

和漢医薬学総合研究所年報

富 山 大 学

第 44 卷 2017 年



Annual Report
Institute of Natural Medicine
University of Toyama
Vol. 44, 2017

富山大学 和漢医薬学総合研究所年報 44 巻 2017 年

Annual Report of Institute of Natural Medicine

University of Toyama Vol. 44, 2017

目次

巻頭言.....	1
総 説	
トランスレーショナルリサーチ推進研究部門「情報科学分野」	
奥 牧人.....	2
各研究部門・附属センターの活動と業績	
資源開発研究部門 生薬資源科学分野.....	12
天然物化学分野.....	19
病態制御研究部門 複合薬物薬理学分野.....	25
病態生化学分野.....	29
消化管生理学分野.....	33
神経機能学分野.....	39
栄養代謝学分野.....	44
臨床科学研究部門 漢方診断学分野.....	47
トランスレーショナルリサーチ推進研究部門	
漢方トランスレーショナルリサーチ分野.....	54
天然薬物開発分野.....	60
情報科学分野.....	67
附属民族薬物研究センター	
国際共同研究分野.....	68
民族薬物資料館.....	71
2017 年度の活動記録.....	74

表紙の写真

ヒメハギ科のイトヒメハギ *Polygala tenuifolia* Willdenow, 遠志, tenuifolin

(モンゴル国ヘンティ県にて, 2015年7月22日, 小松かつ子撮影)

遠志は *Polygala tenuifolia* の根または根皮に由来し、去痰、鎮静、強壮薬として、喀痰・咳嗽、驚きやすく動悸するもの、健忘症、不眠、できものなどに応用される。本品が配合される漢方処方には、帰脾湯、加味帰脾湯、加味温胆湯、人参養栄湯などがある。2015年12月に「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」が策定されたことにより、2017年4月以降、この規格を満足する一般用医薬品のオンジエキス製剤が「中年期以降の物忘れを改善する」という効能効果を表示して、数社から上市された。オンジエキスにアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性上昇作用など、含有成分の tenuifolin に神経保護作用、3, 6'-disinapoyl sucrose に抗うつ作用などが *in vitro*、*in vivo* レベルで報告されているが、抗認知症や抗うつ病に至るまでの作用機序の解明や臨床研究は不十分であり、エビデンスの構築が望まれている。

和漢薬研究の科学基盤形成事業

平成 29 年度 共同利用・共同研究活動

目 次

【一般研究 I】

グリチルリチンによる DAMP:HMGB1 アイソフォームの分別制御と 抗炎症活性のスペクトラムに関する研究.....77

申請代表者	丸山 征郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科システム血拴制御学	特任教授
所外共同研究者	大山 陽子	鹿児島大学病院検査部	医員
所内共同研究者	早川 芳弘	病態制御研究部門病態生化学分野	教授

漢方薬由来化合物のヒト卵管上皮細胞の繊毛動態へ与える影響の解析.....81

申請代表者	岩野 智彦	山梨大学大学院総合研究部医学域	助教
所外共同研究者	竹田 扇	山梨大学大学院総合研究部医学域	教授
所外共同研究者	朱 茂碧	山梨大学大学院総合研究部医学域	大学院生
所内共同研究者	柴原 直利	臨床科学研究部門漢方診断学分野	教授

車前子成分を基盤とした抗がん薬誘発末梢神経障害性異常感覚の 予防・治療薬シーズの同定.....86

申請代表者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	准教授
所外共同研究者	歌 大介	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	助教
所外共同研究者	前坂 未紀	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	学部生
所内共同研究者	小松 かつ子	資源開発研究部門生薬資源科学分野	教授
所内共同研究者	當銘 一文	資源開発研究部門生薬資源科学分野	准教授

ミャンマー産伝統薬用植物由来の抗インフルエンザ活性天然化合物の探索研究.....90

申請代表者	庄司 正樹	徳島文理大学薬学部生化学講座	助教
所外共同研究者	葛原 隆	徳島文理大学薬学部生化学講座	教授
所内共同研究者	伊藤 卓也	資源開発研究部門天然物化学分野 (現 大阪大谷大学薬学部天然薬物学講座)	准教授 (現 教授)

麹菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立.....93

申請代表者 奥津 果優 鹿児島大学農学部 特任助教
所内共同研究者 小松 かつ子 資源開発研究部門生薬資源科学分野 教授

和漢薬の骨髓由来免疫抑制細胞 (MDSC) の調節作用とその意義98

申請代表者 堀江 一郎 東京理科大学薬学部応用薬理学研究室 助教
(現 山口東京理科大学薬学部生体防御学分野)
所外共同研究者 磯濱 洋一郎 東京理科大学薬学部応用薬理学研究室 教授
所内共同研究者 早川 芳弘 病態制御研究部門病態生化学分野 教授

霊芝由来漢方成分生合成酵素の機能解析とその物質生産への応用105

申請代表者 淡川 孝義 東京大学大学院薬学系研究科 講師
所外共同研究者 中村 仁美 東京大学大学院薬学系研究科 助教
所外共同研究者 尾関 雅弘 東京大学大学院薬学系研究科 大学院生
所内共同研究者 森田 洋行 資源開発研究部門天然物化学分野 教授

植物の防御反応を利用した水耕栽培薬用植物の機能性強化に関する研究108

申請代表者 田中 謙 立命館大学薬学部 教授
所内共同研究者 渡辺 志朗 病態制御研究部門栄養代謝学分野 准教授

漢方方剤・生薬由来新規抗マラリア薬の探索112

申請代表者 平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 教授
所外共同研究者 水上 修作 長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 助教
所外共同研究者 Awet Alem 長崎大学熱帯医学研究所免疫遺伝学分野 大学院生
Teklemichael
所内共同研究者 當銘 一文 資源開発研究部門生薬資源科学分野 准教授
所内共同研究者 小松 かつ子 資源開発研究部門生薬資源科学分野 教授

原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析118

申請代表者 加藤 健太郎 帯広畜産大学原虫病研究センター 准教授
所外共同研究者 野中 基弘 帯広畜産大学原虫病研究センター 学部生
所外共同研究者 韓 永梅 帯広畜産大学原虫病研究センター 特任研究員
所内共同研究者 門脇 真 病態制御研究部門消化管生理学分野 教授

精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析.....123

申請代表者	荒木 良太	摂南大学薬学部複合薬物解析学研究室	助教
所内共同研究者	藤原 博典	病態制御研究部門複合薬物薬理学分野	助教
所内共同研究者	松本 欣三	病態制御研究部門複合薬物薬理学分野	教授

植物メロテルペノイド生合成酵素の立体構造解析を基盤とする新規天然薬物資源の開拓129

申請代表者	田浦 太志	富山大学大学院医学薬学研究部（薬学） 薬用生物資源学研究室	准教授
所外共同研究者	飯島 未宇	富山大学大学院医学薬学教育部（薬学） 薬用生物資源学研究室	大学院生
所外共同研究者	中川 竜一	富山大学大学院医学薬学教育部（薬学） 薬用生物資源学研究室	大学院生
所内共同研究者	森田 洋行	資源開発研究部門天然物化学分野	教授

【一般研究Ⅱ】

Characterization of new type III polyketide synthase from Dendrobium orchid.....133

Name of dispatched researcher (派遣研究者名)	Thaniya Wunnakup	Graduate Student
Instructor (指導教官, 研究指導者)	Wanchai De-Eknamkul	Associate Professor of Chulalongkorn University
Affiliation of Instructor (所属)	Chulalongkorn University	
Host Collaborator (受入研究者)	Hiroyuki Morita	教授

【探索研究プロジェクト】

生薬を用いた肝炎ウイルスの新しい制御法の探索.....138

申請代表者	本田 知之	大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座 ウイルス学	准教授
所外共同研究者	西川 祐樹	大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座 ウイルス学	学部学生

癌微小環境を標的とした生薬由来の抗癌物質の探索.....139

申請代表者	寺林 健	大分大学医学部薬理学講座	助教
所外共同研究者	石崎 敏理	大分大学医学部薬理学講座	教授

転写共役因子 YAP1/TAZ を活性化する生薬・漢方薬の多発性骨髄腫治療への応用140

申請代表者	丸山 順一	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	岩佐 宏晃	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	畑 裕	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	教授

エピジェネティックな作用機序を持つ抗癌生薬の探索142

申請代表者	平崎 能郎	千葉大学大学院医学研究院・和漢診療学	特任講師
所外共同研究者	金田 篤志	千葉大学大学院医学研究院・分子腫瘍学	教授
所外共同研究者	篠原 憲一	千葉大学大学院医学研究院・分子腫瘍学	助教

細胞増殖や浸潤シグナル経路を抑制する生薬成分の探索・同定.....144

申請代表者	宮田 信吾	近畿大学東洋医学研究所分子脳科学研究部門	教授
所外共同研究者	石野 雄吾	近畿大学東洋医学研究所分子脳科学研究部門	助教
所外共同研究者	清水 尚子	近畿大学東洋医学研究所分子脳科学研究部門	助教

**迅速な NLRP3 インフラマソーム活性化検出法の開発とこれを制御する生薬
もしくは漢方の探索146**

申請代表者	河西 文武	富山県立大学・工学部・医薬品工学科	講師
-------	-------	-------------------	----

伝統医薬由来の抗インフルエンザウイルス活性探索と作用機序解明147

申請代表者	渡邊 健	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	助教
所外共同研究者	マカウ ジュリ アン ジェンピ	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	大学院生

生薬由来化合物をライブラリとした抗ウイルス剤の探索.....148

申請代表者	袴田 航	日本大学生物資源科学部生命化学科	准教授
所外共同研究者	三浦 一輝	日本大学大学院生物資源科学研究科	大学院生
所外共同研究者	小山 亮祐	日本大学大学院生物資源科学研究科	大学院生

富山大学和漢医薬学総合研究所・長崎大学熱帯医学研究所

第7回交流セミナー講演要旨

富山大学和漢医薬学総合研究所 教授 門脇 真

「樹状細胞の遊走抑制を新規創薬標的とした免疫抑制薬の漢方薬成分からの探索研究」
..... 149

長崎大学熱帯医学・グローバルヘルス研究科長 北 潔

「抗がん・抗感染症薬アスコフラノン ―自然からの贈り物―」 150

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授 當銘 一文

「抗マラリア薬開発を指向した天然薬物研究」 151

長崎大学感染症共同研究拠点 教授 安田 二郎

「新興ウイルス感染症に対する創薬」 152

富山大学和漢医薬学総合研究所 准教授 Suresh Awale

「Application of NMR metabolomics in understanding the physiological target of Kampo
medicine」 153

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 Awet Alem Teklemichael

「Japanese Herbal Medicine (Kampo) Based Antimalarial Drug Development」 154

研究所年報 巻頭の言葉

和漢医薬学総合研究所は、前身の旧・富山大学薬学部附属和漢薬研究施設時代を含めて創設 54 年が経ちました。研究所は、設立当初より①和漢薬材料としての天然物資源を研究する資源開発部門、②和漢薬が適用される病態と適用による病態変化に関する機構等を研究する病態制御部門、③和漢薬の臨床効果の評価から適切利用を研究する臨床科学部門の 3 部門を中核とした組織体制で「和漢薬の学理」を追求し、我が国の和漢薬研究をリードしてきました。創立から半世紀の時を経た今日、社会環境や生活環境の激変、更には高齢者人口の急増などで人類の疾病構造も大きく変わり、生活習慣病、ストレスに密接に関連したアレルギー性疾患や精神疾患、認知症やサルコペニアなど高齢者特有の心身の虚弱化した疾病など、所謂西洋薬でも克服困難な数多くの医療問題が現出してきました。このような背景により、社会から和漢薬医薬学研究に寄せられる期待と求められる役割は以前にも増して大きくなっております。

天然生薬を用いる和漢薬などの伝統薬は、複雑な天然薬物成分から構成されることを特徴とし、その有効性、作用メカニズム、詳細な体内動態等の解析に関する研究戦略や方法論は、今日のめざましい生命科学や情報科学の技術進歩により飛躍的に進化してきました。本研究所は、新しいアイデアと先端的技術を駆使し、「和漢薬の多成分・複雑系」、「和漢薬の治療対象とする病態の複雑系」、さらにはそれら「複雑系の相互作用」を主な研究対象として、『和漢薬の複雑系の科学的理解と解明をめざす研究』を目標に掲げ、社会からの要請に応えるよう邁進します。この目標達成に向け、研究所教員は、大学を挙げての協力・支援を得つつ、新たな研究ミッションの設定、研究組織の改編、国内外の研究機関や研究者コミュニティとの連携強化等を実施し、研究機能の強化を図る所存です。つきましては今後とも皆様方から一層のご支援を賜りますようお願い申し上げます。

平成 30 年 4 月 1 日

和漢医薬学総合研究所 所長 松本欣三

総説

遺伝子発現量データ解析の基礎

富山大学和漢医薬学総合研究所 情報科学分野

奥 牧人

概要：漢方薬の複雑な作用機序を解明するためには、これまでにない新たなアプローチに積極的に取り組むと同時に、過去より受け継がれてきた基礎的な方法論も正しく理解し、必要に応じて最適な方法を選択出来ることが望ましい。本稿では、筆者が以前学生の教育用に作った資料を元に、DNA マイクロアレイにより計測された遺伝子発現量データに関する基礎的な解析法や可視化法について説明する。

1. はじめに

漢方医学は、しばしば中国の伝統医学と混同されるが、それが日本に渡り独自の発展を遂げてきたものである。名前の由来は、江戸時代にオランダから西洋医学が入ってきた際、それと区別するために元からあった医学体系を漢方と称するようになったと言われている。漢方薬は複数の生薬（植物、鉱物、動物の薬用部分）を組み合わせたものであり、多数の天然化合物を含んでいる。漢方薬は現在日本国内で広く使用されており、日本漢方生薬製剤協会による 2011 年の調査では、約 90 %の医師が漢方薬を使用していると回答している[1]。国としての承認や基準作りも進んでおり、医療用医薬品として 148 処方薬が薬価基準に、一般用医薬品として 294 処方が一般用漢方製剤製造販売承認基準にそれぞれ定められている。

漢方薬の複雑な作用機序を解明するため、これまでに多くの研究がなされてきたが、まだ十分には分かっていない。そこで、従来と異なる新たなアプローチとして、生態学や気候学といった他分野で開発が進んでいる統計的手法を生命科学へ移入し、漢方薬の複雑な作用機序の一端を明らかにしようというプロジェクトが立ち上がり、筆者も主要メンバーとして関わってきた。しかし、そこで筆者が強く感じたのは、新規手法を適用する

前に通常の方法論が十分に試されていないのではないかという懸念である。その理由の一つとして、DNA マイクロアレイデータの基本的な解析によって何がどこまで分かるのか、多くの人にとってイメージしづらいことが挙げられる。

そこで本稿では、DNA マイクロアレイにより計測された遺伝子発現量データに関する基礎的な解析法や可視化法について説明する。対象は、自ら遺伝子発現量データ解析に挑戦したい学生や研究員に加え、自分で解析するつもりはないが、論文等で時折見かける生命情報学関係のグラフや表の意味をより深く知りたい、という方などを想定している。

2. 実験条件の確認と他の測定項目のプロット

遺伝子発現量データ解析で最初にすべきことは、実験条件および各サンプルの意味の確認である。意味不明の呪文だと思って解析を続行してしまうと、後でとんでもない取り違えを引き起こす危険がある。特に、何と発音したら良いか分からない単語があるとミスを引き起こしやすいので、最初に調べておく。

サンプルの意味の確認が済んだら、遺伝子発現量データ以外の測定項目を先にプロットする。このとき、エラーバーの種類に注意する。一般に、

標本標準偏差，標準誤差（標本標準偏差を \sqrt{n} で割ったもの），95%信頼区間（標準誤差を約2倍したもの）の3種が使われている（図1）。信頼区間は有意差について部分的な情報を持っている。具体的には，2つの信頼区間が重なっている場合は有意差があるかどうか調べてみないと分からないが，重なりが無い場合は必ず有意差がある。

データのプロットは，従来折れ線グラフや棒グラフ，箱ひげ図などが用いられてきた。箱ひげ図の見方については統計学の教科書等を書いてあるはずなので説明は割愛する。一方，近年図2の右2つのような新しい描画法が出てきた。それぞれ蜂群図，バイオリン図と呼ぶ。

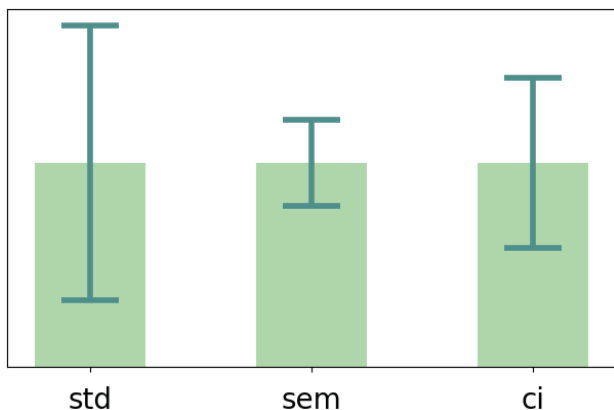


図1. エラーバーの種類による違い。左から順に標本標準偏差，標準誤差，95%信頼区間を同一のデータ（ $n=10$ ）に対し表示している。

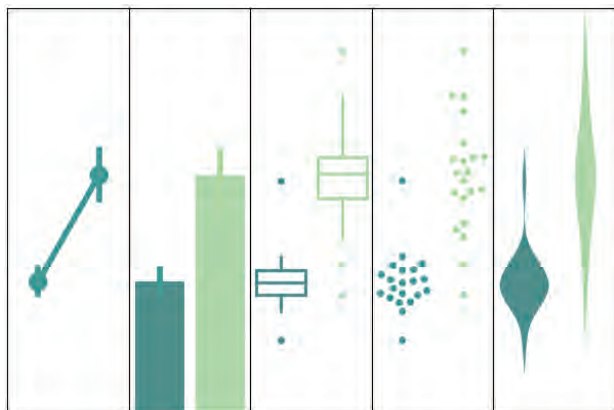


図2. 同一のデータに対する異なる描画法の比較。左から順に折れ線グラフ，棒グラフ，箱ひげ図，蜂群図，バイオリン図を表す。

これらの描画法が登場した背景には，元データの分布が持つ情報の一部が従来のグラフでは失われているという問題意識がある。しかし，データが正規分布に従うと見なせる場合には折れ線グラフや棒グラフが簡潔で分かりやすく，そうでない場合でも，多数のデータを並べて比較する際は横線の明確な箱ひげ図が見やすい。従って，データと解析目的に応じて適切なものを選択するのが良いと考えられる。単にかっこいいからという理由だけで新しいものを選んではいけない。

3. データの前処理

データの前処理は最も手間のかかる工程である。何故なら，自動化や定型化が困難で人間が個別に判断する必要のある処理が多く含まれるからである。細かい注意点やノウハウを挙げ出したらページ数が足りないため，本稿では概説に留める。

DNA マイクロアレイデータの前処理は，主に遺伝子の ID 変換，欠損値の処理，グローバル正規化，対数変換などから成る。これらの順番を入れ替えるとその後の結果が大きく変わるが，何が正しい順番かは筆者の知る限り決まっていない。

遺伝子の ID 変換では，表1に示す主な ID の種類を覚えておく必要がある。これらは遺伝子やそ

表1. 遺伝子や転写産物等を表す主な ID の種類。

ID の種類	例
遺伝子記号	<i>Tnf</i>
フルネーム	Tumor necrosis factor
Entrez	21926
Ensembl	ENSMUSG00000024401
RefSeq	NM_013693
UniProt	P06804
Affymetrix	1419607_at
Agilent	A_51_P385099

の転写産物，さらにそれを翻訳して作られるタンパク質，マイクロアレイのベンダーが設定したプローブ名などを含む。ID 変換をする際は，図 3 に示すような問題が生じるため，ID の意味を踏まえた上で対処法を個別に検討する必要がある。例えば，プローブ名から遺伝子記号への変換ではノンコーディングの部分の変換先が無い。それを解析から除外すべきか，それともプローブ名のまま残すべきかは解析の目的による。遺伝子から転写産物への変換ではスプライシングバリエーションがあるため ID が増えるが，単に変換先の ID の昔の呼び名が後方互換のため併記されているだけの場合でも同様のことが起こる。従って，全てを残すか一つだけを残すかは状況による。プローブ名から転写産物への変換では，複数のプローブが単一の mRNA の異なる領域を担当している場合があり，その場合は最大値を取るのが適切だと一般に考えられている。しかし，それ以外のケースでは平均値にした方が良い場合もあるだろう。

データの前処理に関してもう一つ説明を要する用語がグローバル正規化である。これはサンプル間の分布のズレを補正する処理である（図 4）。通常，GEO 等のデータベースで公開されている遺伝子発現量データは，個々のサンプルに関しては既に推奨された統計的補正がかけられている。しかし，異なるサンプル間のズレの補正は済んでいる場合とない場合があるため，後者の場合は追加の

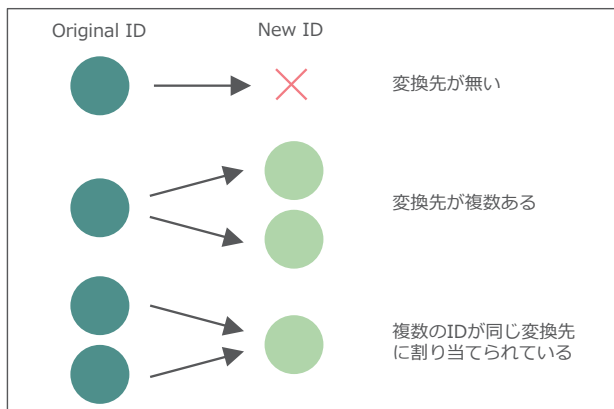


図 3. ID 変換時に生じる問題の例。

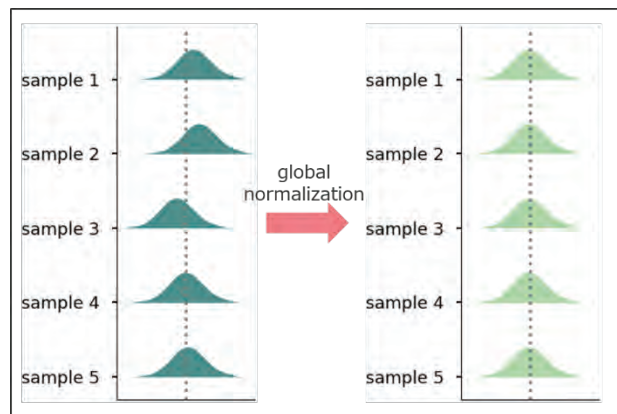


図 4. グローバル正規化の概念図。

正規化が必要となるのである。その背後にある考え方は，全ての遺伝子の発現量が一律に増加または減少するとは考えにくく，測定条件等による系統誤差と見なして問題ないだろうというものがある。平均値または中央値を揃えるといった単純なやり方から，分布の形を全てのサンプルで完全に揃える quantile 正規化[2]などの複雑な手法まであり，データに合わせて適宜選択するのが良い。

4. データ全体の傾向把握

遺伝子発現量データの全体の傾向をつかむため，主成分分析（PCA）などの次元圧縮法がよく用いられる。これにより，多次元の膨大なデータの縮図が得られ，そこから様々なことを読み取ることが出来る。例えば，各サンプルが条件毎に分かれているかどうか，外れ値はないかなどが分かる。もしも直感に反するプロットが得られた場合は，それ以前の作業工程で何かミスは無かったか，用いた前処理法は本当にそのデータに対して適切なものであったか，戻って再検討すべきである。

図 5 に代表的な次元圧縮法のプロットを示す。始めは最も単純な主成分分析を使い，それでうまく傾向が捉えられない場合に限って，より複雑な多次元尺度法（MDS）や t-SNE 法[3]などを順次試すのが良いと考えられる。何故なら，複雑な方法

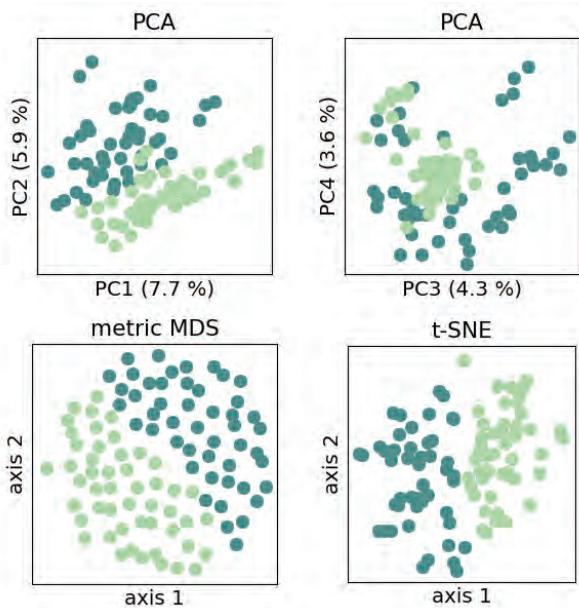


図 5. 同一のデータに対する異なる次元圧縮法の比較. 上段は主成分分析, 左下は計量多次元尺度法, 右下は t-SNE 法の結果をそれぞれ表す. 各点はサンプルを, 色は実験条件を表す.

は決して上位互換ではなく, 疑似乱数の出方次第で結果が異なる上, 解析者が任意に調節可能な多数のパラメータを持っているため, どうしても結果の恣意性の問題が出てきてしまうからである. これを防ぐためには, 疑似乱数の種を変えたり他の方法やパラメータを使ったりしても同様の結果が得られていることを確認する必要がある.

主成分分析では, 各主成分が重要な順に出力されるため, それらの寄与率 (データ全体の分散のうち, 各主成分がどれだけの割合を説明するか) が通常重要視される. 一方, 多次元尺度法や t-SNE 法では各軸の重要性に優劣は無い. 何故かと言うと, これらの手法は高次元のデータを互いの距離関係をなるべく保ったまま 2 次元平面に写像することを目的としており, どの点とどの点が近いか, どれとどれが離れているかという情報のみが考慮されているからである. 従って, たとえプロット全体を時計回りに回転したとしても, 点同士の距離関係は変わらないので問題ない.

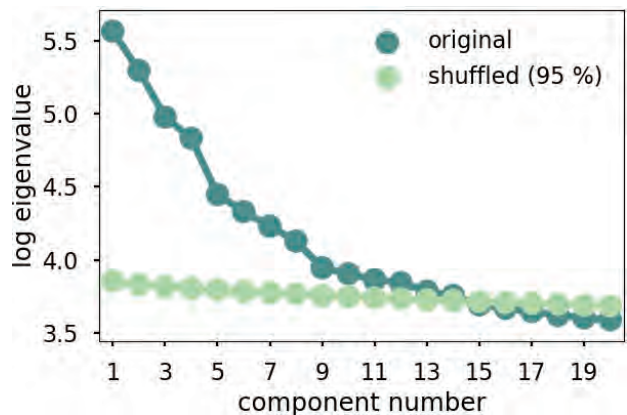


図 6. 主成分分析の有効成分数の推定. 元データとそれをシャッフルしたものを比較している.

主成分分析に話を戻すと, 何番目までの主成分が重要かをデータから推定する方法があるので, 確かめておく心安心である. ここでの目的はあくまでもデータ全体の傾向を捉えることなので, 必ずしも重要と判定された主成分全てを調べる必要はないが, 一つの目安にはなる. 注意として, 古典的な方法の中には使うべきでないと言われるものも多い[4] (1 より大きい固有値の数や, 寄与率の総和が一定値を超えるまで, 目視による scree プロットの変化点など). 信頼のおける方法の一つは, 元データと同じサイズのランダムデータを複数用意し, それらを PCA にかけた結果と元データの結果とを比較する平行分析である (図 6). 元データの固有値がランダムデータのものより有意に上側にある主成分を重要なものとする. ランダムデータは, 元データをサンプル毎にシャッフルしたものなどを用いる. 狭義の平行分析では標準正規分布に従う独立な疑似乱数を使用するが, ここでは広義の意味で呼んでいる.

5. 発現変動遺伝子の取得

発現変動遺伝子 (differentially expressed gene, DEG) とは, 異なる条件やグループ間の比較において発現量が大きく上昇または減少した遺伝子のこと

である。発現変動遺伝子の同定には大きく2通りの方法がある。一つは倍率変化による選別であり、もう一つは仮説検定に基づく判定である。

倍率変化による選別では、一方の発現量の値が他方と比べて2倍より大きく増えたか、或いは1/2倍より小さくなった場合に、DEGと判定することが多い。この慣習的に用いられる閾値に何ら根拠は無く、4倍と1/4倍など、他の値に設定しても構わない。比較したい2つのグループのそれぞれに複数のサンプルがある場合は、発現量の対数を取ったものの平均値を用いる。先に算術平均をとってから対数変換するのではない。

仮説検定の方は、DNAマイクロアレイのデータに限った話だが、対数変換するとほぼ正規分布になるため、一般的にt検定が用いられる。一口にt検定と言っても様々な種類があるが、通常はWelchのt検定を両側検定で使うことが多いだろう(Welchの、と言った時点で、2群比較、独立性、異分散性を仮定したことを意味する)。

ヒトやマウスの遺伝子は2万個以上あるので、各遺伝子についてt検定を繰り返せば、当然多重比較のための特別な処置が必要となってくる。通常の実験研究ではBonferroni補正やTukey-Kramer法などが使われるが、遺伝子発現量データ解析ではBenjamini-Hochberg法(BH法)によるFDR制御がよく用いられる。これについて以下で詳しく説明する。

まず、基本用語の意味についておさらいする。統計量とは、予め定められた手順によって観測データから算出される数値である。例えばt値などである。帰無仮説が真のときに統計量の値が従う分布を考える。このとき、ある観測データに基づく統計量の値に対して、その値またはそれより極端な値が出る確率の総和をp値と呼ぶ(図7)。そして、p値が予め設定しておいた有意水準 α 以下だった場合に帰無仮説が棄却される。これはt検定では有意差があることを意味する。差があるこ

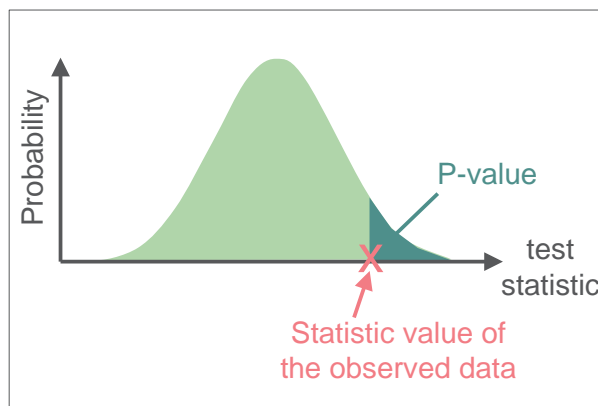


図7. p値の概念図(片側検定の場合)。×印が統計量の値、濃い色の部分の面積がp値を表す。

表2. 混同行列。真陽性(TP)、偽陰性(FN)、偽陽性(FP)、真陰性(TN)の4つの場合がある。

	P (predicted)	N (predicted)
P (actual)	TP	FN
N (actual)	FP	TN

とを陽性(P)、無いことを陰性(N)と表すと、表2に示す混同行列が書ける。

多重比較における一番の問題は、FPが過度に増えることである。例えば、1万個の遺伝子があつて、そのうち真に発現変動を起こしていると予想される遺伝子が500個程度だったとする(図8)。残りは全て陰性のはずだが、通常の有意水準0.05で判定すると、そのうちの5%は陽性として出てくる。その数は約500個にもものぼる。本当に差がある500個が仮に全て正しく陽性と判定出来たとしても、合計で1000個ほど出てくるDEGのうち、約半分は偽物ということになる。

Bonferroni法は、有意水準 α を多重比較数nで割ることで、FPの増加を抑える。しかし、この操作は同時に、真に陽性である遺伝子を検出することも困難にし、FNの増加を引き起こしてしまう。特にnが大きいかほどこのデメリットは大きい。そこで、FPとFNをバランスよく抑えるための新た

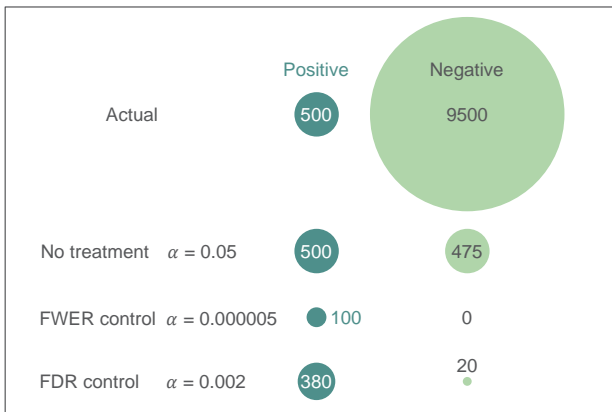


図 8. 多重比較における問題とその対処法概念図。1 行目が真の内訳，下 3 行が各枠組みの中で陽性と判定された遺伝子の内訳を表す。

な枠組みとして登場したのが FDR 制御という考え方であり，それを実現するための手順の一つが BH 法である。FDR 制御に対し，元からあった考え方を FWER 制御と呼ぶ。Bonferroni 法は FWER 制御を実現する手順の一つである。

両者の違いを図 8 に示す。FWER 制御では DEG と判定された遺伝子の中に一つ以上の FP が混入する確率を 5% 以下に抑える。言い換えると 95% の確率で DEG は TP のみから構成される。一方，FDR 制御では DEG の中に含まれる FP の割合を 5% 以下に抑えることを目標とする。つまり，毎回ある程度は FP が混じっていることになる。

BH 法の詳細な説明は割愛するが，その解釈について注意点を述べる。まず，補正するのは p 値ではなく有意水準 α の方である。また，個々の比較毎に異なる補正係数を乗じた p 値や有意水準を用いるのではなく，実質的に全ての比較で同じ値の α を使用していることに相当する。

つまり，まず初めに許容される FP 混入率（通常 5%）を解析者が指定すると，それに応じて最適な有意水準の値がデータから算出され，p 値がそれ以下の遺伝子が陽性と判定され出力される。その有意水準の値とは，陽性と判定された遺伝子の p 値の中で最大のものに他ならない。

6. 発現変動遺伝子リスト間の重複度合の確認

複数の発現変動遺伝子リストが得られている時はベン図を描くことが多い（図 9）。これにより，異なるリスト間で共通する遺伝子や，片方のみに含まれる遺伝子の個数などが把握しやすくなる。しかし，ベン図が有効な集合の個数はせいぜい 4 個が限界である。何故なら，ベン図中の領域の数は集合の個数に対して 2 のべき乗で増えていくため，集合の数が多くなるとベン図から意味のある情報を読み取れなくなるからである。

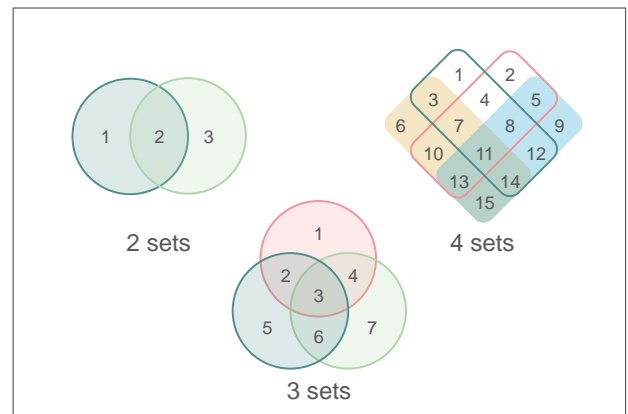


図 9. ベン図の例。実際に使う際は，各領域に含まれる遺伝子数を調べて記入する。

7. クラスタリング

クラスタリングとは，似たようなデータ点をグループ別にまとめる手法である。遺伝子発現量データ解析で頻繁に使用される。例えば時系列データの場合，時間経過とともに発現量が上昇する遺伝子グループ，徐々に減少するグループ，ほぼ一定値のグループなどに切り分けることが出来る。

クラスタリングには様々な種類があるが，遺伝子発現量データ解析では一般に凝集型の階層的クラスタリングがよく用いられている。凝集型でない階層的クラスタリング（分割型と呼ばれる）はほとんど用いられないため，以降では単に階層

的クラスタリングと呼ぶ。

階層的クラスタリングの前処理として、遺伝子毎に z 変換をかける場合が多い。その理由は、そうしない場合に、平均的な発現量の高い遺伝子同士、低い遺伝子同士がそれぞれクラスタを作り、それ以外の観点による分類（例えば、投薬により発現量が徐々に上昇するグループと下降するグループなど）が出来なくなってしまうからである。

階層的クラスタリングには3つの設定項目がある。1つ目の設定項目は類似度・非類似度である。類似度とは似ているほど値が大きくなる指標、非類似度とは似ていないほど値が大きくなる指標のことである。類似度は非類似度に変換して使用する。非類似度のうち、三角不等式など幾つかの条件を満たすものを特に距離と呼ぶ。表3に代表的な類似度と非類似度をまとめるが、筆者の経験上、ユークリッド距離か相関係数のいずれかを使っておけば大体問題ない。

2つ目の設定項目は連結法である。連結法とは、クラスタ間の非類似度をどう決めるかを表す。図10に代表的な3つの連結法を示すが、遺伝子発現量データ解析において単連結法は使うべきでない。何故なら、chaining という現象[5]が発生し、データが本来有するクラスタ構造が得られないからである（図11）。

3つ目の設定項目は樹形図の分割基準である。階層的クラスタリングでは、樹形図をある閾値で

表3. 主な類似度と非類似度.

名前	種別
ユークリッド距離, L2 ノルム	距離
マンハッタン距離, L1 ノルム	距離
チェビシェフ距離, 最大値ノルム	距離
マハラノビス距離	距離
相関係数	類似度
コサイン類似度	類似度

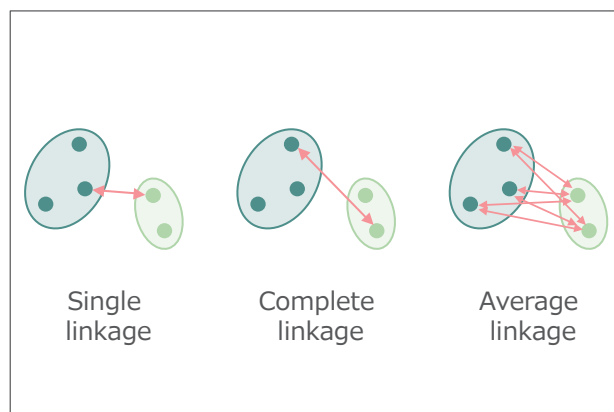


図10. 代表的な連結法概念図. 左から順に単連結法, 完全連結法, 平均連結法を表す. 点同士の非類似度の最小, 最大, 平均値をそれぞれ用いる.

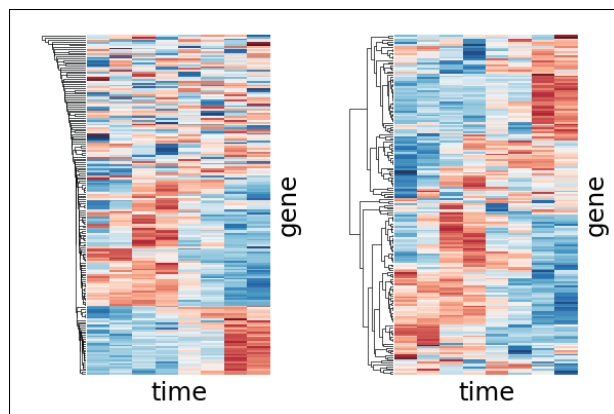


図11. (左) 単連結法による失敗例. Chaining 現象により, 上側3分の1程度が構造化出来ていない. (右) 同じデータに平均連結法を適用したもの.

