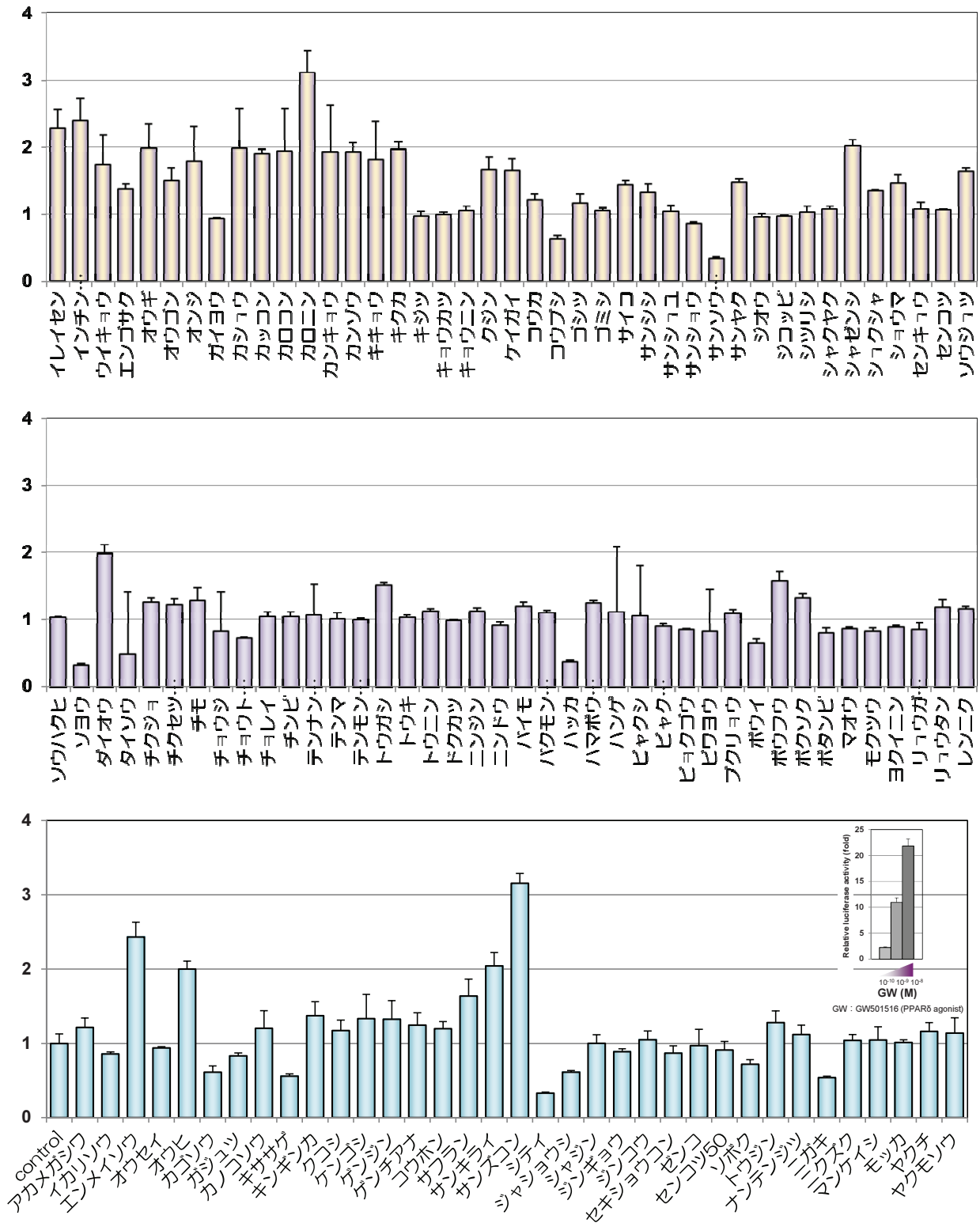


図1. 生薬メタノール抽出エキスのPPAR δ アゴニスト活性試験結果

MW=310 C₁₈H₃₀O₄

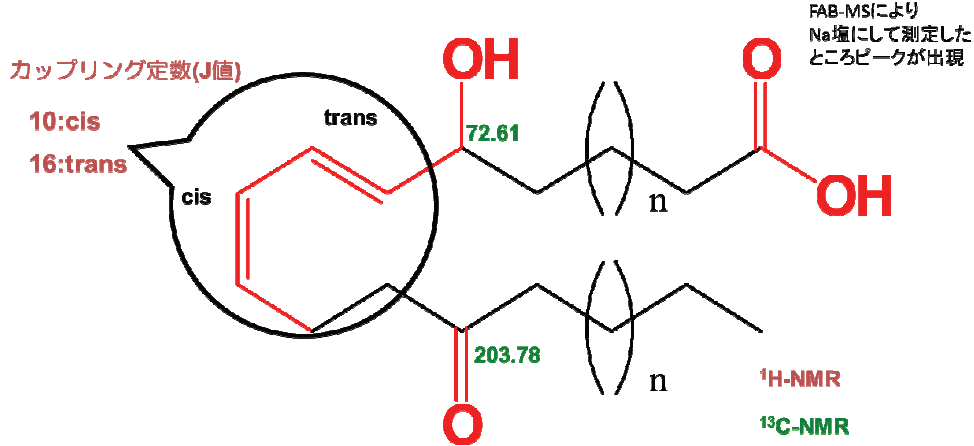


図2. カロニンより単離されたPPAR δアゴニストの推定構造

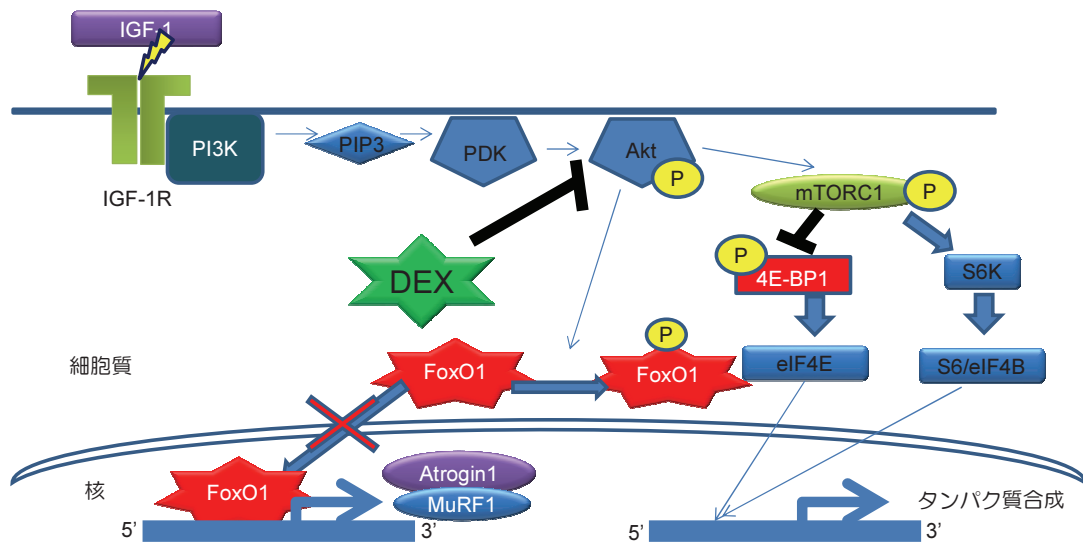


