

Kampo Signal Panel の構築

統括者	済木 育夫	病態生化学分野	教授
所内共同研究者	横山 悟	病態生化学分野	助教
申請代表者	阿部 貴志	新潟大学工学部情報工学科	准教授

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】

漢方方剤はいくつかの生薬を処方することで構成されている。漢方方剤や生薬は経験に基づく効能、性状や味などで分類されており、これらの分類を科学的に理解することは、漢方方剤の効能、作用機序を理解することに繋がると考えられる。そこで、生薬が細胞内シグナルに与える効果に着目し、112種の生薬が10種の転写因子へ及ぼす効果を網羅的に検討した。その結果、生薬の経験的分類ごとに細胞内シグナルへ及ぼす効果が類似していることを明らかにした(PLoS One, 2015)。そこで本年度は、漢方方剤の効能について新規情報を得るために、漢方方剤と構成生薬の相対的な関係を指標に、多次元尺度構成法(MDS)を用いて検討を行った。

【方法】

転写因子によりルシフェラーゼの発現が調節される10種のレポーターベクターを作製した。それらのベクターを肺がん細胞株A549へリポフェクション法により各々遺伝子導入した後、生薬エキス(100 μ g/mL)または漢方方剤(100 μ g/mL)で刺激した。48時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイを行い、得られたデータを用いて、MDSによる漢方方剤とその構成生薬のポジショニングマップを作製した。

【結果】

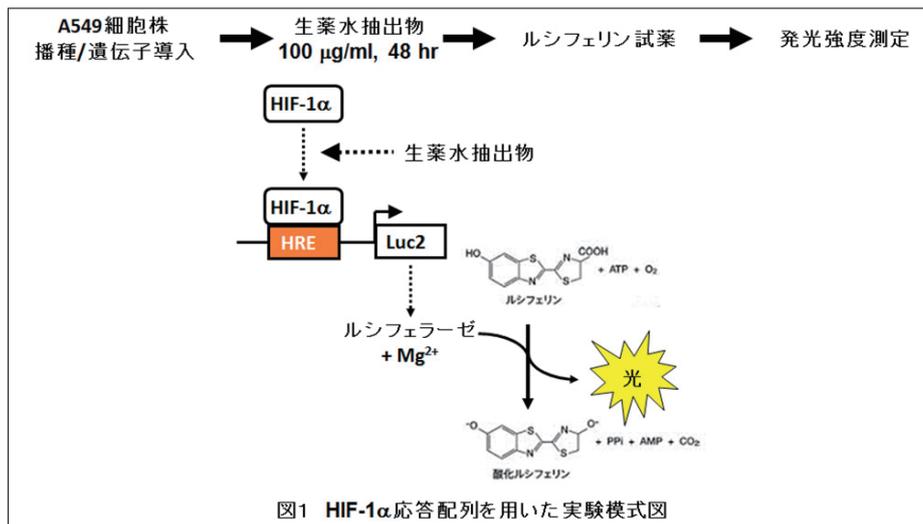
十全大補湯と構成生薬のデータをMDSで解析した結果、補気薬、補血薬に分類される生薬群と四君子湯(補気薬)、四物湯(補血薬)が同様の傾向を持つことが明らかとなった。また、細胞内シグナルに及ぼす効果は蒼朮・白朮でそれぞれ異なるにも関わらず、2種の朮は同様の位置にマッピングされた。十全大補湯以外の漢方方剤をMDSで解析した結果、調べたすべての漢方方剤で生薬群から離れた場所に漢方方剤がマッピングされた。

【結論】

今回の結果より、漢方方剤の効能が生薬エキスによる効果の平均ではなく、相加相乗効果が存在する可能性が示唆された。本研究では、1種の細胞、10種のレポーターベクターのみにおける検討だったが、さらに多くのデータを集積することで、より詳細な解析が可能であると考えられる。経験知と科学知をつなぐ重要な研究になると考えられるとともに、新規薬効についても予測応用できる可能性があると考えられる。

■背景および目的

「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についての科学的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（図1は転写因子HIF1 α の応答配列HREを含むルシフェラーゼプラスミドを用いた実験の模式図である）。