切断することにより最終的なクラスタ分けを行う（図12）。閾値が高いと少数の大きなクラスタが得られ、低いと細かなクラスタが多数出てくる。閾値を直接指定する場合もあれば、指定したクラスタ数となるように分割する場合もある。何をもちって最適な分割と呼べるかはデータや解析目的により異なるため、人間が樹形図やヒートマップを目視で確認してその都度分割基準を決めるのが良いだろう。

階層的クラスタリングの結果をヒートマップで表すとき、赤から緑へ変化するカラースケール

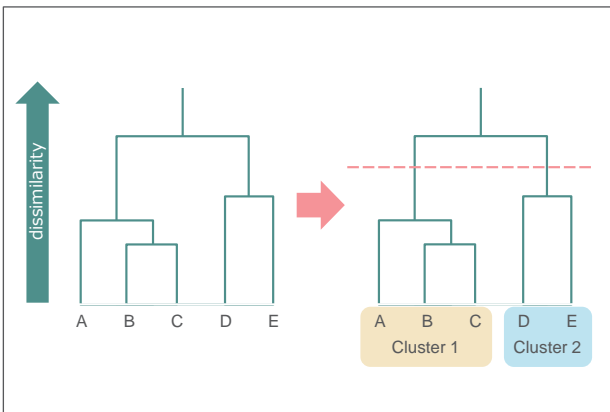


図 12. クラスタ分割の概念図。

を使ってはいけない。何故なら、色覚異常の人が区別できないからである。昔の論文では広く使われていたが、それらを真似しようとすべきでない。代わりに、赤と青、マゼンタと緑などの組み合わせを使う。

8. エンリッチメント解析

エンリッチメント解析とは、ある遺伝子リストがあったとき、その中にどのようなタイプの遺伝子が多く含まれているかを調べるものである。例えば、100 個の発現変動遺伝子をこの解析にかけると、その中に炎症反応に関わる遺伝子が 30 個含まれていたとか、インスリンのシグナル伝達経路に関わる遺伝子が 10 個いたとか、などの情報がまとめて列挙される。

個々の遺伝子には、それが生体内でどのような機能や役割を果たしているかを表すためのタグが複数付けられている。英語では *annotation* と呼ぶため注釈と訳すこともある。表記ゆれを防ぐため、タグとして使って良いものは予め決まっている。遺伝子発現量データ解析でよく使うのは、GO (gene ontology) タグと、KEGG パスウェイのタグである (表 4)。

GO タグは大きく 3 つのグループに分類されているが、通常は BP (biological process) グループ

表 4. 遺伝子に付いているタグの例。

タグ	種別
inflammatory response	GO (BP)
macrophage cytokine production	GO (BP)
insulin signaling pathway	KEGG
cell cycle	KEGG

に属するタグだけ調べれば十分だろう。何故なら、残りの 2 グループは結果の解釈が難しいからである。GO タグには大まかな内容のタグから詳細なタグまで様々なものがある。あまりにも内容が漠然としたものや逆に細か過ぎるタグはエンリッチメント解析の役に立たないので、有用な GO タグだけを集めたサブセットも幾つか考案されている。有名なものでは、GO slim や GO FAT などがある。

KEGG のタグの方は、各遺伝子がどの経路に関わっているかを表す。GO タグと内容的に重複する部分も大きいですが、多くの遺伝子が関わる経路が見つかったら、それらが経路上のどこに位置するかを図示出来るという特徴がある (図 13)。

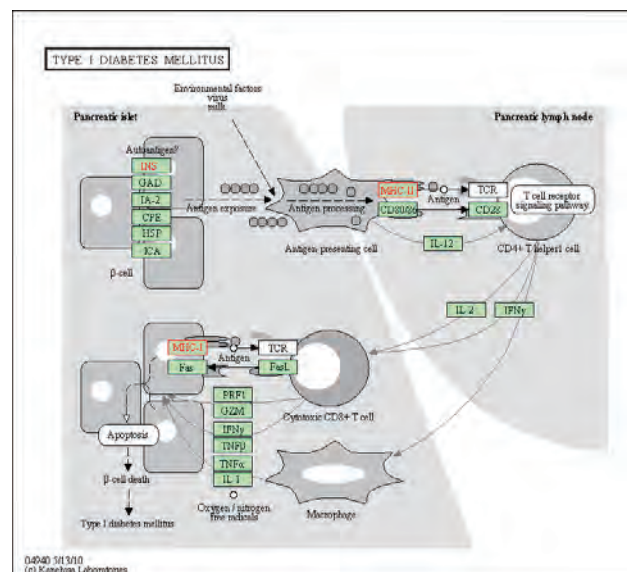


図 13. KEGG パスウェイの例。注目している遺伝子を図中でハイライト表示することが出来る。

エンリッチメント解析では、解析対象の遺伝子集合と、あるタグを持つ遺伝子集合とを比較し、有意な重複があるかどうかを調べる (図 14)。これを全てのタグに対して繰り返し行い、有意だったタグの一覧を出力する。有意性の判定にはフィッシャーの正確検定を使う (図 15)。これは、もしも2つの集合が互いに無関係だった場合に偶然起こり得る重複割合に対して、実際の重複割合が有意に大きいかどうかを調べるものである。

エンリッチメント解析の結果を図示する際、慣習的に p 値の対数を取って符号を反転したものを棒グラフで表すことが多い。しかし、そもそも p 値の大小は比較すべきものではないので、そのような慣行の蔓延に筆者は強い懸念を抱いている。

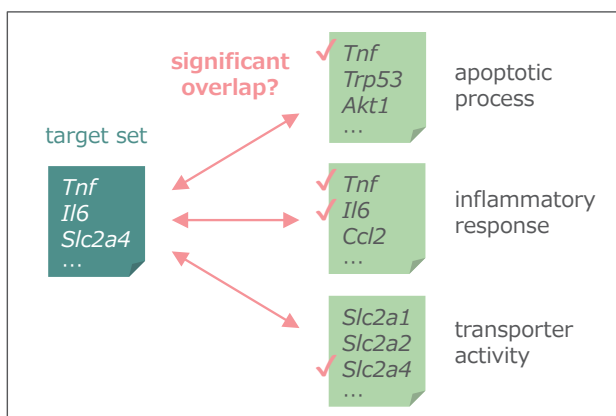


図 14. エンリッチメント解析の概念図。

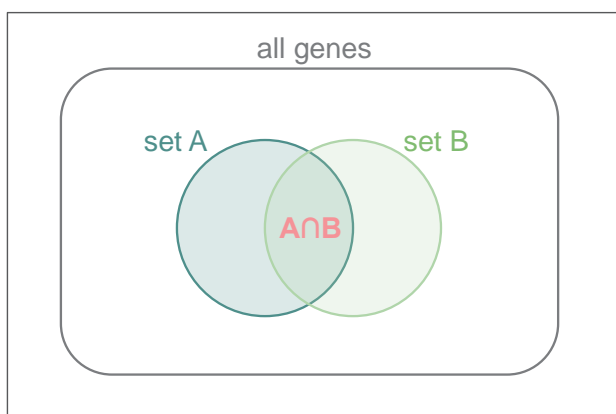


図 15. フィッシャーの正確検定の概念図。比較する2つの集合のそれぞれのサイズ、重複の大きさ、全遺伝子数の計4つの数値を用いる。

9. ネットワーク図の描画

ネットワーク図は見た目が派手なので、読者に強い印象を与えることを第一の目的とした作成の依頼を受けることも少なくない。しかし、研究における全てのグラフについて言えることだが、その図から何が読み取れるのか、読者に伝えたいメッセージとは何か明確でない図に研究上の価値は無い。ネットワーク可視化の分野では、各頂点のラベルを表示しない場合、頂点数が約1000個を超えるものは一枚絵として描画しても仕方がないと一般的に考えられている。何故なら、頂点や枝が過度に折り重なり、何も構造が見取れなくなるからである。「巨大な毛玉」と揶揄されることもある。一方、各頂点のラベルを表示する場合、描画可能なネットワークのサイズはさらに小さくなる。何故なら、ラベルの文字が判読可能である必要があるからである。筆者の経験上、せいぜい数十頂点が限界だろう。そのサイズの図を出して一体何を伝えたいのか、必ずはっきりさせるべきである。

ネットワークの取得法には大きく2通りある。一つは遺伝子発現量データから各遺伝子間の相関係数を計算し、その絶対値がある閾値以上の場合に枝を張るというものである。もう一つはデータベースで検索を行い、相互作用があることが知られている遺伝子間や、相互作用があると予測されている遺伝子間に枝を張る方法である (図 16)。

ネットワーク内に複数のサブクラスタが形成されている場合は、コミュニティ検出が有効である。コミュニティとはネットワーク解析の用語で、比較的密に結合している部分グラフのことを指す。クラスタと読み替えても問題ない。検出には Louvain 法や infomap 法などがよく用いられる。

ネットワークの可視化では、各頂点の大きさ、形、色に何を対応させるのか、各枝の太さや色に何を割り当てるのかを決める必要がある (図 16)。

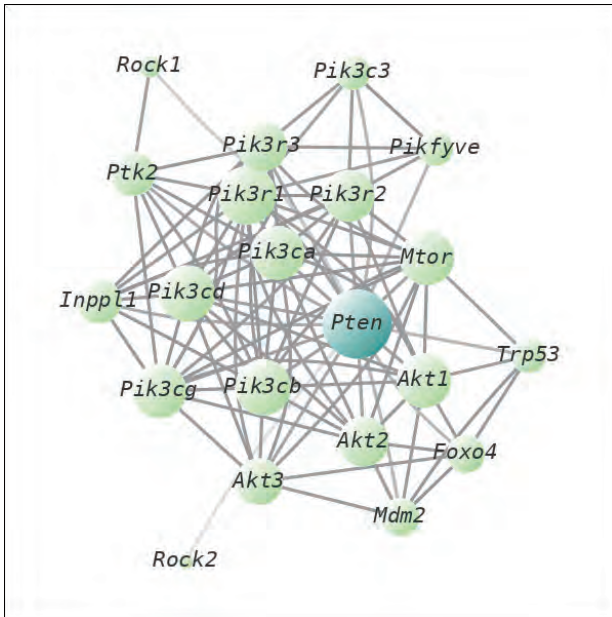


図 16. データベースを検索し *Pten* と関連性の強い上位 20 個の遺伝子のネットワークを取得した結果. 頂点の大きさには次数を, 枝の輝度には媒介中心性をそれぞれ割り当てている.

また, 頂点の配置をグラフ構造から自動で計算する手法も幾つかあるので, それらの中から適宜データと目的に合ったものを選ぶ.

10. まとめ

本稿では DNA マイクロアレイデータ解析の基礎について説明した. 全体を通して言えることは, 多くの作業工程において正解と呼べる手順はいまだ確立しておらず, 解析者は日々難しい選択を迫られているということである. 本稿が判断の一助となれば幸いである. また, 本稿で紹介した基礎的な手法が漢方薬の複雑な作用機序の解明に役立つことを願う.

本稿で記述した内容の少なくとも一部は, 同じトランスクリプトームを対象とした次世代シーケンサーの RNA-seq データにも適用可能と考えられる. また, 基本的な考え方はプロテオーム, メタボローム, マイクロバイオームなど他のオミ

クスデータにもある程度通じる部分があると期待される.

図 5, 6, 11 では公開データ GSE2565 を使用した. 図 13 では KEGG データベースを, 図 16 では STRING データベースをそれぞれ利用した. 残りは人工的に作成したデータを用いた.

謝辞

本研究は富山大学のプロジェクト「医薬学と複雑系数理学からの挑戦 ～「未病」の解明、そして新たな医療体系の構築と地域との連携による健康人口の増加～」(通称, 未病プロジェクト) 関係者の先生方からの多大なご支援を頂きながら進めております. 附属病院長でプロジェクトリーダーをされている齋藤滋先生を始め, プロジェクトの中心的メンバーとしてご活躍されている和漢医薬学総合研究所の門脇真先生, 小泉桂一先生, 林周作先生, 都市デザイン学部の春木孝之先生, 人間発達科学部の成行泰裕先生に深く感謝致します. また, 本プロジェクトの発足以前より継続して指導頂いている東京大学生産技術研究所の合原一幸先生に厚く御礼申し上げます.

参考文献

- [1] 日本漢方生薬製剤協会, 漢方薬処方実態調査 2011, <http://www.nikkankyo.org/serv/serv1.htm>
- [2] BM Bolstad, et al., *Bioinform.*, 19(2):185-193 (2003).
- [3] L van der Maaten and G Hinton, *JMLR*, 9:2579-2605 (2008).
- [4] DA Jackson, *Ecology*, 74(8):2204-2214 (1993).
- [5] 神鷹, 人工知能学会誌, 18(1):59-65 (2003).

(2018 年 4 月, 和漢医薬学総合研究所年報の
総説として執筆)

各研究部門・附属センターの活動と業績

生薬資源科学分野

Division of Pharmacognosy

教授	小松かつ子	Professor	Katsuko Komatsu (Ph.D.)
准教授	當銘 一文	Associate Professor	Kazufumi Toume (Ph.D.)
助教	朱 姝	Assistant Professor	Shu Zhu (Ph.D.)
研究員	葛 躍偉 (8月まで)	Postdoctoral Fellow	Yue Wei Ge (Ph.D.)

◇研究目的

地球環境の変化により、薬用天然資源の減少が危惧される。そこで本分野では、生薬資源の現状の把握と代替生薬の開発、生薬の特徴を把握した効率的利用の促進並びに栽培薬用植物の選択と栽培拡充を目的にして、アジアにおける漢薬資源の調査と薬用生物の遺伝学的、成分化学的、薬理学的多様性の解析を行う。また、天然薬物の標準化を目的にして、遺伝子多型に基づく生薬同定法の開発並びに成分・活性情報の融合による生薬機能の解析を行う。

◇研究概要

I) 薬用植物及び伝統薬物の調査研究

- 1) モンゴル東部で防風の資源植物及びそれらの生育土壌を調査した（モンゴル国立大学との共同研究）。
- 2) 中国の広西壮族自治区及び広東省で骨碎補の資源植物の調査を行った。（北京大学薬学院、三峡大学との共同研究）。
- 3) ミャンマーの Bago Region, Ayarwaddy Region 及び Tanintharyi Region で、サラシア及び縮砂の資源植物の野生状況を調査した（ミャンマー保健省伝統医療局との共同研究）。

II) 薬用植物・生薬の多様性の解析

- 1) 葉緑体 *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列に基づく骨碎補の基原植物の客観的同定法を開発し、日本、中国及び台湾に流通している骨碎補市場品の基原を明らかにした。植物材料及び市場品について HPLC 分析による成分比較を行い、基原植物の違いによる成分的差異を明らかにした。
- 2) 長野県で系統保存されているダイオウ (*Rheum coreanum* × *R. palmatum*) について、核 ITS 領域の塩基配列の解析を行い、交配種の系統推定には ITS 配列が有用であることを示唆した。
- 3) モンゴル産 *Saposhnikovia divaricata* について LCMS による成分プロファイリングを行い、30 成分（17 種のクロメン類及び 13 種のクマリン類）を同定・推定し、中国産防風と比較した。このうち 16 化合物について、定量分析の標準品とするため、防風抽出物より単離・同定を行った。

III) 薬用植物の国内栽培の拡充を指向した研究

エゾウコギの人工水耕—圃場ハイブリッド栽培を 4 年間行い、圃場生育中の根茎について eleutherosides B, E の含量を調べた結果、「刺五加」と同等であり、茎にも 2 成分が存在した。

IV) 伝統薬物の活性成分の探索と構造解析

車前子の抗がん薬誘発末梢神経障害改善作用成分の探索研究を行い、活性画分よりイリドイド 2 種を同定した。そのうち、prdicularis-lactone を主成分として含む画分に抗アロディニア作用を見出した。

◇原著論文

- 1) Karmakar U. K., Toume K., Ishikawa N., Arai M. A., Sadhu S. K., Ahmed F., Ishibashi M.: Bioassay-guided isolation of compounds with TRAIL-resistance overcoming activity from *Datura stramonium*. Nat. Prod. Commun., 11: 185-187, 2016.
- 2) Andoh T., Uta D., Kato M., Toume K., Komatsu K., Kuraishi Y.: Prophylactic administration of aucubin inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia via the inhibition of endoplasmic reticulum stress in peripheral Schwann cells. Biol. Pharm. Bull., 40: 473-478, 2017. doi: 10.1248/bpb.b16-00899.
- 3) Hishiki T., Kato F., Miura T., Tajima S., Toume K., Umezaki M., Takasaki T.: Hirsutine, an indole alkaloid of *Uncaria rhynchophylla*, inhibits late step in dengue virus lifecycle. Front. Microbiol., 8: 1674, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01674.
- 4) Kaneta Y., Arai M. A., Ishikawa N., Toume K., Koyano T., Kowithayakorn T., Chiba T., Iwama A., Ishibashi M.: Identification of BMI1 promoter inhibitors from *Beaumontia murtonii* and *Eugenia operculata*. J. Nat. Prod., 80: 1853-1859, 2017. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00138.
- 5) Maruyama T., Ezaki M., Shiba M., Yamaji H., Yoshitomi T., Kawano N., Zhu S., Cheng X., Yokokura T., Yamamoto Y., Fuchino H., Sun H., Komatsu K., Kawahara N.: Botanical origin and chemical constituents of commercial *Saposhnikovia* radix and its related crude drugs available in Shaanxi and the surrounding regions. J. Nat. Med., 72: 267-273, 2018. doi: 10.1007/s11418-017-1149-7.
- 6) Liu X., Arai M. A., Toume K., Ishibashi M.: Isolation of resistomycin from a terrestrial actinomycete with TRAIL resistance-overcoming activity. Nat. Prod. Commun., 13: 65-66, 2018.
- 7) Shimada-Takaura K., Nakamura Y., Kawase M., Komatsu K., Takahashi K.: Quality characterization of Japanese medicinal *Paeoniae Radix* by metallomic analysis. Chem. Pharm. Bull., 66, 353-357, 2018. doi: 10.1248/cpb.c17-00729.
- 8) Zhou S. S., Xu J., Tsang C. K., Yip K. M., Yeung W. P., Zhao Z. Z., Zhu S., Fushimi H., Chang H. Y., Chen H. B.: Comprehensive quality evaluation and comparison of *Angelica sinensis* radix and *Angelica acutiloba* radix by integrated metabolomics and glycomics. J Food & Drug Anal., 2018. doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.015.

◇著書

- 1) 小松かつ子: 第2章 生薬の歴史; p. 9-20, 第3章 生薬の基原植物の形態と分類; p. 21-36. パートナー生薬学 改訂第3版増補, 竹谷孝一, 木内文之, 小松かつ子編集, 南江堂, 東京, 2018.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- * 1) Zhu S., Komatsu K. Development of alternative resources of herbal drug through integrated approaches based on genetic and chemical diversity. The 2nd Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network Symposium; 2017, 9, 25-26; Jinan, China.
- 2) Asanuma M., Zhu S., Hotta K., Ge Y. W., Toume K., Shimizu H., Yoshimatsu K., Cai S. Q., Komatsu K. Genetic and chemical polymorphism of Japanese cultivated *Rheum* species. The 2nd Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network Symposium; 2017, 9, 25-26; Jinan, China.
- 3) Zhang H. P., Zhu S., He Y. M., Cai S. Q., Hakamatsuka T., Maruyama T., Komatsu K. Applying trnH-psbA intergenic spacer sequence to identify *Drynariae Rhizoma*. The 2nd Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network Symposium; 2017, 9, 25-26; Jinan, China.
- * 4) Komatsu K., Zhu S. Genetic, Chemical and Pharmacological Diversity of Ginseng Drugs. Ginseng Conference, 2017, 9, 26; Chungnam, Korea.
- * 5) Komatsu K. Sustainable Medicinal Resources: Genetic and Chemical diversity of *Paeonia lactiflora* and Development of Branded Peony Root. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine, Program to supporting research activities of female researchers (MEXT, JAPAN) - Initiative for Realizing Diversity in the Research Environment; 2017, 11, 10; Toyama.
- * 6) Ge Y. W. Study on the chemistry and bioactivity of *Eleutherococcus senticosus* Leaves. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine, Program to supporting research activities of female researchers (MEXT, JAPAN) - Initiative for Realizing Diversity in

- the Research Environment; 2017, 11, 10; Toyama.
- 7) Asanuma M., Zhu S., Hotta K., Ge Y. W., Toume K., Shimizu H., Yoshimatsu K., Cai S. Q., Komatsu K. Genetic and chemical polymorphism of Japanese cultivated *Rheum* species. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017, 11, 10; Toyama.
 - 8) Zhang H. P., Zhu S., He Y. M., Cai S. Q., Hakamatsuka T., Maruyama T., Komatsu K. Applying trnH-psbA intergenic spacer sequence to identify *Drynariae Rhizoma*. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017, 11, 10; Toyama.
 - 9) Hou Z. Y., Toume K., Andoh T., Komatsu K. Search on anti-allodynic compounds from *Plantaginis Semen* that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017, 11, 10; Toyama.
 - 10) Nakamura K., Zhu S., Komatsu K., Hattori M., Iwashima M. Cloning, expression, and characterization of the enzymes, which can cleave the C-glycosidic bond in puerarin. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017, 11, 10; Toyama.
 - * 11) 小松かつ子. シャクヤク *Paeonia lactiflora* の多様性の解析と「富山ブランド芍薬」の作出に関する研究. 薬用植物栽培研究会 45 周年記念事業; 2017, 7, 15; 甲州市.
 - 12) 小松かつ子. 『広恵濟急方』に見る江戸時代の民間救急療法. 第 3 回日本語の歴史的典籍国際研究集会, 大規模学術フロンティア促進事業「日本語の歴史的典籍の国際共同研究ネットワーク構築計画」; 2017, 7, 28-29; 東京.
 - 13) 當銘一文, 侯志艶, 加藤充, 葛躍偉, 安東嗣修, 小松かつ子. 車前子由来パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究. 第 34 回和漢医薬学会学術大会; 2017, 8, 26-27; 福岡.
 - 14) 水上修作, アウトアレム テクレミカエル, 當銘一文, ファルハナモサデック, チェリフマハムドサマ, グエンティエンフイ, 小松かつ子, 平山謙二. 和漢薬ライブラリーを用いた新規抗マラリア薬の探索. 第 34 回和漢医薬学会学術大会; 2017, 8, 26-27; 福岡.
 - 15) 山内唯, 葛躍偉, 吉松嘉代, 小松かつ子, 東田千尋. エゾウコギ薬水エキスによる記憶向上作用と活性成分の検討. 第 34 回和漢医薬学会学術大会; 2017, 8, 26-27; 福岡.
 - * 16) 小松かつ子. ウコン類生薬の標準化を指向した多様性解析研究. 日本香辛料研究会第 32 回学術講演会; 2017, 9, 1; 加古川.
 - 17) 中村賢一, 鍋島 渉, 有竹萌音, 朱 姝, 小松かつ子, 服部征雄, 岩島 誠. 腸内細菌由来ペエラリン酸化物代謝酵素の機能解析と酵素的 C-グリコシル化反応の検討. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017, 9, 9-10; 千葉.
 - 18) 政田さやか, 山路弘樹, 武田修己, 嶋田康男, 小松かつ子, 内山奈穂子, 袴塚高志. 新疆甘草に含まれるグリチルリチン酸及びガラクトンログリチルリチン酸量の調査. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017, 9, 9-10; 千葉.
 - 19) 侯志艶, 當銘一文, 安東嗣修, 小松かつ子. Search on anti-allodynic compounds from *Plantaginis Semen* that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017, 9, 9-10; 千葉.
 - 20) 張含培, 朱 姝, 何毓敏, 蔡少青, 袴塚高志, 丸山卓郎, 小松かつ子. 骨碎補の遺伝子解析による基原評価法の開発. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017, 9, 9-10; 千葉.
 - 21) 小松かつ子, 出口鳴美, 伏見裕利, 入口敦志, 相田 満, 岩橋清美. 『広恵濟急方』に見る江戸時代の民間救急療法. 日本薬史学会 2017 年会; 2017, 10, 28; 埼玉.
 - * 22) 當銘一文. 抗マラリア薬開発を指向した天然薬物研究. 長崎大学熱帯医学研究所・富山大学和漢薬学総合研究所第 7 回交流セミナー「熱帯医学と和漢薬研究の新展開 -新しい医療体系の構築を目指して-」; 2017, 12, 4; 長崎.
 - * 23) 小松かつ子. Application of comprehensive study on diversity of medicinal resources to standardization and sustainable uses of herbal drugs. 北京大学薬学院・富山大学和漢薬学総合研究所ジョイントシンポジウム; 2018, 3, 5; 北京, 中国
 - 24) 勝山陽平, 藤田夏澄, 當銘一文, 石橋正己, 大西康夫. *Streptomyces* sp. IFM11307 由来芳香族ポリケタイド yoropyrazone 生合成経路の解析. 日本農芸学会; 2018, 3, 13-18; 名古屋.

- 25) 高尾汐織, 村上守一, 田村隆幸, 朱 姝, 川本元裕, 中井秀人, 吉松嘉代, 小松かつ子. 人工水耕一圃場ハイブリッド栽培で育成したエゾウコギの品質評価 (1). 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.
- 26) 君島 伸, 當銘一文, 張 含培, 朱 姝, 何 毓敏, 蔡 少青, 袴塚高志, 丸山卓郎, 小松かつ子. 骨碎補の品質標準化を指向した成分分析. 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.
- 27) BATSUKH Zolboo, 當銘一文, JAVZAN Batkhuu, 数馬恒平, 堀田健一郎, 蔡 少青, 林茂樹, 川原信夫, 小松かつ子. LC-MS法を用いたモンゴル産防風のメタボロミックプロファイリング. 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.
- 28) 吉富太一, 若菜大悟, 内山奈穂子, 河野徳照, 横倉胤夫, 山本 豊, 瀧野裕之, 小松かつ子, 川原信夫, 丸山卓郎. 逆相系固相抽出による試料調製を利用したボウフウ類生薬の¹H-NMRメタボローム解析と特徴的成分. 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.
- 29) Simplicite Joel Tatsimo Ndendoug, Kazufumi Toume, Léopold Havyarimana, Katsuko Komatsu. Phytochemical investigation of a Cameroonian medicinal plant, *Maytenus senegalensis*. 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.
- 30) 荒井雄樹, 南園友紀, 和田梨沙, 田中翔斗, 藤原博典, 松本欣三, 當銘一文, 吾郷由希夫, 荒木良太, 矢部武士. 加味温胆湯は抗うつ様作用と細胞外セロトニン量増加作用を有する. 日本薬学会第138年会; 2018, 3, 25-28; 金沢.

◇その他

講演等

- 1) 當銘一文. 講演「生薬・薬用資源からの活性成分の探索」. フォーラム富山「創薬」-県スイス・バーゼル交流事業にかかる派遣若手研究者の研究発表-; 2017, 5, 18; 富山.
- 2) 小松かつ子. 講義「和漢薬／生薬 入門」. 富山大学楮鞭会; 2017, 6, 7; 富山大学.
- 3) 小松かつ子. 「江戸の医書 今に活かす 応急処置記す『広恵濟急方』」. 北日本新聞(朝刊). 2017, 6, 18; 社会:27.
- 4) 當銘一文. 総説「薬用資源からの生物活性天然物の探索」. 月刊和漢薬. 2017, 6; (No. 699), 6: pp. 9-12.
- 5) 當銘一文. 講演「がん関連シグナル伝達に作用する生物活性天然物の探索」. 和漢医薬学総合研究所・東西医薬学交流セミナー; 2017, 7, 11; 富山大学.
- 6) 小松かつ子. 研修会(民族薬物資料館). JICA Knowledge Co-Creation Program平成29年度課題別研修「適正な医薬品の供給・品質管理・使用に向けた薬事行政及び薬剤師の役割」; 2017, 7, 11; 富山大学.
- 7) 小松かつ子. 平成29年度ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI「和漢薬ってこんなに身近にあったんだ! ～和漢薬体験してみよう～」. 日本学術振興会; 2017, 8, 5; 富山大学.
- 8) 小松かつ子. 野外で薬草を観察する会. 富山県薬事研究所; 2017, 8, 6; 立山山麓.
- 9) 小松かつ子. 講義「和漢薬の品質とサステナビリティ」. 第22回和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017, 8, 9; 富山大学.
- 10) 小松かつ子. 体験実習「和漢薬鑑定に挑戦」. 第22回和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017, 8, 10; 富山大学.
- 11) 小松かつ子. 記念講演「『万葉集』と『延喜式』(越中・能登)に登場する生薬について」及び展示パネル等の監修. 大伴家持生誕1300年記念秋の特別企画展「家持が見た薬草」, 高岡市万葉歴史館; 2017, 9, 3; 高岡市.
- 12) 小松かつ子. 「生薬研究 情報拠点にも, 富山大 和漢医薬学総合研究所」; グローバル時代をひらく. 日経新聞(朝刊). 2017, 9, 13; 学ぶ 磨く 育つ 大学:27.
- 13) 小松かつ子. 講演「生薬“ガジュツ”の標準化を指向した多様性解析研究」. 大阪生薬協会第263回技術部会; 2017, 10, 2; 大阪.
- 14) 小松かつ子. 講義「遺伝子から見た世界の薬用植物－生薬資源の探索～品質評価」. 平成

- 29 年度漢方薬・生薬研修会, 日本生薬学会, 公益財団法人日本薬剤師研修センター; 2017, 10, 15; 東京.
- 15) 小松かつ子. 野外観察会. 第 18 回加賀・能登の薬草シンポジウム, 金沢大学薬学系分子生薬研究室(薬用植物園); 2017, 10, 22; 加賀市.
 - 16) 小松かつ子, 朱姝. 現地学習(民族薬物資料館). 平成 29 年度富山市民大学講座「生活医学薬学を学ぶ」; 2017, 10, 13; 富山大学.
 - 17) 小松かつ子. 講義「和漢薬を健康に活かす」. 平成 29 年度富山市民大学講座「生活医学薬学を学ぶ」; 2017, 10, 27; 富山.
 - 18) 小松かつ子(企画運営者), 當銘一文(協力者), 朱姝(協力者). 伝統薬物の科学研究国際シンポジウム主催. 文部科学省平成 29 年度科学技術人材育成費補助事業, 富山大学「女性研究者による国際シンポジウム企画・開催助成金」; 2017, 11, 10; 富山.
 - 19) 當銘一文, 訪問. JICA 草の根技術協力(地域活性化特別枠)事業「ミャンマーにおける伝統医薬品の製造管理及び品質管理の改善を通じた保健衛生向上事業」; 2018, 2, 3-11; ネピドー, ヤンゴン, マンダレー(ミャンマー)
 - 20) 當銘一文. Tom's TV 撮影協力(薬学部安東嗣修先生との共同研究の紹介), 北日本放送, 2018, 2, 4 放送分.
 - 21) 小松かつ子. Tom's TV 撮影協力(民族薬物資料館の紹介), 北日本放送, 2018, 3, 4 放送分.

受賞

- 1) 張 含培: 第 2 回富山・アジア・アフリカ創薬研究シンポジウム ポスター賞「Applying trnH-psbA intergenic spacer sequence to identify *Drynariae Rhizoma*」. 2017, 9.

◇共同研究

学内

- 1) 東田千尋, 数馬恒平, 紺野勝弘(和漢医薬学総合研究所), 長田拓哉(附属病院), 安東嗣修(大学院医学薬学研究部), 岩坪美兼(大学院理工学研究部): 伝統薬のサステイナビリティと現地還元を指向したアジアの薬用植物の調査研究, 2015~2017.
- 2) 安東嗣修(大学院医学薬学研究部): 抗がん薬誘発末梢神経障害に対する漢方方剤及び生薬の効果に関する研究, 2014~
- 3) 長田拓哉, 塚田一博, 藤井 努(附属病院): 漢方製剤の腫瘍増殖抑制効果に関する研究, 2014~
- 4) 東田千尋(和漢医薬学総合研究所): 漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化, 2016~

国内

- 1) 袴塚高志, 丸山卓郎, 合田幸広(国立医薬品食品衛生研究所): 次世代医薬品の効率的実用化推進のための品質評価技術基盤の開発, 2017~
- 2) 川原信夫((独)国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター): 薬用植物の国内栽培推進を指向した基盤技術及び創薬資源の開発に関する研究, 2016~
- 3) 吉松嘉代((独)国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター): 安心・安全・高品質な漢方薬原料生薬の持続的利用を指向した薬用植物バイオナーサリーの構築とブランド生薬の開発に関する研究, 2015~2017.
- 4) 平 修(福井県立大学生物資源学部), 川原信夫, 菱田敦之((独)医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター), 村上守一, 田村隆幸(富山県薬用植物指導センター), 磯田 進(昭和大学薬学部), 児玉 容, 清水秀樹, 西澤洋一(長野県健康福祉部), 数馬恒平(和漢医薬学総合研究所): 地域産学官連携によるブランド生薬の開発に関する研究, 2012~2017.
- 5) 大槻 崇(日本大学生物資源科学部): 和漢薬の品質評価を目指した定量 NMR に関する研究, 2014~

- 6) 中村賢一, 岩島 誠 (鈴鹿医療科学大学薬学部) : ヒト腸内細菌による C-配糖体代謝反応に関する研究, 2013～
- 7) 高橋京子 (大阪大学大学院薬学研究科) : メタロミクス解析による生薬の探索的品質評価と国産化応用, 2013～2017.
- 8) 原田和生 (大阪大学大学院薬学研究科) : 漢方薬の新品質評価法の開発を目指したメタボロームデータと生物活性の相関解析, 2014～
- 9) 日紫喜隆行 (東京都医学総合研究所) : 抗 Dengue ウイルス作用をもつ天然薬物の探索, 2014～
- 10) 福地 守 (高崎健康福祉大学薬学部), 田淵明子 (富山大学院医学薬学研究部) : 脳由来神経栄養因子 BDNF 遺伝子発現誘導能に基づいた脳機能改善効果を有する生薬・和漢薬のスクリーニングおよびその作用機序の解明, 2016～
- 11) 平山謙二, 水上 修作 (長崎大学熱帯医学研究所) : 伝統医薬を基盤とする抗マラリア薬の開発, 2016～
- 12) 平山謙二, 水上 修作 (長崎大学熱帯医学研究所) : 漢方方剤・和漢薬由来新規抗トリパノソーマ薬の探索, 2017～
- 13) 奥津果優 (鹿児島大学農学部), 丸山卓郎 (国立医薬品食品衛生研究所) : 麴菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立, 2017～
- 14) 荒木良太, 矢部武士 (摂南大学薬学部) : 精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析, 2017～
- 15) 相田 満, 岩橋清美 (国文学研究資料館) : 古典籍を活用した和漢薬に関する総合研究, 2015～2017.

海外

- 1) 蔡 少青 (中国・北京大学薬学院), Galzad Javzan Batkhoo (モンゴル・モンゴル国立大学) : 伝統薬のサステナビリティと現地還元を指向したアジアの薬用植物の調査研究, 2015～2017
- 2) Dr. Yi Yi Myint, Mr. Kya Soe (ミャンマー・保健省伝統医療局) : Field Research, and Genetic and Chemical Analyses on Myanmar Medicinal Plant, 2016～
- 3) Galzad Javzan Batkhoo (モンゴル・モンゴル国立大学) : Field Research, and Chemical Analysis on Mongolian Medicinal Plants, 2017～

◇研究費取得状況

- 1) 日本学術振興会科学研究費助成事業, 基盤研究(B)(第3年度)(代表:小松かつ子, 分担: 當銘一文, 朱 姝)「伝統薬のサステナビリティと現地還元を指向したアジアの薬用植物の調査研究」
- 2) 日本学術振興会科学研究費助成事業, 基盤研究(C)(第3年度)(代表:當銘一文)「ケモトリックプロファイリングに基づく和漢薬複合成分の解析」
- 3) 日本学術振興会研究成果普及事業, ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI (代表:小松かつ子, 分担: 出口鳴美) 和漢薬体験プログラム「和漢薬ってこんなに身近にあったんだ!～和漢薬体験してみよう～」
- 4) 平成 29 年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構, 創薬基盤推進研究事業「次世代医薬品の効率的実用化推進のための品質評価技術基盤の開発」(協力者:小松かつ子, 朱 姝, 當銘一文)「原料生薬の遺伝子解析を利用した品質標準化と理化学試験に関する研究」
- 5) 平成 28 年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構, 創薬基盤推進研究事業「薬用植物の国内栽培推進を指向した基盤技術及び創薬資源の開発に関する研究」(分担:小松かつ子) : 「国際的視野に立脚した薬用植物資源, 関連情報の集積・調査研究」
- 6) 平成 27 年度国立研究開発法人日本医療研究開発機構, 創薬基盤推進研究事業「安心・安全・高品質な漢方薬原料生薬の持続的利用を指向した薬用植物バイオナーサリーの構築とブランド生薬の開発に関する研究」(分担:小松かつ子, 協力者: 當銘一文,

- 朱 姝)：「新旧技術による生薬の生産基盤構築と性能評価に関する研究」
- 7) 平成 29 年度熱帯医学研究拠点一般共同研究 (代表：小松かつ子, 分担：當銘一文, 朱 姝)「生薬由来新規抗マラリア薬の探索」
 - 8) 平成 29 年度熱帯医学研究拠点一般共同研究 (代表：當銘一文, 分担：小松かつ子, 朱 姝)「漢方方剤・和漢薬由来新規抗トリパノソーマ薬の探索」
 - 9) 富山県受託研究「和漢薬・バイオテクノロジー研究」(分担：小松かつ子, 當銘一文)「車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬(薬用植物)の探索」
 - 10) 富山大学運営費交付金機能強化費 (分担：小松かつ子, 當銘一文, 朱 姝)「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
 - 11) 平成 29 年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究, 一般研究 I (分担：小松かつ子, 當銘一文)「車前子成分を基盤とした抗がん薬誘発末梢神経障害性異常感覚の予防・治療薬シーズの同定」
 - 12) 平成 29 年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究, 一般研究 I (分担：當銘一文, 小松かつ子)「漢方方剤・生薬由来新規抗マラリア薬の探索」
 - 13) 平成 29 年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究, 一般研究 I (分担：小松かつ子)「麴菌の発酵により変化する成分に焦点を当てた神麴の品質評価法の確立」

◇研究室在籍者

学部 3 年生：山本祥雅

学部 4 年生：高尾汐織, 花澤志帆

学部 5 年生：堀田健一郎, 君島 伸

学部 6 年生：白川愛扇, 富田有紀

大学院修士 2 年：侯 志艷, 張 含培

Yasenjiang AXIMU (10 月入学), 劉 群棟 (10 月入学)

大学院博士 1 年：喻 歡歡 (10 月入学)

大学院博士 2 年：Zolboo BATSUKH (10 月入学)

大学院博士 3 年：浅沼 舞

客員研究員：Simlice Joel TATSIMO NDENDOUNG (2017, 6/1~2017, 11/29)

協力研究員：高橋京子 (大阪大学, 2017, 6/20~2018, 3/31), 中村賢一 (鈴鹿医療科学大学, 2017, 4/1~2018, 3/31)

◇学位(修士)取得者

修士論文

侯 志艷：Search on anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain

(パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する車前子成分の探索)

張 含培：骨碎補の遺伝子解析による基原同定法の開発と品質評価

天然物化学分野

Division of Natural Products
Chemistry

教授	森田 洋行	Professor	Hiroyuki Morita (Ph.D.)
准教授	伊藤 卓也	Associate Professor	Takuya Ito (Ph.D.)
助教	松井 崇 (~5月)	Assistant Professor	Takashi Matsui (Ph.D.)
助教	ウォン チン ピアウ (10月~)	Assistant Professor	Chin Piow Wong (Ph.D.)

◇研究目的

本分野は、天然物化学や生物有機化学、構造生物学、計算化学、酵素工学等の多岐に渡る分野の方法論を駆使して、和漢薬や天然薬物に対する科学的知見を得ることで、創薬等に貢献していくことを目的としている。現在、化合物の分子多様性の創出を目指した天然生理活性分子の生合成に関わる酵素の応用研究と、新規医薬品の開発を指向した天然資源からの新規生理活性分子の探索研究を中心に、下記のテーマを行っている。

◇研究概要

I) 天然有機化合物の生合成と酵素工学

- 1) 植物ポリケタイド骨格形成酵素群の精密機能解析と立体構造を基盤とした触媒機能の拡張
- 2) 和漢薬生理活性分子の生合成に関わる新規酵素群の異種発現系の構築と超精密機能解析
- 3) 微生物由来インドールプレニル基転移酵素の立体構造基盤の確立と機能改変
- 4) 新規有用類縁体の創製を指向した放線菌由来生物活性物質の生合成研究

II) 和漢薬などの天然生理活性分子の単離・構造決定

- 1) 植物・微生物・海洋生物からの Vpr 阻害活性を指標とした HIV 感染症治療薬候補分子の探索と阻害機構の解析
- 2) 植物・微生物・海洋生物中の抗生物質に関する研究
- 3) 植物・微生物・海洋生物からの抗がん活性を有する物質の探索とそれらの誘導体の合成
- 4) アジアにおける未利用薬用資源の探索

III) 構造生物学を基盤とした生理活性分子の薬理活性発現機構の解析

- 1) 新規抗菌剤開発へ向けた細菌蛋白質-天然物由来化合物との複合体結晶構造解析
- 2) 新規抗ウイルス薬開発へ向けたウイルス蛋白質-天然物由来化合物との複合体結晶構造解析
- 3) アセチルコリンエステラーゼと天然生理活性分子との複合体結晶構造解析

◇原著論文

- 1) Zhang L., Hashimoto T., Qin B., Hashimoto J., Kozono I., Kawahara T., Okada M., Awakawa T., Ito T., Asakawa Y., Ueki M., Takahashi S., Osada H., Wakimoto T., Ikeda H., Shin-Ya K., Abe I.: Characterization of Giant Modular PKSs Provides Insight into Genetic Mechanism for Structural Diversification of Aminopolyol Polyketides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 56: 1740-1745, 2017. doi: 10.1002/anie.201611371.前年度未掲載分

- 2) Matsui T., Lallo S., Nisa K., Morita H.: Filamenting Temperature-Sensitive Mutant Z Inhibitors from *Glycyrrhiza glabra* and Their Inhibitory Mode of Action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 1420-1424. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.095. 前年度未掲載分
- 3) Okada M., Sugita T., Wong C. P., Wakimoto T., Abe I.: Identification of Pyridinium with Three Indole Moieties as An Antimicrobial Agent. *J. Nat. Prod.*, 80: 1205-1209, 2017. doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01152.
- 4) Kawasaki M., Kuroyanagi S., Ito T., Morita H., Tanaka Y., Toyooka N.: Synthesis and Odor Properties of Phantolide Analogues. *Tetrahedron*, 73: 2089-2099, 2017. doi: org/10.1016/j.tet.2017.02.055.
- 5) Okada M., Saito K., Wong C. P., Li C., Wang D., Iijima M., Taura F., Kurosaki F., Awakawa T., Abe I.: Combinatorial Biosynthesis of (+)-Daurichromenic Acid and Its Halogenated Analogue. *Org. Lett.*, 19: 3183-3186.
- 6) Kodama T., Ito T., Dibwe D. F., Woo S., Morita H.: Syntheses of Benzophenone-Xanthone Hybrid Polyketides and Their Antibacterial Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 2397-2400, 2017. doi: org/10.1016/j.bmcl.2017.04.017.
- 7) Matsui T., Kodama T., Mori T., Tadakoshi T., Noguchi H., Abe I., Morita H.: 2-Alkylquinolone Alkaloid Biosynthesis in The Medicinal Plant *Evodia rutaecarpa* Involves Collaboration of Two Novel Type III Polyketide Synthases. *J. Biol. Chem.*, 292: 9117-9135. doi: 10.1074/jbc.M117.778977.
- 8) Nguyen H. M., Ito T., Kurimoto S., Ogawa M., Win N. N., Hung V.Q., Nguyen H.T., Kubota T., Kobayashi J., Morita H.: New Merosesquiterpenes from A Vietnamese Marine Sponge of *Spongia* sp. and Their Biological Activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 3043-3047, 2017. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.05.060.
- 9) Kazuma K., Ando K., Wang X., Rangel M., Cabrera M. P. S., Hirata I. Y., Franzolin M. R., Lei B., Lee S. M.-Y., Mori-Yasumoto K., Sekita S., Kadowaki M., Satake M., Konno K.: Peptidomic Analysis of The Venom of The Solitary Bee *Xylocopa appendiculata circumvolans*. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 23:40. 2017. doi 10.1186/s40409-017-0130-y.
- 10) Win N. N., Ito T., Ngwe H., Win Y. Y., Prema, Okamoto Y., Tanaka M., Asakawa Y., Abe I., Morita H.: Labdane Diterpenoids from *Curcuma amada* Rhizomes Collected in Myanmar and Their Antiproliferative Activities. *Fitoterapia*, 122: 34-39, 2017. doi: 10.1016/j.fitote.2017.08.006.
- 11) Mba Nguekeu Y. M., Awouafack M. D., Tane P., Nguedia Lando M. R., Kodama T., Morita H.: A Kaempferol Triglycoside from *Tephrosia preussii* Taub. (Fabaceae). *Nat. Prod. Res.*, 31: 2520-2526, 2017. doi: 10.1080/14786419.2017.1315720.
- 12) Ho V. D., Hoang T. N. H., Vo Q. H., Phan V. K., Le T. A., Pham V. T., Nguyen M. H., Kodama T., Ito T., Morita H., Raal A., Nguyen T. H.: Cycloartane-type Triterpene Glycosides Anopanins A-C with Monoacyldigalactosylglycerols from *Anodendron paniculatum*. *Phytochemistry*, 144: 113-118, 2017. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.09.004.
- 13) Matsumoto H., Konno K., Kazuma K.: A comprehensive LC-MS and Isolation Study of Cicada Slough as A Crude Drug. *Nat. Prod. Commun.*, 12: 1789-1792, 2017.
- 14) Kazuma K., Masuko K., Konno K., Inagaki H.: Combined Venom Gland Transcriptomic and Venom Proteomic Analysis of The Predatory ant *Odontomachus monticola*. *Toxins*, 9: 323, 2017. doi:10.3390/toxins9100323.
- 15) Ferreira Júnior W. A., Zaharenko A. J., Kazum, K., Picolo G., Gutierrez V. P., Freitas J. C., Konno K., Cury Y.: Peripheral 5-HT₃ Receptors Are Involved in The Antinociceptive Effect of Bunodosine 391. *Toxins.*, 10: 12, 2017. doi:10.3390/toxins10010012.
- 16) Nzogong R. T., Nganou B.K., Tedonkeu A.T., Awouafack M.D., Tene M., Ito T., Tane P., Morita H.: Three New Abietane-type Diterpenoids from *Plectranthus africanus* and Their Antibacterial Activities. *Planta Med.*, 84: 59-64, 2018. doi: 10.1055/s-0043-114426.
- 17) Nugroho A. E., Hashimoto A., Wong C. P., Yokoe H., Tsubuki M., Kaneda T., Hadi A. H. A., Morita H.: Ceramicines M-P from *Chisocheton ceramicus*: Isolation and Structure-Activity Relationship Study. *J. Nat. Med.*, 72: 64-72, 2018. doi: 10.1007/s11418-017-1109-2.
- 18) Wong C. P., Awakawa T., Nakashima Y., Mori T., Zhu Q., Liu X., Abe I.: Two Distinct Substrate Binding Modes for The Normal and Reverse Prenylations of Hapalindoles by The Prenyltransferase AmbP3. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57: 560-563, 2018. doi: 10.1002/anie.201710682.