図3. Dexamethasoneによる筋肉萎縮誘導作用機序

細胞レベルの研究と並行して、骨格筋萎縮のモデル動物を用いた漢方方剤の有効性の評価を実施した。筋萎縮モデルには、下肢への運動神経を切断する「除神経モデル」、動物の下肢をつり上げ、前肢のみで生活させることで、下肢を不活動状態にする「後肢懸垂モデル」、薬物モデルである「Dexamethasone誘導モデル」の3種類が報告されている。今回、我々は比較的容易に作製できるDexamethasone誘導モデルを用いて、筋萎縮の改善作用を検討することとした。骨格筋において、筋肉を増加させる働きを有するインスリン様成長因子IGF-1は、図3に示すようなシグナル伝達を行い、タンパク合成系であるS6キナーゼの活性を増加させ、また筋肉特異的なユビキチンリガーゼであるAtrogin1やMuRF1などの分解系分子の発現を抑制することで、筋肉量を増大させている。Dexamethasoneは糖質コルチコイド受容体に作用することで、この筋肉増加シグナルの上流であるAktの活性化（リン酸化）を抑制し、その結果、筋肉量の減少を誘導する。

使用した漢方方剤は、肢体が萎えて運動障害が生じた状態で使用される加味四物湯を用いた。漢方方剤の胃内強制投与とdexamethasoneの腹腔内投与は同時期から開始し、投与開始16日後に解剖を

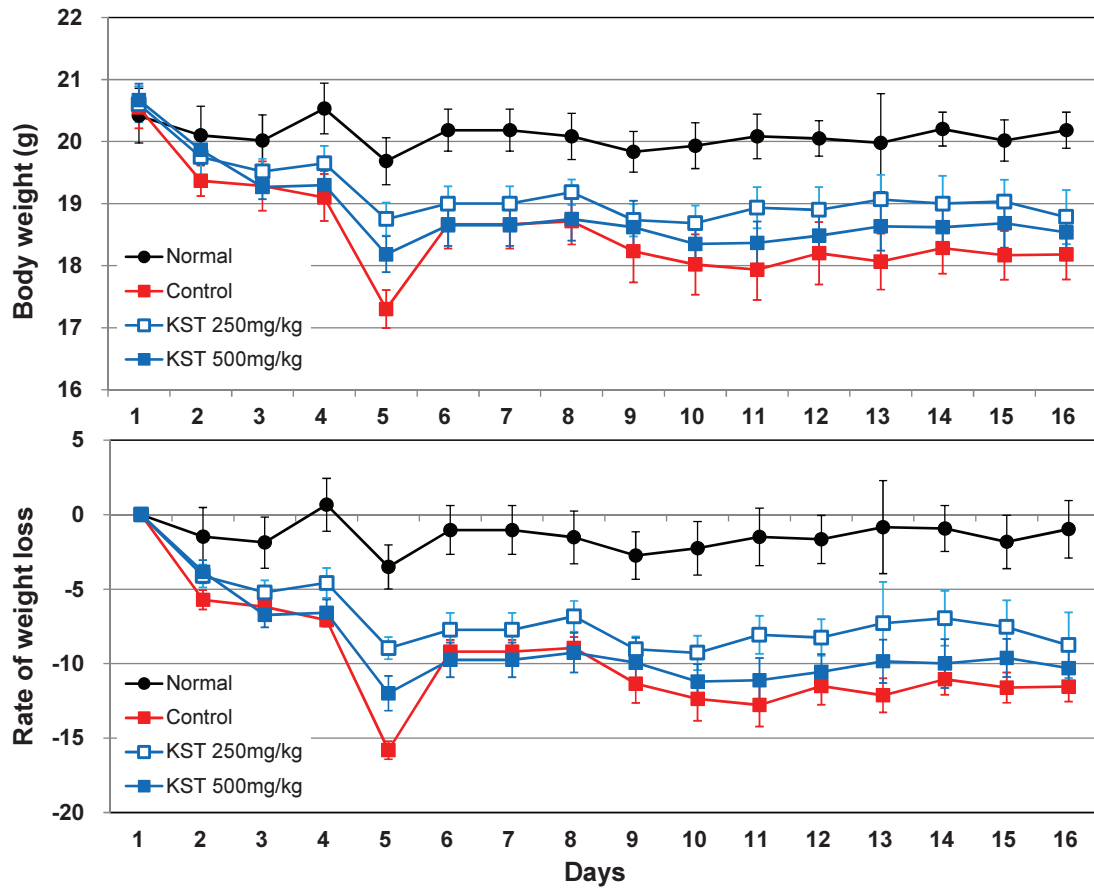
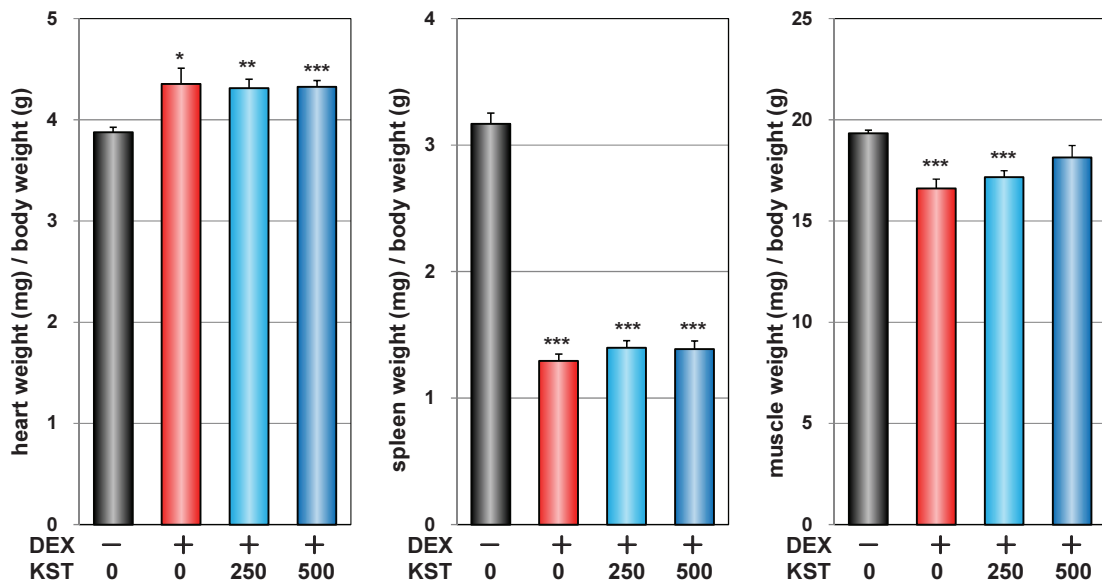