■方 法

2-1. 細胞培養

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）をミリポアフィルター（0.22 μ m/径、Millipore）にて濾過滅菌したものを使用した。細胞はCO₂インキュベーター（37℃、5% CO₂）によって培養した。

2-2. プラスミドの構築、遺伝子導入とクラスタリング

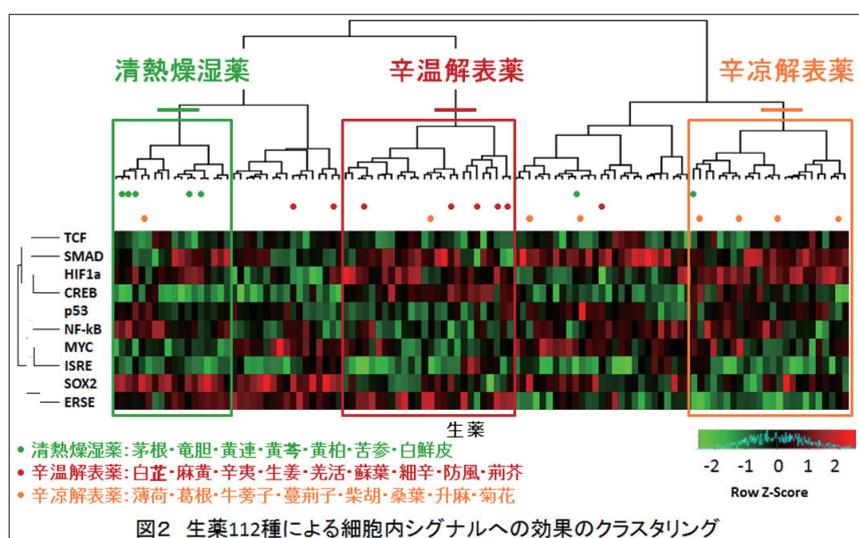
pGL4.26 (Promega) に CREB, ERSF, HIF-1 α , IRFs, MYC, NF- κ B, p53, SMAD, SOX2, TCF/LEF のそれぞれの転写因子結合配列をタンデムに結合させた10種のレポータープラスミドを構築した。

ヒト非小細胞肺癌細胞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、あるいは多次元尺度構成法を用いてマッピングを行った。多次元尺度構成法は、「細胞内シグナルに及ぼす効果が類似している生薬を近くに、効果が異なっている生薬をより遠くに配置して、それを2次元で可視化 (表現) する」ものである。

■結果および考察

3-1. 構成生薬112種によるクラスタリング

生薬エキス112種を用いて10種の転写因子の転写活性化能に対する効果を検討し、クラスタリングを行った。中医学に基づく経験的な分類では、生薬は22種に分類される。その中の清熱燥湿薬、辛温解表薬、辛涼解表薬と呼ばれる生薬群が、今回のクラスタリングによりそれぞれ有意に別のクラスターにエンリッチされていた (図2)。このことから、これまでに経験的に言われていた生薬の効能ごとに、細胞内シグナルへの効果が異なる可能性が示された。また10種という少ない転写因子に対する効果でも十分に分類されていることから、転写因子の数を増加させることで、より正確な生薬の分類が可能になると考えられる。



3-2. 辛温解表薬、辛涼解表薬の特徴

図2で辛温解表薬、辛涼解表薬がエンリッチされていたクラスターに着目し、さらに検討を行った結果 (図3)、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3A)、また辛温解表薬、辛涼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3B)。このことから、CREB・ERSFに関わるシグナル経路が、辛温解表薬、辛涼解表薬の効能に重要である可能性が示唆された。さらに、CREB・ERSFの下流遺伝子の発現を調べた結果、辛温解表薬・辛涼解表薬による転写活性への効果と同様の結果が得られたこと (図4)。また漢方薬において辛温解表薬

に分類されている葛根湯においても、辛温解表薬の生薬エキスと同様にCREBの転写活性化、ERSFの転写活性化がそれぞれ観察された（図5）。今回の生薬エキスによる細胞内シグナルへの効果の検討成果より、複数の生薬を組み合わせて処方された漢方薬の効能の解明にも応用できる可能性が示唆された。