- 19) Ito T., Nguyen H. M., Win N. N., Vo H.Q., Nguyen H. T., Morita H.: Three New Sesquiterpene Aminoquinones from A Vietnamese *Spongia* sp. and Their Biological Activities. *J. Nad. Med.*, 72: 298–303, 2018. doi: 10.1007/s11418-017-1130-5.

◇総説

- 1) Win N. N., Ngwe H., Abe I., Morita H.: Naturally Occurring Vpr Inhibitors from Medicinal Plants of Myanmar. *J. Nad. Med.*, 4: 579–589, 2017. doi: 10.1007/s11418-017-1104-7.
- 2) 伊藤卓也：ミャンマー伝統医学の最新動向と薬用植物の科学的根拠の解明，「生薬・薬用植物研究の最新動向」（高松 智（監修）），CMC 出版社，pp. 140–150, 2017.
- 3) 伊藤卓也：ミャンマー伝統生薬の有効性の検証，*アグリバイオ* 88; 77-79, 2017.
- 4) 紺野勝弘：有毒植物による食中毒の最近の動向．*食品衛生研究*，67 (5)，29–35, 2017.

◇著書

- 1) Awouafack M. D., Tane P., Morita H.: Isolation and structure characterization of Flavonoids. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*, InTech-open science/open mind, ed, J. Justino, pp. 45–59, 2017.

◇学会報告（*：特別講演，シンポジウム，ワークショップ等）

- * 1) Morita H.: Characterization of two novel plant type III polyketide synthases from *Evodia rutaecarpa*. 9th US-Japan Seminar on the biosynthesis of Natural Products. 2017 May 30-June 4; CA, USA. (Invited lecture)
- * 2) Ito T.: Collaboration with Some Universities of Myanmar in Natural Product Research. Symposium on traditional medicine and primary healthcare in Toyama and Myanmar. 2017 Jun 26; Toyama, Japan. (Invited lecture)
- 3) Ito, T, Nisa K, Morita H.: Phytochemical study on *Baeckea frutescens* collected in Indonesia. 58th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. 2017 Jul 29-Aug 2; Portland, Oregon, USA.
- 4) Ju Y., Hoshino S., Win N. N., Yang X., Abe I., Morita H.: Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase. The 2nd International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network. 2017 Sep 26-27; Shandong, China.
- 5) Nguyen H. M., Ito T., Morita H.: New merosesquiterpenes from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. and their biological activities. The 2nd International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network. 2017 Sep 26-27; Shandong, China.
- * 6) Morita H.: 2-Alkylquinolone alkaloid biosynthesis in the medicinal plant *Evodia rutaecarpa*. International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources. 2017 Sep 28; Jecheon, Korea. (Invited lecture)
- * 7) Win N. N.: Discovery of potent Vpr inhibitors for HIV infection from *Kaempferia pulchra* Rhizomes collected from Myanmar. International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources. 2017 Sep 28; Jecheon, Korea. (Invited lecture)
- 8) Ki D., Ito T., Win N.N., Morita H.: Chemical constituents of *Spongia officinalis* collected in Myanmar. International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources. 2017 Sep 28; Jecheon, Korea.
- 9) Woo S., Ito T., Dibwe D.F., Morita H.: Syntheses and antibacterial activities of benzophenone-xanthone hybrid polyketides. International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources. 2017 Sep 28; Jecheon, Korea.
- 10) Woo B., Ju Y., Yang X., Win N.N., Morita H. Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase. International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources. 2017 Sep 28; Jecheon, Korea.
- * 11) Morita H.: Combinatorial biosynthesis of an unnatural novel aloesone analog by exploiting type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase. The 1st Japan-China Biosynthesis seminar. 2017 Oct. 3; Shanghai, China. (Invited lecture)
- * 12) Win N. N.: Discovery of bioactive natural products from Myanmar medicinal plants. The 15th

- International Symposium on Traditional Medicine in Toyama. 2017 Nov. 9; Toyama. (Invited lecture)
- * 13) Awouafack M. D.: Phytochemical investigation of some Cameroonian medicinal plants. The 15th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama. 2017 Nov. 9; Toyama. (Invited lecture)
 - 14) Woo B, Ju Y, Yang X, Win N. N., Morita H. Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2017 Nov 10; Toyama.
 - 15) Nguyen H. M., Ito T, Morita H. New merosesquiterpenes from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. and their biological activities. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2017 Nov 10; Toyama.
 - * 16) Morita H.: Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds. Seminar in Jinan University. 2017 Nov. 16; Guangzhou, China. (Invited lecture)
 - * 17) Morita H.: Manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds. Seminar in South China Sea Institute of Oceanology, CAS. 2017 Nov. 17; Guangzhou, China. (Invited lecture)
 - 18) Nguyen H. M., Ito T., Morita H. New merosesquiterpenes from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. and their biological activities. 第 64 回日本生薬学会年会. 2017 Sep 9-10 ; 千葉.
 - 19) Awouafack M. D., Nzogong R. T., Nganou B. K., Tedonkeu A. T., Tane M, Ito T, Tane P, Morita H. Antibacterial diterpenoids from a Cameroonian medicinal plant *Plectranthus africanus*. 第 64 回日本生薬学会年会. 2017 Sep 9-10 ; 千葉.
 - 20) Win N. N., Ito T, Ngwe H, Morita H. Isopimarane diterpenoids: Vpr inhibitors from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar. 第 64 回日本生薬学会年会. 2017 Sep 9-10 ; 千葉.
 - 21) Win N. N., Ito T., Win Y. Y., Prema, Ngwe H., Morita H. Labdane Diterpenoids from *Curcuma amada* Rhizomes Collected in Myanmar. 日本薬学会第 138 年会 ; 2018 Mar 26-28 ; 金沢.
 - 22) Awouafack M. D., Tane P., Morita H. Antibacterial constituents from a Cameroonian medicinal plant *Paullinia pinnata* L. 日本薬学会第 138 年会 ; 2018 Mar 26-28 ; 金沢.

◇その他

- 1) Morita H.: Studies on the biosynthesis of 2-alkylquinolone and manipulation of plant polyketide-producing enzymes to produce new compounds. The 15th International Symposium on Traditional Medicine in Toyama; 2017 Nov. 9; Toyama. (Lecture)
- 2) Morita H.: Discovery of new bioactive compounds from natural sources and by engineering approaches of secondary metabolite enzyme. Joint Seminar on Recent Advances in Drug Discovery and Biopharmaceutics; 2018 Jan 22; Cairo.
- 3) 森田洋行：漢方・生薬の有効成分. 第 22 回和漢医薬学総合研究所 夏期セミナー; 2017 Aug 8 ; 富山 (講義)
- 4) 森田洋行：植物成分の生合成. 漢方薬・生薬研修会. 2017 Jun 18 ; 東京 (講義)
- 5) 紺野勝弘：身の回りに潜む毒を持つ生き物たち, 放送大学富山学習センターオープンセミナー, 2017 Aug 5, 富山
- 6) 紺野勝弘：身の回りに潜む毒草, 放送大学富山学習センター冬のオープンセミナー, 2018 March 10, 富山
- 7) 禹 甫庚：International Symposium on Strategy for the future of Natural Product Resources ポスター優秀賞, 「Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase」 2017 Sep
- 8) 鞠 嘩：富山大学アジア・アフリカ拠点形成事業シンポジウム ポスター優秀賞, 「Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase」 2017 Sep

◇共同研究

国内

- 1) 葛山智久：東京大学生物生産工学研究センター、「インドールプレニル基転移酵素の酵素触媒機構に関する研究」、2015, 9～
- 2) 内田浩二：名古屋大学大学院生命農学研究科、「アポリポタンパク質の DNA ピロール化機構に関する研究」、2015, 12～
- 3) 尾仲宏康：東京大学大学院農学生命科学科、「ゴードスポリン耐性作用メカニズムの構造学的解析」、2016, 2～
- 4) 大川 徹：北海道大学大学院工学研究院、「新規ラセマーゼの触媒機構の解析」
- 5) 岡田正弘：東京大学大学院薬学系研究科、「新規プレニル転移酵素の触媒機構の解析」
- 6) 庄司正樹、葛原隆：徳島文理大学薬学部、「東南アジア産伝統生薬由来の抗ウイルス物質の探索研究」
- 7) 稲垣英利：産業技術総合研究所、「アリおよびハチに由来する生理活性物質の作用機序に関する研究」
- 8) 篠崎淳一助教：昭和薬科大学天然物化学研究室、「有毒植物の迅速・簡便な遺伝子鑑別法の開発」

海外

- 1) Subehan Ambo Lallo：インドネシア・ハサヌディン大学薬学部、「インドネシア産天然資源からの生物活性化合物の単離・構造決定」
- 2) Hla Ngwe：ミャンマー・ヤンゴン大学化学部、「ミャンマー産薬用植物の生物活性化合物に関する研究」
- 3) Nang Mya Han：ミャンマー・ベイ大学海洋学部、「ミャンマー産海綿の生態調査と化学成分の解析」
- 4) Sornkanok Vimolmangkang：タイ・チュラロンコン大学薬学部、「新規 III 型ポリケタイド合成酵素の探索と機能同定」
- 5) Hoai Thi Nguyen：ベトナム・フエ大学医学薬学部、「ベトナム産天然資源中の化学成分の解析」
- 6) Shepo Shi: 北京中医薬大学、「新規 III 型ポリケタイド合成酵素の X 線結晶構造解析」、2016, 10～
- 7) Prof. Jan Tytgat: University of Leuven, Leuven, Belgium “Electrophysiological studies of peptide neurotoxins from venomous animals”
- 8) Dr. Andre Junqueira Zaharenko: Butantan Institute, São Paulo, Brazil “Bioactive components in sea anemone venom”

◇研究費取得状況

- 1) 日本学術振興会、二国間交流事業オープンパートナーシップ共同研究（代表：森田洋行）「ミャンマー産未利用薬用資源の化学的解析と遺伝資源の保存」
- 2) 基盤研究（B）（海外学術調査）（代表：森田洋行）「あらたな創薬資源の採集調査と成分解析及び遺伝資源バンクの構築」
- 3) 基盤研究（B）（代表：森田洋行）「DABB ファミリー酵素を素材とした新規ポリケタイド閉環酵素の創出」
- 4) 新学術領域（研究領域提案型）（代表：森田洋行）「植物由来新規ポリケタイド閉環酵素の探索と物質生産」
- 5) 基盤研究（C）（代表：伊藤卓也）「東南アジア産薬用植物の薬効・効能の科学的エビデンスを解明する」
- 6) 若手研究（B）（代表：松井崇）「サステイナブルな物質生産を目指したプレニル基転移酵素の構造・機能解析」

- 7) 特別研究員奨励費（受容研究者：森田洋行）「カメルーン産薬用植物の抗菌活性成分に関する研究」
- 8) かなえ医薬振興財団・アジア・オセアニア交流研究助成（代表：森田洋行）「HIV 治療薬の開発を指向したミャンマー産薬用植物及び海綿からの Vpr 阻害物質の探索」
- 9) 小林国際奨学財団研究助成（代表：森田洋行）「未利用薬用資源からの医薬品シードの探索と遺伝資源バンクの拡張」
- 10) 平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）（分担：紺野勝弘）「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
- 11) 科学研究費 基盤研究 (C)（分担：紺野勝弘）「狭食・狩猟性アリ類の神経毒の餌動物ナトリウムチャンネルに対する適応変化の検証」

◇研究室在籍者

- 大学院修士 1 年：劉倩倩（10 月入学）
- 大学院修士 1 年：趙洋（10 月入学）
- 大学院修士 1 年：禹甫庚
- 大学院修士 1 年：Sherif Adel Arafa Aly Mohamed ElSabbagh
- 大学院修士 2 年：杜凱莉（10 月入学）
- 大学院修士 2 年：鞠嘩（9 月修了）
- 大学院修士 2 年：Senda Kartika Rakainsa（9 月修了）
- 大学院博士 1 年：奇大源
- 大学院博士 2 年：Nguyen Minh Hien
- 大学院博士 3 年：禹昭年（10 月入学）
- 研 究 員：紺野勝弘（JICA）
- 研 究 員：Nwet Nwet Win（武田財団奨学金）
- 研 究 員：Maurice D Awouafack（JSPS 外国人特別研究員）
- 研 究 員：Sornkanok Vimolmangkang（6 月～7 月）
- 研 究 員：Thaniya Wunnakup（7 月～8 月）
- 研 究 員：Ali Mahmoud El Halawany（9 月～11 月）
- 研 究 生：Prema（10 月～3 月）
- 研 修 生：Wachiraporn Saibuppha（7 月）
- 研 修 生：Wichitra Khomsai（7 月）
- 研 修 生：Srinon Chanakarn（8 月～10 月）
- 研 修 生：Tancharoenlarp（8 月～10 月）

◇学位（修士，博士）取得者

修士論文：

鞠嘩：Combinatorial biosynthesis of aloesone analog by exploiting a type III polyketide synthase and olivetolic acid cyclase

Senda Kartika Rakainsa：Isolation and structure determination of new diterpenoids from *Plectranthus scutellarioides* collected in Indonesia and their antibacterial and cytotoxic activities

教授	松本 欣三	Professor	Kinzo Matsumoto (Ph.D.)
准教授	東田 道久	Associate Professor	Michihisa Tohda (Ph.D.)
助教	藤原 博典	Assistant Professor	Hironori Fujiwara (Ph.D.)

◇研究目的

中枢神経系疾患の病態と発症機構に関する薬理学的研究を行うとともに、和漢薬をはじめ、複合成分からなる薬物の薬効に関する計量薬理学的評価、作用本体の追求および分子レベルでの作用機序の解明を目的とした研究を行っている。

◇研究概要

I) 中枢神経系疾患の病態と発症機構に関する基礎研究

- 1) 心理的ストレスで起こる異常行動および薬物応答性変化の神経機構、神経ステロイドをはじめとする神経機能修飾因子の役割に関する研究と軽度発達障害モデルとしての応用
- 2) 病態モデルにおける神経伝達物質等の内在性因子や天然薬物成分の脳内動態に関する研究

II) 複合薬物およびその成分の中枢作用に関する神経薬理学的研究

- 1) 認知症病態の *in vivo* および *in vitro* モデル系における和漢薬および和漢薬成分の抗認知症作用と神経保護作用の評価ならびに作用分子機構の解明
- 2) 認知症進行を抑制する神経細胞保護薬および GSK3 β 阻害薬の開発を志向した伝統薬物・民族薬の薬理作用の探索と作用機序の解析
- 3) 神経伝達受容体の機能解析および受容体作用薬の分子機構に関する電気生理学的・生化学的研究

III) 和漢薬理論に対するエビデンスの付与とその理論を利用した病態関連因子の単離，機能解析，和漢薬作用に関する研究

- 1) 分子的視点に基づく分析的解析法と全身的視点に基づく統合薬理学的手法の両面からの和漢薬理論（五行論，対薬等）へのエビデンスの付与
- 2) 遺伝子導入細胞を用いた神経伝達機能に及ぼす和漢薬作用およびその分子的機序に関するリアルタイム解析
- 3) 和漢薬理論を基盤としたうつ病態関連因子の同定と単離，その発現制御による動的機能解析，ならびに複合薬物薬理学的視点に立脚した和漢薬作用の解析

◇著書

- 1) 松本欣三：第 16 章 釣藤鈎アルカロイドの薬理作用，アルカロイドの科学，化学同人，東京，323-334，2017.

◇原著論文

- 1) Awale S., Tawila AM., Dibwe DF., Ueda JY., Sun S., Athikomkulchai S., Balachandran C., Saiki I., Matsumoto K., Esumi H.: Highly oxygenated antiausterity agents from the leaves of *Uvaria dac.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27(9): 1967-1971, 2017. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.021.
- 2) Fujiwara H., Han Y., Ebihara K., Awale S., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Daily administration

- of yokukansan and keishito prevents social isolation-induced behavioral abnormalities and down-regulation of phosphorylation of neuroplasticity-related signaling molecules in mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17: 195, 2017. doi: 10.1186/s12906-017-1710-7.
- 3) Ebihara K., Fujiwara H., Awale S., Dibwe DF., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: a novel animal model of ASD. *Behav. Brain. Res.*, 334: 6-15, 2017. doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.019.
 - 4) Dibwe DF., Sun S., Ueda JY., Balachandran C., Matsumoto K., Awale S.: Discovery of potential antiausterity agents from the Japanese cypress *Chamaecyparis obtusa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 4898-4903, 2017. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.09.034.
 - 5) Sasaki-Hamada S., Suzuki A., Sanai E., Matsumoto K., Oka JI.: Neuroprotection by chotosan, a Kampo formula, against glutamate excitotoxicity involves the inhibition of GluN2B-, but not GluN2A-containing NMDA receptor-mediated responses in primary cultured cortical neurons. *J. Pharmacol. Sci.*, 135: 134-137, 2017. doi: 10.1016/j.jphs.2017.10.009.
 - 6) Tohda C., Tohda M.: Extracellular cathepsin L stimulates axonal growth in neurons. *BMC Res. Notes.*, 10(1): 613, 2017. doi: 10.1186/s13104-017-2940-y.
 - 7) Tohda M.: Novel RNA editing sites of 5-HT_{2C} receptor encoding the third intracellular loop domain in undifferentiated NG108-15 cells. *Ann. Pharmacol. Pharmaceu.*, 2(26): 1136, 2017.
 - 8) Fujiwara H., Tsushima R., Okada R., Awale S., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Sansoninto, a traditional herbal medicine, ameliorates behavioral abnormalities and down-regulation of early growth response-1 expression in mice exposed to social isolation stress. *J. Tradit. Complement. Med.*, 8(1):81-88, 2018. doi: 10.1016/j.jtcme.2017.03.004.
 - 9) Tohda M.: Possible interaction of serotonin 2C receptor mRNA editing at C-site with expression of microtubule-associated protein 2 and neurite outgrowth in rat cultured cortical cells. *MOJ Curr Res & Rev.*, 2018;1(1): 00004, 2018. DOI: 10.15406/mojcr.2018.01.00004

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- * 1) Kinzo Matsumoto, Hironori Fujiwara, Yaoyu Han, Ken Ebihara, Suresh Awale: Experimental approach to developmental disorder treatment from traditional medicine. The 1st International Conference on Natural Medicines: ICNM2017, 2017, 8, 5-6, Bangkok, Thailand. (Invited lecture)
- 2) Ken Ebihara, Hironori Fujiwara, Suresh Awale, Dya Fita Dibwe, Ryota Araki, Takeshi Yabe, Kinzo Matsumoto: SKF105111 induced autismspectrum disorder (ASD) -like behavior may offer anovel animal model to explore therapeutic drugs for ASD. The 1st International Conference on Natural Medicines: ICNM2017, 2017, 8, 5-6, Bangkok, Thailand.
- 3) Ariyawan Tantipongpiradet, Orawan Monthakantirat, Kinzo Matsumoto, Suresh Awale, Chantana Boonyarut, Supwadee Daodee, Natdanai Musigavong, Supaporn Pitiporn, Yaowared Chulikhit: Effect of Thai herbal formula for menopause on depressive-like behavior in ovariectomized mice model. The 1st International Conference on Natural Medicines: ICNM2017, 2017, 8, 5-6, Bangkok, Thailand.
- 4) 郭青雲, 藤原博典, 海老原健, Awale Suresh, 荒木良太, 矢部武士, 松本欣三: 神経ステロイド allopregnanolone の生合成阻害による社会性行動低下に対する加味逍遥散の改善効果. 第34回和漢医薬学会大会, 2017, 8, 26-27, 福岡.
- 5) 木村恭子, 大竹浩紀, 藤原博典, 松本欣三: 内因性アセチルコリンによる VEGF 産生の細胞特異性. 第68回薬理学会北部会, 2017, 9, 15-16, 山形.
- * 6) 木村恭子, 藤原博典, 大竹浩紀, 松本欣三: VEGF シグナリングとそのアセチルコリン性制御. Toyama Academic GALA 2017, 2017, 9, 27, 富山. (ワークショップ)
- * 7) 海老原健, 藤原博典, アワレ スレス, ディブエ ディタ フィタ, 荒木良太, 矢部武士, 松本欣三: 神経ステロイド allopregnanolone の生合成阻害によって生じる自閉症スペクトラム様症状について. Toyama Academic GALA 2017, 2017, 9, 27, 富山. (ワークショップ)
- * 8) 松本欣三: 次世代 KAMPO 科学の創成を志向した KAMPO-OMICS の基盤構築. Toyama Academic GALA 2017, 2017, 9, 27, 富山. (ワークショップ)
- * 9) 松本欣三, 郭青雲, 海老原健, Awale Suresh, 荒木良太, 矢部武士, 藤原博典: 自閉症スペクトラム(ASD)様症状発現における脳内神経ステロイド・アロプレグナノロンの役割と加味

- 逍遥散による発現抑制. 第16回日本臨床中医薬学会大会, 2017, 9, 23, 川越. (シンポジウム)
- * 10) 松本欣三: こどもの心の病と漢方薬: 発達障害の予防治療に向けた伝統薬からの実験的アプローチ Experimental approach to developmental disorder treatment from traditional medicine. 日中友好病院中薬国際伝統医薬シンポジウム, 2017, 12, 2, 北京, 中国. (招待講演)
 - 11) 荒井雄樹, 南園友紀, 和田梨沙, 田中翔斗, 藤原博典, 松本欣三, 當銘一文, 吾郷由希夫, 荒木良太, 矢部武士: 加味温胆湯は抗うつ様作用と細胞外セロトニン量増加作用を有する. 日本薬学会第138回年会, 2018, 3, 25-28, 金沢.
 - * 12) 藤原博典, 荒木良太, 矢部武士, 松本欣三: 発達障害の予防治療を指向した漢方薬のリポジショニング. 日本薬学会第138回年会, 2018, 3, 25-28, 金沢. (シンポジウム)

◇その他

- 1) 東田道久: 和漢薬 ヒトは左でくるま右? 常識のベクトルを回すことで見えてくる和漢薬の本質. 富山市民大学講座, 生活医学薬学を学ぶ, 2017, 6, 23, 富山.
- 2) 東田道久: ちょっと立ち止まって考えてみよう、和漢薬の本当の面白さと本当の難しさ. 平成29年度漢方医学と生薬講座, 2017, 7, 22, 富山.
- 3) 松本欣三: 記憶の病と和漢薬. 富山市民大学講座, 2017, 7, 28, 富山.
- 4) 松本欣三: こころと記憶と和漢薬. 第22回和漢医薬学総合研究所・夏期セミナー, 2017, 8, 9-10, 富山.
- 5) Kinzo Matsumoto: Lessons about diseases of memory and mind learned from the mouse and traditional medicines. ベトナム国立薬物研究所招聘セミナー, 2017, 8, 29, ハノイ.
- * 6) 松本欣三: 認知症治療で果たす漢方薬の役割—その臨床・前臨床的エビデンス. 第196回石川漢方談話会, 2017, 10, 13, 金沢. (招待講演)
- * 7) 松本欣三: “マウスから学ぶ” “こころと記憶の病” と和漢薬. 第60回富山県理科教育研究発表会記念講演, 2017, 11, 22, 富山. (招待講演)
- 8) 東田道久: 談話室: 消えゆく美音に酔いしれる: みみは万能への入り口. ファルマシア, 53(1): 7, 2017.
- 9) 東田道久: 新刊紹介: 病気とくすり2016. ファルマシア, 53(4): 372, 2017.
- 10) 東田道久: 新刊紹介: ジャンクDNA. ファルマシア 52(5): 502, 2017.
- 11) 東田道久: 新刊紹介: ノンコーディングRNA RNA分子の全体像を俯瞰する. ファルマシア, 52(6): 603, 2017.
- 12) 東田道久: 新刊紹介: シーン別 わかる! 漢方Q&A. ファルマシア, 52(10): 954, 2017.

◇共同研究

研究所内

- 1) 渡辺志朗 博士: 栄養代謝学分野, 「漢方薬の薬効メディエータに関する研究」および「認知症の予防治療に資する天然薬食物の開発」, 2013~
- 2) Awale Suresh 博士: 天然物創薬, 「注意欠陥・多動性障害モデルマウスの行動障害を指標とした和漢薬応用法の開発」, 2015~
- 3) 東田千尋博士: 神経機能学, 「機能強化プロジェクト: 漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」, 2017~

学内

- 1) 高雄啓三 博士: 生命科学先端研究支援ユニット, 「学長裁量(研究戦略経費): 核磁気共鳴(NMR)装置を活用した超高解像度マウス脳機能画像解析システムの確立とその疾患モデルマウスへの応用」, 2017~

学外

- 1) 岡淳一郎 博士: 東京理科大学薬学部, 「糖尿病態で発症する認知障害に対する漢方薬の実験的治療の研究」および「釣藤散の抗うつ作用および抗認知症作用に関する研究」, 2012~
- 2) 矢部武士 博士: 摂南大学薬学部, 「隔離飼育動物モデルにおけるエピジェネティックな精神神経性障害の発症機構解明と薬物(和漢薬)制御」, 2014~

- 3) 野口博司 博士, 梅原薫 博士: 日本薬科大学, 静岡県立大学薬学部, 「Phytoestrogen miroestrol の抗認知症および抗ストレス作用に関する研究」, 2013～
- 4) 青木伊知男 博士: 放射性医学研究所, 「和漢薬の脳内作用機構に関する分子イメージング法による解析」, 2014～
- 5) 荒木良太 博士: 摂南大学薬学部, 「精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析」, 2016～

海外

- 1) Yaowared Chulikhit 博士: タイ・コンケン大学薬学部, 「認知症およびうつ病の予防治療に資する天然薬物の開発」, 2010～
- 2) Pham Nguet Thi Hang 博士: ベトナム・国立天然薬物研究所, 「認知症の予防治療に資する天然薬物の開発」, 2010～
- 3) Nguyen Minh Khoi 博士: ベトナム・National Institute of Medicinal Materials, 「ベトナム生薬 *Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith の抗認知症効果とその作用分子機構に関する実験薬理学的研究」, 2014～
- 4) Le Thi Xoan 博士: ベトナム・国立天然薬物研究所, 「認知・情動障害の予防治療に資するベトナム天然薬物の開発」, 2015～

◇研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費, 挑戦的萌芽研究 (代表: 松本欣三) 「ADHD エピジェネティック動物モデルでの発症機構解明と和漢薬による予防治療法」直接経費 50 万 (3/3 年目)
- 2) 平成 29 年度学長裁量経費, 戦略的経費 (代表: 松本欣三; 分担: 中川崇, Suresh Awale, 高崎一朗, 渡辺志朗, 条美智子) 「次世代 KAMPO 科学の創成を志向した KAMPO-OMICS の基盤構築 和漢薬と病態の包括的理解に向けた化学的分子基盤の構築 ―生体の内側から捉える和漢薬と疾患の複雑系―」100 万
- 3) 平成 29 年度 和漢医薬学総合研究所 共同利用・共同研究拠点, 一般研究 I (所内代表: 藤原博典) 「精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析」60 万
- 4) 平成 29 年度 公益財団法人小林国際奨学財団, 研究助成 (代表: 藤原博典) 「自閉症スペクトラム障害の新規発症抑制因子である神経ステロイド allopregnanolone のエピジェネティクス制御および和漢薬作用に関する研究」150 万 (1 年目)
- 5) 平成 29 年度学長裁量経費, 部局長リーダーシップ支援経費 (藤原博典) 40 万
- 6) 平成 29 年度学長裁量経費, 部局長リーダーシップ支援経費による論文発表支援 (藤原博典) 20 万

◇研究室在籍者

薬学部 3 年生: 下平隆文, 安藤慶顕, 大島知佳子

薬学部 4 年生: 小濱寛之

大学院修士 2 年: 海老原健, 木村恭子, 郭青云

研 究 生: 李林煜

インターンシップ学生: Ms. Kanlaya Ruengwinitwong (タイ・Khon Kaen 大学薬学部, 2017, 9/17～12/9)

病態生化学分野

Division of Pathogenic Biochemistry

教授	早川 芳弘	Professor	Yoshihiro Hayakawa (Ph.D.)
助教	横山 悟	Assistant Professor	Satoru Yokoyama (Ph.D.)
研究員	モイッチ マリア	Postdoctoral Fellow	Marija Mojic (Ph.D.)
事務補佐員	浅里かおる	Secretary	Kaoru Asari

◇研究目的

本分野は、病態の生化学的研究を行うとともに、和漢薬を含む種々の薬物の病態に及ぼす効果を生化学的、免疫学的、あるいは遺伝学的に研究することを目的としている。

和漢薬を中心に、構造の明らかにされた成分あるいは化合物を用いて、種々の病態に有効な薬物の探索とその作用機序を分子レベルで解明する。「証」といわれる病態変化／症候を遺伝子工学的、免疫学的手法等を駆使してその遺伝的背景を解析し、薬物の効果発現との関連性からその科学的基盤を解明する。現在、がん、免疫疾患などを中心にして検討を行っている。

◇研究概要

I) がん病態における自然免疫応答の役割解明と創薬への応用

- 1) NK細胞のバイオロジーと腫瘍免疫応答における役割
- 2) がん病態進展における腫瘍微小環境での自然免疫応答の役割
- 3) がんモデルにおける病態のリアルタイムイメージング

II) がんの増殖・転移機構の解明とその制御

- 1) 薬剤併用による細胞死誘導効果とその分子機構の解明
- 2) 上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) の制御機構の解析と阻害剤の探索
- 3) がん転移病態モデルを用いての転移阻害効果の解析

III) 和漢薬に関する基礎的研究

- 1) 漢方方剤およびその構成成分によるがん転移抑制とその機構
- 2) 和漢薬による免疫応答および免疫疾患の制御に関する研究

◇著書

- 1) 横山悟, 早川芳弘 第5章第2節 「がん転移の最新メカニズム、創薬への応用」, 動物/疾患モデルの作製技術・病態解析・評価方法, pp154-159, 2017.
- 2) Yokoyama S, Fisher DE. Transcriptional Regulation in melanoma, Melanoma Development -Molecular Biology, Genetics and Clinical Application. 2nd Edition, pp95-117, 2017.

◇原著論文

- 1) Takeda K., Nakayama M., Hayakawa Y., Kojima Y., Ikeda H., Imai N., Ogasawara K., Okumura K., Thomas D.M., Smyth M.J.: IFN-gamma is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoeediting. Nat Commun., 8: 14607, 2017. doi.: 10.1038/ncomms14607.
- 2) Wu H., Tao A., Martin J.D., Quader S., Liu X., Takahashi K., Hespel L., Miura Y., Hayakawa Y.,

- Irimura T., Cabral H., Kataoka K.: Proteasome Inhibitor-Loaded Micelles Enhance Antitumor Activity Through Macrophage Reprogramming by NF-kappaB Inhibition. *J. Pharm. Sci.*, 106: 2438-2446, 2017. doi.: 10.1016/j.xphs.2017.03.031.
- 3) Xu X., Yokoyama S., Hayakawa Y., Saiki I.: Coptidis Rhizoma induces intrinsic apoptosis through BAX and BAK activation in human melanoma. *Oncol. Rep.*, 38: 538-544, 2017. doi.: 10.3892/or.2017.5672.
 - 4) Kamiyama M., Shirai T., Tamura S., Suzuki-Inoue K., Ehata S., Takahashi K., Miyazono K., Hayakawa Y., Sato T., Takeda K., Naguro I., Ichijo H.: ASK1 facilitates tumor metastasis through phosphorylation of an ADP receptor P2Y12 in platelets. *Cell Death Differ.*, 24: 2066-2076, 2017. doi.: 10.1038/cdd.2017.114.
 - 5) Endo S., Xia S., Suyama M., Morikawa Y., Oguri H., Hu D., Ao Y., Takahara S., Horino Y., Hayakawa Y., Watanabe Y., Gouda H., Hara A., Kuwata K., Toyooka N., Matsunaga T., Ikari A.: Synthesis of Potent and Selective Inhibitors of Aldo-Keto Reductase 1B10 and Their Efficacy against Proliferation, Metastasis, and Cisplatin Resistance of Lung Cancer Cells. *J. Med. Chem.*, 60: 8441-8455, 2017. doi.: 10.1021/acs.jmedchem.7b00830.
 - 6) Ami N., Sato H., Hayakawa Y.: Paclitaxel-induced hypothermia and hypoperfusion increase breast cancer metastasis and angiogenesis in mice. *Oncol. Lett.*, 15: 2330-2334, 2018. doi.: 10.3892/ol.2017.7621.
 - 7) Ogura K., Sato-Matsushita M., Yamamoto S., Hori T., Sasahara M., Iwakura Y., Saiki I., Tahara H., Hayakawa Y.: NK Cells Control Tumor-Promoting Function of Neutrophils in Mice. *Cancer Immunol Res.*, 2018. doi.: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0204.

◇総説

- 1) Mojic M., Takeda K., Hayakawa Y.: The Dark Side of IFN-gamma: Its Role in Promoting Cancer Immune Evasion. *Int J Mol Sci.*, 19: pii: E89, 2017. doi.: 10.3390/ijms19010089.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) 横山悟, 早川芳弘, 櫻井宏明, 済木育夫 : COP9 シグナルソーム 5(COPS5)は転写因子 SNAIL を脱ユビキチン化することにより肺がんの転移を制御する, 第 21 回日本がん分子標的治療学会, 2017. 06. 14-16, 福岡.
- 2) 岩上雄亮, 横山悟, 早川芳弘, 済木育夫 : メラノーマにおける脱ユビキチン化酵素 PSMD14 の細胞増殖および転移に対する効果の検討, 第 26 回日本がん転移学会, 2017. 07. 27-28, 大坂.
- * 3) 横山悟: 細胞内シグナルからみる漢方理論, 第 34 回和漢医薬学会総会, 2017. 08. 26-27, 福岡.
- 4) 笠原栞, 横山悟, 早川芳弘: マウス花粉症モデルを用いた小青竜湯の薬理作用解析, 第 34 回和漢医薬学会総会, 2017. 08. 26-27, 福岡.
- 5) 梅山凜, Hardianti Besse, 横山悟, 早川芳弘: Toll 様受容体を介した炎症性シグナルに対する桑白皮の作用, 第 34 回和漢医薬学会総会, 2017. 08. 26-27, 福岡.
- 6) 山本優, 小倉圭介, 佐々木宗一郎, 向田直史, 早川芳弘, 生物発光イメージングを用いた乳がん骨転移過程における NK 細胞の役割解明, 金沢大学がん進展制御研究所 50 周年記念国際シンポジウム; 2017.10.25-26; 金沢.
- * 7) Hayakawa Y. Targeting innate lymphocytes to regulate cancer-associated inflammation, The 1st International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research; 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.
- 8) Miyazato K, Hayakawa Y. Anti-metastatic effect of thalidomide through the regulation of NK cell homeostasis. The 1st International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research; 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.
- 9) Miyazato K, Tahara H, Hayakawa Y. Anti-metastatic effect of immunomodulatory drugs (IMiDs) through the regulation of NK cell homeostasis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017); 2017 Oct. 29-Nov. 2; Kanazawa
- 10) Ogura K, Sato-Matsushita M, Hori T, Iwakura Y, Tahara H, Saiki I, Hayakawa Y. NK cells control tumor-promoting function of neutrophils. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine

- and Interferon Society (ICIS2017); 2017 Oct. 29-Nov. 2; Kanazawa.
- 11) Umeyama R, Yokoyama S, Hayakawa Y, Anti-inflammatory effect of Morus alba L. bark to suppresses Toll-like receptor activation in RAW264.7 macrophages. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017); 2017 Oct. 29-Nov. 2; Kanazawa
 - 12) Mojic M, Shitaoka K, Kishi H, Muraguchi A, Tahara H, Hayakawa Y. Time-scale analysis of interplay between occult immunogenic tumor and immune response. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017); 2017 Oct. 29-Nov. 2; Kanazawa
 - 13) 早川芳弘. 腫瘍炎症応答制御におけるナチュラルキラー細胞の役割. 第9回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム, 2017. 06. 09; 東京.
 - * 14) 早川芳弘. 発光イメージングを応用したがん-宿主免疫相互作用の解析, 第27回日本サイトメトリー学会学術集会; 2017. 06. 10; 神戸.
 - 15) 早川芳弘, 小倉圭介, 田原秀晃, NK cells control tumor-promoting function of neutrophils. 第21回日本がん免疫学会総会; 2017. 06. 28-30; 千葉.
 - 16) 宮里紀穂, 濟木育夫, 早川芳弘. Immunomodulatory Drugs のNK細胞を介したがん転移抑制機序の解明. 第26回日本がん転移学術集会・総会; 2017. 07. 27-28; 大阪.
 - 17) 山本優, 田原秀晃, 早川芳弘, 原発性肺癌における肺固有NK細胞の役割, 第76回日本癌学会学術総会; 2017. 09. 28-30; 横浜.
 - 18) 徐小鷗, 横山悟, 早川芳弘, 濟木育夫, オウレンはBAX/BAKの活性化によるアポトーミスを誘導し, 悪性黒色腫の成長を阻害する. 第76回日本癌学会学術総会; 2017. 09. 28-30; 横浜.
 - 19) Shitaoka K, Hamana H, Kobayashi E, Ozawa T, Hayakawa Y, Muraguchi A, Kishi H, Majority of tumor infiltrating lymphocytes in B16F10 melanoma recognized tumor-associated antigens, but not melanoma-associated antigens or neoantigens. 第46回日本免疫学会学術集会; 2017.12.12-14; 仙台.
 - 20) Mojic M, 早川芳弘. Tumor-specific CTL's reduced clonality and proliferation index, not the inhibitory immune checkpoint expression, as hallmarks of B16 melanoma immune evasion. 第46回日本免疫学会学術集会; 2017.12.12-14; 仙台.

◇共同研究

国内

- 1) 向田直史：金沢大学がん進展研究所 共同研究課題
- 2) 鹿内正孝：玄米酵素（株）

◇講義

- 1) 早川芳弘：富山大学薬学部「免疫学」
- 2) 早川芳弘：富山大学薬学部「東西医薬学」
- 3) 早川芳弘：富山大学薬学部「和漢医薬学入門」
- 4) 早川芳弘：富山大学医学薬学教育部博士後期課程薬科学専攻「国際医薬学特論」
- 5) 早川芳弘：東京大学薬学部「がん細胞生物学」
- 6) 早川芳弘：富山県立いずみ高等学校看護学科講義
- 7) 早川芳弘：富山県立富山中部高校探求科学科「発展探求β」, 「イングリッシュサイエンスキャンプ」
- 8) 横山 悟：富山大学理工学教育部修士課程生命工学専攻 講義「薬理学・遺伝子工学特論」

◇研究費取得状況

- 1) 平成29年度 文部科学省科学研究費 新学術領域「予防を科学する炎症細胞社会学」(分担：早川芳弘)「ケミカルバイオロジーを用いた炎症性疾患に対する分子標的予防研究」(H29. 08. 01～H34. 03. 31)
- 2) 平成29年度 文部科学省科学研究費 基盤研究(C)(代表：濟木育夫)「遺伝子発現解

- 析で漢方理論を科学する」(H27, 04, 01～H30, 03, 31)
- 3) 平成 29 年度 文部科学省科学研究費 若手 (B) (代表：横山悟)「悪性黒色腫の新規治療法を目指した転写因子 SOX10 の機能解析」(H28, 04, 01～H30, 03, 31)
 - 4) 平成 29 年度 小林国際奨学財団 研究助成 (代表：早川芳弘)

◇研究室在籍者

- 学 部 3 年 生 : 関戸景子, 平田卓也, 菅原美紗 (12 月より配属)
- 学 部 4 年 生 : 佐藤純也
- 大学院修士 2 年 : 笠原栞, 沖昂平, 藤原俊幸
- 大学院博士 1 年 : 梅山凜, 宮里紀穂
- 大学院博士 2 年 : 岩上雄亮, 徐小鷗/Xu Xiao' ou (10 月入学)
- 大学院博士 3 年 : 小倉圭介, 李陸暉/Li Lu-hui (10 月入学), 網のぞみ (10 月社会人入学)
- 事 務 補 佐 員 : 浅里かおる
- 学 内 研 究 生 : 山本 優 (富山大学医学部・第一外科, 2016. 04. 01～)
- 研 究 員 : Marija Mojic (Postdoctoral Fellow)
 済木育夫 (Postdoctoral Fellow)
- 外国人客員研究員 : Na Han (Shenyang Pharmaceutical University, 2017.10.03~2016.12. 21)
 Sisca Ucce (Universitas Gadjah Mada, 2017.10.01~2018.3. 31)
 Gorrepotu Dani Susmitha (Gitam University, 2017.10.01~2018.3. 31)

◇学位 (修士, 博士) 取得者

- 修士論文 : 平成 30 年 3 月
- 笠原栞 : マウス季節性アレルギー鼻炎モデルの確立と小青竜湯の薬理的機序解析
- 沖昂平 : がん細胞の抗原特異的免疫応答に対する耐性獲得に伴う形質変化の解析
- 藤原俊幸 : リンパ腫全身播種における NK 細胞による免疫監視の重要性
- 博士論文 : 平成 30 年 3 月
- 網のぞみ : 細胞障害性抗がん剤の副作用の緩和治療に関する研究
- 小倉圭介 : がん悪性化進展制御におけるナチュラルキラー細胞の役割

消化管生理学分野

Division of Gastrointestinal
Pathophysiology

教授	門脇 真	Professor	Makoto Kadowaki (Ph.D.)
助教	山本 武	Assistant Professor	Takeshi Yamamoto (Ph.D.)
助教	林 周作	Assistant Professor	Shusaku Hayashi (Ph.D.)
研究員	長田夕佳 (2017.04.01-2018.01.31)	Postdoc	Yuka Nagata (Ph.D.)

