

マウス体内時計を視点とした東洋医学治療法の評価系開発

柴田重信¹, 小岩剛貴², 藤森亜紗子², 森島 剛³(¹理工学術院, ²理工学研究科, ³理工学部)

【目的】

東洋医学の伝統的手法である「漢方薬治療法」の体内時計・エネルギー代謝に及ぼす影響について、報告をする。漢方薬は特定の臓器の疾病を取り扱うと言うより、全身の状態を改善したり、あるいは健康増進を目的とした治療法である。時計遺伝子が脳を始めとして全身の臓器や筋肉にも発現し、体内時計システムはホメオスタシス維持に重要であることがわかってきているので、漢方薬治療が時計を介して、生体システムの改善などに役立っている視点で研究を展開している。

【1】漢方薬の時計遺伝子発現に与える影響

初年度は、末梢臓器の代表として肝臓や肺を選択し、時計遺伝子発現に対する、種々の漢方薬の作用を調べた。本実験では、肝臓や肺の不調による疾病により有効であろう考えられている漢方薬の組み合わせを用いた。マウスの肝臓のPer1遺伝子発現は大柴胡湯、柴胡桂枝湯により、用量依存的に増大した。したがって、漢方薬に含まれている生薬の組み合わせから、柴胡を含む漢方薬に肝臓の時計を動かす作用がある可能性が示唆された。一方、肺の時計遺伝子Per1、Per2の遺伝子発現は小青竜湯により顕著に増大したが、肺機能の改善に臨床応用される麦門冬湯にはそのような作用はみられなかった。

最近mPer2::luciferaseノックインマウスの肝臓の時計遺伝子発現リズムは生物発光リズムとして長期間観察できることが分かってきた。また、漢方薬投与による位相の変動も観察できることが分かってきた。そこで、次年度は、まず手に入れた12種類の漢方薬の肝臓時計遺伝子発現の周期と位相に対する作用を調べた。【方法】大柴胡湯、小柴胡湯、柴胡桂枝湯、小青竜湯、当帰芍薬散、加味逍遙散、桂枝茯苓丸、麦門冬湯、補中益気湯、十全大補湯、麻杏甘石湯、人參養榮湯の12種類の漢方薬を1ug/mlの濃度で、肝臓培養液中に添加した。その後、ルミサイクル（経時的に発光量を自動的に計測する機器）に入れ、Per2時計遺伝子発現の位相と周期を計測した。対照群には溶媒として水のみを添加した。【結果と考察】その結果、大柴胡湯、柴胡桂枝湯、麦門冬湯、麻杏甘石湯は位相が少し前進する傾向が見られた。一方、大柴胡湯は発振周期を長くし、麻杏甘石湯、十全大補湯、人參養榮湯は発振周期を短くする

ことが分かった。一般的に、時計遺伝子のミュータントマウスでは、活動リズム周期が短くなったり (Per 2, Cry1 ミュータント)、長くなったり (Per1, Cry2, Clock) するフェノタイプが出現することが知られているので、発振周期に作用する漢方薬は時計遺伝子作用する可能性が強く示唆された。

最近の研究では、体内時計とメタボリックシンドロームが密接な関係にあることが分かってきた。例えば、Clockのミュータントは肥満・糖尿病になりやすく、時差ボケマウスもやはり肥満になりやすいことが知られている。一方、エネルギー代謝に関与する遺伝子としてSirt1, Pgc-1aが知られているが、これらの遺伝子産物はPer2やBmal1といった時計遺伝子を転写調節することが知られている。また、高脂血症や糖尿病治療の使われているPpar α , Ppar γ の作動薬が時計遺伝子発現を調節する。また逆に体内時計がPpar α 遺伝子発現を調節し、日内変動を示す。ところで最近漢方薬が肥満防止に良いということで、防風通聖散などが用いられている。以上のことを要約すれば、漢方薬が体内時計遺伝子発現とエネルギー代謝に関与する遺伝子発現に同時に作用し、体内時計の改善と肥満改善に寄与する可能性が指摘される。その点を明らかにするために、まず上記6種の漢方薬を4日間経口投与したときの体重変化を調べた。【方法】体内時計に作用した大柴胡湯、柴胡桂枝湯、麦門冬湯、麻杏甘石湯、十全大補湯、人參養榮湯の6種の漢方薬を125mg/kgの用量で4日間経口投与した。対照群は水投与とした。【結果と考察】その結果、大柴胡湯、柴胡桂枝湯と十全大補湯は、マウスの体重が、2.9g, 1.9g, 2.5g低下し、これは対照群が0.8g増加するのとは対照的であった。一方、麦門冬湯、麻杏甘石湯、人參養榮湯の3種類は、体重が0.8g, 0.8g, 1.6g増大となり、先の3種類とは全く異なった。今回は、漢方薬が、体内時計に影響をし、かつ肥満や糖尿病に有用である可能性を視野にスクリーニングをかけていることもあり、以下の実験では体重低下が見られた大柴胡湯、柴胡桂枝湯と十全大補湯を用いて実験を行うこととした。漢方薬は混餌して与える研究が広く行われており、またストレス軽減、長期投与を考慮して、これら3種の漢方薬を混餌で与え、体重、時計遺伝子、エネルギー代謝関連遺伝子発現