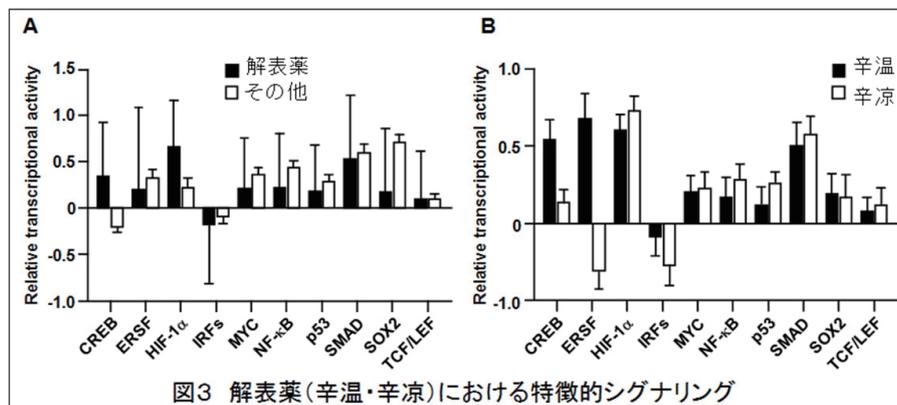


図3 解表薬(辛温・辛涼)における特徴的シグナリング

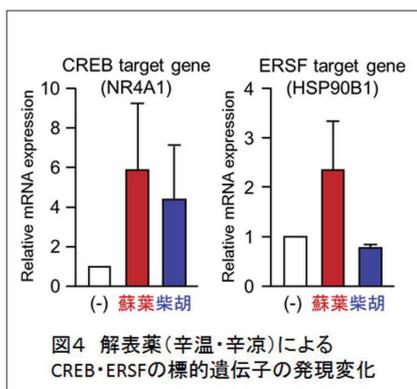


図4 解表薬(辛温・辛涼)によるCREB・ERSFの標的遺伝子の発現変化

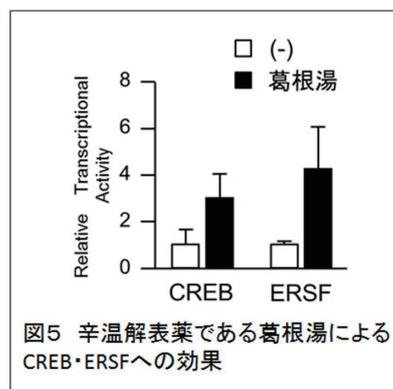


図5 辛温解表薬である葛根湯によるCREB・ERSFへの効果

3-3. 十全大補湯とその構成生薬を用いたマッピング

十全大補湯は、四物湯（補血薬）・四君子湯（補気薬）・桂皮・黄耆で構成されている。十全大補湯・四物湯・四君子湯・構成生薬エキスを用いて10種の転写因子の転写活性化能に対する効果を検討し、多次元尺度構成法を用いたマッピングを行った（図6）。その結果、図4のX軸方向に生薬エキスと漢方薬が分類された。このことは、漢方薬の効能が、構成生薬の効能の平均として発現するものではないということを示していると考えられる。また「四物湯とその構成生薬」と「四君子湯とその構成生薬」が分類されたことから（図6、Y軸方向）、これまで経験的に言われていた補気薬、補血薬という分類を、細胞内シグナルに及ぼす効果で証明できる可能性があることが示唆された。さらに、四物湯・四君子湯に桂皮・黄耆を加えた十全大補湯が、桂皮・黄耆エキスに類似した細胞内シグナルの効果を示すことから、今回の実験手法が漢方薬における加減法等の考え方についての何らかの科学的根拠を与えることが出来るものであると考えられる。

3-4. 十全大補湯における蒼朮・白朮の作用の比較

市販されている十全大補湯には、朮として蒼朮を使用しているものと白朮を使用しているものの2種が存在する。そこで図4と同様に蒼朮を白朮に置き換えて多次元尺度構成法を用いたマッピングを行った（図7）。その結果、細胞内シグナルに及ぼす効果は蒼朮・白朮でそれぞれ異なるにも関わらず、