◇研究目的

消化管疾患，特に腸管免疫性疾患の病因及び病態形成機序を解明し，それに基づく和漢薬等を含めた新規治療薬の創出に繋がる研究を目指す。

◇研究概要

1. 潰瘍性大腸炎及び大腸炎関連発がんの病因及び病態形成機序の解明
2. 食物アレルギーの病因及び病態形成機序の解明
3. 粘膜型マスト細胞や樹状細胞の病態生理学的役割とその活性化制御機構の解明
4. 腸管粘膜免疫系と自律神経系のクロストークの解明
5. 腸管免疫性疾患におけるコリン性抗炎症・免疫機構の解明
6. 腸管免疫寛容機構の解明
7. 腸管免疫性疾患の病因及び病態形成機序に基づく和漢薬からの創薬研究

消化管は生体と外界とのインターフェイスであり，多くの外来抗原に絶えず暴露されている。そのため，病原微生物を排除しつつ必要な栄養素だけを吸収し，さらに食物抗原などに対しては免疫寛容を誘起するというような“非自己である異種抗原の排除と自己に対する寛容”を巧妙に操る腸管粘膜免疫系が発達し，全リンパ球の60-70%が集積している。また，腸管は第三の自律神経系であり脊髄に匹敵する神経細胞を持つ腸管神経系を有し，中枢からほぼ独立して基本的な機能を発現することができる唯一の器官である。これらの免疫系と神経系は内分泌系と共に「腸管イントラネット」を形成し，緊密なクロストークをしながら生体の恒常性を精妙に維持している。

複合薬物である和漢薬は生体の恒常性の維持に重きを置く薬物治療体系であり，生体の最も重要な制御システムである神経系や免疫系は，必然的に和漢薬治療の大きなターゲットとなっている。従って，現代医療の中でも，複雑系である消化管疾患は漢方薬治療が比較的多く取り入れられている領域である。

消化管生理学分野では，近年患者が急増してきている難治性腸管免疫性疾患である潰瘍性大腸炎及び食物アレルギーを主な対象疾患として，「腸管イントラネット」の破綻という俯瞰的視点も含めてその病因・病態を解明し，それに基づき，和漢薬・漢方薬を「臨床予測性の高い」創薬リソースとして，さらに漢方薬版ドラッグ・リポジショニング等により有用な治療薬の創出に繋がる研究を行うことを目的としている。

◇原著論文

- 1) Hayashi S., Hamada T., Zinsou D. G. A., Oshiro M., Itoi K., Yamamoto T., Kadowaki M.: PI3K p85 α Subunit-deficient Macrophages Protect Mice from Acute Colitis due to the Enhancement of IL-10 Production. *Sci Rep.*, 7: 6187, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-06464-w.
- 2) Kazuma K., Ando K., Nihei K. I., Wang X., Rangel M., Franzolin M. R., Mori-Yasumoto K., Sekita S., Kadowaki M., Satake M., Konno K.: Peptidomic Analysis of the Venom of the Solitary Bee *Xylocopa Appendiculata Circumvolans*. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 23: 40, 2017. doi: 10.1186/s40409-017-0130-y.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) Kadowaki M., Nagata Y., Hayashi M., Hayashi S., Yamamoto T.: Improvement of Therapeutic Efficacy of Oral Immunotherapy in Combination with Regulatory T Cell-inducer Kakkonto in a Murine Food Allergy Model. 3rd East-West Integrative Medicine for Immunology & Wellness – Practice, Science, & Technology, 2017, 5, 13-15, New York.
- 2) 長田夕佳, 山本 武, 門脇 真.: 食物アレルギー病態モデルに対する葛根湯と経口免疫療法の併用療法によるレチノイン酸代謝酵素抑制を介した制御性T細胞の誘導. 第66回日本アレルギー学会学術大会, 2017, 6, 16-18, 東京.
- 3) Hayashi S., Zinsou D., Tobe K., Kadowaki M.: CD206 Positive Intestinal Macrophages Accelerate the Colonic Epithelial Wound Healing. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.
- 4) Wakabayashi N., Hayashi S., Kadowaki M.: Enhancer of IL-10 Production in Intestinal Macrophages Suppresses the Development of an Experimental Colitis in Mice. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.
- 5) Yamamoto T., Nagata Y., Hayashi M., Kadowaki M.: Intestinal Regulatory T Cells Induced by Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Improve Therapeutic Efficacy of Oral Immunotherapy in Food Allergy Model Mice. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.
- 6) 山本 武, 長田夕佳, 林美智慧, 苟 巧, 門脇 真.: 経口免疫療法と葛根湯の併用療法による食物アレルギーの治療効果増加の機序の検討. 第34回和漢医薬学会学術大会, 2017, 8, 26-27, 福岡.
- 7) 窪野孝貴, 林周作, 福西快文, 門脇 真.: インシリコスクリーニングを応用した炎症性腸疾患に対する新規治療薬の探索研究. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017, 8, 26, 京都.
- 8) 若林ののか, 林周作, 門脇 真.: 腸管マクロファージのIL-10産生亢進を標的とした炎症性腸疾患に対する新規治療薬の探索研究. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017, 8, 26, 京都.
- 9) Ogata H., Yamamoto T., Kadowaki M.: Various TLRs Ligands Activate Isolated Mouse Enteric Neurons and PLC is Involved in TLR4 Signaling Pathway. International Society for Autonomic Neuroscience 2017 (ISAN 2017), 2017, 8, 30-9, 2, Nagoya.
- 10) Ogata H., Kadowaki M., Yamamoto T.: IL-6 Contributes to the Interaction between Enteric Nervous System and Mucosal Immune System. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 2, Kanazawa.

- 11) Wakabayashi N., Hayashi S., Kadowaki M.: Search for an Enhancer of IL-10 Production in the Intestinal Macrophages for New Therapy against Inflammatory Bowel Disease. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 2, Kanazawa.
- 12) Hayashi S., Sendo M., Hertati A., Tobe K., Kadowaki M.: CD206 Positive Intestinal Macrophages Contribute to the Colonic Epithelial Wound Healing. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 2, Kanazawa.
- 13) Gou Q., Yamamoto T., Nagata Y., Hayashi M., Kadowaki M.: Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Can Improve the Efficacy of Oral Immunotherapy in Food Allergy Models by Induction of Regulatory T Cells. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2017, 11, 10, Toyama.
- 14) Zinsou D., Hayashi S., Kadowaki M.: Exploration for Natural Medicines that Stimulate the Production of IL-10 in Macrophages as a Therapeutic Approach in Inflammatory Bowel Disease. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2017, 11, 10, Toyama.
- 15) 若林ののか, 林周作, 門脇真.: 腸管マクロファージのIL-10産生亢進を標的とした炎症性腸疾患の新規治療薬として有用な生薬由来化合物の探索. 日本薬学会 北陸支部 第129回例会, 2017, 11, 26, 金沢.
- 16) 林美智慧, 山本武, 長田夕佳, 門脇真.: 食物アレルギー病態モデルでの葛根湯経口投与と経口免疫療法の併用による粘膜型マスト細胞の脱顆粒抑制作用とその機序の検討. 日本薬学会 北陸支部 第129回例会, 2017, 11, 26, 金沢.
- 17) 張玥, 山本武, 門脇真.: 形質細胞様樹状細胞の遊走を抑制する和漢薬含有化合物の探索とその炎症性腸疾患病態モデルに対する治療効果. 日本薬学会 北陸支部 第129回例会, 2017, 11, 26, 金沢.
- * 18) 門脇真.: 未病研究の最前線～経験知の「未病」を数理科学を用いて科学知へと導く～. 日本臨床薬理学会 第38回学術大会, 2017, 12, 7-9, 横浜.
- 19) Nagata Y., Yamamoto T., Kadowaki M.: Long-Term Effect of Combined Therapy of Oral Immunotherapy and Japanese Traditional Medicine Kakkonto on Food Allergy Mice. American Academy of Allergy Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, 2018, 03, 02-05, Orlando.
- 20) Hayashi S., Sendo M., Hertati A., Tobe K., Kadowaki M.: Role of CD206 Positive Macrophages in the Mucosal Repair after Intestinal Inflammation. KEYSTONE SYMPOSIA -The Resolution of Inflammation in Health and Disease-, 2018, 03, 24-28, Dublin.

◇その他

講演

- 1) 山本武.: 『食物アレルギーの治療法の確立への葛根湯の応用』- 葛根湯による腸管粘膜免疫系の制御作用を介した効果-. 天然薬物研究方法論アカデミー 第20回研究集会. 2017, 8, 5, 東京.
- 2) 門脇真.: 消化管疾患と漢方薬. 和漢医薬学総合研究所 第22回夏期セミナー, 2017, 8, 9-10, 富山.
- 3) 山本武.: アレルギー疾患と漢方薬. NPO 富山のくすし 平成29年度第5回漢方医学と生薬講座, 2017, 9, 9, 富山.
- 4) 門脇真.: 炎症関連大腸発癌における腸内細菌叢の病的変化 dysbiosis に対するニコチン及びニコチン受容体活性化の影響. 喫煙科学研究財団 特定研究「炎症性腸疾患における腸内細菌叢のゲノムワイド解析と喫煙による変化」中間検討会, 2018, 2, 2, 東京.

話題提供

- 1) 林 周作.: インジゴを含有する青黛は潰瘍性大腸炎の新たな治療薬となるか. “トピックス”. ファルマシア., 53: 820, 2017.

◇共同研究

国内

- 1) 藏本博史：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科応用生物学部門細胞機能学分野
「逆流性食道炎の病態生理学的及び形態学的研究」
「腸管免疫性疾患における腸管神経系の役割に関する研究」
2004, 5-
- 2) 門脇 孝：東京大学大学院 医学系研究科 代謝栄養病態学（糖尿病・代謝内科）
小安重夫：理化学研究所 統合生命医科学研究センター
「PI3 キナーゼ欠損マウスを用いた免疫学的研究」
2004, 7-
- 3) 加藤伸一：京都薬科大学 病態薬科学系 薬物治療学分野
「抗がん剤起因性腸炎に対する大建中湯、紫苓湯および関連方剤の効果に関する研究」
（和漢医薬学総合研究所 2012-2013 年度, 2015 年度公募型共同研究 採択課題）
2012, 4-
- 4) 合原一幸：東京大学 生産技術研究所
「数理モデルから紐解く漢方薬の複雑系動力学
～「未病」の検出からの新たな創薬に向けて～」
（和漢医薬学総合研究所 2014-2015 年度公募型共同研究 採択課題）
2013, 11-
- 5) 立川仁典：横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科
山西芳宏：九州大学高等研究院 生体防御医学研究所
「和漢薬のターゲットタンパク質のインシリコ探索」
（和漢医薬学総合研究所 2014-2015 年度公募型共同研究 採択課題）
2014, 4-
- 6) 安達貴弘：東京医科歯科大学 難治疾患研究所 免疫疾患分野
「腸管神経系と腸管粘膜免疫系の相互作用の解明」
2016, 12-
- 7) 加藤健太郎：帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野
「原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析」
（和漢医薬学総合研究所 2017 年度公募型共同研究 採択課題）
2017, 4-

◇研究費取得状況

- 1) 平成 29 年度 日本学術振興会科学研究費 若手研究 (B) 代表：林 周作
研究課題：CD206 陽性マクロファージの腸管の恒常性維持及び炎症性腸疾患における役割の解明
- 2) 平成 29 年度 日本学術振興会科学研究費 基盤研究 (B) 代表：門脇 真 分担：山本 武, 林 周作
研究課題：漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング

- 3) 平成 29 年度 日本学術振興会科学研究費 挑戦的萌芽研究 代表：門脇 真
研究課題：漢方薬・大建中湯を応用した慢性大腸炎関連発癌に対する新規薬物治療戦略
- 4) 平成 29 年度 日本学術振興会科学研究費 基盤研究 (C) 代表：山本 武
研究課題：葛根湯併用による安全かつ効率的な経口免疫療法による食物アレルギーの
治療方法の確立
- 5) 平成 29 年度 日本学術振興会科学研究費 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化)
代表：林 周作
研究課題：炎症性腸疾患において腸管マクロファージが腸管粘膜の損傷を修復する
メカニズムの解明
- 6) 平成 29 年度 富山大学 機能強化経費 (機能強化促進分) 分担：林 周作
研究課題：医薬学と複雑系数理学からの挑戦～「未病」の解明、そして新たな医療体系の構築
と、地域との連携による健康人口の増加～
- 7) 平成 29 年度 科学技術人材育成費補助事業「ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ
(特色型)」短期留学助成金 代表：長田 夕佳
- 8) 平成 29 年度 和漢医薬学総合研究所 公募型共同研究 (一般研究) 分担：門脇 真
研究課題：原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の
解析
- 9) 平成 29 年度 和漢薬・バイオテクノロジー委託研究 代表：門脇 真 分担：山本 武
研究課題：急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的
治療法の創出ー東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチー
- 10) 平成 28～31 年度 (第 5 回) 公益財団法人 小林国際奨学財団 研究助成 代表：門脇 真
分担：林 周作
研究課題：漢方医薬学と数理工学の融合による「未病」の科学的予測と新規医療戦略の
構築ー腸管免疫性疾患への新たなアプローチー
- 11) 平成 29～32 年度 (第 6 回) 公益財団法人 小林国際奨学財団 研究助成 代表：林 周作
研究課題：炎症によって傷害された腸管粘膜の修復促進作用を有する、炎症性腸疾患の
新たな治療薬の開発研究
- 12) 平成 29 年度 公益財団法人 喫煙科学研究財団 特定研究 代表：門脇 真 分担：林 周作,
山本 武
研究課題：炎症性腸疾患における腸内細菌叢のゲノムワイド解析と喫煙による変化
ー炎症関連大腸がんにおける腸内細菌叢の病的変化 dysbiosis に対するニコ
チン及びニコチン受容体活性化の影響ー
- 13) 平成 29 年度 公益財団法人 ニッポンハム食の未来財団 研究助成 代表：山本 武
研究課題：葛根湯の併用による経口免疫寛容の治療効率の向上及びその機序の解明
- 14) 平成 29 年度 公益財団法人 田村科学技術振興財団 研究助成 代表：林 周作
研究課題：腸管マクロファージの IL-10 産生亢進を標的とした炎症性腸疾患に対する
創薬研究
- 15) 平成 30 年度 公益財団法人 ダノン健康栄養財団 若手研究助成 代表：長田 夕佳
研究課題：レチノイン酸産生代謝制御作用を有する食品成分による食物アレルギー体質
の改善
- 16) 平成 29 年度 公益財団法人 小笠原科学技術振興財団 国際研究集会出现出張助成 代表：山本 武
参加学会：18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017)
- 17) 平成 29 年度 公益財団法人 日本アレルギー協会 国際交流助成金 代表：林 周作
参加学会：18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017)

◇研究室在籍者

薬学部 3 年生：小川雄大
薬学部 3 年生：加藤 諒
薬学部 4 年生：仙道水月
薬学部 4 年生：宮田佳奈
大学院修士 1 年：林 美智慧
大学院修士 1 年：宋 夢婷
大学院修士 2 年：苟 巧
大学院修士 2 年：張 詩雨
大学院修士 2 年：窪野孝貴
大学院修士 2 年：若林ののか
大学院博士 1 年：緒方華子
大学院博士 1 年：Ai Hertati
大学院博士 1 年：張 玥
大学院博士 2 年：金内優也
大学院博士 3 年：Zinsou Donald

◇学位（修士，博士）取得者

修士論文

若林ののか：腸管マクロファージの IL-10 産生亢進作用を有する炎症性腸疾患の新規治療薬として有用な生薬由来化合物の探索

神経機能学分野

Division of Neuromedical Science

教授	東田 千尋	Professor	Chihiro Tohda (Ph.D.)
助教	久保山 友晴	Assistant Professor	Tomoharu Kuboyama (Ph.D.)
特命助教	楊 熙蒙	Specially Appointed Assistant Professor	Ximeng Yang (B. P.)

◇研究目的

本分野では、神経変性疾患や老年性疾患の克服を目指した研究を実施している。難治性疾患に対する画期的な治療薬を見出すことと、病態を制御する因子の解明を目標に、薬理学、神経科学、和漢薬学的視点から多面的に取り組み、以下の2項目に対して、基礎研究から臨床研究まで幅広く研究を進めている。

①和漢薬研究による「Unmet medical needs を克服する新しい治療薬の開発」を加速させ、成果をヒトに届ける

②和漢薬研究による、新しい生理機能の発見および新しいカテゴリーの治療薬の提示

具体的には、神経回路網が破綻することによって機能不全が永続あるいは進行する難治性神経変性疾患（主としてアルツハイマー病、脊髄損傷、うつ病）をターゲットとして研究を行っている。神経回路網が破綻した後からでもこれら疾患における神経機能を正常に回復させるような、根本的治療戦略としての“神経回路網再構築薬”の開発を目指している。またサルコペニア改善薬の開発も進めている。

アルツハイマー病研究では、モデルマウスの神経回路網を修復することにより記憶障害を顕著に改善する漢方方剤や生薬由来成分を見出し、それらのシグナリングの解析を進めている。脊髄損傷研究では、ニューロン、アストロサイト、マイクログリア、骨格筋など様々な細胞に対して質的变化を与え、運動機能改善を促進する種々の薬物を見出している。

◇研究概要

- 1) 中枢神経における神経ネットワーク再構築を促進する分子機序の包括的解明
- 2) アルツハイマー病、脊髄損傷、うつ病に対する根本的治療を目指した和漢薬研究
- 3) グリア細胞と神経細胞の相互作用による、神経変性疾患の改善メカニズムの解明
- 4) 骨格筋萎縮の改善に有効な薬物の研究
- 5) 基礎研究を植物性医薬品開発、漢方方剤の効能拡大に繋げるための、ヒトでの Proof of Concept

◇原著論文

- 1) Tohda C., Tohda M. : Extracellular cathepsin L stimulates axonal growth in neurons. BMC Res Note., 10(1): 613, 2017. doi: 10.1186/s13104-017-2940-y.

- 2) Kuboyama T., Hirotsu K., Arai T., Yamasaki H., Tohda C. : Polygalae Radix extract prevents axonal degeneration and memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol.*, 8: 805, 2017. doi: 10.3389/fphar.2017.00805.
- 3) Tohda C., Yang X., Matsui M., Inada Y., Kadomoto E., Nakada S., Watari H., Shibahara N. : Diosgenin-Rich Yam Extract Enhances Cognitive Function: A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind, Crossover Study of Healthy Adults. *Nutrients*, 9(10), 1160, 2017. doi: 10.3390/nu9101160.
- 4) Kobayashi R., Tohda C. : Extracellular Cytosolic Aspartate Aminotransferase Promotes Axonal Growth and Object Recognition Memory. *Neurochem Res.*, 42(12): 3465-3473, 2017. doi: 10.1007/s11064-017-2394-6.
- 5) Kuboyama T., Wahane S., Huang Y., Zhou X., Wong J. K., Koemeter-Cox A., Martini M., Friedel R. H., Zou H. : HDAC3 inhibition ameliorates spinal cord injury by immunomodulation. *Sci Rep.*, 7(1): 8641, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08535-4.
- 6) Kogure C., Tohda C. : Human placenta extract ameliorates memory dysfunction and dendritic atrophy in a 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Traditional & Kampo Medicine*, 4(2): 94-104, 2017. doi: 10.1002/tkm2.1075.
- 7) Yang Z., Kuboyama T., Tohda C. : A systematic strategy for discovering a therapeutic drug for Alzheimer's disease and its target molecule. *Front Pharmacol.*, 8: 340, 2017. doi: 10.3389/fphar.2017.00340.
- 8) Yang X., Tohda C.: Heat Shock Cognate 70 Inhibitor, VER-155008, Reduces Memory Deficits and Axonal Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol.*, 9: 48, 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.00048.
- 9) Sakamoto I., Ueyama T., Hayashibe M., Nakamura T., Mohri H., Kiyonari H., Shigyo M., Tohda C., Saito N. : Roles of Cdc42 and Rac in Bergmann glia during cerebellar corticogenesis. *Exp Neurol.*, 302:57-67, 2018. pii: S0014-4886(17)30332-1, 2017. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.12.003.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) Watari H., Shimada Y., Tohda C. Cytosolic aspartate aminotransferase, a direct binding protein of kamikihito, regulates axon growth. The 6th Joint Symposium -WHO CCs for Traditional Medicine in Korea & Japan 2017, 6, 16 (Tokyo, Japan)
- 2) Tohda C., Tanie Y., Tanabe N., Kuboyama T. Neuroleukin enhanced axonal growth in neurons and self secretion from astrocytes. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 3) Kuboyama T., Huang Y., Wahane S., Wong J. K., Koemeter-Cox A., Martini M., Friedel R. H., Zou H. HDAC3 inhibition ameliorates spinal cord injury by immunomodulation. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 4) Tanabe N., Kuboyama T., Tohda C. Novel pharmacological effects of matrine: Axonal growth activity overcoming an inhibitory environment and improvement of spinal cord injury. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 5) Kominato S., Kuboyama T., Tohda C. Polygalae Radix extract induces M2 microglia predominance and improves spinal cord injury. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 6) Kodani A., Tanabe N., Tohda C. Chronic spinal cord injury repair mediated by skeletal muscle-secreted new myokine. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 7) Yang X., Tohda C. Diosgenin improves memory function in a mouse model of Alzheimer's disease via the reduction of HSC70. 第40回日本神経科学学会大会 2017, 7, 20 - 23 (千葉)
- 8) 久保山友晴, 弘津圭祐, 荒井哲也, 山崎寛生, 和田篤敬, 東田千尋: 遠志によるアルツハイマー病予防作用. 第34回和漢医薬学会学術大会 2017, 8, 26 - 27 (福岡)
- 9) 山内唯, 葛躍偉, 吉松嘉代, 小松かつ子, 東田千尋: エゾウコギ葉水エキスによる記憶向上作用と活性成分の検討. 第34回和漢医薬学会学術大会 2017, 8, 26 - 27 (福岡)
- 10) 金原嘉之, 嶋田豊, 東田千尋: 芍薬エキスおよび芍薬由来化合物の筋細胞に対する効果. 第34回和漢医薬学会学術大会 2017, 8, 26 - 27 (福岡)
- 11) 小湊誠也, 久保山友晴, 東田千尋: マイクログリアを M2 に誘導する生薬エキスの探索と

- その脊髄損傷改善作用の検討. 第 34 回和漢医薬学会学術大会 2017, 8, 26 - 27 (福岡)
- 12) Kominato S., Kuboyama T., Tohda C. Polygalae Radix extract induces M2 microglia and improves the locomotor function in the spinal cord injury. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine 2017, 11, 10 (富山)
 - 13) Tohda C, Yang X. Cognitive enhancement by diosgenin treatment. Society for Neuroscience 47th Annual Meeting (Neuroscience 2017) 2017, 11, 11 - 15 (Washington DC, USA.)
 - 14) Yang X, Tohda C. Diosgenin restores axonal degeneration via the reduction of HSC70, resulting in improvement of memory function in Alzheimer's disease. Society for Neuroscience 47th Annual Meeting (Neuroscience 2017) 2017, 11, 11 - 15 (Washington DC, USA.)
 - 15) Kodani A, Tohda C. Acteoside improves chronic spinal cord injury via a skeletal muscle-secreted new myokine. Society for Neuroscience 47th Annual Meeting (Neuroscience 2017) 2017, 11, 11 - 15 (Washington DC, USA.)
 - 16) 楊熙蒙, 東田千尋: Diosgenin による HSC70 の減少はアルツハイマー病の軸索萎縮と記憶障害を改善する. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 2017, 11, 26 (金沢)
 - 17) 小谷篤, 東田千尋: 新規マイオカインを介したアクテオシドによる慢性期脊髄損傷改善作用の研究. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 2017, 11, 26 (金沢)
 - 18) 東田千尋: 脊髄損傷の運動麻痺および骨格筋萎縮を改善する薬物の研究. 平成 29 年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会 2017, 12, 6 - 7 (名古屋)
 - 19) 久保山友晴, 東田千尋: 遠志エキスはアルツハイマー病モデルマウスの軸索変性及び記憶障害の誘発を予防する. 日本薬学会第 138 年会 2018, 3, 25 - 28 (金沢)

招待講演

- 1) 東田千尋: 脊髄損傷治療を目指した和漢薬研究. 薬事研究会特別講演 2017, 5, 16 (富山)
- 2) 東田千尋: 認知症に挑む和漢薬研究. 平成 29 年 富山薬窓会 富山・石川合同支部総会講演会 2017, 7, 1 (富山)
- 3) 東田千尋: アルツハイマー病の記憶障害を改善する帰脾湯・加味帰脾湯. 第 34 回和漢医薬学会学術大会 大会特別企画 「日本東洋医学会との合同シンポジウム」 2017, 8, 26 - 27 (福岡)
- 4) 東田千尋: ラエンネック研究からペプチドの新効果発見へ. 第 6 回 JBP 研究会 2017, 9, 15 - 16 (久留米)
- 5) 東田千尋: 神経疾患に有効な生薬の基礎研究から臨床研究まで; 出口を見据えたアカデミアの取組. 医薬品産業情報研究会第 80 回ヘルスケア分科会 2017, 12, 8 (富山)

◇その他

その他の講演

- 1) 久保山友晴: アルツハイマー病の予防と治療を目指した伝統薬物研究. 平成 29 年度 第 8 回漢方医学と生薬講座 2017, 12, 16 (富山)

新聞記事, 雑誌など

- 1) 2017 年 6 月 20 日 Health Medicinet Plant reveals anti-Alzheimer's compounds
2017 年 6 月 20 日 EurekAlert! Plant reveals anti-Alzheimer's compounds
- 2) 2017 年 6 月 20 日 読売新聞 (地域) 生薬でマウス記憶力改善 アルツハイマー治療に期待 富山大実験
- 3) 2017 年 6 月 20 日 北陸中日新聞 (社会) アルツハイマー創薬へ前進 富大グループ 生薬で記憶改善 作用の成分特定

- 4) 2017年6月20日 北日本新聞(社会) 生薬どの成分どう効く 富山大和漢研グループメカニズム解明法確立 「骨碎補」で認知症改善
- 5) 2017年6月20日 富山新聞(地域社会) 和漢薬研究効率よく 富大グループ マウスに投与、細胞分析 アルツハイマー改善薬物発見
- 6) 2017年6月21日 GEN News Anti-Alzheimer's Compounds Found in Medicinal Plant Via New Drug Discovery.
- 7) 2017年6月21日 Health Medicine Isolating anti-Alzheimer's compounds in plants
- 8) 2017年6月21日 Science Newsline Plant Reveals Anti-Alzheimer's Compounds
- 9) 2017年6月21日 Neuroscience RSS Feeds - Neuroscience News Updates Plant Reveals Anti-Alzheimer's Compounds
- 10) 2017年6月21日 Science Daily Isolating anti-Alzheimer's compounds in plants: Scientists develop new technique to isolate active therapeutic compounds for Alzheimer's disease from plants
- 11) 2017年6月21日 The Medical News Japanese scientists develop method to isolate anti-Alzheimer's compounds from plants
- 12) 2017年6月21日 MedicalXpress Plant reveals anti-Alzheimer's compounds
- 13) 2017年6月22日 Frontiers Blog Plant reveals anti-Alzheimer's compounds
- 14) 2017年6月28日 Asian Scientist Isolating Anti-Alzheimer's Compounds From Traditional Medicine
- 15) 2017年10月26日 北日本新聞(社会・地域) ヤマイモ成分で認知機能が向上 富山大東田教授ら 臨床研究で証明
- 16) 2017年10月26日 富山新聞(社会) 和漢薬で認知機能改善 ヤマイモなどに含有・ジオスゲニン 富大グループ 臨床研究で確認
- 17) 生薬「骨碎補」アルツハイマー病改善に有効 実業之富山(2017)7月5日(VOL.72(7))p.47.
- 18) 動物実験で認知症症状改善作用が確認されたやまいもの認知機能向上効果が人を対象とした臨床試験でもついに実証 月刊健康4月号(2018)3月2日 p35-37.

◇特許

- 1) 東田千尋, 松谷裕二, 杉本健士, inventors; レジリオ株式会社, assignee. アルツハイマー病の治療剤を含む, 神経細胞の軸索の機能不全が関与する疾患の治療剤. 特許第6165323号. 2017 Mar 23.
- 2) 東田千尋, 郭太乙, 宮崎博之, inventors; 株式会社日本生物製剤, 国立大学法人富山大学 assignee. 記憶改善用ペプチド. 特許第6161183号. 2017 June 23.
- 3) 東田千尋, 小松かつ子, inventors; レジリオ株式会社, assignee. 神経回路網の再構築・賦活剤. 特許第6165380号. 2017 June 30.
- 4) 東田千尋, inventors; レジリオ株式会社, assignee. アルツハイマー病等を含む神経疾患の1,25D3-MARRSが関与する治療薬及び治療法. 特許第6267160号. 2018 Jan 5.

◇共同研究

- 1) 小松かつ子: 富山大学, 「神経変性疾患に有効な伝統薬物分子の探索とその治療戦略」
- 2) 松谷裕二: 富山大学, 「acteoside類の研究」「新規化合物の神経保護作用の研究」
- 3) 上山健彦: 神戸大学バイオシグナル研究センター, 「活性酸素過剰 NADPH oxidase 4 (Nox4)トランスジェニックマウスを用いた脊髄損傷修復に関する研究」「アストロサイトを介し神経修復を促進する化合物のスクリーニングと新薬開発」
- 4) 野村靖幸: 久留米大学・細井徹: 広島大学・金子雅幸: 広島大学, 「小胞体ストレス応答機構を標的とする和漢薬由来抗アルツハイマー病薬の創製研究」
- 5) 佐藤亜希子: ワシントン大学, 「睡眠の質および断片化を改善する漢方方剤の検討」
- 6) 酒井隆一: 北海道大学水産科学研究院, 「アルツハイマー病の記憶障害を改善する海洋天然物の探索」
- 7) Hongyang Zou: Icahn School of Medicine at Mount Sinai, 「遺伝子発現を介した軸索再生の

研究」

- 8) 日本生物製剤：「胎盤抽出物の中樞神経機能における効果の検討」
- 9) 小松かつ子，津田正明，久保山友晴，田渕明子，渡り英俊，東田道久：富山大学，「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
- 10) 松井三枝：金沢大学，「認知機能等に関する臨床研究」
- 11) 小林製薬：「認知症領域における生薬オンジの有効性研究」
- 12) ロート製薬：「生薬「遠志」に関する研究」
- 13) 戸邊一之：富山大学，「マイクログリアを介した脊髄損傷治療法の開発」

◇研究費取得状況

- 1) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 B (代表：東田千尋，連携：久保山友晴)「慢性期脊髄損傷の薬物治療；骨格筋萎縮と軸索断裂を改善する生薬医薬品の開発研究」
- 2) 文部科学省研究費補助金，基盤研究 B 海外 (分担：東田千尋)「薬用資源植物の多様性を利用した伝統薬の永続的利用プログラムの構築」
- 3) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 B (分担：東田千尋)「細胞表面の「生命装置」に作用する海洋天然物の探索」
- 4) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 B (分担：東田千尋)「漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング」
- 5) 日本医療研究開発機構研究費・創薬基盤推進研究事業 (分担：東田千尋)「安心・安全・高品質な漢方薬原料生薬の持続的利用を指向した薬用植物バイオナーサリーの構築とブランド生薬の開発に関する研究」
- 6) AMED 創薬基盤推進研究事業 (分担：東田千尋)「次世代医薬品の効率的実用化推進のための品質評価技術基盤の開発」
- 7) 一般財団法人北陸産業活性化センター R&D 推進・研究助成金 (代表：東田千尋，分担：久保山友晴)「神経回路網の再構築による認知症予防・改善のための機能性表示食品の開発」
- 8) 神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究 (代表：久保山友晴)「マイクログリアの善玉化に着目した脊髄損傷治療法の開発」
- 9) 富山大学学長裁量経費 (研究戦略経費) (分担：東田千尋) 「若手有機化学者を中核とした糖質アナログ創薬研究基盤の構築」
- 10) 富山大学運営費交付金機能強化費 (代表：東田千尋，分担：久保山友晴)「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
- 11) 富山大学学長裁量経費 (教育研究活性化等経費) (代表：久保山友晴) 「マイクログリアの善玉化によるアルツハイマー病治療法の開発」

◇研究室在籍者

学部 3 年生：長瀬絵沙，南雲美咲
学部 4 年生：細川治起，井関隆介
学部 5 年生：山内唯
学部 6 年生：小暮智里
大学院修士 1 年：小湊誠也
大学院修士 2 年：小谷篤
大学院博士 1 年：楊熙蒙 (2017, 11, 30 まで)，谷江良崇
大学院博士 3 年：田辺紀生，金原嘉之 (医学部より派遣)
大学院博士 4 年 (2017, 9, 30 まで)：楊志友

栄養代謝学分野

Division of Nutritional Biochemistry

准教授	渡辺 志朗	Associate Professor	Shiro Watanabe (Ph.D.)
助教	藤田 恭輔	Assistant Professor	Kyosuke Fujita (Ph.D.)

◇研究目的

脂質生化学の研究技法を用いて、和漢薬ならびに植物由来油脂の脂質代謝に及ぼす影響を明らかにし、その分子機構を解明することが、本研究分野の目的である。

◇活動概要

1) 脂質の網羅的分析を用いた和漢薬ならびに天然由来成分の生理病態に対する制御活性の解析

脂肪酸ならびに胆汁酸の網羅的分析から、動物胆およびその主成分である胆汁酸の脂質代謝ならびに炎症反応に及ぼす影響を明らかにした。これらの分子機構を胆汁酸の核内および細胞表面受容体への作用の観点から解明する。

2) 胆汁酸が関与する脂質代謝異常の制御に関する研究

防己黄耆湯が胆汁酸負荷によって誘導される肝障害を軽減することを明らかにした。この効果の分子機構を、胆汁酸の生体内濃度調節機構の観点から解明する。

3) エゴマの有効活用法の開発をとおした地域貢献

エゴマの葉ならびに種子由来油脂の新規活用法の開発を目指した研究を展開し、近隣地域産業の促進に寄与することを目指す。

◇原著論文

- 1) Fujita K., Iguchi Y., Une M., Watanabe S.: Ursodeoxycholic acid suppresses lipogenesis in mouse liver: Possible role of the decrease in β -muricholic acid, a farnesoid X receptor antagonist. *Lipids*, 52: 335-344, 2017.
- 2) Morita M., Honda A., Kobayashi A., Watanabe Y., Watanabe S., Kawaguchi K., Takashima S., Shimozawa N., Imanaka T.: Effect of Lorenzo's oil on hepatic gene expression and the serum fatty acid level in abcd1-deficient mice. *JIMD Rep.*, 2017 May 31. doi: 10.1007/8904_2017_32.
- 3) Okamoto T., Kawaguchi K., Watanabe S., Agustina R., Ikejima T., Ikeda K., Nakano M., Morita M., Imanaka T.: Characterization of human ATP-binding cassette protein subfamily D reconstituted into proteoliposomes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 496: 1122-1127, 2018.
- 4) Afroz S., Yagi A., Fujikawa K., Rahman MM., Morito K., Fukuta T., Watanabe S., Kiyokage E., Toida K., Shimizu T., Ishida T., Kogure K., Tokumura A., Tanaka T.: Lysophosphatidic acid in medicinal herbs enhances prostaglandin E2 and protects against indomethacin-induced gastric cell damage in vivo and in vitro. *Prostagl Other Lipid Mediat.*, 135: 36-44, 2018.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) 螺澤太郎、大山拓郎、富田 勇、松本 隼、守田雅志、渡辺志朗、今中常雄. 副腎白質ジストロフィー: 骨髄移植による神経変性発症抑制機構. 日本生化学会北陸支部, 2017, 6, 3, 金沢.
- 2) 渡辺志朗、藤田恭輔、西田健志、井村譲二. 動物胆のデキストラン硫酸ナトリウム誘発性

- 大腸炎に対する軽減効果. 和漢医薬学会学術大会, 2107, 8, 26-27, 福岡.
- 3) 藤田恭輔、渡辺志朗. 防己黄耆湯はリトコール酸誘発胆汁うっ滞を改善する. 和漢医薬学会学術大会, 2017, 8, 26-27, 福岡.
 - 4) 守田雅志、富田海斗、佐藤瑛晶、松本 隼、渡辺志朗、下澤伸行、今中常雄. ペルオキシソーム脂肪酸β酸化の活性化を指標とした副腎白質ジストロフィー治療候補化合物の探索. 第59回日本先天代謝異常学会総会, 2017, 10, 12-14, 川越市.
 - 5) 守田雅志、大山拓郎、螺澤太郎、依田大輝、渡辺志朗、今中常雄. 副腎白質ジストロフィー: 骨髄移植による神経変性抑制効果の解析. 第40回日本分子生物学会年会第90回日本生化学会大会合同大会, 2017, 12, 6-9, 神戸.
 - 6) *渡辺志朗、藤田恭輔、能勢充彦. 胆汁酸代謝の制御を介する漢方薬の作用機構. 日本薬学会第138年会, 2018, 3, 25-28, 金沢.
 - 7) 道志 勝、渡辺志朗、藤田恭輔、富岡直子、細山田真、赤江豊能. α-リノレン酸の給餌がマウス脳内炎症応答に及ぼす影響. 日本薬学会第138年会, 2018, 3, 25-28, 金沢.
 - 8) 守田雅志、佐藤瑛晶、富田海斗、松本隼、渡辺志朗、今中常雄、宋 孝紀. 副腎白質ジストロフィー治療候補化合物の探索 – 新規ペルオキシソーム脂肪酸β酸化活性測定法の開発とスクリーニング. 日本薬学会第138年会, 2018, 3, 25-28, 金沢.
 - 9) 藤田恭輔、渡辺志朗、柳原五吉、宮野加奈子、上園保仁. 悪液質性筋萎縮モデルマウスに対するエゴマ油の効果検討. 日本薬学会第138年会, 2018, 3, 25-28, 金沢.

◇その他

- 1) 渡辺志朗. エゴマの付加価値を高めるための大学からの研究アプローチ. スーパーフードイン TOYAMA 講演会; 2017 May 18; 富山市.
- 2) 渡辺志朗. エゴマの付加価値を高めるための大学からの研究アプローチ. エゴマ 6次産業化部会総会 講演会; 2017 June 17; 富山市.
- 3) 渡辺志朗. エゴマオイルのがん悪液質モデルマウスに対する効果. エゴマ 6次産業化推進グループ会合・講演会; 2018 March 14; 富山市.

◇共同研究

- 1) 守田雅志: 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学), 「副腎白質ジストロフィーにおけるペルオキシソーム極長鎖脂肪酸代謝の異常の機構解明に関する研究」
- 2) 田中 保: 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部(薬学系) 衛生薬学分野, 「抗消化性潰瘍効果を示す漢方薬の有効成分としてのリン脂質メディエーター研究」
- 3) 上田 浩: 岐阜大学工学部, 「GPCRであるTGR5を介する胆汁酸の新規疾患制御機構の解明」
- 4) Suresh Awale: 富山大学和漢医薬学総合研究所, 「エゴマ葉の成分分析とその新規活用法に関する研究」
- 5) 上園保仁: 国立がん研究センター, 「悪液質モデルマウスに対するエゴマ油の効果に関する研究」
- 6) 道志 勝; 帝京大学薬, 「脳虚血モデルマウスにみられる摂食障害に対するn-3系脂肪酸の予防効果の評価」
- 7) 酒井秀紀: 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学), 薬物による容積感受性外向き整流性Cl⁻チャンネルの阻害における脂質代謝の役割に関する研究

◇非常勤講師

- 1) 渡辺志朗: 富山県立大学工学部「細胞工学」2017, 5-6.
- 2) 藤田恭輔: 富山県立大学工学部「生物学 II」2017, 10-2018, 2.

◇研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究(C) (代表: 帝京大学薬 道志 勝) 「脳虚血モデルマ

- ウスにみられる摂食障害に対する n-3 系脂肪酸の予防効果の評価」
- 2) 文部科学省科学研究費，若手研究(B) (代表：藤田恭輔) 「機能性トリテルペンのがん悪液質性筋萎縮に対する改善効果の検証」
 - 3) 学長裁量経費 教育研究活性化基盤経費 (分担：渡辺志朗) 「次世代 KAMPO 科学の創成を志向した漢方オミックス(Kampo Omics)の基盤構築」
 - 4) 受託研究費 富山市長 (代表：渡辺志朗) 「エゴマブランド化促進に関するエゴマ含有成分の有効性実証研究業務」
 - 5) 受託研究費 広貫堂 (代表：渡辺志朗) 「エゴマ葉の新規効能の探索研究」
 - 6) 小林国際奨学財団研究助成 (代表：渡辺志朗) 「生活習慣病治療に用いられる漢方薬の腸管内の胆汁酸濃度ならびに糖・脂質代謝異常に及ぼす影響の評価」

◇研究室在籍者

大学院医学薬学教育部博士後期課程 1 年生：陳卓爾
薬学部薬学科 5 年生：辻哲也
薬学部薬学科 4 年生：加賀谷元太
薬学部創薬科学科 3 年生：橋本卓也
薬学部創薬科学科 3 年生：保岡漠
薬学部創薬科学科 3 年生：藤原大地
協力研究員：田辺宏樹（北陸大学薬学部）

漢方診断学分野

Division of Kampo Diagnostics

教授	柴原 直利	Professor	Naotoshi Shibahara (M.D., Ph.D.)
准教授	小泉 桂一	Associate Professor	Keiichi Koizumi (Ph.D.)
助教	条 美智子	Assistant Professor	Michiko Jo (Ph.D.)
技術補佐員	犬寫 明子	Assistant	Akiko Inujima
技術補佐員	五十嵐 喜子	Assistant	Yoshiko Igarashi (2017年3月まで)

◇研究目的

漢方薬は様々な疾患の治療において幅広く使用されており、慢性あるいは難治性疾患における漢方薬による治療及び進展予防効果への期待も大きい。その一方で、漢方医学は経験的であるとの批判もあり、臨床研究や基礎研究を通じた科学的エビデンスの蓄積が求められている。エビデンスの蓄積には、漢方医学的概念や証（適応病態）の客観化するとともに、漢方薬の薬理効果や作用機序を解明することにより、漢方医薬学を普遍的なものとする必要である。そこで、本分野は、漢方医学的病態や漢方薬の治療効果に関する臨床研究と、実際の臨床での漢方薬使用状況を考慮した基礎研究により、新たな漢方医学を確立することを目指している。

◇研究概要

I) 漢方方剤・生薬の薬理効果の基礎的研究

- 1) 浮腫・下痢・慢性腎臓病・癌に対する漢方方剤・生薬の効果
- 2) 漢方方剤・生薬の粘膜免疫活性効果
- 3) 漢方方剤・生薬の粘膜ワクチンアジュバント効果
- 4) 漢方方剤・生薬成分の生体内動態解析
- 5) 生薬の品質及び漢方方剤の去加方に起因する効果発現の変化
- 6) 生薬・漢方方剤含有成分の同定・生物活性の評価
- 7) ストレス対応漢方方剤の薬理効果

II) 証の科学的翻訳に関する臨床的研究

- 1) 漢方医学的病態の数値化
- 2) 自律神経系と漢方医学的病態との関連性
- 3) 各種疾患に対する漢方方剤の臨床効果

III) 漢方医薬学教育に関する研究

- 1) 漢方医薬学教育効果に関する検討
- 2) 漢方医薬学研修プログラムの開発

◇原著論文

- 1) Takikawa A., Mahmood A., Nawaz A., Kado T., Okabe K., Yamamoto S., Aminuddin A., Senda S., Tsuneyama K., Ikutani M., Watanabe Y., Igarashi Y., Nagai Y., Takatsu K., Koizumi K., Imura J., Goda N., Sasahara M., Matsumoto M., Saeki K., Nakagawa T., Fujisaka S., Usui I., Tobe K.: HIF-1 α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance.

- Diabetes, 65(12): 3649-3659, 2016. (前回未掲載)
- 2) Nawaz A., Aminuddin A., Kado T., Takikawa A., Yamamoto S., Tsuneyama K., Igarashi Y., Ikutani M., Nishida Y., Nagai Y., Takatsu K., Imura J., Sasahara M., Okazaki Y., Ueki K., Okamura T., Tokuyama K., Ando A., Matsumoto M., Mori H., Nakagawa T., Kobayashi N., Saeki K., Usui I., Fujisaka S., Tobe K.: CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. Nat Commun., 8(1): 286, 2017.
 - 3) Tohda C., Yang X., Matsui M., Inada Y., Kadomoto E., Nakada S., Watari H., Shibahara N.: Diosgenin-Rich Yam Extract Enhances Cognitive Function: A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind, Crossover Study of Healthy Adults. Nutrients, 9(10): 112-119, 2017.