を調べた。【**方法**】成人が飲む薬用量を考え、粉末食に3%の濃度で加えた粉末食を錠剤機で成形し、通常の餌のように10日間摂食させた。摂食量、体重を測定した後、肝臓を取り出し、real time RT-PCRで遺伝子発現を調べた。【**結果と考察**】体重は、対照群で1.5g増大したが、十全大補湯では1.1gと増大が小さかった。一方、大柴胡湯、柴胡桂枝湯はそれぞれ、1.6g、1.8gと対照群と大差なかった。次に肝臓の遺伝子発現を調べてみると、大柴胡湯、柴胡桂枝湯はPer1, Per2, Sirt1, Pgc-1aのいずれの遺伝子発現にもほとんど何ら作用を及ぼさなかったが、十全大補湯はPer2遺伝子発現を有意に低下させ、Sirt1, Pgc-1aの遺伝子発現を対照群の3-4倍程度、有意に増大させた。このことは、十全大補湯が、体内時計にも作用し、エネルギー代謝にも作用する漢方薬であることが世界で初めて見いだされた。

これまでの研究で、十全大補湯が自由摂食でPer2遺伝子発現を低下させ、Sirt1, Pgc-1aの遺伝子発現を増大させることが判明した。十全大補湯は10種類の生薬からなる漢方薬であり、これに含まれる生薬は、先に述べた防風通聖散と共通する生薬もある。そこで、十全大補湯と防風通聖散に共通する生薬例えば、トウキなどが抗肥満効果などを有する可能性が考えられる。今回、十全大補湯に含まれ、すぐに入手可能であった8種の生薬について、漢方薬の場合と同様に調べた。【**方法**】センキュウ、ソウジュツ、トウキ、ブクリョウ、ケイヒ、シャクヤク、ニンジン、カンゾウ、の8種の生薬を漢方として用いた時の割合に換算して与えた。例えばカンゾウは他の生薬の半分量しか入っていないために、半分量を与えた。それぞれの生薬の与えた%は、3x(組成比/28.5)とした。混餌により、10日間与え、摂食量、体重ならびに時計遺伝子とエネルギー代謝関連遺伝子の発現量を調べた。【**結果と考察**】すべての生薬間に摂食量の差は認められなかった。体重変化に有意差は認められなかったが、カンゾウ、シャクヤク、ニンジンでは抑制される傾向にあった。次に時計遺伝子発現を調べてみると、Per2遺伝子発現はカンゾウ、ケイヒ、シャクヤク、ニンジンで低下傾向があり、カンゾウでは有意に低下した。Sirt1遺伝子発現は、ソウジュツ、トウキで有意に増大した。また、Pgc-1aはセンキュウ、トウキで増大した。以上の結果を図1に示す。縦軸は溶媒投与の遺伝子発現率を1とし、相対的な変化率として示した。以上の結果から以下の考察ができる。十全大補湯が有する体内時計に対する作用とエネルギー代謝に対する作用は、10種含まれているそれぞれの生薬の薬理作用の総和として現れる。したがって、生薬単品だけの摂取では、十全大補湯が本来持っている薬理作用、治療効果は期待できないであろう。最近の研究では、一つの遺伝子発現が下流遺伝子発現を連鎖的に調整することが知られており、今回の例では、Sirt1が、Pgc-1aを促進的に制御し、Per2を抑制的に制御することが知られているので、ある特定の生薬がこのパスウェイを活性化していると考えたが、複数の生薬が協力的に作用していることが判明した。今回の研究結果から、トウキの成分がエネルギー代謝に重要である可能性が指摘され、有効成分の単離を行う必要もあろう。また、十全大補湯と生薬成分が類似する抑肝散や、肥満治療に有効であると言われていた防風通聖散にも共通した作用が見られるか否かを確かめる必要がある。

【**研究成果・業績**】 吉田晶子、山口正太郎、工藤崇、柴田重信
更年期モデルマウスの体温調節に対する体内時計の関与 第14回日本時間生物学会学術大会学術大会 1-C-040 東京 2007年11月7日-11月9日
山口正太郎、吉田晶子、山田健司、工藤崇、柴田重信、
卵巣を切除した更年期障害モデルマウスにおける体温サーカディアン・ウルトラディアンリズムの変化 第85回生理学会大会1P-G-109 東京 2008年3月25日-3月27日
堂本隆壯、井筒裕之、小岩剛貴、柴田重信、
外界の温度変化がマウス末梢の時計遺伝子発現に与える影響 第15回日本時間生物学会学術大会、P038、岡山、2008年11月8-9日
小岩剛貴、平尾彰子、田原優、柴田重信、
十全大補湯がマウス肝臓の時計遺伝子及び代謝関連遺伝子に与える影響 2010年度薬理学会学術大会、大阪、2010年3月16-18日
森島剛、小岩剛貴、柴田重信
十全大補湯がマウスの時計遺伝子及び代謝関連遺伝子に与える効果 2010年日本栄養・食糧学会学術大会、徳島、2010年5月21-23日