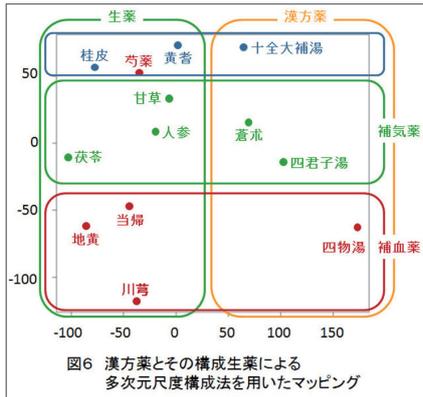


図6 漢方薬とその構成生薬による
多次元尺度構成法を用いたマッピング

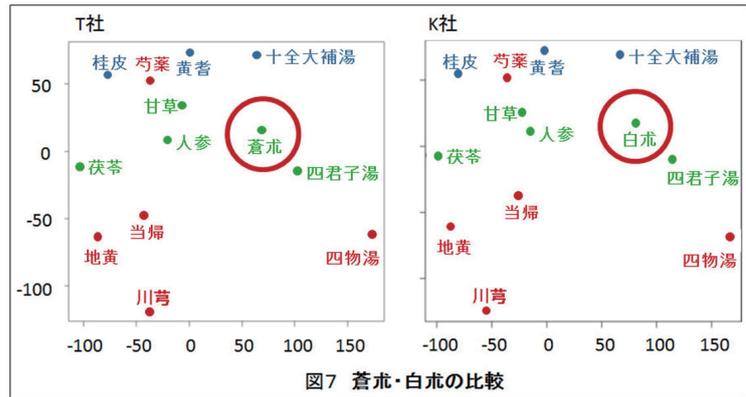


図7 蒼朮・白朮の比較

2種の朮は同様の位置にマッピングされた。このことは、蒼朮・白朮の2種の生薬の十全大補湯中の作用が類似していることを示唆しており、異なる朮を用いている市販の十全大補湯においても同様の効能が認められることを支持する結果であると考えられる。

3-5. 漢方薬と構成生薬のマッピング

十全大補湯で、漢方薬と構成生薬を分類することが可能であったことから、他の漢方方剤（大建中湯、半夏瀉心湯、黄蓮解毒湯）を用いて同様のマッピングを行った（図8）。用いた漢方方剤すべてにおいて、漢方方剤が構成生薬と離れた位置にマッピングされた。この結果は、漢方方剤の効能・効果は、それぞれの構成生薬の効能・効果の平均として現れるものではなく、相加相乗効果のような相互作用をもって発揮されていることを捉えていると考えられる。

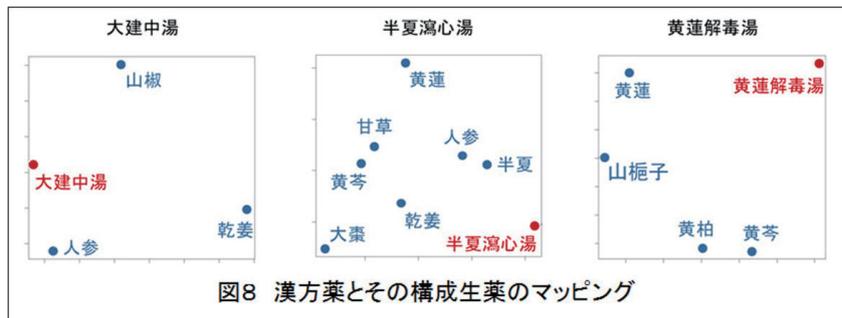


図8 漢方薬とその構成生薬のマッピング

■ 結論

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、辛涼解表薬)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。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。

今回の研究の一部については、Eshima, S., Yokoyama, S.*, Abe, T., Hayakawa, Y., Saiki, I. (2015) Multi-pathway cellular analysis on crude natural drugs/herbs from Japanese Kampo formulations. PLoS One. 10, e0128872. * *corresponding author* に掲載されている。