◇著書

- 1) 柴原直利: スタンダード薬学シリーズⅡ 6医療薬学Ⅳ. 薬理・病態・薬物治療(4). 日本薬学会編. 東京: 東京化学同人; SB034 日本薬局方に収載される漢方薬の適応となる証, 症状や疾患について例示して説明できる. p348-363, 2017.
- 2) 条美智子, 柴原直利: 生薬・薬用植物研究の最新動向. 高松智編. 東京: シーエムシー出版; 五苓散の糖尿病モデルラットにおける水代謝調節作用の検討. p73-79, 2017.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) Jo M, Trujillo AN, Breslin JW.: Evidence of Functional Ryanodine Receptors in Rat Mesenteric Collecting Lymphatic Vessels. The Molecular Pharmacology and Physiology Scientific Retreat 2017; 2017 Nov 1; Tampa, Florida.
- 2) 柴原直利: 指導医講習会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 3) 柴原直利: 専攻医のための説明会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 4) 柴原直利: 医療倫理・医療安全講習会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 5) 柴原直利: 漢方入門講座1 血の病態と治療方剤. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 6) 渡り英俊, 竹澤章裕, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 補気剤が不妊治療中の諸症状に有効であった3症例. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 7) 野上達也, 渡り英俊, 藤本誠, 竹澤章裕, 金原嘉之, 北原英幸, 三澤広貴, 柴原直利, 嶋田豊: 加味帰脾湯、芎帰膠艾湯が有効であった小児不応性血球減少症の一例. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 8) 小田口浩, 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 折笠秀樹, 花輪壽彦: 熟練した漢方専門医の舌診・脈診・腹診平準化. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 9) 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 小田口浩, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 花輪壽彦: COI関連「漢方診療標準化プロジェクト」(第7報) 公開“漢方診察 手合わせ会”参加者の反響. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 10) 小田口浩, 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 花輪壽彦: シンポジウム 漢方医学的所見の客観化に向けた取り組み. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 11) 柴原直利*: シンポジウム「五苓散の基礎と臨床～ 脳外科領域での有用性について」五苓散の効果発現におけるアクアポリンの関与. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 12) 飯塚紘史, 小泉桂一, 水野祐介, 須崎美貴子, 竹下佳輝, 大塚義起, 柴原直利: 芍薬甘草湯煎液作成方法が含有微粒子の形態・免疫活性化作用に与える影響. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.

- 13) 呉伊義, 木村真梨, 成田絢香, サランチチグ, 江藤武志, 入矢美沙, 条美智子, 柴原直利: 正常ラット腸管における五苓散のAQPを介した水分調節に対する検討. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 14) 成田絢香, 水野祐介, 江藤武志, 呉伊義, サランチチグ, 条美智子, 柴原直利: 補中益気湯及び大建中湯がワルファリンコントロールに及ぼす影響. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 15) 水野祐介, 成田絢香, 江藤武志, 大河原優, 条美智子, 柴原直利: 漢方方剤における猪胆汁と豚胆汁の相違. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 16) 北原英幸, 三澤広貴, 金原嘉之, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 防風通聖散去黄芩加黄連の使用経験. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 17) 野上達也, 三原弘, 藤本誠, 渡り英俊, 北原英幸, 三澤広貴, 金原嘉之, 柴原直利, 嶋田豊: 卒前教育における漢方医学シミュレーション教育の試み. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 18) 金原嘉之, 三澤広貴, 北原英幸, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 山本樹, 柴原直利, 嶋田豊: 本事方・貝母湯が奏効した慢性咳嗽の一例. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 19) 三澤広貴, 北原英幸, 金原嘉之, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 苓桂朮甘湯と甘麥大棗湯の併用が有効であったパニック障害の3例. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 20) 柴原直利: 高齢者疾患と漢方. 第11回日本東洋医学会専門医制度九州地区教育講演会; 2017 Nov 23; 福岡. (招待講演)

◇その他

- 1) Shibahara N.: Relation between the clinical effects and quality difference. Sikchi Symposium on the Combination of Traditional Medicine and Food; 2017 Nov 2; Daejeon, Korea. (Invited lecture)
- 2) 柴原直利: 臍上部圧痛について: 中日中医薬学術シンポジウム 2017; 2017 Dec 7; 北京. (招待講演)
- 3) Jo M.: Lymphatic contraction mechanisms. USF Health Cardiology and fellows Bench to Bedside series; 2017 Dec 20; Tampa, Florida.
- 4) Shibahara N.: Tenderness Above the Umbilicus: Academic Lecture at Guangxi University of Chinese MEdicine; 2018 Mar 5; Nanning, China.
- 5) Shibahara N.: The traditional medical education as a life-long education for the general public at University of Toyama: Experts' Forum on Feasibility and Plan for the Herbal Medicine School Establishment; 2018 Mar 23; Daegu, Korea.
- 6) 柴原直利: 症例検討: 第 35 回漢方診断研究会; 2017 Apr 20; 富山.
- 7) 柴原直利: 漢方医学の基本的概念: 富山のくすし 平成 29 年度第 1 回漢方医学と生薬講座; 2017 Apr 22; 富山.
- 8) 柴原直利: 未病と養生: 平成 29 年度富山市民大学 生活医学薬学を学ぶ; 2017 May 12; 富山.
- 9) 柴原直利: 漢方医学の診察方法と漢方薬: 富山のくすし 平成 29 年度第 2 回漢方医学と生薬講座; 2017 May 13; 富山.
- 10) 柴原直利: 症例検討: 第 69 回富山漢方談話会; 2017 May 16; 富山.
- 11) 柴原直利: 現代の医療機関における漢方治療の現状と実際: 九州連合清心会大会; 2017 May 21; 福岡.
- 12) 柴原直利: 漢方医学における気血水: 平成 29 年度富山市民大学 生活医学薬学を学ぶ; 2017 May 26; 富山.
- 13) 柴原直利: 四診について: 富山大学楮鞭会; 2017 May 31; 富山.
- 14) 柴原直利: 高齢者疾患の漢方治療: 武生医師会 6 月次医学会; 2017 Jun 10; 武生, 福井.
- 15) 柴原直利: 症例検討: 第 36 回漢方診断研究会; 2017 Jun 15; 富山.
- 16) 柴原直利: 癌治療における漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 3 回漢方医学と生薬講

- 座; 2017 Jun 19; 富山.
- 17) 柴原直利: 症例検討: 第 70 回富山漢方談話会; 2017 Jul 11; 富山.
 - 18) 柴原直利: 漢方講座 高齢者疾患の漢方治療: 登録販売者生涯学習研修 A 講座; 2017 Jul 13; 富山.
 - 19) 柴原直利: 地域医療における漢方治療の役割 – 冷え症、うつ症状、認知症などを中心に – , 日常診療に役立つ漢方処方 – 便秘・頭痛・ストレス・疲労倦怠 – : 鹿島漢方カンファレンス; 2017 Jul 15; 神栖, 茨城.
 - 20) 柴原直利: 心の病の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 4 回漢方医学と生薬講座; 2017 Jul 22; 富山.
 - 21) 柴原直利: フレイル・サルコペニアの漢方治療, 精神・神経疾患の漢方治療, 皮膚症状に対する漢方治療 – かゆみ・ほてり等の症状に – : 漢方フォローアップセミナー; 2017 Jul 30; 松本.
 - 22) 柴原直利: 駆瘀血剤の基礎と臨床: 第 22 回富山大学和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017 Aug 9-10; 富山.
 - 23) 柴原直利, 金原嘉之: 気血水診断法: 第 22 回富山大学和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017 Aug 9-10; 富山.
 - 24) 柴原直利: 症例検討: 第 37 回漢方診断研究会; 2017 Aug 24; 富山.
 - 25) 柴原直利: 消化器疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 5 回漢方医学と生薬講座; 2017 Sep 9; 富山.
 - 26) 柴原直利: 症例検討: 第 71 回富山漢方談話会; 2017 Sep 12; 富山.
 - 27) 柴原直利: 高齢者に対する漢方の選択術, 女性に対する漢方の選択術, 実技指導 – 腹診、舌診 – : 大阪フォローアップセミナー; 2017 Sep 23; 大阪.
 - 28) 柴原直利: 症例検討: 第 38 回漢方診断研究会; 2017 Oct 19; 富山.
 - 29) 柴原直利: 漢方薬の副作用: 富山のくすし 平成 29 年度第 6 回漢方医学と生薬講座; 2017 Oct 21; 富山.
 - 30) 柴原直利: 漢方講座 消化器疾患の漢方治療: 登録販売者生涯学習研修 A 講座; 2017 Nov 9; 富山.
 - 31) 柴原直利: 漢方繁用処方解説: 全砺波薬剤師会・全砺波薬業会合同研修会; 2017 Nov 11; 富山.
 - 32) 金原嘉之, 三澤広貴, 北原英幸, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 山本樹, 柴原直利, 嶋田豊: 本事方・貝母湯が奏効した慢性咳嗽の一例: 第 21 回和漢診療学シンポジウム; 2017 Nov 18; 富山.
 - 33) 柴原直利: 症例検討: 第 72 回富山漢方談話会; 2017 Nov 21; 富山.
 - 34) 柴原直利: 高齢者疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 7 回漢方医学と生薬講座; 2017 Nov 25; 富山.
 - 35) 柴原直利: 呼吸器疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 8 回漢方医学と生薬講座; 2017 Dec 16; 富山.
 - 36) 柴原直利: 症例検討: 第 39 回漢方診断研究会; 2017 Dec 21; 富山.
 - 37) 柴原直利: 症例検討: 第 73 回富山漢方談話会; 2018 Jan 16; 富山.
 - 38) 柴原直利: 婦人科疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 9 回漢方医学と生薬講座; 2018 Jan 20; 富山.
 - 39) 柴原直利: 大学漢方医学教育のカリキュラムの提案 – 大学医学部モデルコアカリキュラムの改訂を受けて – : 第 1 回漢方医学教育 SYMPOSIUM2018; 東京.
 - 40) 柴原直利: 症例検討: 第 40 回漢方診断研究会; 2018 Feb 15; 富山.
 - 41) 柴原直利: 耳鼻咽喉科疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 10 回漢方医学と生薬講座; 2018 Feb 24; 富山.
 - 42) 柴原直利: 症例検討: 第 74 回富山漢方談話会; 2018 Mar 20; 富山.

◇共同研究

学内

- 1) 嶋田豊（富山大学医学薬学研究部（医学）和漢診療学講座教授）、「漢方医学の臨床研修プログラムの開発」, 1999, 4～
- 2) 嶋田豊（富山大学医学薬学研究部（医学）和漢診療学講座教授）, 藤本誠（富山大学医学薬学研究部（医学）和漢診療学講座講師）, 「肝・腎線維化に対する桂枝茯苓丸の有効性に関する薬理学的研究」, 2009, 2～
- 3) 高本考一（富山大学医学薬学研究部神経・整復学講座助教）, 「急性・亜急性期頸部痛・腰痛に対する物理・理学療法確立に関する臨床的研究(急性・亜急性期頸部・腰部痛に対するトリガーポイント圧迫治療法の効果：ランダム化比較試験)」, 2009, 11, 9～
- 4) 高本考一（富山大学医学薬学研究部神経・整復学講座助教）, 「急性・亜急性期頸部・腰痛に対する物理・理学療法確立に関する臨床的研究(急性・亜急性期頸部・腰部痛に対する温熱療法及び寒冷療法とトリガーポイント徒手圧迫療法との併用治療効果の検討：ランダム化比較試験)」, 2013, 4, 1～
- 5) 齋藤滋（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）産科婦人科学教授）, 林周作（富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学助教）, 櫻井宏明（富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）がん細胞生物学教授）, 藤秀人（富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）医療薬学教授）, 梅寄雅人（富山大学和漢医薬学総合研究所情報科学准教授）, 春木孝之（富山大学工学部知能情報工学講師）, 笹野一洋（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）数学教室教授）, 中川肇（富山大学附属病院経営企画情報部教授）, 戸邊一之（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）第一内科学教授）, 関根道和（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）疫学健康政策学教授）, 東田千尋（富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学准教授）, 笹岡利安（富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）臨床薬理学教授）, 杉山敏郎（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）第三内科学教授）, 北島勲（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）臨床分子病態検査学教授）, 山城清二（富山大学附属病院総合診療部教授）, 鈴木道雄（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）神経精神医学教授）, 嶋田豊（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）和漢診療学教授）, 竹内登美子（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）老年看護学教授）, 高崎一朗（富山大学工学部生体情報薬理学准教授）, 「医薬学と情報数理学のからの挑戦 ～「未病」および「時間治療」の規定因子の検出からの新たな医療戦略の構築～」, 2015, 4, 1～
- 6) 松本欣三（富山大学和漢医薬学総合研究所複合薬物薬理学教授）, 中川崇（富山大学大学院医学薬学研究部先端生命医療学域分子病態医学系准教授）, Suresh Awale（富山大学和漢医薬学総合研究所天然薬物開発准教授）, 渡辺志朗（富山大学和漢医薬学総合研究所栄養代謝学准教授）, 横山悟（富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学助教）, 高崎一朗（富山大学工学部生命工学科生体情報薬理学准教授）, 「次世代KAMPO科学の創成を志向した漢方御漢方オミックス（Kampo Omics）の基盤構築」, 2016, 7, 22～
- 7) 門脇 真（富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学教授）, 山西芳裕（九州大学高等研究院准教授）, 梅寄雅人（富山大学和漢医薬学総合研究所情報科学特命准教授）, 東田千尋（富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学准教授）, 「漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング」, 2016, 4, 1～

国内

- 1) 花輪壽彦(北里大学東洋医学総合研究所所長), 小田口浩(北里大学東洋医学総合研究所副所長), 三瀧忠道(島県立医科大学会津医療センター漢方医学講座教授), 並木隆雄(千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座准教授), 新井信(東海大学医学部内科学系准教授), 村松慎一(自治医科大学内科学講座神経内科学部門特命教授), 嶋田豊(富山大学医学薬学

- 研究部和漢診療学講座教授),「漢方標準化プロジェクト」, 2013, 2, 1~
- 2) 平山謙二 (長崎大学熱帯医学研究所教授),「漢方薬を基盤とした抗マラリア薬の開発」, 2015, 4~
 - 3) 合原一幸 (東京大学生産技術研究所教授),「数理モデルから紐解く漢方薬の複雑系動力学 ~「未病」の検出からの新たな創薬に向けて~」, 2013, 11~
 - 4) 岩野智彦 (山梨大学大学院総合研究部医学域助教),「漢方薬由来化合物のヒト卵管上皮細胞の絨毛動態へ与える影響の解析」, 2016, 4~
 - 5) 日本製薬商事株式会社,「牛黄清心元の抗精神作用に関する研究」, 2015, 9~
 - 6) クラシエ製薬株式会社漢方研究所:「尿中カテコラミン測定による漢方処方有用性の薬理的検討」, 2014, 12~
 - 7) 医療法人社団ファインメッド:「五苓散の経口投与と経直腸投与による血中成分濃度の相違に関する研究」, 2016, 12~
 - 8) ロート製薬:「植物中に含まれる新規核酸の機能研究」, 2014, 10~
 - 9) 小林製薬:「メタボリックシンドロームにおける新規漢方処方の有効性研究」, 2017, 8~

海外

- 1) Jerome W. Breslin (Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Professor),「Lymphatic contraction mechanisms」, 2017, 3~
- 2) 方剛 (広西中医薬大学荘医学准教授),「中日国際協力プロジェクトによる荘医学の新展開に関わる研究」, 2017, 10~
- 3) Nguyen Phuong Dung (University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city, Faculty of Traditional Medicine, Professor),「伝統薬の薬効評価に関わる日越共同研究」2017, 1~

◇非常勤講師

- 1) 柴原直利: 富山大学医学薬学教育部,「和漢医薬学入門」, 2017, 4, 21.
- 2) 柴原直利: 福井大学医学部,「実践臨床病態学」, 2017, 4, 24.
- 3) 柴原直利: 富山福祉短期大学看護学部,「東洋医学概論」, 2017, 9, 7~21.
- 4) 柴原直利: 富山大学医学薬学教育部 (薬学),「東洋医学概論」, 2017, 10, 5~2018, 2, 1.
- 5) 柴原直利: 富山大学医学薬学教育部 (薬学),「病院実務実習」, 2017, 10, 16~2017, 12, 8.
- 6) 柴原直利: 富山大学大学院医学薬学教育部 (医学系) 修士課程,「東洋医学概論」, 2017, 12, 12, 2018, 1, 24.
- 7) 小泉桂一: 富山病院附属看護学校,「栄養・生化学」, 2017, 4, 8~9, 25.

◇研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (C) (代表: 柴原直利, 継続)「アクアポリンを介した五苓散の下痢改善効果に関する研究」80万
- 2) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (分担: 柴原直利, 継続)「漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング」30万
- 3) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (代表: 小泉桂一, 新規)「漢方医薬学と複雑系数理科学の挑戦 ~未病の検出から始まる新たな医療戦略の構築へ~」420万
- 4) 文部科学省科学研究費, 若手 (B) (代表: 条美智子, 新規)「ラット腸間膜リンパ管を用いた五苓散の浮腫改善機序の解明」110万
- 5) 富山大学運営費交付金機能強化費, 松本欣三 (富山大学和漢医薬学総合研究所複合薬物薬理学) (分担: 柴原直利, 条美智子)「次世代KAMPO科学の創成を志向した漢方オミックス (Kampo Omics) の基盤構築」80万

- 6) 富山大学運営費交付金機能強化費, 齋藤 滋 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 産科婦人科学) (分担: 小泉桂一, 柴原直利) 「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」 120 万

◇研究室在籍者

1. 大学院後期3年: 飯塚紘史
2. 大学院前期2年: 水野祐介, 呉伊羲, 法本健吾
3. 大学院前期2年: 劉夢馨 (秋入学)
4. 大学院前期1年: サランチチグ
5. 薬学部薬学科6年: 須崎美貴子, 成田絢香
6. 薬学部薬学科5年: 江藤武志, 竹下佳輝
7. 薬学部薬学科4年: 大河原優, 大塚義起
8. 薬学部薬学科3年: 酒井玲奈, 島田涼

◇研究目的

臨床研究を活性化するために、病態あるいは疾病に関わる基礎研究の成果を、臨床現場に橋渡しするトランスレーショナルリサーチの推進が強く求められている。漢方薬（生薬及び漢方方剤）は経験知に基づいて様々な病態や疾病に対して用いられてきたが、エビデンスに基づいた医療を求められる今日では、当然のことながら、その経験を科学的エビデンスに置き換える作業が求められている。本分野は、漢方薬に関する基礎研究による有望なシーズを臨床に結びつける橋渡し研究により、医療に貢献することを目的とし、トランスレーショナルリサーチを積極的に推進する。

◇研究概要

I) 漢方方剤・生薬の治療効果に関する基礎的研究

- 1) 疾患モデルを用いた既存漢方方剤の治療効果に関する研究
- 2) 去加法および合方による新規漢方方剤の治療効果に関する研究
- 3) 西洋医学的薬剤の効果に対する生薬の影響に関する研究

II) 漢方方剤・生薬の治療効果に関する臨床的研究

- 1) 生薬品質の相違が臨床効果に及ぼす影響に関する研究
- 2) 各種疾患に対する漢方方剤・生薬の治療・予防効果に関する研究
- 3) 証の解明に関わる研究

◇原著論文

- 1) Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K.: CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat Commun.*, 8(1): 286, 2017.
- 2) Tohda C, Yang X, Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N.: Diosgenin-Rich Yam Extract Enhances Cognitive Function: A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind, Crossover Study of Healthy Adults. *Nutrients*, 9(10): 112-119, 2017.

◇著書

- 1) 柴原直利：スタンダード薬学シリーズⅡ 6医療薬学Ⅳ. 薬理・病態・薬物治療(4). 日本薬学会編. 東京：東京化学同人；SB034 日本薬局方に収載される漢方薬の適応となる証，症状や疾患について例示して説明できる. p348-363, 2017.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) 柴原直利: 指導医講習会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 2) 柴原直利: 専攻医のための説明会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 3) 柴原直利: 医療倫理・医療安全講習会. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 4) 柴原直利: 漢方入門講座1 血の病態と治療方剤. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋
- 5) 渡り英俊, 竹澤章裕, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 補気剤が不妊治療中の諸症状に有効であった3症例. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 6) 野上達也, 渡り英俊, 藤本誠, 竹澤章裕, 金原嘉之, 北原英幸, 三澤広貴, 柴原直利, 嶋田豊: 加味帰脾湯、芍帰膠艾湯が有効であった小児不応性血球減少症の一例. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 7) 小田口浩, 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 折笠秀樹, 花輪壽彦: 熟練した漢方専門医の舌診・脈診・腹診平準化. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 8) 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 小田口浩, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 花輪壽彦: COI関連「漢方診療標準化プロジェクト」(第7報) 公開“漢方診察 手合わせ会”参加者の反響. 第68回日本東洋医学会学術総会; 2017 Jun 2-4; 名古屋.
- 9) 小田口浩, 関根麻理子, 若杉安希乃, 伊藤雄一, 石毛達也, 川鍋伊晃, 村松慎一, 並木隆雄, 新井信, 嶋田豊, 柴原直利, 三瀦忠道, 花輪壽彦: シンポジウム 漢方医学的所見の客観化に向けた取り組み. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 10) 柴原直利*: シンポジウム「五苓散の基礎と臨床～ 脳外科領域での有用性について」五苓散の効果発現におけるアクアポリンの関与. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 11) 飯塚紘史, 小泉桂一, 水野祐介, 須崎美貴子, 竹下佳輝, 大塚義起, 柴原直利: 芍薬甘草湯煎液作成方法が含有微粒子の形態・免疫活性化作用に与える影響. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 12) 呉伊義, 木村真梨, 成田絢香, サランチチグ, 江藤武志, 入矢美沙, 条美智子, 柴原直利: 正常ラット腸管における五苓散のAQPを介した水分調節に対する検討. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 13) 成田絢香, 水野祐介, 江藤武志, 呉伊義, サランチチグ, 条美智子, 柴原直利: 補中益気湯及び大建中湯がワルファリンコントロールに及ぼす影響. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 14) 水野祐介, 成田絢香, 江藤武志, 大河原優, 条美智子, 柴原直利: 漢方方剤における猪胆汁と豚胆汁の相違. 第34回和漢医薬学会大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.
- 15) 北原英幸, 三澤広貴, 金原嘉之, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 防風通聖散去黄芩加黄連の使用経験. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 16) 野上達也, 三原弘, 藤本誠, 渡り英俊, 北原英幸, 三澤広貴, 金原嘉之, 柴原直利, 嶋田豊: 卒前教育における漢方医学シミュレーション教育の試み. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 17) 金原嘉之, 三澤広貴, 北原英幸, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 山本樹, 柴原直利, 嶋田豊: 本事方・貝母湯が奏効した慢性咳嗽の一例. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 18) 三澤広貴, 北原英幸, 金原嘉之, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊: 苓桂朮甘湯と甘麥大棗湯の併用が有効であったパニック障害の3例. 第43回日本東洋医学会北陸支部例会; 2017 Oct 22; 金沢.
- 19) 柴原直利: 高齢者疾患と漢方. 第11回日本東洋医学会専門医制度九州地区教育講演会; 2017 Nov 23; 福岡. (招待講演)

◇その他

- 1) Shibahara N.: Relation between the clinical effects and quality difference. Sikchi Symposium on the Combination of Traditional Medicine and Food; 2017 Nov 2; Daejeon, Korea. (Invited lecture)
- 2) 柴原直利: 臍上部圧痛について: 中日中医薬学術シンポジウム 2017; 2017 Dec 7; 北京. (招待講演)
- 3) Jo M.: Lymphatic contraction mechanisms. USF Health Cardiology and fellows Bench to Bedside series; 2017 Dec 20; Tampa, Florida.
- 4) Shibahara N.: Tenderness Above the Umbilicus: Academic Lecture at Guangxi University of Chinese MEdicine; 2018 Mar 5; Nanning, China.
- 5) Shibahara N.: The traditional medical education as a life-long education for the general public at University of Toyama: Experts' Forum on Feasibility and Plan for the Herbal Medicine School Establishment; 2018 Mar 23; Daegu, Korea.
- 6) 柴原直利: 症例検討: 第 35 回漢方診断研究会; 2017 Apr 20; 富山.
- 7) 柴原直利: 漢方医学の基本的概念: 富山のくすし 平成 29 年度第 1 回漢方医学と生薬講座; 2017 Apr 22; 富山.
- 8) 柴原直利: 未病と養生: 平成 29 年度富山市民大学 生活医学薬学を学ぶ; 2017 May 12; 富山.
- 9) 柴原直利: 漢方医学の診察方法と漢方薬: 富山のくすし 平成 29 年度第 2 回漢方医学と生薬講座; 2017 May 13; 富山.
- 10) 柴原直利: 症例検討: 第 69 回富山漢方談話会; 2017 May 16; 富山.
- 11) 柴原直利: 現代の医療機関における漢方治療の現状と実際: 九州連合清心会大会; 2017 May 21; 福岡.
- 12) 柴原直利: 漢方医学における気血水: 平成 29 年度富山市民大学 生活医学薬学を学ぶ; 2017 May 26; 富山.
- 13) 柴原直利: 四診について: 富山大学楮鞭会; 2017 May 31; 富山.
- 14) 柴原直利: 高齢者疾患の漢方治療: 武生医師会 6 月次医学会; 2017 Jun 10; 武生, 福井.
- 15) 柴原直利: 症例検討: 第 36 回漢方診断研究会; 2017 Jun 15; 富山.
- 16) 柴原直利: 癌治療における漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 3 回漢方医学と生薬講座; 2017 Jun 19; 富山.
- 17) 柴原直利: 症例検討: 第 70 回富山漢方談話会; 2017 Jul 11; 富山.
- 18) 柴原直利: 漢方講座 高齢者疾患の漢方治療: 登録販売者生涯学習研修 A 講座; 2017 Jul 13; 富山.
- 19) 柴原直利: 地域医療における漢方治療の役割 - 冷え症、うつ症状、認知症などを中心に - , 日常診療に役立つ漢方処方 - 便秘・頭痛・ストレス・疲労倦怠 - : 鹿島漢方カンファレンス; 2017 Jul 15; 神栖, 茨城.
- 20) 柴原直利: 心の病の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 4 回漢方医学と生薬講座; 2017 Jul 22; 富山.
- 21) 柴原直利: フレイル・サルコペニアの漢方治療, 精神・神経疾患の漢方治療, 皮膚症状に対する漢方治療 - かゆみ・ほてり等の症状に - : 漢方フォローアップセミナー; 2017 Jul 30; 松本.
- 22) 柴原直利: 駆瘀血剤の基礎と臨床: 第 22 回富山大学和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017 Aug 9-10; 富山.
- 23) 柴原直利, 金原嘉之: 気血水診断法: 第 22 回富山大学和漢医薬学総合研究所夏期セミナー; 2017 Aug 9-10; 富山.
- 24) 柴原直利: 症例検討: 第 37 回漢方診断研究会; 2017 Aug 24; 富山.
- 25) 柴原直利: 消化器疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 5 回漢方医学と生薬講座; 2017 Sep 9; 富山.
- 26) 柴原直利: 症例検討: 第 71 回富山漢方談話会; 2017 Sep 12; 富山.
- 27) 柴原直利: 高齢者に対する漢方の選択術, 女性に対する漢方の選択術, 実技指導 ~ 腹診、舌診 ~ : 大阪フォローアップセミナー; 2017 Sep 23; 大阪.

- 28) 柴原直利: 症例検討: 第 38 回漢方診断研究会; 2017 Oct 19; 富山.
- 29) 柴原直利: 漢方薬の副作用: 富山のくすし 平成 29 年度第 6 回漢方医学と生薬講座; 2017 Oct 21; 富山.
- 30) 柴原直利: 漢方講座 消化器疾患の漢方治療: 登録販売者生涯学習研修 A 講座; 2017 Nov 9; 富山.
- 31) 柴原直利: 漢方常用処方解説: 全砺波薬剤師会・全砺波薬業会合同研修会; 2017 Nov 11; 富山.
- 32) 金原嘉之, 三澤広貴, 北原英幸, 渡り英俊, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 山本樹, 柴原直利, 嶋田豊: 本事方・貝母湯が奏効した慢性咳嗽の一例: 第 21 回和漢診療学シンポジウム; 2017 Nov 18; 富山.
- 33) 柴原直利: 症例検討: 第 72 回富山漢方談話会; 2017 Nov 21; 富山.
- 34) 柴原直利: 高齢者疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 7 回漢方医学と生薬講座; 2017 Nov 25; 富山.
- 35) 柴原直利: 呼吸器疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 8 回漢方医学と生薬講座; 2017 Dec 16; 富山.
- 36) 柴原直利: 症例検討: 第 39 回漢方診断研究会; 2017 Dec 21; 富山.
- 37) 柴原直利: 症例検討: 第 73 回富山漢方談話会; 2018 Jan 16; 富山.
- 38) 柴原直利: 婦人科疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 9 回漢方医学と生薬講座; 2018 Jan 20; 富山.
- 39) 柴原直利: 大学漢方医学教育のカリキュラムの提案—大学医学部モデルコアカリキュラムの改訂を受けて—: 第 1 回漢方医学教育 SYMPOSIUM2018; 東京.
- 40) 柴原直利: 症例検討: 第 40 回漢方診断研究会; 2018 Feb 15; 富山.
- 41) 柴原直利: 耳鼻咽喉科疾患の漢方治療: 富山のくすし 平成 29 年度第 10 回漢方医学と生薬講座; 2018 Feb 24; 富山.
- 42) 柴原直利: 症例検討: 第 74 回富山漢方談話会; 2018 Mar 20; 富山.

◇共同研究

学内

- 1) 嶋田豊 (富山大学医学薬学研究部 (医学) 和漢診療学講座教授), 「漢方医学の臨床研修プログラムの開発」, 1999, 4~
- 2) 嶋田豊 (富山大学医学薬学研究部 (医学) 和漢診療学講座教授), 藤本誠 (富山大学医学薬学研究部 (医学) 和漢診療学講座講師), 「肝・腎線維化に対する桂枝茯苓丸の有効性に関する薬理学的研究」, 2009, 2~
- 3) 高本考一 (富山大学医学薬学研究部神経・整復学講座助教), 「急性・亜急性期頸部痛・腰痛に対する物理・理学療法の確立に関する臨床的研究(急性・亜急性期頸部・腰部痛に対するトリガーポイント圧迫治療法の効果: ランダム化比較試験)」, 2009, 11, 9~
- 4) 高本考一 (富山大学医学薬学研究部神経・整復学講座助教), 「急性・亜急性期頸部・腰痛に対する物理・理学療法の確立に関する臨床的研究(急性・亜急性期頸部・腰部痛に対する温熱療法及び寒冷療法とトリガーポイント徒手圧迫療法との併用治療効果の検討: ランダム化比較試験)」, 2013, 4, 1~
- 5) 齋藤滋 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 産科婦人科学教授), 林周作 (富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学助教), 櫻井宏明 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学教授), 藤秀人 (富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 医療薬学教授), 梅寄雅人 (富山大学和漢医薬学総合研究所情報科学准教授), 春木孝之 (富山大学工学部知能情報工学講師), 笹野一洋 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 数学教室教授), 中川肇 (富山大学附属病院経営企画情報部教授), 戸邊一之 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 第一内科学教授), 関根道和 (富山大学大学院医学薬学研究部 (医

- 学)疫学健康政策学教授), 東田千尋(富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学准教授), 笹岡利安(富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)臨床薬理学教授), 杉山敏郎(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)第三内科学教授), 北島勲(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)臨床分子病態検査学教授), 山城清二(富山大学附属病院総合診療部教授), 鈴木道雄(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)神経精神医学教授), 嶋田豊(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)和漢診療学教授), 竹内登美子(富山大学大学院医学薬学研究部(医学)老年看護学教授), 高崎一朗(富山大学工学部生体情報薬理学准教授), 「医薬学と情報数学のからの挑戦 ～「未病」および「時間治療」の規定因子の検出からの新たな医療戦略の構築～」, 2015, 4, 1～
- 6) 松本欣三(富山大学和漢医薬学総合研究所複合薬物薬理学教授), 中川崇(富山大学大学院医学薬学研究部先端生命医療学域分子病態医学系准教授), Suresh Awale(富山大学和漢医薬学総合研究所天然薬物開発准教授), 渡辺志朗(富山大学和漢医薬学総合研究所栄養代謝学准教授), 横山悟(富山大学和漢医薬学総合研究所病態生化学助教), 高崎一朗(富山大学工学部生命工学科生体情報薬理学准教授), 「次世代KAMPO科学の創成を志向した漢方御漢方オミックス(Kampo Omics)の基盤構築」, 2016, 7, 22～
- 7) 門脇 真(富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学教授), 山西芳裕(九州大学高等研究院准教授), 梅寄雅人(富山大学和漢医薬学総合研究所情報科学特命准教授), 東田千尋(富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学准教授), 「漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング」, 2016, 4, 1～

国内

- 1) 花輪壽彦(北里大学東洋医学総合研究所所長), 小田口浩(北里大学東洋医学総合研究所副所長), 三瀨忠道(島県立医科大学会津医療センター漢方医学講座教授), 並木隆雄(千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座准教授), 新井信(東海大学医学部内科学系准教授), 村松慎一(自治医科大学内科学講座神経内科学部門特命教授), 嶋田豊(富山大学医学薬学研究部和漢診療学講座教授), 「漢方標準化プロジェクト」, 2013, 2, 1～
- 2) 岩野智彦(山梨大学大学院総合研究部医学域助教), 「漢方薬由来化合物のヒト卵管上皮細胞の絨毛動態へ与える影響の解析」, 2016, 4～
- 3) 日本製薬工業株式会社: 「牛黄清心元の抗精神作用に関する研究」, 2015, 9～
- 4) クラシエ製薬株式会社漢方研究所: 「尿中カテコラミン測定による漢方処方有用性の薬理的検討」, 2014, 12～
- 5) 医療法人社団ファインメッド: 「五苓散の経口投与と経直腸投与による血中成分濃度の相違に関する研究」, 2016, 12～

海外

- 1) Jerome W. Breslin (Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Professor), 「Lymphatic contraction mechanisms」, 2017, 3～
- 2) 方剛(広西中医薬大学荘医学准教授), 「中日国際協力プロジェクトによる荘医学の新展開に関わる研究」, 2017, 10～
- 3) Nguyen Phuong Dung (University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city, Faculty of Traditional Medicine, Professor), 「伝統薬の薬効評価に関わる日越共同研究」2017, 1～

◇非常勤講師

- 1) 柴原直利: 富山大学医学薬学教育部, 「和漢医薬学入門」, 2017, 4, 21.
- 2) 柴原直利: 福井大学医学部, 「実践臨床病態学」, 2017, 4, 24.
- 3) 柴原直利: 富山福祉短期大学看護学部, 「東洋医学概論」, 2017, 9, 7～21.

- 4) 柴原直利：富山大学医学薬学教育部（薬学）、「東洋医学概論」，2017, 10, 5～2018, 2, 1.
- 5) 柴原直利：富山大学医学薬学教育部（薬学）、「病院実務実習」，2017, 10, 16～2017, 12, 8.
- 6) 柴原直利：富山大学大学院医学薬学教育部（医学系）修士課程，「東洋医学概論」，2017, 12, 12, 2018, 1, 24.

◇研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費，基盤研究（C）（代表：柴原直利，継続）「アクアポリンを介した五苓散の下痢改善効果に関する研究」80万
- 2) 文部科学省科学研究費，基盤研究（B）（分担：柴原直利，新規）「漢方薬成分のインシリコ標的タンパク質探索による漢方薬リポジショニング」30万
- 3) 富山大学運営費交付金機能強化費，松本欣三（富山大学和漢医薬学総合研究所複合薬物薬理学）（分担：柴原直利，条美智子）「次世代KAMPO科学の創成を志向した漢方オミックス（Kampo Omics）の基盤構築」80万
- 4) 富山大学運営費交付金機能強化費，齋藤 滋（富山大学大学院医学薬学研究部（医学）産科婦人科学）（分担：小泉桂一，柴原直利）「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」120万

天然薬物開発分野

Division of Natural Drug Discovery

准教授	アワレ スレス	Associate Professor	Suresh Awale (Ph.D.)
研究員	ディブエ ディア フィタ エディ	Postdoc.	Dibwe D. F. Eddy (Ph.D.)
研究員	チャンドラセイカー バラチャンドラン	Postdoc.	C. Balachandran (Ph.D.)

◇研究目的

天然物創薬分野では、主として、腫瘍微小環境を標的とする天然抗がん物質の探索を目的に研究を進めている。

◇研究概要

一般的ながん細胞は無秩序かつ急速に増殖するが、腫瘍血管系が脆弱で不規則に形成されるために栄養や酸素の欠乏した環境にさらされることになる。しかしながら、がん細胞は低栄養・低酸素といった極限状態におかれると、エネルギー代謝を変えることで生存する特有の耐性機構を示す。特に、PANC-1のようなヒト膵臓がん細胞はこのような耐性を獲得しており、低栄養・低酸素といった厳しい環境下においても長期間の生存が可能となっている。したがって、がん細胞の栄養飢餓耐性を解除する化合物 (antiausterity agent) は新たな抗がん剤探索の標的と考えられる。ほとんどの膵臓がん患者は速やかに転移を起し、短期間で死に至る。これまで膵臓がんに対する有効な薬はなく、従来の抗がん剤に対しては耐性を示す。それゆえ、栄養飢餓耐性を標的とする天然抗がん物質の探索が、治療戦略において重要な研究課題の一つであると考えられる。この目的を達成するために、以下の研究を行っている。

我々は、伝統的知識や伝統的生薬が新たな抗がん剤、特に有効な治療法がない膵臓がんに対する抗がん剤開発の手がかりとなることを確信している。

I) 植物資源の膵臓がん細胞に対する抗がん活性スクリーニング

和漢生薬、アーユルヴェーダ生薬など各地の伝統薬で用いられる薬用資源について、栄養飢餓状態におけるヒト膵臓がん細胞 PANC-1 細胞に対する抗がん活性スクリーニングを進めている。

II) 生理活性を指標とした新規抗がん候補物質の探索

栄養飢餓耐性を解除する活性を有する生薬について、活性を指標に各種クロマトグラフィ (シリカゲル, ODS, 高性能 TLC, MPLC, HPLC) による成分の分離・精製を行い、分光学的データ (NMR, MS, UV, IR, CD) に基づく成分の構造決定を行う。リード化合物については、他のヒト膵臓がん細胞 (MIA Paca2, KLM-1, NOR-P1, Capan-1, PSN-1 など) からなる細胞パネルでの評価も行うとともに、活性成分についての構造活性相関や作用機構についての研究も行う。有望な候補物質は、ヒト膵臓がんのマウスモデルを用いた *in vivo* での抗腫瘍活性効果の評価を実施する。

Ⅲ) 定量的メタボロミクス解析を利用した抗がん剤の作用機構の解明

がん細胞におけるタンパク質の発現や作用についてはよく研究されている一方、有機酸、アミノ酸、糖類、脂質のような低分子の代謝はあまり注目されていない。栄養飢餓耐性を有するがん細胞においては通常とは異なるエネルギー代謝が行われていると推察されることから、細胞内の低分子を含めた代謝物の網羅的分析は antiausterity agent の作用機構の解明に有用であると考えられる。我々は FT-NMR および FT-MS によるメタボローム解析を進めている。

◇原著論文

- 1) Dang P. H., Nguyen H. X., Duong T. T. T., Tran T. K. T., Nguyen P. T., Vu T. K. T., Vuong H. C., Phan T. H. N., Nguyen M. T. T., Nguyen N. T., Awale S. : α -Glucosidase Inhibitory and Cytotoxic Taxane Diterpenoids from the Stem Bark of *Taxus wallichiana*. *J. Nat. Prod.*, 80: 1087–1095, 2017. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00006.
- 2) Awale S., Tawila A. M., Dibwe D. F., Ueda J, Sun S., Athikomkulchai S., Balachandran C., Saiki S., Matsumoto K., Esumi H. : Highly oxygenated antiausterity agents from the leaves of *Uvaria dac*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 1967–1971, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.03.021.
- 3) Nguyen K. D. H., Dang P. H., Nguyen H. X., Nguyen M. T. T., Awale S., Nguyen N. T. : Phytochemical and cytotoxic studies on the leaves of *Calotropis gigantean*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27: 2902–2906, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.087.
- 4) Balachandran C., Arun Y., Sangeetha B., Durairandiyam V., Awale S., Emi N., Ignacimuthu S., Perumal P. T.: In vitro and in vivo anticancer activity of 2-acetyl-benzylamine isolated from *Adhatoda vasica* L. leaves. *Biomed. Pharmacother.*, 93: 796–806, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.096.
- 5) Fujiwara H., Han Y., Ebihara K., Awale S., Araki R., Yabe T. Matsumoto K.: Daily administration of yokukansan and keishito prevents social isolation-induced behavioral abnormalities and down-regulation of phosphorylation of neuroplasticity-related signaling molecules in mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17(1):195,2017. DOI: 10.1186/s12906-017-1710-7.
- 6) Rahman K. N. A., Haribabu J., Balachandran C., Bhuvanesh N. S. P., Karvembu R. : Copper, nickel and zinc complexes of 3-acetyl coumarin thiosemicarbazone: Synthesis, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity and DNA/ protein binding properties. *Polyhedron*, 135: 26–35, 2017. DOI: 10.1016/j.poly.2017.0.
- 7) Sudhapriya N., Balachandran C., Awale S., Perumal P. T. : Sn(II)-mediated facile approach for the synthesis of 2-aryl-2H-indazole-3-phosphonates and their anticancer activity. *New J. Chem.*, 41: 5582-5594, 2017. DOI:10.1039/C7NJ00843K.
- 8) Mayakrishnan S., Arun Y., Balachandran C., Awale S., Maheswari N. U., Perumal P. T. : Ru(II)-catalysed regioselective C-H/O-H oxidative annulation to access isochromeno[8,1-ab]phenazines: far red fluorescence and live cancer cell imaging. *ACS Omega*, 2: 2694–2705, 2017. DOI: 10.1021/acsomega.7b00335.
- 9) Chang H., Wang Y., Gao X., Song Z., Awale S., Han N., Liu Z., Yin J. : Lignans from the root of *Wikstroemia indica* and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Fitoterapia*, 121: 31–37, 2017. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.06.012.