図4. Dexamethasone 誘導筋萎縮モデルにおける体重及びその変化量



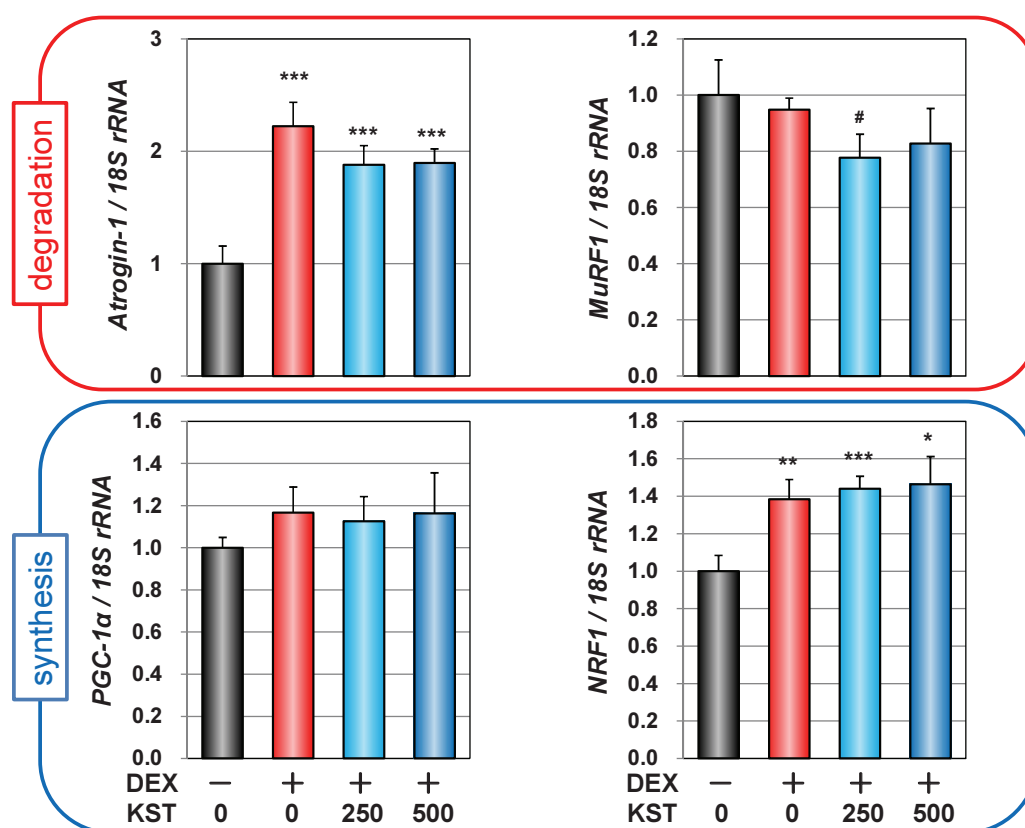
Error bars represent mean + SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Normal.

図5. Dexamethasone 誘導筋萎縮モデル解剖時の臓器重量

実施し、心臓及び脾臓、下肢筋肉の重量を測定した。また、下肢筋肉に関してはその後の遺伝子発現量の検討や、タンパク質発現量の検討を実施した。

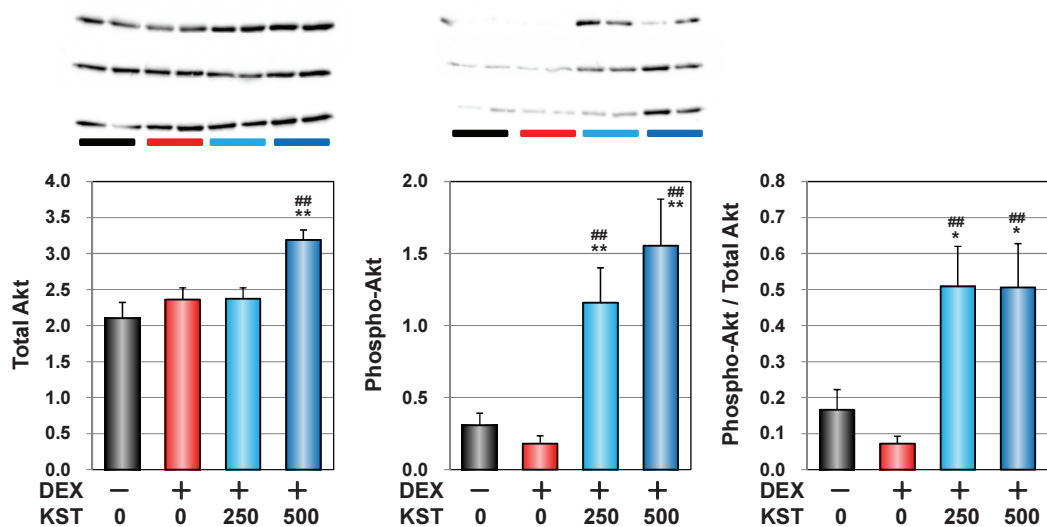
その結果、デキサメタゾン投与による膝下筋肉及び体重量の減少を加味四物湯は、用量依存的(250, 500 mg/kg)に抑制した(図4)。また、解剖時における臓器重量に関しては(図5)、筋肉組織である心臓重量がdexamethasone投与により有意に増加したが、これは、全身の体重減少によって、相対的に増加傾向を示したものと考えられる。また、加味四物湯投与による影響はなかった。脾臓重量に関しては、dexamethasone投与により減少することが報告されており、今回のモデルにおいても有意に減少したが、加味四物湯による影響はなかった。一方、下肢筋肉重量に関しては、dexamethasone投与によって有意に減少していたが、加味四物湯500 mg/kg投与群において有意ではないが回復傾向を示していた。