- 10) Tshitenge D. T., Feineis D., Awale S., Bringmann G.: Gardenifolins A–H, Scalemic Neolignans from *Gardenia ternifolia*: Chiral Resolution, Configurational Assignment, and Cytotoxic Activities against the HeLa Cancer Cell Line.
J. Nat. Prod., 80: 1604–1614, 2017. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00180.
- 11) Ebihara K., Fujiwara H., Awale S., Dibwe D. F., Araki R., Yabe T., Matsumoto K. : Decrease in endogenous brain allopregnanolone induces autism spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: a novel animal model of ASD.
Behav. Brain Res., 334: 6–15, 2017. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.07.019.
- 12) Fathy M., Awale S., Nikaido T.: Phosphorylated Akt Protein at Ser⁴⁷³ Enables HeLa Cells to Tolerate Nutrient-Deprived Conditions.
Asian Pac. J. Cancer Prev., 18: 3255–3260, 2017. DOI:10.22034/APJCP.2017.18.12.3255.
- 13) Nguyen H.X., Nguyen M.T.T., Nguyen N.T., Awale S. : Chemical Constituents of Propolis from Vietnamese *Trigona minor* and Their Antiausterity Activity against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line.
J. Nat. Prod., 80: 2345–2352, 2017. DOI:10.1021/acs.jnatprod.7b00375.
- 14) Dibwe D.F., Sun S., Ueda J., Balachandran C., Matsumoto K., Awale S. : Discovery of potential antiausterity agents from the Japanese Cypress *Chamaecyparis obtuse*.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 27: 4898–4903, 2017. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.09.034.
- 15) Fayez S., Li J., Feineis D., Mudogo V., Awale S., Bringmann G.: Ancistrolikokines E-H and Related 5,8'-coupled Naphthylisoquinoline alkaloids from the Congolese Liana *Ancistrocladus likoko* with Antiausterity Activities against PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells.
RSC Adv., 7: 53740–53751, 2017. DOI:10.1039/C7RA11200A.
- 16) Li J., Seupel R., Bruhn T., Feineis D., Kaiser M., Brun R., Mudogo V., Awale S., Bringmann G. : Jozilebomines A and B, Naphthylisoquinoline Dimers from the Congolese Liana *Ancistrocladus ileboensis*, with Antiausterity Activities against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line.
J. Nat. Prod., 80: 2807–2817, 2017. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00650.
- 17) Fujiwara H., Tsushima R., Okada R., Awale S., Araki R., Yabe T., Matsumoto K.: Sansoninto, a traditional herbal medicine, ameliorates behavioral abnormalities and down-regulation of early growth response-1 expression in mice exposed to social isolation stress.
J. Trad. Complement. Med., 8: 81–88, 2018. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.03.004.
- 18) Rohini G., Haribabu J., Sheeba M. M., Aneesrahman K. N., Bhuvanesh N. S. P., Balachandran C., Karvembu R., Sreekanth A. : Ru(II)- η^6 -benzene Complexes of Dibenzosuberonyl Appended Aroyl/Acylthiourea Ligands: In vitro Biomolecular Interaction Studies and Catalytic Transfer Hydrogenation.
Chemistry Select, 3:18–28, 2018. DOI: 10.1002/slct.201702538.
- 19) Nguyen H. X., Do T. N. V., Nguyen N. T. T., Dang P. H., Tho L. H., Awale S., Nguyen N. T. T.: A New Alkenylphenol from The Propolis of Stingless Bee *Trigona minor*.
Nat. Prod. Commun., 13,: 69–70, 2018 .
- 20) Mahendran P., Rajendran A. J., Balchandran C., Stalin A., Rangan S., Kothandapani L., Kella C. R., Awale S., Hiteshkumar B.N. : Synthesis of novel β -amino alcohols from phenylacetylcarbinol - cytotoxicity activity against A549 cells and molecular docking.
Res. Chem. Intermediat., 44: 535–552, 2018. DOI: 10.1007/s11164-017-3118-x.

- 21) Lombe B. K., Feineis D., Mudogo V., Brun R., Awale S., Bringmann G. : Michellamines A6 and A7, and further mono- and dimeric naphthylisoquinoline alkaloids from a Congolese *Ancistrocladus* liana and their antiausterity activities against pancreatic cancer cells. *RSC Adv.*, 8: 5243–5254, 2018. DOI: 10.1039/C8RA00363G.

◇学会報告 (*: 特別講演, シンポジウム, ワークショップ等)

- 1) Chandrasekar Balachandran, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale : Antiausterity activity of isopanduratin-A and its mechanism of action against PANC-1 human pancreatic cancer cells. 日本薬学会第 138 年会, 2018, 3/25-28, 金沢.
- 2) Sijia Sun, Dya Fita Dibwe, Chandrasekar Balachandran, Ampai Phrutivorapongkul, Suresh Awale : Furanocoumarins from the peels of *Citrus hystrix* and their antiausterity activity against three human pancreatic cancer cell lines. 日本薬学会第 138 年会, 2018, 3/25-28, 金沢.
- 3) Dya Fita Dibwe, Nusrin Pongterdsak, Kritsaya Chaithatwatthana, Ampai Phrutivorapongkul, Ahmed M. Tawila, Chandrasekar Balachandran, Suresh Awale : Discovery of potential antiausterity agents from Thai *Derris scandens*. 日本薬学会第 138 年会, 2018, 3/25-28, 金沢.
- 4) Suresh Awale : Application of NMR metabolomics in understanding the physiological target of Kampo medicine. 第 7 回 和漢研・熱研ジョイントセミナー; 2017 Dec. 4; Nagasaki.
- 5) Sijia Sun, Dya Fita Dibwe, Chandrasekar Balachandran, Ampai Phrutivorapongkul, Suresh Awale : Bergamottin, an anti-austerity agent from *Citrus hystrix* induced autophagy mediated PANC-1 cell death. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017 Nov. 10; Toyama.
- 6) Nusrin Pongterdsak, Kristaya Chaithatwatthana, Ampai Phrutivorapongkul, Sijia Sun, Ahmed M. Tawila, Ashraf M. Omar, Chandrasekar Balachandran, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale : Study on the anti-austerity activity of *Derris scandens* extract against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017 Nov. 10; Toyama.
- 7) Kristaya Chaithatwatthana, Nusrin Pongterdsak, Ampai Phrutivorapongkul, Sijia Sun, Ashraf M. Omar, Ahmed M. Tawila, Chandrasekar Balachandran, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale : Anti-austerity activity of *Piper betle* extract against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine; 2017 Nov. 10; Toyama.
- 8) Takahiro Maruyama, Takahiro Okada, Takuya Okada, Satoyuki Takahara, Chandrashaker Balachandran, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale, Naoki Toyooka : Synthesis and evaluation of preferential cytotoxicity under nutrient-deprived conditions of plumbagin derivatives. The 35th Medicinal Chemistry Symposium; 2017 Oct. 25-27; Nagoya.
- 9) Suresh Awale : Discovery of potential anticancer agents from the Japanese cypress “Hinoki”. Toyama Academic GALA 2017; 2017 Sept. 27, Toyama.
- 10) Dya Fita Dibwe, Suresh Awale : Chemical Constituents of *Piper longum* and their Antiausterity activity. Toyama Academic GALA 2017; 2017 Sept. 27; Toyama.
- 11) Sijia Sun, Dya Fita Dibwe, Chandrasekar Balachandran, Ampai Phrutivorapongkul, Suresh Awale : Discovery of antiausterity strategy based anticancer agents from *Citrus hystrix* DC. Toyama Academic GALA 2017; 2017 Sept. 27; Toyama.
- 12) 海老原 健、藤原 博典、Suresh Awale、Dya Fita Dibwe、荒木 良太、矢部 武士、松本 欣三 : 神経ステロイド allopregnanolone の生合成阻害によって生じる自閉症スペクトラム様症状について. Toyama Academic GALA 2017; 2017 Sept. 27; Toyama.
- 13) 松本欣三, 郭青雲, 海老原健, Awale Suresh, 荒木良太, 矢部武士, 藤原博典. 自閉症:

スペクトラム(ASD)様症状発現における脳内神経ステロイドの役割と加味逍遙散による発現抑制. 16th Annual Conference of Japan-China Joint Society for Clinical and Traditional Medicines; 2017 Sept. 23; Saitama.

- 14) Guo Q., Ebihara K., Fujiwara H., Dibwe D.F., Awale S., Araki R., Yabe T., Matsumoto K. : Improvement effect of kami-shoyo-san on sociability disorder induced by biosynthesis inhibition of neurosteroid allopregnanolone. The 34th Congress of the medical and pharmaceutical Society for Wakan-yaku; 2017 Aug 26-27; Fukuoka.
- 15) Ken Ebihara, Hironori Fujiwara, Suresh Awale, Dya Fita Dibwe, Ryota Araki, Takeshi Yabe, Kinzo Matsumoto : SKF105111 Induced Autism Spectrum Disorder (ASD)-like Behavior May Offer a Novel Animal Model to Explore Therapeutic Drugs for ASD. The 1st International Conference on Natural Medicine (ICNM 2017); 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.
- 16) Ariyawan Tantipongpiradet, Orawan Monthakantirat, Kinzo Matsumoto, Suresh Awale, Chantana Boonyarat, Supawadee Daodee, Natdanai Musigavong, Supaporn Pitiporn, Yaowared Chulikhit : Effect of Thai Herbal Formula for Menopause on Depressive-like Behavior in Ovariectomized Mice Model. The 1st International Conference on Natural Medicine (ICNM 2017); 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.
- 17) Kinzo Matsumoto, Hironori Fujiwara, Yaoyu Han, Ken Ebihara, Suresh Awale : Experimental approach to developmental disorder treatment from traditional medicine. The 1st International Conference on Natural Medicine (ICNM 2017); 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.
- * 18) Suresh Awale: Discovery of natural anti-cancer agents targeting cancer cells' tolerance to nutrition starvation. The 1st International Conference on Natural Medicine (ICNM 2017); 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand.

◆ その他

- 1) Suresh Awale : 抗膵臓がん活性を有する有望な植物資源としての富山県産檜に関する天然物化学研究. 平成 29 年度富山第一銀行奨学財団の研究発表会; 2017 July 7 ; 富山。
- 2) Suresh Awale : Structure Elucidation of Natural Products: Tips and Techniques. 応用天然物化学特論; 2017 July 5; 富山大学。
- 3) Suresh Awale : Continued Importance of Natural Product Drugs in the 21st Century. 応用天然物化学特論; 2017 Jun 6; 富山大学。
- 4) Suresh Awale : Discovery of natural anti-cancer agents targeting cancer cells' tolerance to nutrition starvation. 和漢医薬学総合研究所_東西医薬学交流セミナー; 2017 Jun 13, 富山。

受賞

- 1) Dibwe Dya Fita Eddy : 若手研究者部門ポスター賞, Toyama Academic GALA 2017, 平成 29 年 9 月 27 日・富山大学
- 2) 藤橋優希 : 優秀発表者「薬学科」平成 29 年度富山大学薬学部・卒業研究発表会

◇共同研究

国内

- 1) 江角浩安 : 国立がん研究センター東病院, 「栄養飢餓耐性を標的とする天然抗腫瘍物質の研究」, 2012 ~
- 2) 松本欣三 : 富山大学, 2015 ~

- 3) 渡辺志朗：富山大学，2016～
- 4) 豊岡尚樹：富山大学，2016～
- 5) 上田純也：広島国際大学，2015～

海外

- 1) Prof. Gerhard Bringmann : Institut fuer Organische Chemie, Universitat Wuerzburg, Germany.
Discovery of potential natural anticancer agents – 2016～
- 2) Prof. Hermann Stuppner : Institute of Pharmacy/Pharmacognosy, University of Innsbruck, Austria.
Discovery of novel secondary metabolites from higher plants with anticancer activities– 2017～
- 3) Prof. Simon Lewis : Department of Chemistry, University of Bath, United Kingdom.
Synthesis of grandifloracin analogues as the potential anticancer agents. 2017～
- 4) Dr. Sirivan Athikomkulchai : タイ・シーナカリンウィロート大学，「タイ薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究」，2011, 4～
- 5) Dr. Ampai Phrutivorapongkul : タイ・チェンマイ大学，「タイ薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究」，2017～
- 6) Dr. Surya Kant Kalauni : ネパール・トリブバン大学，「ネパール薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究」，2011, 4～
- 7) Dr. Mai Thanh Thi Nguyen : ベトナム・国立ホーチミン市大学，「ベトナム薬用植物の栄養飢餓耐性を標的とする抗がん物質の探索研究」，2011, 4～
- 8) Dr. Bhusan Shakya : ネパール・トリブバン大学，「栄養飢餓耐性を標的とする合成抗がん物質の探索研究」，2012, 4～
- 9) Prof. Jakab Magolan : Department of Chemistry, University of Idaho, USA
Synthesis of coumarin derivatives as antiausterity agents – 2012, 4～
- 10) Prof. Mark Coster : Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University, Australia. Total synthesis of antiausterity agents –2015, 10～
- 11) Prof. Lih-Geeng Chen : Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Taiwan.
Screening of Taiwanese medicinal plants for antiausterity activity and discovery of natural anticancer agents – 2015, 9～
- 12) Prof. Yu-Jang Li : Department of Applied Chemistry. National Chiayi University, Taiwan.
Synthesis of antiausterity strategy based anticancer agents – 2015, 9～

◇研究費取得状況

- 1) 年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C) 平成 28 年度～31 年度 (代表 : Suresh Awale)
- 2) 平成 29 年学長裁量経費教育研究活性化基盤経費 (分担 : Suresh Awale) 「次世代 KAMPO 科学の創成を志向した漢方オミックス (Kampo Omics) の基盤構築」
- 3) 学長裁量経費 Toyama Academic Gala 2017 一般部門 (代表 : Dibwe Dya Fita Eddy)
- 4) 所長リーダーシップ経費・和漢医薬学総合研究所

◇研究室在籍者

薬学部 3 年生：藤野 春香

薬学部 3 年生：青池 滢

薬学部 4 年生：猪岡 響

薬学部 4 年生：藤橋 優希

大学院修士 2 年：Sijia Sun

大学院博士 1 年：Ahmed Mohammed Tawila

大学院博士 1 年：Ashraf Mohammed Omar

研究員：Chandrasekar Balachandran (インド・ポストドック、2016, 11～2018, 3)

研究員：Dibwe Dya Fita Eddy (コンゴ・ポストドック、2017, 4～)

インターンシップ学生：Nusrin Pongterdsak (タイ・チェンマイ大学、2017, 9/18～12/8)

インターンシップ学生：Kritsaya Chaithatwatthana (タイ・チェンマイ大学、2017, 9/18～12/8)

インターンシップ学生：蘇靖雅 (台湾・国家嘉義大学、2017, 9/24～9/28)

インターンシップ学生：李嘉傑 (台湾・国家嘉義大学、2017, 9/24～9/28)

インターンシップ学生：李平卉 (台湾・国家嘉義大学、2017, 9/24～9/28)

インターンシップ学生：葉聿昕 (台湾・国家嘉義大学、2017, 9/24～9/28)

◇研究目的

本分野は、生命情報科学および数理科学の観点から和漢医薬学に関する研究を幅広く支援および推進することを目的とする。

◇研究概要

本分野では、和漢医薬学総合研究所が運用・公開している各データベースのさらなるデータの充実と利便性の向上を目指し、それらの基盤整備を進めている。また、和漢医薬学に関する複数の研究課題に対して、生命情報科学的・数理科学的観点から取り組んでいる。具体的には、本学の他の研究室と連携しながら、遺伝子発現データ解析を通じて肥満や炎症性腸疾患などの多因子疾患に対する新規バイオマーカーを探索し、それらのバイオマーカーの値が漢方製剤投与によりどう変化するかを調べるなどの研究を進めている。

◇原著論文

なし

◇学会報告

なし

◇共同研究

学内

- 1) 小泉 桂一 (和漢研), 門脇 真 (和漢研), 林 周作 (和漢研), 「メタボリックシンドローム, 炎症性腸疾患, 大腸癌の各モデルマウスの遺伝子発現データの解析」, 2014年12月～
- 2) 齋藤 滋 (医学部), 門脇 真 (和漢研), 小泉 桂一 (和漢研), 春木 孝之 (工学部), 成行 泰裕 (人間発達科学部), 林 周作 (和漢研), ほかに多数, 「医薬学と数理科学の連携による未病の研究プロジェクト」, 2016年5月～

国内

- 1) 合原 一幸 (東京大学生産技術研究所), 「疾病の早期診断のための数理解析手法の開発」, 2014年5月～

国際共同研究分野

Division of International Cooperative Researches

客員教授	Rungpetch C. Sakulbumrungsil	Professor	Rungpetch C. Sakulbumrungsil (Ph.D)
客員教授	Jun Yin	Professor	Jun Yin (Ph.D)
客員教授	Nguyen Minh Khoi	Professor	Nguyen Minh Khoi (Ph.D)

◇研究目的及び概要

目覚ましい発展を遂げた現代西洋医学においても治療に難渋する疾患が多く、天然物を活用した伝統医学に関する研究成果や臨床効果に期待が寄せられている。伝統医学に関わる研究を高い水準で維持・発展させるためには、最新の研究方法論や天然物に関する情報交換が必要である。和漢医薬学総合研究所は天然物の研究を発展させるために、3カ国・4機関との間に国際協力拠点（ICC）を形成するとともに、8カ国・地域14機関と部局間協定を締結している。

そこで、民族薬物研究センター国際共同研究分野は、各国の大学及び研究機関の研究者と連携して、伝統医学と現代医学を融合した国際共同研究を促進することを目的に、(1) タイ・チュラロンコン大学薬学部や中国・北京大学医学部薬学院との国際協力拠点を通じた国際共同研究の推進、(2) 大学間や部局間協定締結機関とのジョイントシンポジウム、学生交流を通じた国際共同研究の維持・発展を図っている。

◇原著論文

- 1) Nguyen T.D., Thuong P.T., Hwang I.H., Hoang T.K., Nguyen M.K., Nguyen H., Na M.: Anti-Hyperuricemic, Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of *Siegesbeckia orientalis* L. Resulting from the Fraction with High Phenolic Content. *BMC Complement Altern Med.*, 17(1): 191, 2017. doi: 10.1186/s12906-017-1698-z.
- 2) Shao J., Liu Z., Wang L., Song Z., Chang H., Han N., Yin J.: Screening of the optimized prescription from Suqingwan in terms of its therapeutic effect on DSS-induced ulcerative colitis by its regulation of inflammatory and oxidative mediators. *J Ethnopharmacol.*, 202: 54-62, 2017. doi: 10.1016/j.jep.2017.03.006. Epub 2017 Mar 8.
- 3) Noparatayaporn P., Sakulbumrungsil R., Thaweethamcharoen T., Sangseenil W.: Comparison on Human Resource Requirement between Manual and Automated Dispensing Systems. *Value Health Reg Issues*, 12: 107-111, 2017. doi: 10.1016/j.vhri.2017.03.007. Epub 2017 May 23.
- 4) Zhou J., Han N., Lv G., Jia L., Liu Z., Yin J.: Two New β -Dihydroagarofuran Sesquiterpenes from *Celastrus orbiculatus* Thunb and Their Anti-Proliferative Activity. *Molecules*, 22(6). pii: E948, 2017. doi: 10.3390/molecules22060948.
- 5) Ma R., Xiao Y., Lv Z., Tan H., Chen R., Li Q., Chen J., Wang Y., Yin J., Zhang L., Chen W.: AP2/ERF Transcription Factor, Ii049, Positively Regulates Lignan Biosynthesis in *Isatis indigotica* through Activating Salicylic Acid Signaling and Lignan/Lignin Pathway Genes. *Front Plant Sci.*, 8:1361, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.01361. eCollection 2017.
- 6) Li H.F., Xu F., Yang P., Liu G.X., Shang M.Y., Wang X., Yin J., Cai S.Q.: Systematic screening and characterization of prototype constituents and metabolites of total astragalosides using

- HPLC-ESI-IT-TOF-MSn after oral administration to rats. *J Pharm Biomed Anal.*, 142:102-112, 2017. doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.009. Epub 2017 May 5.
- 7) Zhai J., Zhang F., Gao S., Chen L., Feng G., Yin J., Chen W.: Time- and NADPH-Dependent Inhibition on CYP3A by Gomisin A and the Pharmacokinetic Interactions between Gomisin A and Cyclophosphamide in Rats. *Molecules*, 22(8). pii: E1298, 2017. doi: 10.3390/molecules22081298.
 - 8) Chang H., Wang Y., Gao X., Song Z., Awale S., Han N., Liu Z., Yin J., Chen W.S.: Lignans from the root of *Wikstroemia indica* and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Fitoterapia*, 121:31-37, 2017.
 - 9) Tangcharoensathien V., Sommanustweechai A., Chanthong B., Sumpradit N., Sakulbumrungsil R., Jaroenpoj S., Sermsinsiri V.; Thai SAC Working Group.: Surveillance of antimicrobial consumption: methodological review for systems development in Thailand. *J Glob Health*, 7(1):010307, 2017. doi:10.7189/jogh.07.010307.
 - 10) Zheng X., Zheng W., Zhou J., Gao X., Liu Z., Han N., Yin J.: Study on the discrimination between *Corydalis Rhizoma* and its adulterants based on HPLC-DAD-Q-TOF-MS associated with chemometric analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, pii: S1570-0232(17)30933-9, 2017. doi:10.1016/j.jchromb.2017.10.028.
 - 11) Zhai J., Zhang F., Gao S., Chen L., Feng G., Yin J., Chen W.: *Schisandra chinensis* extract decreases chloroacetaldehyde production in rats and attenuates cyclophosphamide toxicity in liver, kidney and brain. *J Ethnopharmacol.*, 210:223-231. 2018. doi: 10.1016/j.jep.2017.08.020.
 - 12) Ha D.T., Long P.T., Hien T.T., Tuan D.T., An N.T.T., Khoi N.M., Van Oanh H., Hung T.M.: Anti-inflammatory effect of oligostilbenoids from *Vitis heyneana* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages via suppressing the NF- κ B activation. *Chem Cent J.*, 12(1):14, 2018. doi: 10.1186/s13065-018-0386-5.
 - 13) Chang S., Yang Z., Han N., Liu Z., Yin J.: The antithrombotic, anticoagulant activity and toxicity research of ambinine, an alkaloid from the tuber of *Corydalis ambigua* var. *amurensis*. *Regul Toxicol Pharmacol.*, pii: S0273-2300(18)30067-9, 2018. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.03.004.
 - 14) Ngoc T.M., Phuong N.T.T., Khoi N.M., Park S., Kwak H.J., Nhiem N.X., Trang B.T.T., Tai B.H., Song J.H., Ko H.J., Kim S.H. :A new naphthoquinone analogue and antiviral constituents from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Nat Prod Res.*, 2018 Mar 21:1-7. doi:10.1080/14786419.2018.1452004.

◇活動事業実績

国際協力拠点協定 (ICC)

中国)

北京大学薬学院との共同研究拠点事業

和漢医薬学総合研究所は北京大学医学部と 2005 年に「薬用資源研究における国際協力拠点設置に関する協定」を結び、双方に International Cooperative Center Office (ICCO) を設けた。その後 2010 年及び 2015 年 2 月に再締結し、ICCO を拠点として学術交流を行っている。以下に 2017 年度の活動実績を列記する。

1) 学術交流

・2017 年 11 月 10 日：文部科学省平成 29 年度科学技術人材育成費補助事業「ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ（特色型）」による富山大学「女性研究者による国際シンポジウム企画・開催助成金」により「伝統薬物の科学研究国際シンポジウム」を開催し、北京大学薬学院から蔡少青教授及び若手研究者の王超群氏を招聘して講演いただき、双方の学術交流を図った。

・2018 年 3 月 5 日：小松かつ子教授（生薬資源科学分野）、森田洋行教授（天然物化学分野）及び早川芳弘教授（病態生化学分野）が、北京大学薬学院－富山大学和漢医薬学総合研究所ジョイントシンポジウムに参加し、講演を行った。また、同薬学院の教授らと今後の学術交流について意見交換を行った。

2) 合同調査

・2017年9月12日～19日：小松かつ子教授（生薬資源科学分野）及び蔡少青教授（北京大学薬学院）が中国広西壮族自治区及び広東省で骨碎補の資源調査を実施した。

タイ)

チュラロンコン大学薬学部との共同研究拠点事業

和漢医薬学総合研究所はチュラロンコン大学薬学部と2010年に、双方に International Cooperative Center (ICC) を設置する覚書を締結し、ICCを拠点として学術交流を行っている。以下に2017年度の活動実績を列記する。

1) 学術交流

・2017年6月～7月：森田洋行教授（天然物化学分野）及び Sornkanok Vimolmangkang 助教（チュラロンコン大学薬学部）が、森田洋行教授の研究室にて、「新規 III 型ポリケタイド合成酵素の探索と機能同定」についての共同研究を実施した。

・2017年7月～8月：森田洋行教授（天然物化学分野）及び Thaniya Wunnakup 氏（チュラロンコン大学薬学部大学院生）が、森田洋行教授の研究室にて、「新規 III 型ポリケタイド合成酵素の探索と機能同定」についての共同研究を実施した。

・2017年8月～10月：森田洋行教授（天然物化学分野）の研究室にて Srinon Chanakarn 氏（チュラロンコン大学薬学部生）と Tancharoenlarp 氏（チュラロンコン大学薬学部生）が「酵素の機能解析」についてインターシップを実施した。

・2018年1月25日：松本欣三教授（複合薬物薬理学分野）及び早川芳弘教授（病態生化学分野）がチュラロンコン大学を訪問し、国際協力拠点についての打合せ及び相互交流を推進する為、JSPS 等への交流事業申請について協議を行った。

エジプト)

カイロ大学薬学部との共同研究拠点事業

和漢医薬学総合研究所はカイロ大学薬学部と2011年に、双方に International Cooperative Center Office (ICCO) を設置する覚書を締結した。以下に2017年度の活動実績を列記する。

1) 学術交流

・2018年1月22日：森田洋行教授（天然物化学分野）がカイロ大学を訪問し、今後の国際共同研究についての打合せを行った。

・2017年9月～11月：森田洋行教授（天然物化学分野）及び Ali Mahmoud El Halawany（カイロ大学薬学部准教授）が、森田教授の研究室にて、「エジプトの土壌由来生物活性化合物の単作」についての共同研究を実施した。

館長	小松 かつ子 (9月～)	Professor	Katsuko Komatsu (Ph.D.)
(特命准教授)	伏見 裕利 (~8月)	Associate Professor	Hirotooshi Fushimi (Ph.D.)
技能補佐員	出口 鳴美	Research Assistant	Narumi Deguchi

◇目的

世界の諸民族の伝統薬物を蒐集、保存、展示するとともに、それらの学術情報を収載したデータベースを構築し、伝統薬物に関する共同研究を推進する。

◇活動概要

I) 民族薬物データベース (ETHMEDmmm) の構築

当資料館には、和漢薬、アーユルヴェーダ生薬、ユナニー生薬、タイ生薬、インドネシア生薬、チベット生薬など約 29,000 点の生薬標本が保存されている。これらに関するデータベース (以下、DB) について順次、生薬標本情報並びに学術情報を更新、整理している。

今年度は、民族薬物 DB システムを Linux サーバで再構築し、オンプレミスからクラウドに移行した。また、内容を改変して検索の便を図った。

II) 薬草古典データベースの構築

中国薬草古典「証類本草」データベース：『証類本草』に記載されている生薬 11 品目を新たに公開した。また、I と同様に証類本草 DB システムを Linux サーバで再構築し、オンプレミスからクラウドに移行した。

III) 生薬標本の「二次元バーコード」化

当資料館に保存されている生薬標本の内、主にアーユルヴェーダ生薬約 1,000 点について、保管場所情報を示す二次元バーコードのシールを添付するとともに、二次元バーコード用 DB に登録した。

IV) 「民族薬物資料館」ニュースレターの刊行

当館の活動や館内の展示物などを紹介したニュースレター (第 19 号) を刊行した。

V) 「ひらめき☆ときめきサイエンス事業」の実施

日本学術振興会助成事業による「ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI～」として、平成 29 年 8 月 5 日 (土) に民族薬物資料館で中学生・高校生を対象とした和漢薬体験プログラム「和漢薬ってこんなに身近にあったんだ！～和漢薬体験してみよう～」を実施した。参加者は 21 名 (高校生 4 名、中学生 17 名)。

VI) 古典籍を活用した和漢薬に関する総合研究

江戸時代の古典籍『広恵濟急方』に記載されている生薬 139 種類について、救急療法を抜き出してまとめ、それらを民族薬物 DB に収載し公開した (国文学研究資料館との共同研究)。

VII) 一般公開

第 32 回民族薬物資料館一般公開：平成 29 年 11 月 25 日 (午前 9 時 30 分～午後 4 時)

1日2回各1時間、「補中益気湯」、「十全大補湯」、「大建中湯」などの頻用漢方処方配合生薬を特別展示して解説を行い、続けて館内を案内した。併せて、東京農業大学の御影雅幸教授を招き、和漢薬講座『生薬の国産化について』を開講した。来館者は65名。

◇学会報告（*：特別講演，シンポジウム，ワークショップ等）

- 1) 小松かつ子. 『広恵濟急方』に見る江戸時代の民間救急療法. 大規模学術フロンティア促進事業「日本語の歴史的典籍の国際共同研究ネットワーク構築計画」第3回日本語の歴史的典籍国際研究集会；2017 Jul 28-29；東京.
- 2) 小松かつ子. 『広恵濟急方』に見る江戸時代の民間救急療法. 日本薬史学会2017年会；2017 Oct 28；埼玉.

◇原著論文

- 1) Zhou S. S., Xu J., Tsang C. K., Yip K. M., Yeung W. P., Zhao Z. Z., Zhu S., Fushimi H., Chang H. Y., Chen H. B.: Comprehensive quality evaluation and comparison of *Angelica sinensis* radix and *Angelica acutiloba* radix by integrated metabolomics and glycomics. J Food & Drug Anal., 2018. doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.015.

◇その他

- 1) 伏見裕利. 「日本語の歴史的典籍の共同研究ネットワーク構築計画」. 国文学研究資料館ニュースレター. 2017 Jan; 7:6-7.
- 2) 小松かつ子. 江戸の医書今に生かす. 北日本新聞. 2017 Jun 18.

◇共同研究

国内

- 1) 相田満, 岩橋清美 (国文学研究資料館)：古典籍を活用した和漢薬に関する総合研究, 2015～2017.

◇研究費取得状況

- 1) 日本学術振興会主催, ひらめき☆ときめきサイエンス, 和漢薬体験プログラム「和漢薬ってこんなに身近にあったんだ！～和漢薬体験してみよう～」, 32.9万。

◇記録

I) 見学者 (2017年4月1日～2018年3月31日)

来館者総数：835名 (日本人676名, 外国人159名)

案内総回数：74回 (日本人57回, 外国人17回)

外国人の国名(人数) 台湾(40), 中国(34), ミャンマー(25), ベトナム(21), 韓国(11), タイ(5), アフガニスタン, アメリカ, インドネシア, ザンビア, スリランカ, ハンガリー, ブラジル, モンゴル(各2), インド, タンザニア, パプアニューギニア, フィリピン, フランス, マラウイ, モルドバ(各1)

主な来館者の所属先 【海外】台湾 (開南大学), 中国 (青海省技庁, 北京大学, 内蒙古大学, 広東薬科大学他), ミャンマー (保健・スポーツ省他), 韓国 (ソウル大学他), ベトナム (国立薬物研究所他), タイ (コンケン大学), ハンガリー (大使館), 国際厚生事業団他

【国内】文部科学省，日本学術振興会，北陸経済連合会，国公立大学 8 校，国内公立高校 4 校，富山市民大学講座，富山市，他

Ⅱ) 民族薬物データベース (2017 年 4 月 1 日 ~2018 年 3 月 31 日)

アクセス数 : 15,791 件

Ⅲ) 証類本草データベース (2017 年 4 月 1 日 ~2018 年 3 月 31 日)

アクセス数 : 7,759 件

専門検索登録者数 : 47 名 (全 382 名)

活動記録

2017年度 和漢医薬学総合研究所活動記録

- 4月11日 東西医薬学交流セミナー
第395回和漢医薬学総合研究所セミナー
辻 泰弘 博士（薬学部 医療薬学）
クリニカルファーマコメトリクスで抗菌化学療法を再考する
- 4月25日 東西医薬学交流セミナー
第396回和漢医薬学総合研究所セミナー
歌 大介 博士（薬学部 応用薬理学）
電気生理学的手法を用いた脊髄後角における侵害情報調節機構の解析
～電気生理学的手法の紹介とその活用法を交えて～
- 5月9日 東西医薬学交流セミナー
第397回和漢医薬学総合研究所セミナー
池田 真行 博士（理学部 生物学科）
体内時計を制御する細胞内カルシウムシグナリング
- 5月23日 東西医薬学交流セミナー
第398回和漢医薬学総合研究所セミナー
高雄 啓三 博士（生命科学先端研究支援ユニット）
遺伝子改変マウスの行動解析を起点とした精神疾患研究
- 6月13日 東西医薬学交流セミナー
第399回和漢医薬学総合研究所セミナー
Suresh Awale 博士（和漢医薬学総合研究所 天然薬物開発分野）
Discovery of natural anti-cancer agents targeting cancer cells' tolerance to nutrition starvation
- 6月26日 JICA 草の根技術協力事業
富山・ミャンマー
伝統医薬品・プライマリーヘルスケアシンポジウム2017（パレプラン高志会館）
富山・ミャンマーの保健医療の現在と未来
富山・ミャンマーの伝統医薬品の現在と未来
- 6月27日 東西医薬学交流セミナー
第400回和漢医薬学総合研究所セミナー
Nwet Nwet Win 博士（和漢医薬学総合研究所 天然物化学分野）
Diterpenoids Vpr Inhibitors from *Kaempferia pulchra* Rhizomes Collected in Myanmar
- 7月11日 東西医薬学交流セミナー
第401回和漢医薬学総合研究所セミナー
當銘 一文 博士（和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野）
がん関連シグナル伝達に作用する生物活性天然物の探索

- 7月25日 東西医薬学交流セミナー
第402回和漢医薬学総合研究所セミナー
佐々木 史 博士（富山県農林水産総合技術センター森林研究所）
冬虫夏草菌サナギタケの特異的検出法を用いた研究
- 8月5日 中高生を対象とした和漢薬体験プログラム「和漢薬ってこんなに身近にあったんだ！」
～和漢薬体験してみよう～（民族薬物資料館）
- 8月5～6日 The 1ST International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research (The Sukosol hotel, Bangkok, Thailand)
- 8月9～10日 第22回和漢医薬学総合研究所夏期セミナー（民族薬物資料館，臨床講義室）
和漢薬：その秘めた可能性を解き明かす
- 9月12日 東西医薬学交流セミナー
第403回和漢医薬学総合研究所セミナー
豊岡 尚樹 博士（工学部 生命工学科）
メディシナルケミストリーを指向した有機合成
- 9月26日 東西医薬学交流セミナー
第404回和漢医薬学総合研究所セミナー
春木 孝之 博士（理工学研究部 知能情報工学）
数値シミュレーションと異分野への応用について
- 10月10日 東西医薬学交流セミナー
第405回和漢医薬学総合研究所セミナー
高崎 一朗 博士（工学部 生命工学科）
中枢 PACAP-PAC1 受容体シグナリングに着目した新規鎮痛薬の創薬研究
- 10月24日 東西医薬学交流セミナー
第406回和漢医薬学総合研究所セミナー
小林 栄治 博士（医学部 免疫学）
がん抗原特異的 T 細胞療法を目指した T 細胞受容体の解析
- 11月8～9日 第15回国際伝統医薬シンポジウム・富山2017（富山第一ホテル）
第38回和漢医薬学総合研究所特別セミナーと合同開催
天然資源の活用を目指した研究最前線
- 11月14日 東西医薬学交流セミナー
第407回和漢医薬学総合研究所セミナー
服部 瑞樹 博士（医学部 麻酔科学）
ヒスタミンの敗血症性多臓器不全の増悪因子としての役割
- 11月25日 第32回民族薬物資料館一般公開
- 11月27日 和漢研セミナー
第408回和漢医薬学総合研究所セミナー
山西 芳弘 博士（九州大学高等研究院 生体防御医学研究所）

生体多階層システム研究センター システムコホート学分野)
機械学習とデータ駆動型ドラッグリポジショニングによる創薬

- 11月28日 東西医薬学交流セミナー
第409回和漢医薬学総合研究所セミナー
中町 智哉 博士 (理工学研究部 テンユアトラック若手育成部門)
神経ペプチド PACAP の神経保護作用と涙液分泌促進作用
- 12月4日 第7回 長崎大学熱帯医学研究所・富山大学和漢医薬学総合研究所交流セミナー
(長崎大学グローバルヘルス総合研究棟)
熱帯医学と和漢薬研究の新展開ー新しい医療体型の構築を目指してー
- 12月12日 東西医薬学交流セミナー
第412回和漢医薬学総合研究所セミナー
長谷川 英之 博士 (理工学研究部 知能情報工学)
高速超音波イメージングによる循環動態計測
- 12月14日 和漢研セミナー
第410回和漢医薬学総合研究所セミナー
合田 幸広 博士 (国立医薬品食品衛生研究所 薬品部)
日本における生薬及び生薬製剤の品質保証と、関連する規制及び今後の展望
川原 信夫 博士 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 薬用植物資源研究センター)
薬用植物国内栽培化の現状と課題ー薬用植物資源研究センターの取り組みを中心にー
- 12月15日 和漢研セミナー
第411回和漢医薬学総合研究所セミナー
下林 貢 博士 (バーゼル大学 Research associate)
TOR signaling in metabolism from yeast to human
- 3月5日 北京大学薬学院ー富山大学和漢医薬学総合研究所ジョイントシンポジウム
(北京大学)
- 3月12日 平成29年度 公募型共同研究 研究成果報告セミナー (民族薬物資料館3階会議室)
- 3月30日 和漢医薬学総合研究所運営協議会 (民族薬物資料館3階会議室)

和漢薬研究の科学基盤形成事業
平成29年度
共同利用・共同研究活動

一般研究 I

グリチルリチンによる DAMP:HMGB1 アイソフォームの分別制御と 抗炎症活性のスペクトラムに関する研究

申請代表者	丸山 征郎	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科システム血栓制御学	特任教授
所外共同研究者	大山 陽子	鹿児島大学病院検査部	医員
所内共同研究者	早川 芳弘	病態制御研究部門病態生化学分野	教授

■背景・目的

HMGB1 (High Mobility Group Box-1) は細胞核内で DNA の構造の維持、機能の発現に必須の核内タンパクである。HMGB1 ノックアウトマウスが胎生致死であることから本タンパクの重要性は示されている。

しかし、HMGB1 は、細胞の壊死、あるいは活性化に伴い、核から細胞質、細胞質から細胞外に遊離/放出される。そして細胞外では免疫系細胞を始めとする種々の細胞に発現している Toll Like Receptor (TLR) -4 (TLR-4)、TLR-2、RAGE (Receptor for AGE: Advanced Glycation Endproducts) を介して、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-18 などの炎症性サイトカインや、凝固線溶系因子類 (組織因子、Plasminogen activator Inhibitor-1; PAI-1) などの発現を誘導し、生体防御 (免疫や止血) 系に危険信号因子、いわゆる “alarmins” として作用する。これが時間的、空間的に過剰、遷延、あるいは逸脱して作用すると、全身性炎症反応症候群 (Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) や播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation; DIC)、敗血症性ショックなどのメディエータとして働く。

このように HMGB1 は、本来は核内に在って核内秩序と諸細胞の機能発現に必須の役割を果たすが、組織損傷などの壊死細胞から細胞外に放出されると、炎症・免疫反応、凝固反応などを誘導する。このことから、HMGB1 は代表的な Damage Associated Molecular Pattern (DAMP) と目され、その制御はショック、全身性炎症症候群 (SIRS)、DIC などの病態での最重要の治療方策となってきた (図 1)。

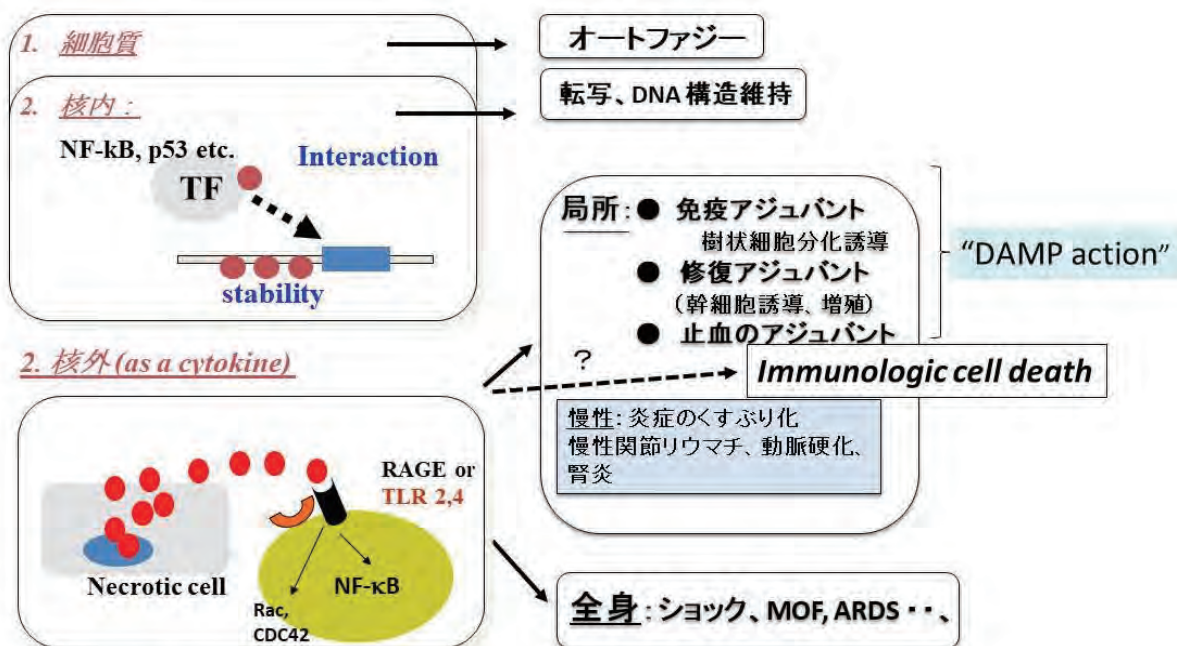


図 1. HMGB1 とは?: High Mobility Group Box-1 protein

そのようななか、Bianchi ME らは、Glycyrrhizin が HMGB1 と結合しその活性を中和することを明らかにした (Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. Chem Biol. 2007 Apr;14(4):431-41)。一方その後には、HMGB1 は3個のSH基を有しており、諸細胞から放出されると全還元型、部分酸化型、全酸化型の3型をとること、そして全還元型は細胞遊走能、部分酸化型は集簇してきた細胞の活性化とケモカイン産生能を、全酸化型はこれらの反応をブロックすることが判明してきた(図2)。

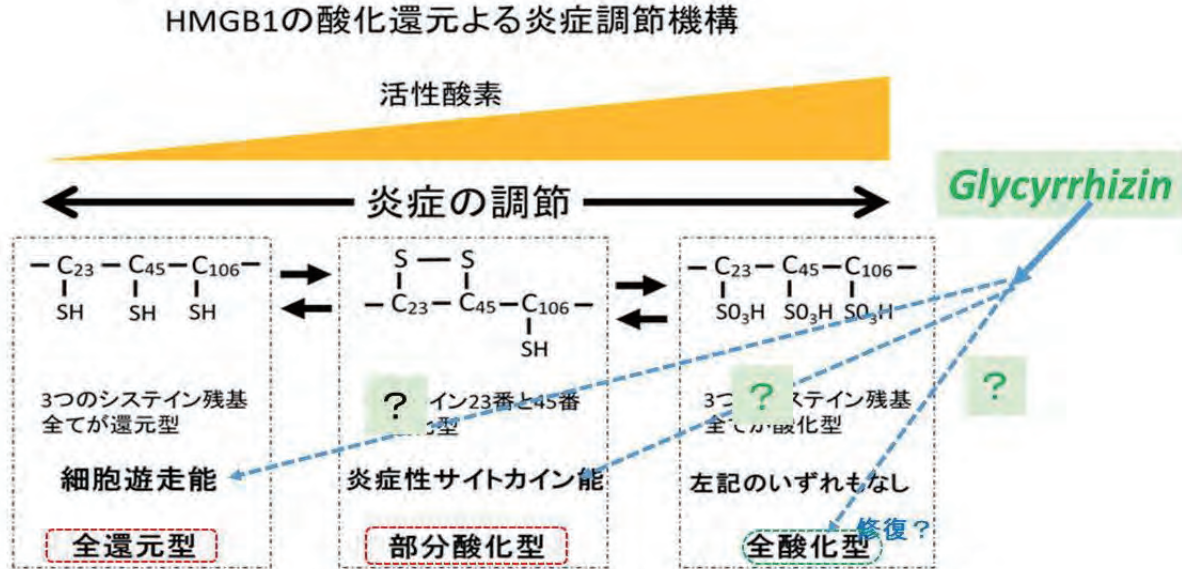


図2. HMGB1の3アイソフォーム

すなわち、全還元型、部分酸化型が DAMP であり、全酸化型は RAMP (Resolution Associated Molecular Pattern) として働くというわけである。さらに最近、免疫系の活性化を誘導する細胞死: Immunologic Cell Death という新規の細胞死の概念も提唱されてきて、癌の治療領域で注目されてきている。この細胞死は、癌において、免疫性抗腫瘍活性を發揮誘導するということから、この免疫誘導性細胞死と HMGB1 の関係性も注目されてきているほか、放射線による癌治療の場合の局所 X 線照射による全身性効果; abscopal effect との関連もあるものと申請者らは想定している。これら immunologic cell death, abscopal effect との関連をも視野に入れて、HMGB1 とグリチルリチンの関係は考察されるべきであろうと筆者らは考えている。

そこで今回の研究では、アデニン投与腎不全ラット(横澤隆子ら、農芸化学雑誌、1981, 95, 811-816)を作製して、①病態形成への HMGB1 の関与、②グリチルリチンの効果、さらにグリチルリチンの HMGB1 の3フォームに及ぼす影響の選択性について検討した。

すなわち③果たして“グリチルリチンが結合して、HMGB1 の向炎症活性、procoagulant 活性を制御するのはどのアイソフォームの HMGB1 か?”ということである(図2)。

また、ex vivo study として、培養腎尿細管細胞、培養単球・マクロファージにおけるサイトカイン、HMGB1 の産生・放出に対するグリチルリチンの影響を検討した。

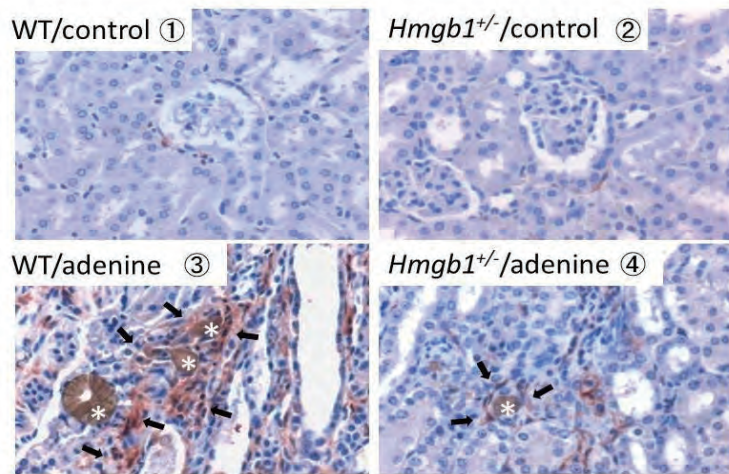


図3. アデニン投与ラットの腎病理像
腎内(糸球体と尿細管)にアデニン結晶の蓄積とマクロファージの集積が観られ(③)、これらの細胞はHMGB1を強く発現していた。HMGB1+/-KOマウスではマクロファージ浸潤が抑制されていた(④)。

■結果・考察

①アデニン投与ラットの病態

横澤の報告に従い水溶液化アデニンを飲水投与した場合のラットは、実験の進行とともに、緩徐進行性の腎障害、さらには腎不全状態に陥り、多飲・多尿を来した。

病理学的検討では、腎内(糸球体内、尿細管)にはアデニン結晶とマクロファージが集簇し(図3)、MCP-1、HMGB1とその受容体(RAGE)、TLR-4(図4)、TNF α (図5)が強く発現していた。

②培養細胞での検討

培養細胞(尿細管、単球・マクロファージ)を用いた検討では、アデニン刺激⇒尿細管細胞⇒MCP-1発現⇒単球/マクロファージ遊走・集簇・活性化⇒TNF α 産生・放出というループを形成して、これが vicious cycle の基盤となっていることが示唆され(図4、図5、図7、図8)、これには全還元型のHMGB1が関与していること(図4)、これに対し、グリチルリチンが抑制的に働いている傾向が示された(図6)。

■結論

①アデニン投与ラット(in vivo)の病態と病理的变化

アデニン投与ラットにおける病理的観察においては、実験の進行とともに、腎臓にアデニン結晶の強い沈着が観察され、加えて生化学的所見より、本ラットは腎不全状態に陥ったものと考えられた。アデニン結晶は糸球体のみならず、尿細管周囲にも沈着していた。これらの尿細管はHMGB1を発現していた。そしてマクロファージの集簇も観察された。これらのマクロファージにおいても、HMGB1が核内のみならず、細胞質にも発現していた。またTNF α 、MCP-1も強く発現していた。

②HMGB1を中核とした炎症性サーキット形成

培養細胞系実験においては、【アデニン⇒尿細管細胞⇒MCP-1、HMGB1放出⇒RAGE, TLR-4発現増強⇒単球集積⇒マクロファージへの分化⇒TNF α 、HMGB1産生・放出】というサーキットが成立しており、これによる悪循環が形成されているものと推定された(図7、図8)。HMGB1の部分ノックダウンマウス(HMGB1^{-/+})ではこれら炎症性細胞とサイトカインループ形成は抑制されていた(図3)。

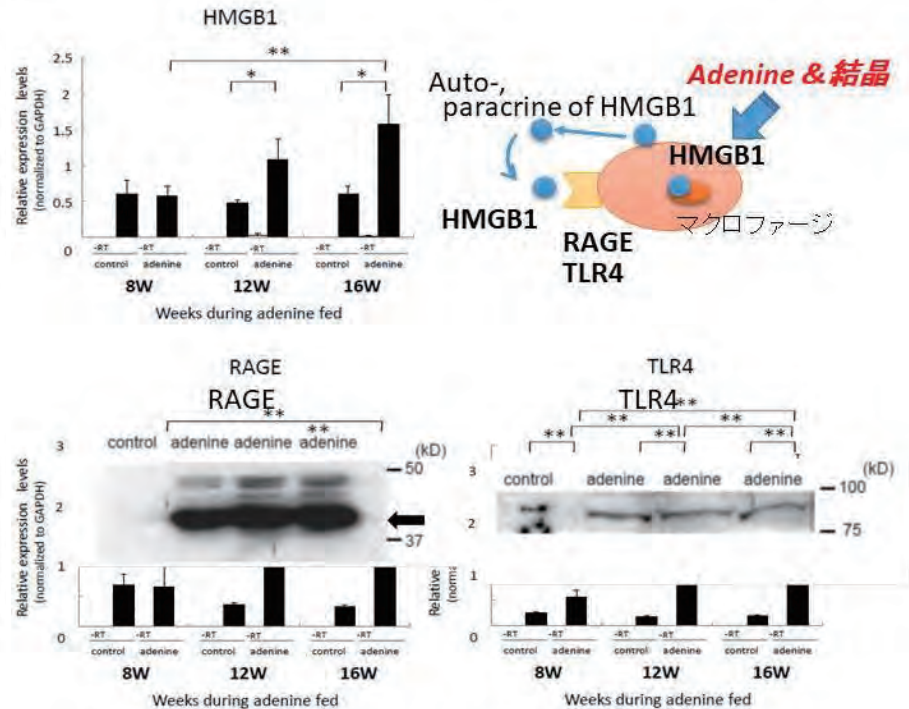


図4. アデニン投与による腎障害の分子細胞病態(推定)とHMGB1-RAGE/TLR4 axis

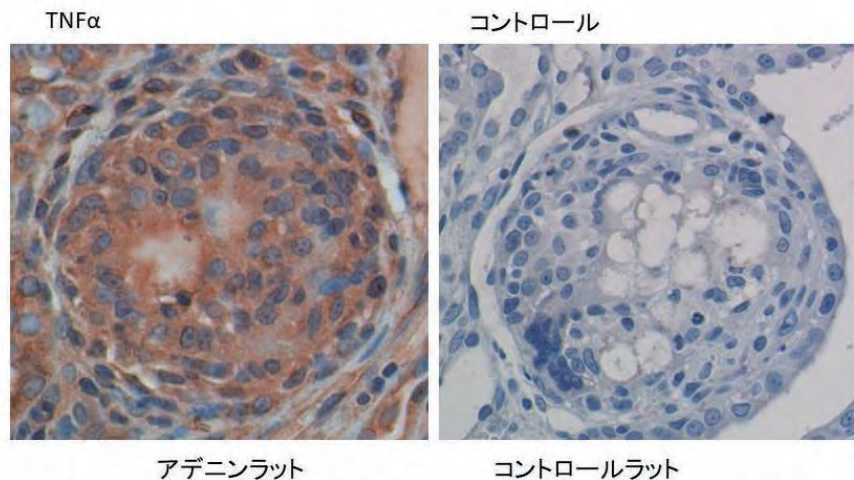


図5. アデニン投与腎不全ラットにおけるTNF α の強い発現

③グリチルリチンの効果、特に HMGB1 の3アイソフォームに対する分別的抑制効果

今回のアデニン慢性投与による HMGB1 を中核とした malignant inflammatory cycle, すなわち【アデニン→尿細管細胞→MCP-1、HMGB1 放出→RAGE, TLR-4 発現増強→単球集積→マクロファージへの分化→TNF α 、HMGB1 産生・放出】というサーキット形成による炎症の悪循環に対して、グリチルリチンが抑制的に働いていることは in vivo, ex vivo の実験から示唆されたが (図6)、果たして HMGB1 の3つのアイソフォームに対して分別して結合・抑制しているのか、否かについては、今回の実験では解明しきれなかった。これは HMGB1 の酸化還元型の厳密な調整が不完全であったためと考えられ、今後検討すべき課題として残った。

④アデニン投与ラットの腎機能不全

一方、アデニン投与ラットは多飲、多尿状態となり、Chronic Kidney Disease (CKD) 状態に陥ったが、これは尿細管へのアクアポリン1 (AQP-1) の発現低下によるものと考えられた (data not shown)。この AQP-1 の発現低下は五苓散投与で一部回復し、ラットの多飲・多尿は軽減した (図8)。

⑤残された課題

今回の実験では確かにグリチルリチンが、培養細胞系において HMGB1 による MCP-1 の発現放出を抑制したが、in vivo のアデニン投与 CKD モデルの病理病態軽減に関しては明確には確認しえなかった。さらにグリチルリチンによる HMGB1 isoform、すなわち全還元型、部分酸化型、全酸化型の分別抑制効果についても明確には証明し得なかった。

また、アデニンの慢性的投与により、ヒトにおける CKD 類似の病態を再現しえた。これは現在増加しつつある高齢者の高尿酸血症患者の CKD のモデルになりうるものと考えられた。そして、このような患者においては、高尿酸血症の治療とともに、グリチルリチン、あるいはグリチルリチンを含む漢方薬などの投与が腎機能障害の進行に抑制的に働く可能性が示唆されるものと考えられた。

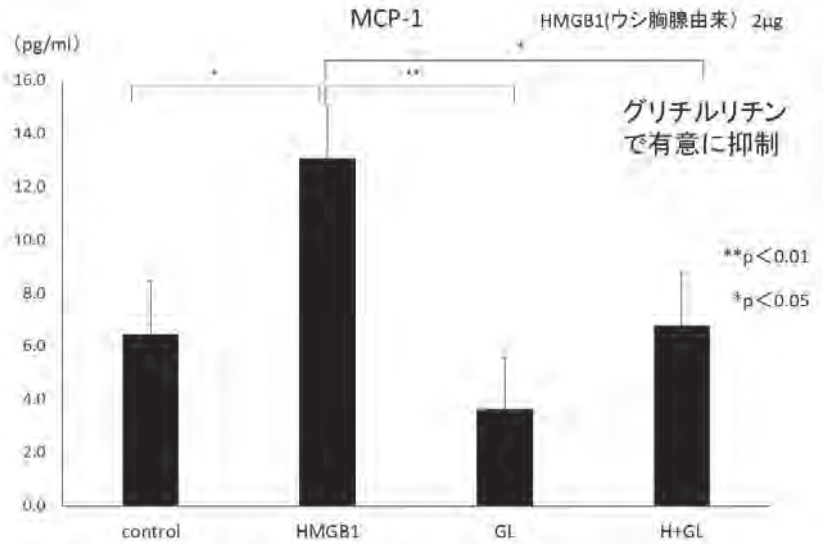


図6. HMGB1によるMCP-1の発現に対するグリチルリチンの抑制効果

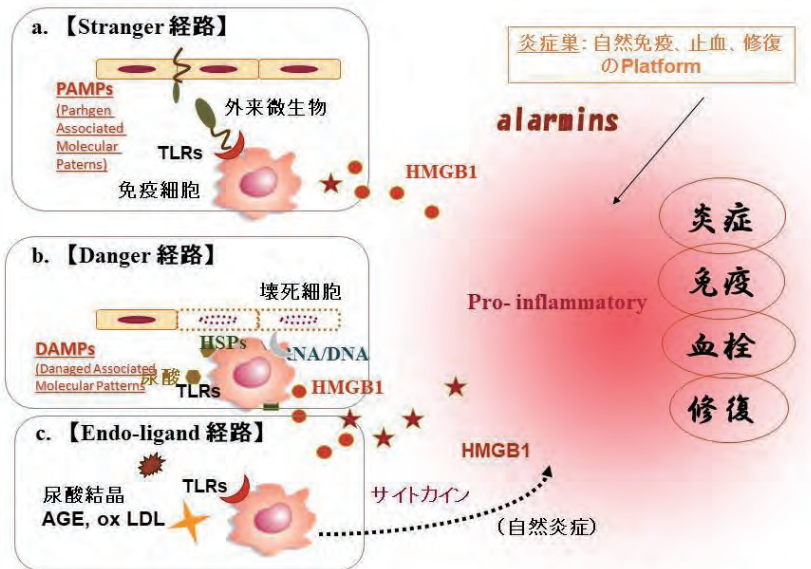


図7. アデニン腎症ラットにおけるDAMP:HMGB1の動態

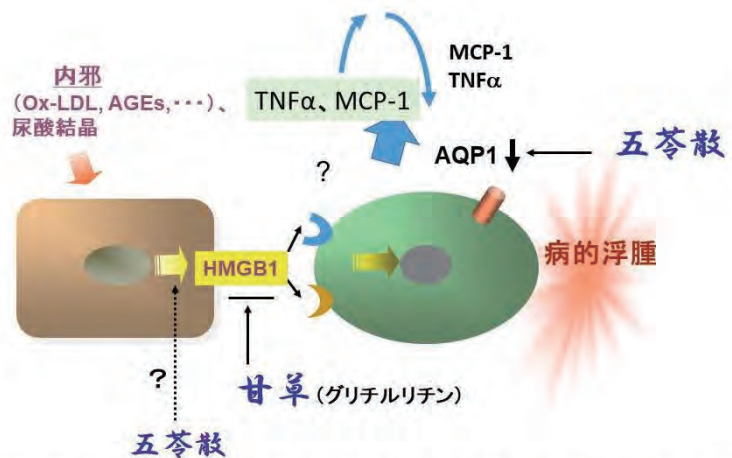


図8. 本モデルにおける腎病態・生理と漢方薬の効果:五苓散と甘草の効果
甘草と五苓散の投与は本モデルにおける腎病変と尿量増加を抑制した。その作用モデル

漢方薬由来化合物のヒト卵管上皮細胞の繊毛動態へ与える影響の解析

申請代表者	岩野智彦	山梨大学大学院総合研究部医学域	助教
所外共同研究者	竹田 扇	山梨大学大学院総合研究部医学域	教授
所外共同研究者	朱 茂碧	山梨大学大学院総合研究部医学域	大学院生
所内共同研究者	柴原直利	臨床科学研究部門漢方診断学分野	教授

■背景・目的

妊娠初期段階である排卵・受精・受精卵成熟における生理機構の解明は、近年の不妊症や子宮外妊娠などの異常妊娠の病態解明、それを受けた治療の基盤となる研究である。

卵管は、卵巣で作られた卵を子宮へ運ぶ通路としての役割を果たすだけでなく、受精卵の発達や精子との受精環境を整える管腔臓器である。卵管内壁を構成する上皮細胞は多数の運動繊毛を有しており、その同期運動が管内の流動性を生み出している。その流動性が乱れると、卵巣から子宮方向への卵細胞の動きやホルモンの流動が不足し、受精効率の低下や子宮外妊娠、受精卵の成熟異常につながると考えられている。繊毛運動の重要性は古くから知られているが、外来因子による繊毛の運動調節機構の詳細は未だ明らかでない。

また、卵巣がんが卵管採の上皮細胞に由来し、ガン化した細胞が転移するのではないかと近年考えられており、その病態の原因究明は治療や予防の点において重要なテーマである。しかしながら、その発生機序には未だ分かっていないことが多く、卵管上皮細胞の分化機構の解明は発癌機構の究明にもつながる。

一方、卵管上皮と似た組織構造を持つ気管上皮では、鼻や口から入ってきた塵や細菌などが粘液に付着し、繊毛細胞の繊毛運動による去痰機能を持つ。ノックアウトマウス等を用いた解析から、気管上皮細胞の発生・分化機構は解明されつつあり、繊毛運動と疾患の関連も示されている。繊毛の運動は、繊毛の柱を構成する微小管の上をモータータンパク質であるダイニンがATPの加水分解によるエネルギーを使って滑り運動を行うことで制御されている。実際に、気管上皮繊毛細胞の繊毛運動はATP依存性のカルシウム流入やcAMPの増加に影響を受けている(Hayashi, T., et al., 2005, *Exp. Physiol.*)。また、漢方去痰薬である龍角散(株式会社龍角散)は、その機序は不明であるが粘液の分泌および繊毛運動の活性化を効能として謳っており、漢方薬と繊毛運動の間には何らかの関係があることが示唆される。

そこで、気管繊毛と似た構造である卵管上皮の繊毛運動に漢方薬がどのような影響を与えるかを解析する事で漢方を不妊治療に役立てることを企図した。すでに、月経不順の改善や不妊症治療に際しては、当帰芍薬散(TJ-23)や桂枝茯苓丸(TJ-25)が既に処方され、その有効性が認められているところである。それらがホルモン分泌に対する効果があることはラットを用いた薬理試験によって示されているが、女性生殖器に対して及ぼす直接的な作用とその機序は分かっていない。そこで本研究では、漢方薬成分が直接卵管細胞に作用して、卵管の恒常性維持に寄与しているのかどうか、またその分子機序を明らかにすることを目的とした。

■ 結果・考察

方法

卵管上皮細胞のin vitro培養

実験に使用したブタ卵管は食肉衛生検査所から購入した。卵管壁を構成する上皮細胞はスクレイパーで筋層と分離し、100U/mL collagenase type IV, 10 μ g/mL DNase Iを37°C中1時間処理後、collagen type Iコート済プラスチックプレート上にて培養した。1x10⁵個の細胞は、24-well Transwellに播種し、2日後に頂端側の培地を除き、基底側には基礎培地(DMEM; Ham's F-12, 1% GlutaMax, 2% B27 supplement, 10ng/mL hEGF, 1mM nicotinamide, 0.5 μ M SB431542)を用いた。上皮細胞の分化成熟を促すために、Air-Liquid interface (ALI) 培養を10~15日間行った。ATPナトリウム塩(A6419-1G)はSigmaから購入した。

漢方薬抽出液の調製

漢方方剤の生薬分量により構成される100gの生薬(株式会社栃本天海堂)に水道水500mLを加え、煎じ器「ニューマイコン漢方煎じ器文火楽々」(EK-SA10型,350w)にて火力中で50分間煎じた。得られた煎じ液をガーゼ(テトラゼNo.2, 白十字)に通し、凍結真空乾燥法(EYELA,FDU-2200)により抽出粉末を作成した。収率は、桂枝茯苓丸8.697%、当帰芍薬散14.795%であった。

免疫染色

4%PFAで固定されたブタ卵管凍結切片および初代細胞に対して、0.1% TritonX-100による膜透過処理後、5%Normal goat serumによるブロッキング処理を行った。免疫染色の一次抗体として、マウスモノクローナルアセチル化チューブリン(ac-tub)抗体 (Sigma, 1:1000)を用いた。二次抗体としてAlexa488 anti-mouse IgG (Thermo)を用いた。核は1 μ g/ml DAPI (Dako)で染色した。

ハイスピードカメラを用いた繊毛運動解析

Olympus microscopeに接続されたハイスピードカメラ(Allied Vision Prosilica GE680)を用いて、トランスウェル上の初代培養卵管細胞の繊毛運動を撮影した(175fps)。取得した動画はTI workbench (早稲田大学井上貴文先生開発)を用いて解析した(Inoue, T. et al., 2018, *Microscopy*)。

PESI-MS(probe electrospray ionization mass spectrometry)を用いたメタボローム解析

6-wellディッシュに培養した卵管上皮細胞を、水または当帰芍薬散(500 μ g/mL)を含む培地で24時間培養を行った。その後細胞をスクレイパーで1.5mLチューブに回収し、PBSで洗浄後、遠心分離にて細胞ペレットにした。細胞ペレットは、50%エタノール200 μ L中でディスポーザブルペッスルにてホモジナイズした。ホモジネートは遠心分離機にて不溶画分と分離後、その上清をLCMS-2020(島津製作所)を用いてPESI-MS解析した(Yoshimura, K., 2011, *Anal. Biochem.*)。

尚、研究計画ではブタおよびヒトの卵管を用いる予定であったが、ヒトの卵管は実験に十分な量が得られなかったため、漢方薬投与実験には使用しなかった。

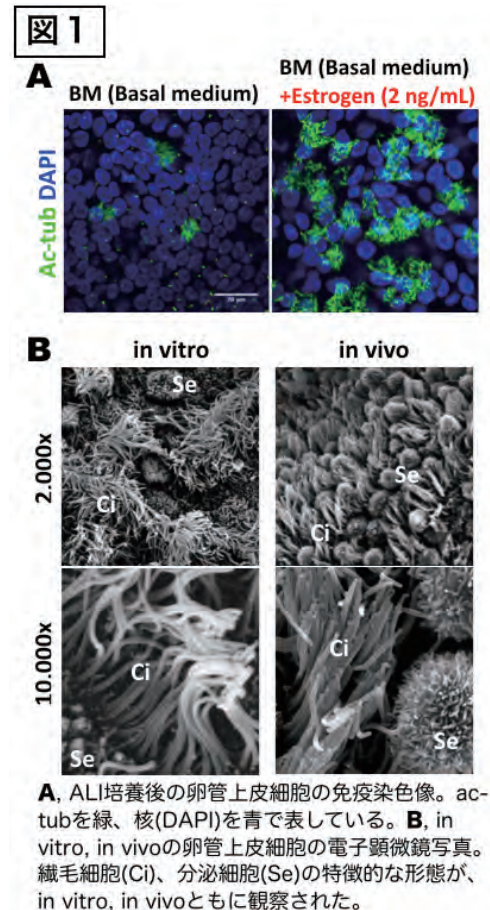
結果と考察

(1) 初代培養卵管上皮の分化とその構造

前年度の研究において我々はin vitroでの卵管上皮培養法を確立し、その実験系を用いて漢方薬成分が卵管上皮細胞の分化および動繊毛の動態に与える影響を解析した。ブタ卵管から分離した上皮細胞は、エストロゲン(2ng/mL)を添加した基礎培地でALI培養を2週間程度行うと、ac-tub陽性の繊毛細胞が分化した(図1A)。走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて上皮細胞の組織構造を観察すると、長い複数の運動繊毛を持つ繊毛細胞(Ci)と短い微繊毛を持つ分泌細胞(Se)が、生体由来の卵管内腔面とほぼ同じ比率で出現していることが分かった(図1B)。これらの結果は、初代培養卵管上皮細胞は細胞運命決定とその組織構築が生体内を再現していることを示しており、この初代培養条件下で漢方薬抽出液の卵管上皮細胞の繊毛運動性への効果について実験を行った。

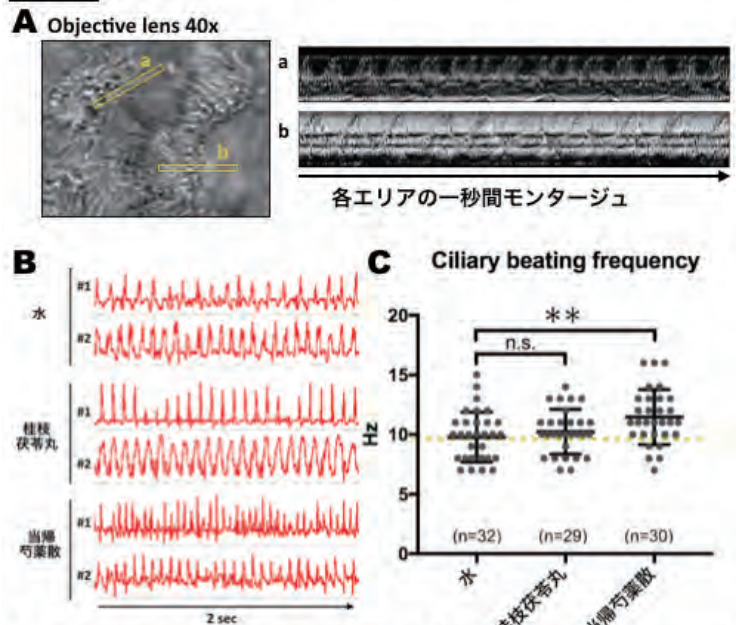
(2) 卵管上皮繊毛細胞の動繊毛の運動への影響(図2)

エストロゲン2ng/mLを含む培地で30日間ALI培養し、卵管上皮細胞を成熟させた。その細胞に対して500μg/mlの漢方薬抽出液を基底側の基礎培地に加え、24時間後にハイスピードカメラを用いて繊毛細胞の繊毛運動を撮影した(図2A)。繊毛打頻度(Ciliary Beating Frequency: CBF)はTIworkbenchソフトウェアを用いて解析した(図2B)。その結果、ネガティブコントロールとしての水を加えられた繊毛細胞は、一秒間に約9.8回の鞭打ち運動を行っていたが、当帰芍薬散を加えられた場合にはそれが約11.7回になり有意に増加していた。一方、桂枝茯苓丸の場合には約10.2回で、それはネガティブコントロールと有意な差ではなかった(図2C)。したがって、繊毛運動の促進に関しては、桂枝茯苓丸よりも当帰芍薬散が効果的であることが示された。



A, ALI培養後の卵管上皮細胞の免疫染色像。ac-tubを緑、核(DAPI)を青で表している。**B**, in vitro, in vivoの卵管上皮細胞の電子顕微鏡写真。繊毛細胞(Ci)、分泌細胞(Se)の特徴的な形態が、in vitro, in vivoともに観察された。

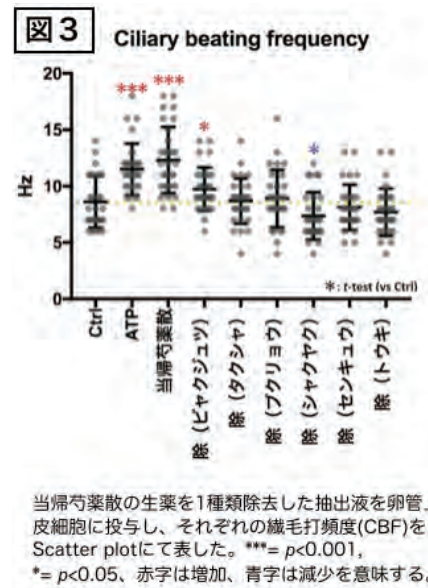
図 2



A, 卵管上皮細胞の微分干涉顕微鏡で撮影した動画のキャプチャ写真(左)。その黄枠の領域(a,b)に対して、1秒間のモニター写真を右に示した。**B**, TIworkbenchで解析した2秒間の繊毛運動を示した。漢方薬投与群に対し、各々代表的な2領域(#1,#2)の繊毛振幅を示した。**C**, 各々の処理において、1秒間あたりの繊毛打頻度(CBF)をScatter plotにて表した。**= p<0.01

(3) 繊毛の運動性に影響を及ぼす当帰芍薬散中の生薬の探索(図3)

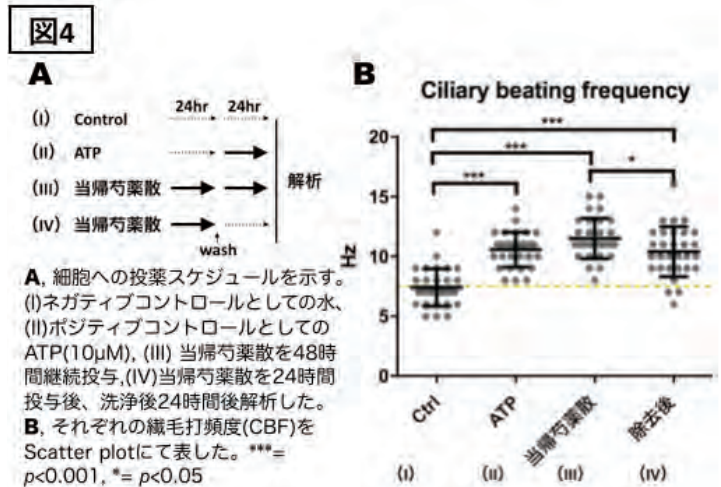
次に、当帰芍薬散に含まれるどの生薬が繊毛運動の促進に寄与しているかを調べるために、当帰芍薬散に含まれる6種類の生薬(ビャクジュツ・タクシャ・ブクリヨウ・シヤクヤク・センキュウ・トウキ)のうち一つを除いた5種の混合抽出液の効果を検討した。その抽出液それぞれに対して(2)と同様の繊毛運動性解析を行った。すると、ビャクジュツを除いた場合にはわずかな運動促進効果は残っていたが、タクシャ・ブクリヨウ・センキュウ・トウキを除いた場合にはネガティブコントロールと差がなかった。一方で、シヤクヤクを除いた場合には、ネガティブコントロールよりも運動性が低下した。つまり、当帰芍薬散は6種類の生薬の混合物である場合にのみ、繊毛運動促進に対して効果的であることが明らかとなった。



当帰芍薬散の生薬を1種類除去した抽出液を卵管上皮細胞に投与し、それぞれの繊毛打頻度(CBF)をScatter plotにて表した。***= $p < 0.001$, * = $p < 0.05$, 赤字は増加、青字は減少を意味する。

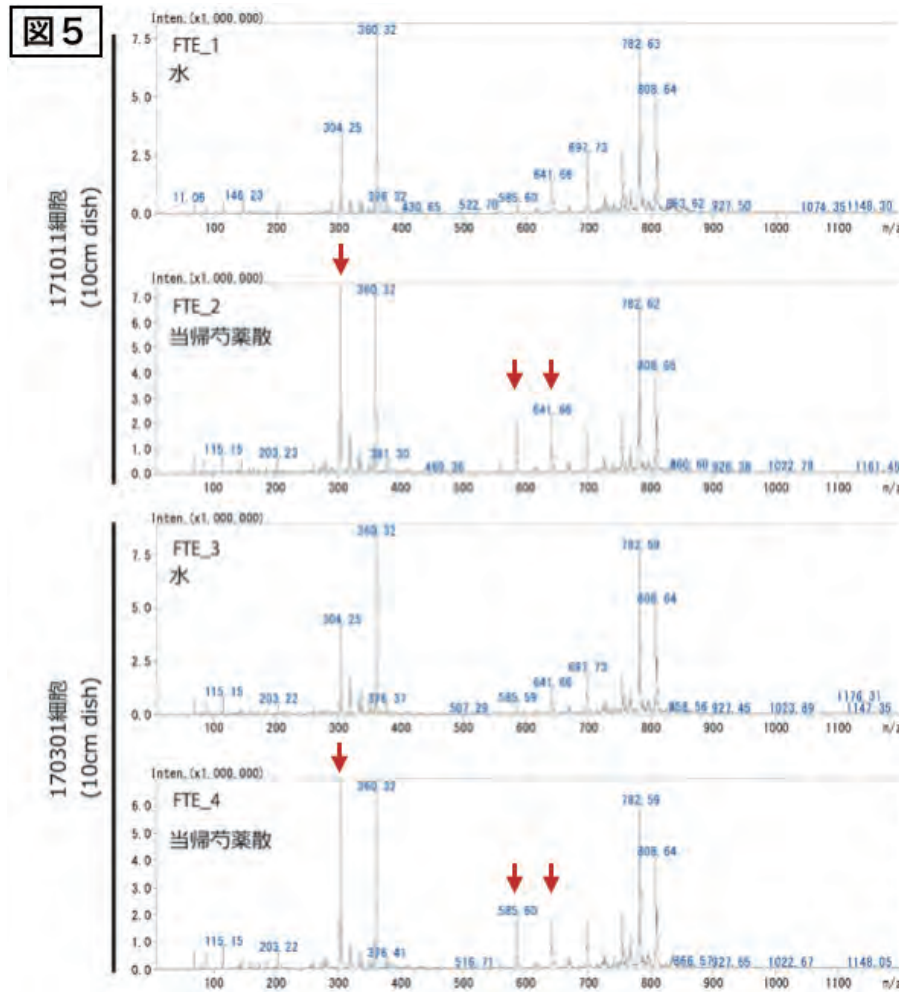
(4) 当帰芍薬散で誘導される繊毛運動促進の持続性(図4)

当帰芍薬散に含まれる6種類がどれも必要なことが分かったが、その効果が繊毛に対する一時的な効果か、細胞内の代謝変化によるものかという疑問が残った。それを明らかにするために、当帰芍薬散を投与して24時間後に洗浄を行い、さらにその24時間後も繊毛運動性が持続するかどうかを検討した(図4A)。すると、当帰芍薬散の継続的な処理は、ポジティブコントロールとしてのATP(10 μ M)と同程度の繊毛運動促進を示し、さらに洗浄後24時間経た細胞でも促進効果が持続していた(図4B)。このことは、当帰芍薬散が繊毛に対して直接運動性を高める効果を及ぼすというよりは、むしろ細胞内のシグナル伝達や代謝変化を引き起こしたことを示唆している。



(5) 当帰芍薬散を添加された細胞のメタボローム解析(図5)

当帰芍薬散が細胞内のどのような代謝変化を引き起こしているのかを調べるために、解剖学講座細胞生物学教室の吉村健太郎博士の協力の下、PESI-MSを用いて細胞のメタボローム解析を行った。採取日の異なる2種類のブタ初代培養細胞に対して水または当帰芍薬散(500 μ g/mL)を投与し、24時間後に細胞溶解液を調製した。ポジティブイオンモードでの測定結果から、2種類の独立したコントロール細胞はほぼ同様のピークパターンを示しており、異なるブタ個体からでも初代培養細胞はメタボロームに大きな差がないことがわかった。一方で、当帰芍薬散を投与された細胞は、コントロール細胞と異なるピークパターンを示し、特に $m/z=304.25$, 585.60 , 641.66 のイオン強度が増加していた。このことは、24時間の当帰芍薬散投与により、細胞内のメタボリズムに確かな変化が起こったことを示している。



水または当归芍薬散を投与した2種類 (171011、170301細胞) の卵管上皮細胞抽出液に対する質量分析を行った。ポジティブイオンモードで測定した m/z 10-1200間での平均化スペクトルを示している。赤矢印は特に変化のあるピークを指している。

■ 結論

卵管上皮細胞のin vitro培養システムを利用し、不妊治療にすでに使われている漢方薬、当归芍薬散・桂枝茯苓丸、卵管上皮細胞に対する効果について検討したところ、当归芍薬散が繊毛運動に対して促進効果を持つことを明らかにした。その効果の持続性という点では、一時的に投与し洗浄後24時間経ても繊毛運動が促進され続けていることが分かった。次に、当归芍薬散中のどの生薬がその効果に決定的であるかを明らかにしようと試みたが、結果的に構成する6種類の生薬が一つでも欠けるとその効果が十分に発揮できないことがわかった。このことは生薬の混合物が協同的に細胞に作用し、細胞内の様々なシグナル伝達経路や細胞内代謝を変化させ、結果として繊毛運動の活性化に現れていることを示唆している。そこで我々は、網羅的に細胞内の代謝変化を調べるためにPESI-MSを用いてメタボローム解析を行った。実際に、当归芍薬散投与された細胞では、メタボリズムが明らかに変化していた。今回の実験結果で増加していた $m/z=304.25$, 585.60 , 641.66 の分子は、当归芍薬散そのものから抽出される主要な成分Paeoniflorin ($[M+Na]^+$: $m/z=503$)など(Chen L., et al., 2009. *J. Pharm. Biomed. Anal.*)には合致しないことを確認している。つまり、これらの分子は当归芍薬散の刺激により細胞内で生成されていると考えられるが、具体的な分子の同定には至らなかった。将来的に、分子代謝マップを具体的に明らかにすることで、繊毛運動の活性化メカニズムについて説明出来ると考えられる。

車前子成分を基盤とした抗がん薬誘発末梢神経障害性異常感覚の予防・治療薬シーズの同定

申請代表者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	准教授
所外共同研究者	歌 大介	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	助教
	前坂 未紀	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	学部生
所内共同研究者	小松 かつ子	資源開発研究部門生薬資源科学分野	教授
	當銘 一文	資源開発研究部門生薬資源科学分野	准教授

■背景・目的

抗がん薬によるがん化学療法は、がん患者にとって非常に重要な治療法であるが、その副作用が、臨床的に問題となっている。特に、抗がん薬投与によって誘発される痛みやしびれなどの末梢神経障害は、患者の生活の質の低下に加え、抗がん薬治療の休薬の指標ともなっており、がん患者の治療の妨げとなっている。しかし、このような末梢神経障害は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬等の薬物ではコントロールが難しく、新たな薬物の開発が望まれている。

牛車腎気丸は、十種の生薬（地黄、山薬、山茱萸、茯苓、沢瀉、牡丹皮、桂皮、附子、牛膝、車前子）から構成される漢方方剤であり、抗がん薬投与患者における末梢神経障害に対しての有効性が報告されている。我々は、これまでにパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が牛車腎気丸の繰り返し投与により抑制されること、また、牛車腎気丸の構成生薬のうち車前子からの抽出エキスにアロディニアの憎悪抑制作用物質が含まれていることを明らかにした。そこで、昨年度、本共同研究において、車前子の熱水抽出物の 20%メタノール溶出画分に抗アロディニア効果を見出した。さらに、本画分を ODS-MPLC により 7 つのフラクションに分け、その内 1 つのフラクションにパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用が見出された。このフラクションを C30-HPLC にて精製し、いくつかの化合物を得た。そのうち 2 種について ¹H-NMR、および高分解能 ESI-MS のスペクトル解析を行い、それぞれ aucubin および geniposidic acid と同定した。そして、この aucubin にパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用があること、その作用機序に末梢神経のシュワン細胞保護による脱髄抑制が関与することを明らかにした。

末梢神経障害を引き起こす抗がん薬は、パクリタキセルだけではない。そこで、本研究では、大腸がん主に用いられ、機械的アロディニアおよび冷ディセスセジア（*）（冷たい刺激に対して過敏状態）を誘発するオキサリプラチン投与マウスを用いて、アウクビンのこれら不快な異常感覚に対する効果を検討した。また、昨年度、車前子熱水抽出物を用いてメタノール並びに、ODS-MPLC で分画し、活性が確認されたフラクションを C30-HPLC にて精製し、得られた化合物で未解析のもの 2 種について解析を行った。

（*）ディセスセジア（dysesthesia：不快な異常感覚）

■結果・考察

<方法>

使用実験動物：

雄性 c57BL/6 系マウス

疼痛評価（機械的アロディニア）：

von Frey フィラメント（0.69 mN）をマウス後肢足蹠に軽くあて、その時生じる疼痛様反応をスコア化（スコア 0：無反応あるいは後肢の左右への移動、スコア 2：後肢の腹部方向への引き挙げ動作、スコア 3：後肢の振り動作あるいは舐め動作）することにより評価した。

疼痛評価 (冷ディセスセジア) :

アセトンをマウス後肢足蹠に作用させ、その時生じる疼痛様反応をスコア化 (スコア 0 : 無反応あるいは後肢の左右への移動, スコア 2 : 後肢の腹部方向への引き挙げ動作, スコア 3 : 後肢の振り動作あるいは舐め動作) することにより評価した。

オキサリプラチン誘発性ディセスセジアマウスモデル :

オキサリプラチン (3 mg/kg) をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後 10 日目をピークとする機械的アロディニアを生じる。また、投与後 3 日目をピークとする冷ディセスセジアが生じる。

パクリタキセル誘発性疼痛マウスモデル :

パクリタキセル (5 mg/kg) をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後 14 日目をピークとする機械的アロディニアを生じる。

トルイジンブルー染色 :

マウス吻側背部皮膚の凍結切片を用い、0.1%トルイジンブルーで染色した。

成分探索 :

車前子の熱水抽出物を水に溶解した後、水の 1.5 倍量のメタノールを添加することで 60%メタノール水溶液とし、多糖類の沈殿を生じさせた。その後、遠心分離 (4,000rpm, 15 分) により得られた上清をダイヤイオン HP-21 カラムに付し、水-メタノール溶媒を用い、メタノールを 20%ずつ段階的に増加させ溶出した。活性フラクションの分画は ODS-MPLC および、分取 HPLC を用いて行った。

ODS-MPLC では、Biotage MPLC システム (Isolera One), Biotage SNAP Ultra C18 カラム (120 g, $\phi 42 \times 150$ mm) を用い、水とメタノールの混合溶媒 (5-100%メタノール), 流速 50 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [5% MeOH (0-4.3 min), 5-15% MeOH (4.3-23.7 min), 30% MeOH (23.7-32.3 min), 100% MeOH (32.3-39.6 min)]。ピーク検出は 200~400 nm の波長領域で行った。

分取 HPLC は、Waters の分取 HPLC システムを用いた (ポンプ Delta 600, UV 検出器 2489)。C30 カラムは Develosil C30-UG-5 (20 \times 250 mm, 20 \times 50 mm のガードカラム追加) を用いた。溶媒 A として 0.1%のギ酸水溶液を、溶媒 B としてアセトニトリルを用い、流速 10 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [4% B (0-10 min), 4-30% B (10-32 min)]。ピーク検出は 210 および 257 nm の波長で行った。

単離成分の構造解析 :

核磁気共鳴 (NMR) 装置は、日本電子製 JEOL EX-400 spectrometer または、JEOL ECA500II spectrometer を用い、重水素化溶媒 D₂O もしくは DMSO-d₆ を用いて測定した。ESI-MS は島津製 LCMS-IT-TOF 質量分析計にて測定した。旋光度は日本分光製 JASCO P2100 デジタル旋光度計を用いて測定した。

<結果>

オキサリプラチン誘発ディセスセジアへの aucubin の効果

Aucubin (50 mg/kg) をオキサリプラチン投与翌日より、1 日 1 回腹腔内注射すると、オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制された。一方、オキサリプラチン誘発冷ディセスセジアは、抑制傾向を示した。

オキサリプラチン投与により、皮膚のマスト細胞の増加並びに脱顆粒が促進される。このことがオキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪に関係することを我々は見出している。しかし、aucubin は、オキサリプラチン誘発のマスト細胞の増加並びに脱顆粒には影響しなかった。

車前子エキス活性画分中の化合物の同定とパクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する効果 :

車前子熱水抽出物を各種カラムクロマトグラフィー (ダイヤイオン HP21, ODS カラム) により分画し、C30-HPLC で精製し、4 種の化合物を得た。その内 2 種は、昨年 aucubin と geniposidic acid であること明らかにした。そこで、本年は、残りの 2 種の化合物について解析した。

(化合物 1)

ESI-LC/MS において m/z 185.0797 [M+H]⁺, 207.0604 [M+Na]⁺ を示したことから分子式を C₉H₁₂O₄ と推定した。¹H-および ¹³C-NMR は pedicularis-lactone [1] のものと良い一致を示した。旋光度は, $[\alpha]_D^{25} +33.4$ (c 0.19,

MeOH)であり, pedicularis-lactone の旋光度 $[\alpha]_D^{15} +45.5$ (c 0.15, MeOH) 【1】と良い一致を示した。そこで, 化合物 1 を pedicularis-lactone と同定した。

(化合物 2)

ESI-LC/MS において m/z 185.0812 $[M+H]^+$, 207.0629 $[M+Na]^+$ を示したことから分子式を $C_9H_{12}O_4$ と推定した。 1H -および ^{13}C -NMR は iridolactone 【1】のものと同じ一致を示した。旋光度は, $[\alpha]_D^{24} -12.8$ (c 0.14, MeOH) であり, iridolactone の旋光度 $[\alpha]_D^{27} -15.3$ (c 0.3, MeOH) 【2】と良い一致を示した。以上より, 化合物 2 を iridolactone と同定した。

<文献>

- 【1】 Li, Y.; Changzeng, W.; Zhongjian, J., Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. *Phytochemistry* 1995, 40 (2), 491-494.
- 【2】 Tanaka, H.; Kamikubo, T.; Yoshida, N.; Sakagami, H.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K., Enantio- and diastereocontrolled synthesis of (-)-iridolactone and (+)-pedicularis-lactone. *Org. Lett.* 2001, 3 (5), 679-681.