有意ではないが加味四物湯投与により下肢筋肉の重量減少が抑制されていたことから、dexamethasoneによって誘導される筋特異的指キチンリガーゼである muscle atrophy F-box/atrogin-1 (*Atrogin-1*) と muscle ring finger-1 (*MuRF1*)、逆に筋肉を増強する方向に作用する *PGC-1 α* と *NRF1* についてその遺伝子発現量を下肢筋肉からRNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いて検討した。その結果(図6)、dexamethasoneによって *Atrogin-1* 遺伝子発現増加を有意ではないが加味四物湯投与群で抑制傾向が認められた。また、*MuRF1* 遺伝子はdexamethasoneによる影響を受けていなかったが、250mg/mL加味四物湯投与群において、有意に発現抑制していた。一方、筋肉を増強する *PGC-1 α* 及び *NRF1* に関しては、dexamethasone投与により増加傾向を示した。これはdexamethasone投与により減少した筋肉量を回復させようとする代償性の反応であるものと考えられる。



Error bars represent mean + SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Normal, # $p < 0.05$ vs Control

図6. 下肢筋肉中における各種遺伝子発現量に及ぼす加味四物湯の効果



Error bars represent mean + SE (n=6), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Normal, ## $p < 0.05$ vs Control

図7. 下肢筋肉中におけるAktタンパク質リン酸化に及ぼす加味四物湯の効果

次に蛋白質合成のシグナル伝達系で重要な役割を果たしているリン酸化酵素Aktの活性に及ぼす影響を検討した。下肢筋肉から抽出したタンパク質をSDS-PAGEを用いて電気泳動し、ウェスタンブロット法によりトータルのAkt発現量とリン酸化Aktの量を測定した。その結果(図7)、トータルAktに関しては500 mg/kg加味四物湯投与群において有意な発現増加が認められた。一方、リン酸化Akt発現量及びリン酸化Akt/トータルAkt比については、dexamethasone投与により有意ではないが減少傾向が認められた。一方加味四物湯投与群において、リン酸化Akt量は濃度依存的に有意に増加していた。また、リン酸化Akt/トータルAkt比については加味四物湯投与両群において同程度ではあるが有意な増加を示していた。

■結論

筋委縮予防・改善を示す天然物の単離同定は、新規筋委縮、筋機能低下の予防・改善薬の開発を可能にすると考えられる。PPAR δ は、PPARサブタイプの中で、その生理的重要性の解明が最も遅かったことや、数種類合成されたアゴニストに発癌の可能性が報告されたことにより、現在臨床応用されているPPAR δ アゴニスト剤は存在しない。また、天然由来PPAR δ アゴニストの報告もほとんどなく、新規PPAR δ アゴニストの単離同定は新薬の開発につながるものと考えられる。今回PPAR δ アゴニスト活性の高かった生薬メタノールエキスから、そのような化合物の単離同定が望まれる。

また、筋委縮モデル動物を用いた筋委縮予防・改善作用を有する漢方方剤の探索により、有効性を示す漢方方剤を見出すことができれば、筋委縮という疾患の長期性を考えると長期投与が可能である漢方方剤の有効利用が考えられ、漢方方剤の新しい方面への応用を支持する科学基盤形成に寄与できるものと期待している。