これら化合物を主に含有する画分 3 (pedicularis-lactone が主成分) および画分 4 (iridolactone が主成分) を用いて, 抗アロディニア効果を検討したところ, pedicularis-lactone が主成分である画分 3 でパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制された。

<考察>

車前子の成分である aucubin は, パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制する (昨年度の成果)。今回, 本研究において aucubin は, オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制することを見出した。これまでに, オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの憎悪に, 皮膚内マスト細胞の増加とその脱顆粒が関与することを明らかにしてきた。そこで, aucubin のマスト細胞への影響を検討した。しかし, オキサリプラチンによる皮膚におけるマスト細胞の増加と脱顆粒に対して aucubin は影響しなかった。したがって, aucubin は, マスト細胞に影響しない可能性が示唆される。Aucubin は, パクリタキセル投与による末梢神経の脱髄や髄鞘を形成するシュワン細胞への障害を抑制することを見出してきている。オキサリプラチン投与によっても末梢神経の脱髄が進行することが知られている。したがって, aucubin は, 脱髄の保護を介して機械的アロディニアを抑制している可能性が示唆される。

本研究では, オキサリプラチン投与によって生じる冷刺激に対する過敏反応 (冷ディセスセジア) は, aucubin によって抑制されなかった。オキサリプラチン投与による冷刺激誘発の過敏反応には, 温度感受性イオンチャネル TRPM8 が関与することを見出している。おそらくアウクビンは, TRPM8 の発現や活性化に影響しなかった可能性がある。

これまでに, aucubin や geniposidic acid を同定し, aucubin がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制することを見出した。本研究では, さらに車前子の抗アロディニア作用を示す活性成分の分析を行い, pedicularis-lactone および iridolactone を同定した。これら 2 つの成分にはこれまで疼痛抑制に関する報告はない。本研究では, それぞれの成分を主に含有する画分を用いてパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪への作用を検討したところ, pedicularis-lactone 含有の画分でアロディニアの憎悪抑制作用が認められた。今後, pedicularis-lactone 自身による抗アロディニア効果とその疼痛抑制作用機序の検討を行う予定である。

■結論

車前子の成分である aucubin は, パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛だけでなく, オキサリプラチン誘発末梢神経障害性疼痛においても有用である。また, aucubin 以外にも pedicularis-lactone が抗アロディニア活性を示す車前子の有効成分である可能性がある。

■学会発表

学会:

① 當銘一文, 加藤 充, 侯 志艶, 北村 亮, 葛 躍偉, 白 焱晶, 倉石 泰, 安東嗣修, 小松かつ子. 車前子由来パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究. 第35 回和漢医薬学会学術大会; 2017 Aug 26-27; 福岡.

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

- ② 侯 志艶, 當銘一文, 安東嗣修, 小松かつ子. Search on anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 日本生薬学会第 64 回年会 ; 2017 Sep 9-10 ; 千葉.

■研究協力者

侯 志艶 : 富山大学和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野

ミャンマー産伝統薬用植物由来の抗インフルエンザ活性天然化合物の探索研究

申請代表者 庄司 正樹 徳島文理大学 薬学部 生化学講座 助教

所外共同研究者 葛原 隆 徳島文理大学 薬学部 生化学講座 教授

所内共同研究者 伊藤 卓也 資源開発研究部門 天然物化学分野 准教授
(現 大阪大谷大学 薬学部 天然薬物学講座) (現 教授)

■背景・目的

我々は、新しい抗インフルエンザ薬を開発する為の候補化合物を探索する目的で、薬用植物資源が世界的に豊富にも関わらず薬用植物研究が未だ不十分なミャンマーの薬用植物に着目した。そこで、118種類のミャンマー産植物由来エキスについて、A型インフルエンザウイルス感染からの生存細胞率を指標とするスクリーニングを行った(図1)。その結果、コントロール(DMSO群)(図1, 青枠)と比較して、強力な活性を示す6種類の植物エキス(図1, 赤枠:#7および38, 40, 41, 52, 60)を見出した(図1)。

我々は、スクリーニング結果の中でも強い活性を示した#41 および 52, 60 の植物らに着目した。#60:トウダイグサ科植物の *Jatropha multifida* Linn. は、ミャンマーにおいて“Say-ma-khan”として知られる伝統生薬であり、熱や消化不良、咳、皮膚感染等の症状に使用されている。この植物エキスに含まれる抗インフルエンザ活性物質を特定するために、水及び酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルムエキスを調製し、A型インフルエンザウイルスの感染及び増殖阻害活性を検討した。DMSO 群と比較して、水エキスではウイルス感染細胞数、一方クロロホルムエキスでは培養上清中のウイルス量がそれぞれ有意に減少した(公表論文1)。本研究成果は、高く評価され、*BMC Complementary and Alternative Medicine*(公表論文1)に掲載された。

次に、我々は、#41:カヤツリグサ科植物 *Cyperus scariosus* R. Br および#52:リンドウ科植物 *Gentiana kurroo* Royle. に着目した。一般的に、*C. scariosus* は抗炎症および抗胃痛、利尿、発汗、一方 *G. kurroo* は抗菌、抗炎症、抗マラリア、鎮痛、鎮静として、それぞれミャンマーの伝統生薬として使用されている。しかしながら、今回のスクリーニングで見出した抗インフルエンザ活性およびその活性成分については、分かっていない。そこで、本研究では、*C. scariosus* および *G. kurroo* の詳細な抗インフルエンザ活性の検討とその活性成分の特定を目的とした。

■結果・考察

我々は、詳細な抗インフルエンザ活性と活性成分の特定のために、*C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎から水および酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルムを用いて、各種溶媒抽出エキスを作製した。

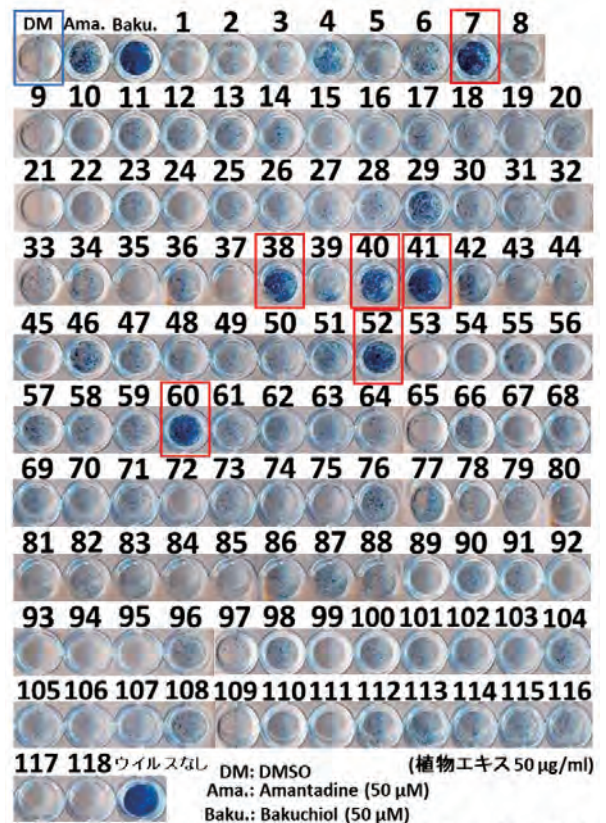


図1 ミャンマー産伝統薬用植物由来エキスを用いた抗インフルエンザスクリーニング

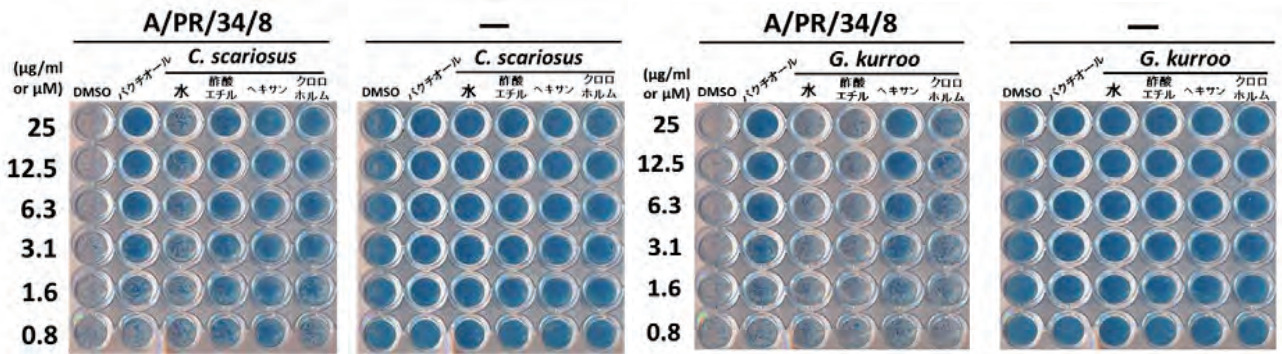


図2 *C. scariosus* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染からの細胞生存効果 図3 *G. kurroo* 各溶媒抽出エキスによるウイルス感染からの細胞生存効果

初めに、各溶媒抽出エキスと A 型インフルエンザウイルス (A/PR/34/8) を共培養し、イヌ腎臓由来 (MDCK) 細胞に作用させた。培養 4 日後細胞を染色することにより、インフルエンザウイルス感染からの細胞生存率を測定したところ、*C. scariosus* の酢酸エチルおよびヘキサン、クロロホルムエキス (図 2) に、一方 *G. kurroo* のヘキサンエキス (図 3) に濃度依存的なウイルス感染からの強力な細胞生存効果を示した。次に、それぞれの抽出エキスと A/PR/34/8 の共培養試料を MDCK 細胞に作用後、インフルエンザウイルス核タンパク質 (NP) を免疫蛍光染色することで、ウイルス感染細胞数を測定した。その結果、*C. scariosus* の酢酸エチルおよびヘキサン、クロロホルムエキスの作用により、濃度依存的なウイルス感染細胞数が減少し、その中でもヘキサンエキスが最も強力な減少率を示した (図 4)。一方 *G. kurroo* では、ヘキサンエキスにのみ濃度依存的にウイルス感染細胞数が減少した (図 5)。感染からの細胞生存率および感染細胞数を測定する試験法は、ウイルスとエキスを前処理した混合物を細胞に作用させるため、ウイルス生活環において感染初期を阻害することを示唆している。以上より、*C. scariosus* および *G. kurroo* のヘキサンエキスには、ウイルス感染を阻害する強力な化合物が含まれていると考えられる。

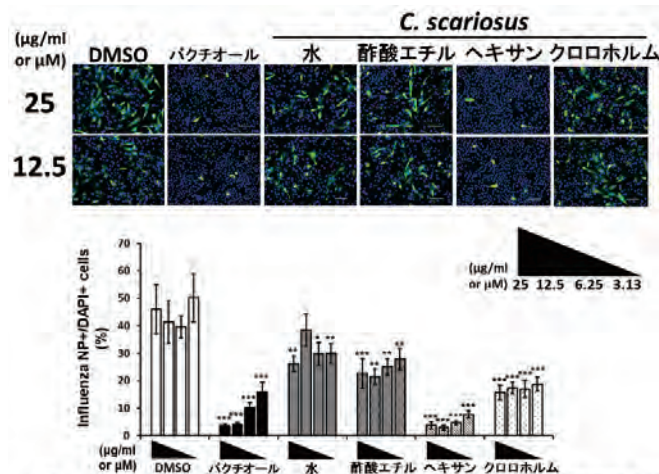


図4 *C. scariosus*各溶媒抽出エキスによるウイルス感染阻害効果

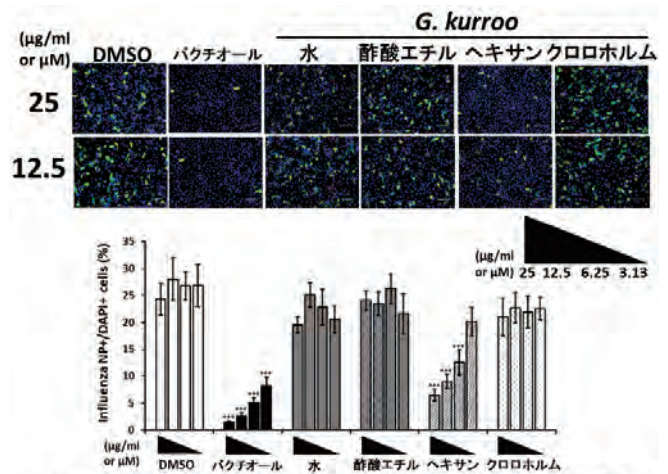


図5 *G. kurroo*各溶媒抽出エキスによるウイルス感染阻害効果

さらに、あらかじめ A/PR/34/8 を感染させた MDCK 細胞に *C. scariosus* および *G. kurroo* の各溶媒抽出エキスを作用させ、培養 24 から 72 時間まで経時的に培養液中のウイルス力価を測定することにより、ウイルス増殖阻害作用を検討した。*C. scariosus* では、ヘキサンエキスにのみ経時的なウイルス力価の減少が見られた (図 6A)、一方 *G. kurroo* の各溶媒抽出エキスでは、ウイルス力価の減少が見られなかった (図 6B)。培養液中のウイルス量を測定する試験法では、あらかじめウイルスを感染させた細胞に対してエキスを作用させるため、感染後期 (増殖) を阻害することを示唆している。以上より、*C. scariosus* のヘキサンエキスは、ウイルス増殖を抑制する化合物を有することが考えられる。

次に、我々は、*G. kurroo* のヘキサンエキスに含まれる抗インフルエンザ活性成分を特定するため、

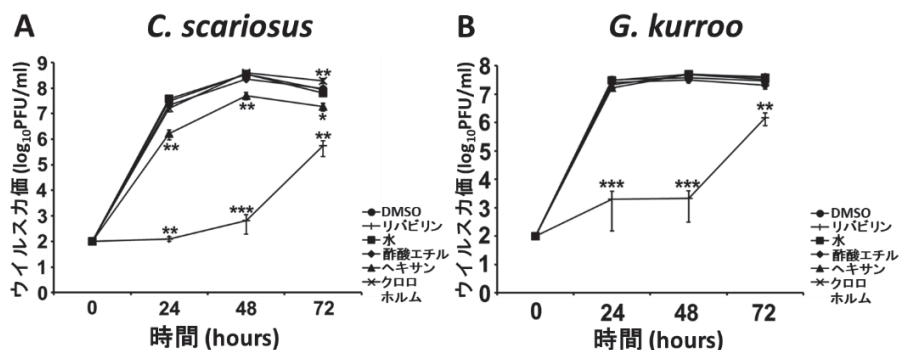


図6 *C. scariosus* および *G. kurroo* 各溶媒抽出エキスによるウイルス増殖阻害効果

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

各種クロマトグラフィーにより分画・精製を行ったところ、Compound#1~5 が単離された。これら 5 種の化合物と A/PR/34/8 の共培養試料を MDCK 細胞に作用後、ウイルス感染からの細胞生存性と感染細胞数を測定した。これらの化合物は、いずれもウイルス感染細胞の生存性を上昇させ(図 7)、感染細胞数を減少させた(図 8)。特に、Compound#1 に最も強い活性が認められた。したがって、*G. kurroo* 根茎のヘキサンエキスによる抗インフルエンザ活性は、Compound#1~5 が関与し、Compound#1 がその活性の中心となっていると考えられる。

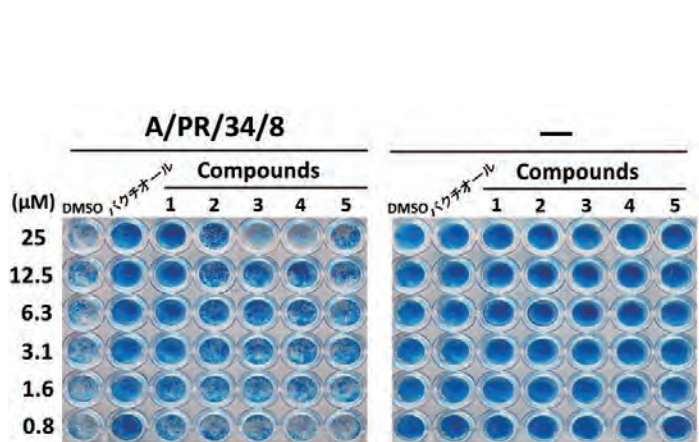


図7 *G. kurroo*根茎のヘキサンエキスから分離された化合物によるウイルス感染からの細胞生存効果

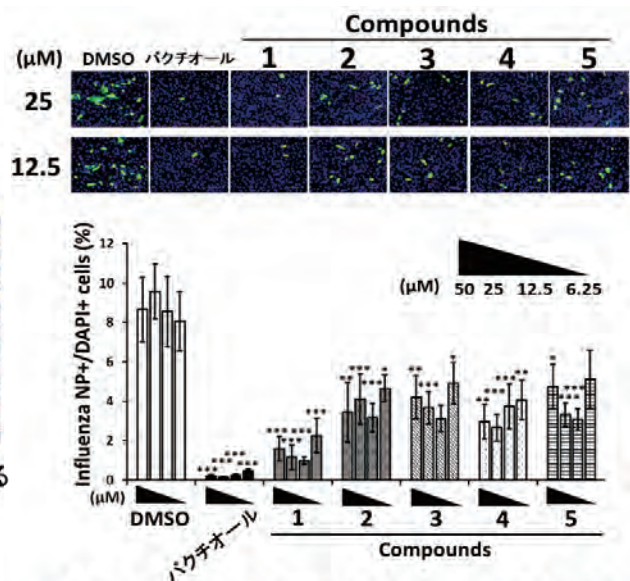


図8 *G. kurroo*根茎のヘキサンエキスから分離された化合物によるウイルス感染阻害効果

■結論

本研究により、我々は、*C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎のヘキサンエキスによる抗インフルエンザ活性を発見しただけでなく、強力な抗インフルエンザ活性を示す新たな化合物 Compound#1 も見出した。しかしながら、これらのエキスや化合物がどのようなメカニズムにより抗インフルエンザ活性を示しているのか分かっていない。したがって、これらの抗インフルエンザ活性のメカニズム解析が今後の研究課題である。本研究結果は、ミャンマー産の *C. scariosus* および *G. kurroo* 根茎が抗インフルエンザ生薬として使用できること、さらに Compound#1 が新たな抗インフルエンザ薬のリード化合物としての可能性を秘めていることを示している。

■公表論文

- Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Aki Masuda, Nwet Nwet Win, Hla Ngwe, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido, Hiroyuki Morita, Takuya Ito* and Takashi Kuzuhara*. *Corresponding authors.
Anti-influenza virus activity of extracts from stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar.
BMC Complementary and Alternative Medicine 2017, 17:96.

■公表予定論文

- Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Mami Tomimoto, Minami Sugimoto, Aki Masuda, Nwet Nwet Win, Hla Ngwe, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido, Hiroyuki Morita, Takuya Ito* and Takashi Kuzuhara*. *Corresponding authors.
Anti-influenza activity of hexane extracts of *Gentiana kurroo* Royle rhizomes collected in Myanmar.
BMC Complementary and Alternative Medicine submitted.
- Masaki Shoji*, So-Yeun Woo, Natsumi Yano, Minami Sugimoto, Aki Masuda, Nwet Nwet Win, Hla Ngwe, Etsuhisa Takahashi, Hiroshi Kido, Hiroyuki Morita, Takuya Ito* and Takashi Kuzuhara*. *Corresponding authors.
Anti-influenza virus activity of extracts from the rhizome of *Cyperus scariosus* R. Br collected in Myanmar.
Manuscript in preparation.

麴菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立

申請代表者 奥津 果優 鹿児島大学農学部 特任助教

所内共同研究者 小松 かつ子 資源開発研究部門生薬資源科学分野 教授

■背景・目的

神麴は、古来消化不良や食欲不振などの胃腸器疾患に利用されてきた漢方用薬であり、『公定規格に記載されていない生薬の規格及び試験方法』¹⁾において、「麴に赤小豆、杏仁、青蒿、蒼茸、野蓼を混合したものを圧縮して成型し、数日間発酵させた後乾燥したものである」と記載されている。この麴菌による発酵過程が神麴の最大の特徴であるといえ、麴菌の生成する酵素や代謝物が有用性に寄与していると考えられる。

神麴は半夏白朮天麻湯や加味平胃散に配合されることからその需要が高まりつつあり、現在日本薬局方への記載が検討されている。しかしながら、有用成分や発酵に寄与する微生物が不明である上、市場品によって外観や品質が全く異なっていることから、品質管理のための標準化が難航している。そこで本研究では、神麴の成分的もしくは微生物学的な特徴を明らかにすることにより、神麴を品質管理するための指標を見出すことを目的とした。

■結果・考察

日本の生薬企業3社より、神麴市場品を13サンプル蒐集し（表1）、以下の分析に用いた。

1. 神麴に含まれる成分の分析

【消化酵素】

市販される多くの胃腸薬には、有効成分の一つとして消化酵素が配合されている。そこで神麴についても、消化酵素活性を調べることにした。サンプルより酵素抽出を行い、 α -amylase 測定キット (Kikkoman), Lipase activity assay kit (Cayman) により活性を測定した。

その結果、全ての市場品に酵素活性が見られ（表1）、アミラーゼについてはA社より入手した韓国産神麴（サンプルH~J）が高い傾向であった。リパーゼについては、韓国産神麴（サンプルH~M）の活性が共通して高く、中国産（サンプルA~G）の30倍以上になることが分かった。

【フェルラ酸】

麴の原料である穀類中には、抗炎症作用が報告されている²⁾フェルラ酸が含まれる。そこで、神麴市場品中のフェルラ酸の含量をHPLCにより定量した。その結果、全てのサンプルにフェルラ酸が含まれることが確認されたが、含量は25-554 nmol/g とばらつきが大きいことが分かった（表1）。韓国産神麴は25.8-91.4 nmol/g、中国産は99.9-554.6 nmol/g と中国産神麴の含量が高い傾向であった。これまでの研究においても中国産神麴のフ

表1. 実験に用いた神麴市場品とその分析結果

サンプル名	産地	入手年	入手先	Amylase (U/g)	Lipase (U/g)	Ferulic acid (nmol/g)	糸状菌	一般細菌	耐熱性菌
A		2016	B社	0.48	2.6	99.9	1.0×10^2	1.3×10^8	1.8×10^8
B		2015	A社	0.47	0.1	321.0	$<10^2$	1.2×10^8	2.0×10^8
C		2013	A社	0.38	11.4	87.8	$<10^2$	1.1×10^8	1.3×10^8
D	中国	2013	B社	1.59	1.9	554.6	$<10^2$	7.8×10^8	1.1×10^9
E		2012	A社	0.46	25.8	140.7	$<10^2$	1.0×10^8	1.7×10^8
F		2009	A社	0.47	5.5	109.8	$<10^2$	1.1×10^8	1.6×10^8
G		2008	A社	0.36	11.9	176.5	$<10^2$	1.0×10^8	1.1×10^8
H		2000	A社	2.25	1673.8	60.7	$<10^2$	2.5×10^3	4.0×10^3
I		1998	A社	1.61	696.7	42.3	$<10^2$	7.0×10^2	2.5×10^2
J	韓国	1993	A社	2.16	2656.5	91.4	$<10^2$	3.1×10^3	2.1×10^3
K		2013	C社	0.89	5805.5	75.4	-	-	-
L		2015	C社	0.53	4025.0	59.9	-	-	-
M		2017	C社	0.95	2639.7	25.8	-	-	-

ェルラ酸含量が高いことが報告されており³⁾, 中国と韓国では原料もしくは製造工程が異なることが示唆された。

【GC-MS 検出成分】

神麴の原料とされるセイコウ, ソウジ, タデは精油を含んでおり, 精油成分に含まれるセスキテルペン類は唾液や胃液の分泌を促進することで健胃作用を示すことが知られている⁴⁾. そこで, 神麴に含まれる精油成分を GC-MS を用いて調べた. その結果, 神麴市場品には 23 種類の共通成分があることが分かった (表 2). その中には linalool や terpinen-4-ol, dihydroactinolide などの植物由来の精油成分に加え, phenylethyl alcohol や γ -nonalactone などの発酵食品に特徴的な香气成分も含まれていた。

検出された全成分の主成分分析を行なったところ, 市場品が大きく 3 グループに分類された (図 1A). 中国産神麴は全て同じグループに分類され, 韓国産神麴は入手先によって 2 グループに分けられた. 各成分の主成分負荷量を調べたところ, 中国産には 4-vinylguaiacol や pyridine 類などが多い傾向があり, 韓国産の H, I, J には linalool や menthol など植物由来の精油成分, 韓国産の K, L, M には短鎖の脂肪酸や脂肪族アルデヒドが多く含まれる傾向があった (図 1B). 4-vinylguaiacol や pyrazine 類は加熱により生成する成分であることが報告されており^{5,6)}, 中国産神麴は製造過程で加熱乾燥されていることが予想された。

表 2 神麴市場品に共通する成分

Group	Name
Acids	Dodecanoic acid
	Palmitic acid
	Octanoic Acid
Alcohols	Linalool
	Terpinen-4-ol
	Benzyl Alcohol Phenylethyl Alcohol
Aldehydes	2-(E)-Heptenal
	Benzaldehyde
	Hexanal Nonanal Decanal
Esters	Methyl salicylate
	2-Phenylethyl acetate
Ketones	Pulegone
	Piperitone 2-Octanone
Lactones	γ -Nonalactone
	Geranylacetone
Others	Dihydroactinolide
	Paeonol
	Naphthalene
	Methyleugenol

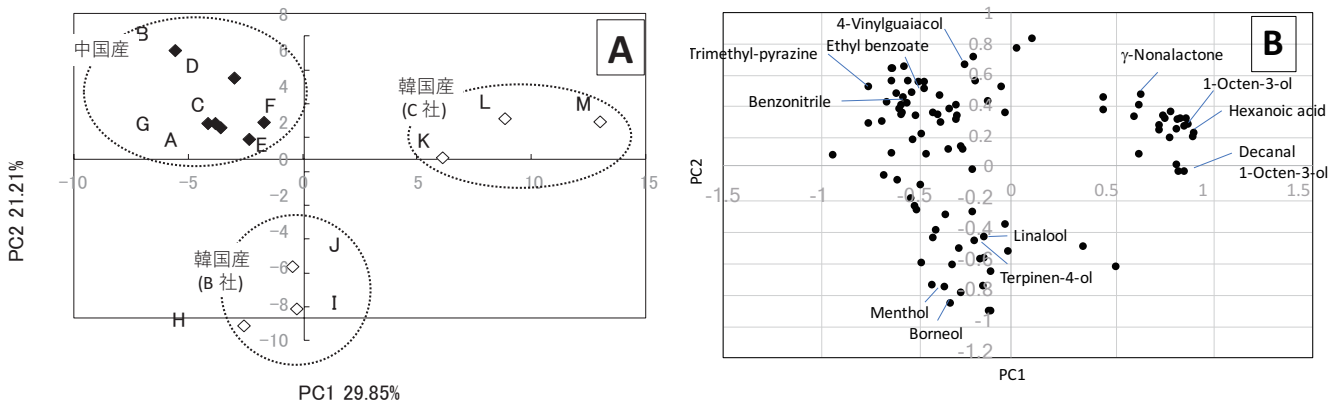


図 1 GC-MS で検出される成分の主成分分析結果 A: スコアプロット, B: ローディングプロット

2. 神麴に存在する微生物の分析

【生菌数の測定】

神麴を滅菌水に懸濁した液を適宜希釈後, 平板培地に塗抹, 培養した後, 出現したコロニー数を測定した (表 1). その結果, 麴菌を含む糸状菌様のコロニーはほとんど検出できず, 生菌として麴菌を検出することが困難であった. 一方, 中国産神麴には一般細菌, 特に耐熱性の細菌が 10^8 以上存在しており, 麴菌以外の細菌類が多く存在することが示唆された。

【菌叢解析】

生菌数の結果より, 麴菌以外の細菌が多量に存在することが示唆されたため, 次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析により微生物の群集構造を調べた. 神麴から DNA 抽出を行い (ZR Fecal DNA MiniPrep), プライマーセット V3V4f-V3V4r を用いて細菌 16S rDNA V3/V4 領域を, また ITS1F_KYO1-ITS2_KYO2 を用いて真菌 ITS 1 領域を対象とした PCR 増幅を行った. 各試料について, 得られたアンプリコンを次世代シーケンス装置 MiSeq (Illumina) に供して 2×300 bp の条件でシーケンシングを行なった. 得られたリードは, クオリティフィルタリングを行なった後, Qiime を用いて細菌及び真菌の帰属分類群の推定を行なった. 結果を図 2 に示す. 細菌の群集構造において, 中国産神麴では *Bacillus* sp. が 50% 以上を占めていた. *Bacillus* 属細菌は一般に耐熱性の芽胞を形成する. よって生菌として多く検出された耐熱性の細菌は *Bacillus* 属細菌と推察した。

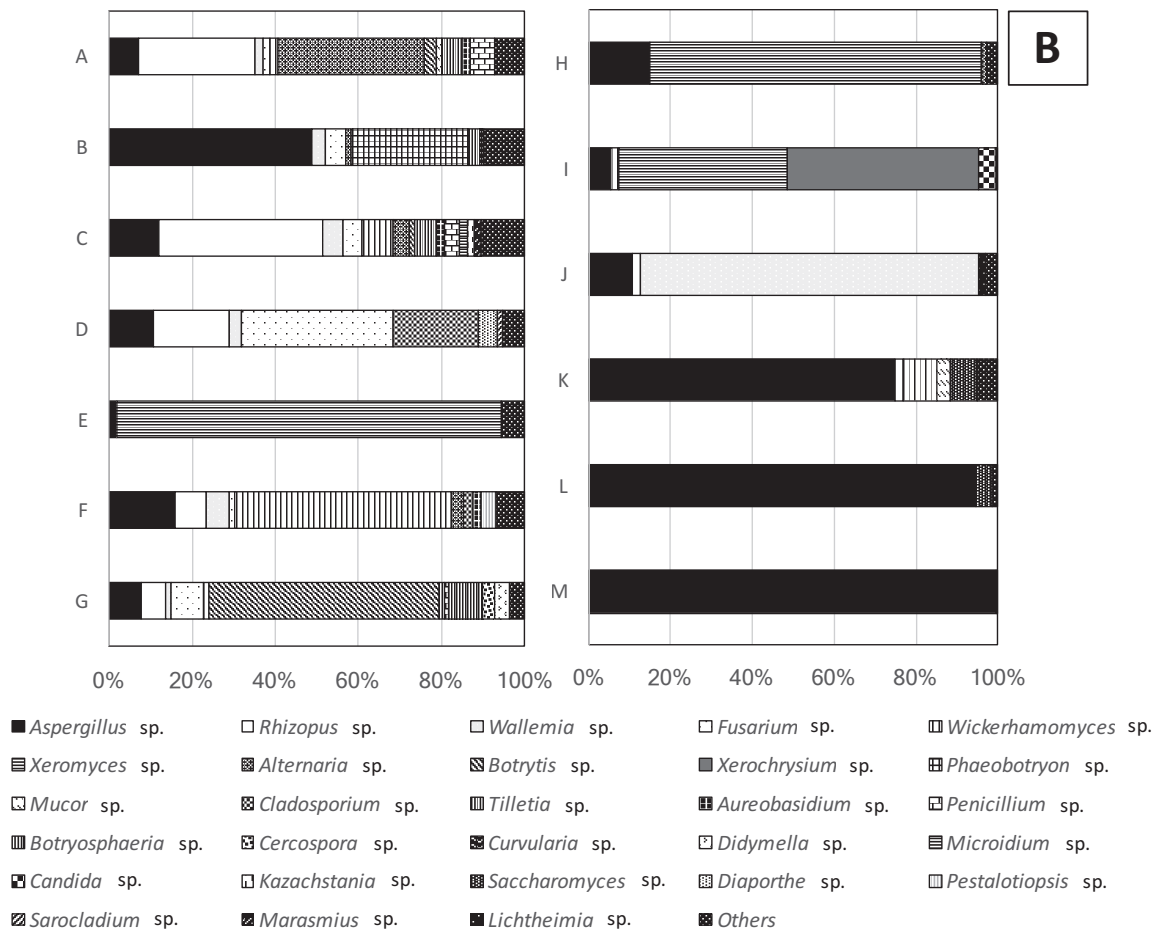
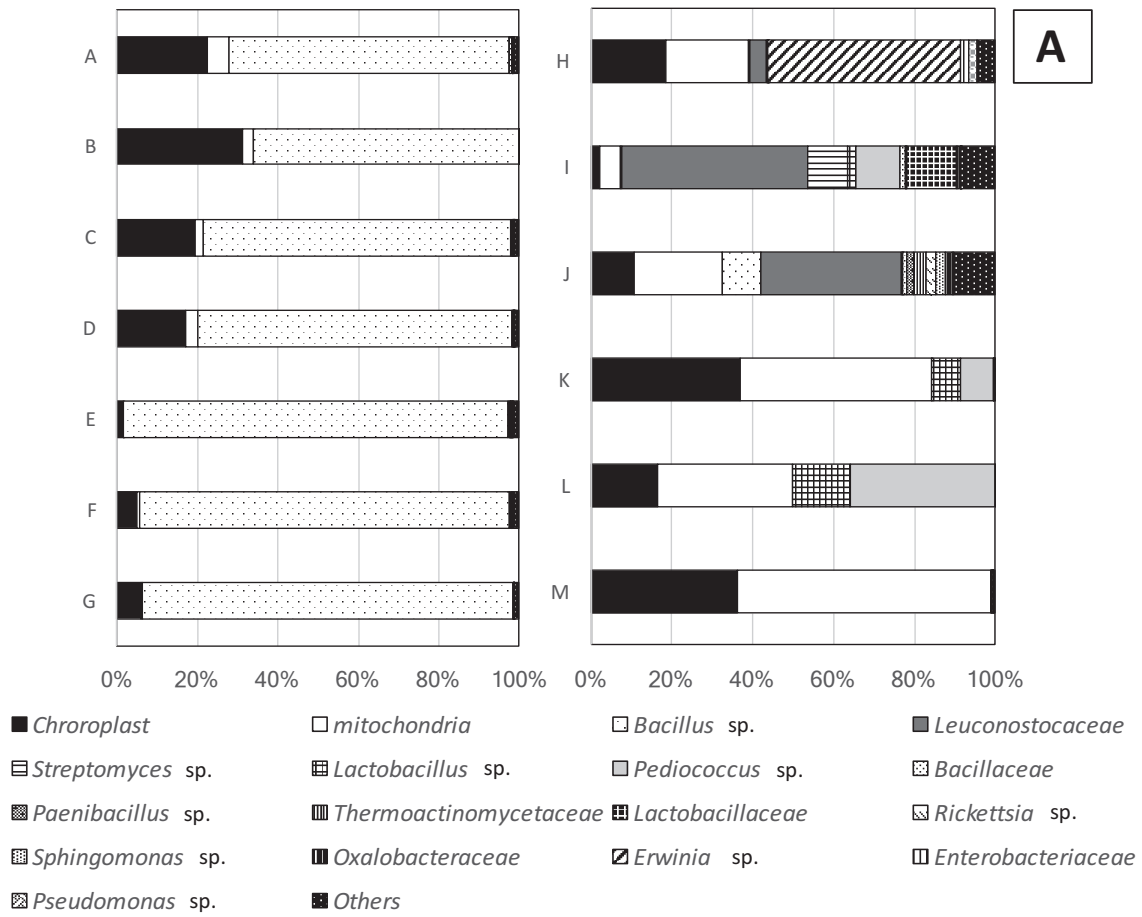


図 2 神麴市場品の菌叢解析 A: 細菌 (16S rDNA V3/V4 領域), B: 真菌 (ITS1 領域)

一方、韓国産神麴では植物由来の葉緑体 DNA やミトコンドリア由来の DNA の占める割合が多くなっており、細菌の存在割合が低いことが予想された。また韓国産には、*Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. などの乳酸菌が検出された。

真菌の群集構造を調べた結果、全てのサンプルに共通して *Aspergillus* sp. 及び *Rhizopus* sp. といった麴菌が検出された (図 2B)。一方、*Mucor* sp. は一部のサンプルにしか検出されず、存在比も全体の数パーセントであった。E, H, I については *Xeromyces* sp. が、J については *Wallemia* sp. が大部分を占めていたが、これらの真菌は食品の汚染菌として知られており、耐乾性であることが報告されている。さらに、D にはカビ毒を生産する可能性がある *Fusarium* sp. が検出され、市場品の中には微生物汚染されているサンプルがあることが示唆された。産地別に比較すると、中国産神麴では多様な真菌が検出され、群集構造に多様性が見られた一方、韓国産神麴においては群集構造が単純で、*Rhizopus* sp. に比べ *Aspergillus* sp. の存在比が高いことが分かった。特に韓国産の K, L, M については *Aspergillus* sp. の存在比が全体の 80% 以上を占めており、他の微生物がほとんど検出されなかった。K, L, M については前述の成分組成においても同一のグループを形成していたことから、このような微生物の違いが香り成分に影響していることが示唆された。

【麴菌の定量】

次世代シーケンスによって *Aspergillus* sp. 及び *Rhizopus* sp. といった麴菌が検出されたことから、これら麴菌の定量を試みた。表 3 に示したプライマー及び SYBR premix Ex Taq II (TliRNase H plus) を用いてリアルタイム PCR を行なった。リアルタイム PCR の結果、図 3 に示すように *Rhizopus* sp. のコピー数は $10^4 \sim 10^7$ となり、産地による傾向は見られなかったが、*Aspergillus* sp. のコピー数は $10^1 \sim 10^{12}$ とサンプルによって差が大きく、韓国産神麴のコピー数が多い傾向が見られた (図 3)。また上記の次世代シーケンスの結果から汚染菌の割合が高かった E, H, I, J についても絶対量としては麴菌が 10^4 以上存在することが分かった。

表 3 リアルタイム PCR に使用したプライマー

<i>Rhizopus</i> 検出用プライマー (28S ribosomal RNA)	
Zygo-F1	TTCAAAGAGTCAGGTTGTTTGG
Zygo-R1	CAGTCTGGCTCCAACGGTCC
<i>Aspergillus</i> 検出用プライマー (18S ribosomal RNA)	
Asp2	ACCCCCCTAGGCCAGTCCG
AspG	GCCAGCGAGTACATCACCTTGG

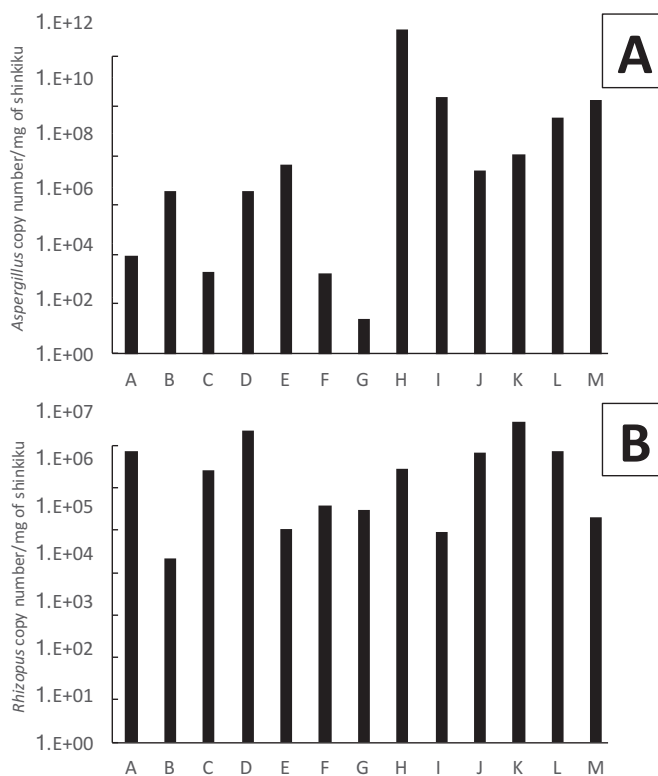


図 3 リアルタイム PCR による麴菌の定量

A: *Aspergillus* sp., B: *Rhizopus* sp.

■結論

市場品の神麴に共通する成分として、既に報告されている消化酵素 (アミラーゼ, リパーゼ), フェルラ酸の存在を確認し、新たに原料植物由来のテルペン類 (linalool, terpinen-4-ol) など 23 成分が見出された。酵素活性は消化促進作用に関与し、フェルラ酸には抗炎症作用、精油成分には健胃作用がそれぞれ期待でき、これらが神麴の消化薬としての有用性に寄与していると考えられた。さらに微生物としては、*Aspergillus* sp. や *Rhizopus* sp. といった麴菌が共通して存在することが明らかになった。

一方、共通性はあったものの、神麴は産地や入手先によって特徴が異なることも明らかになった。特に GC-MS で検出される成分の主成分分析において、同一のグループに分類された韓国産 C 社のサンプルは、他のサンプルと微生物叢が大きく異なり、*Aspergillus* 属糸状菌が優先的に増殖していることが分かった。よって微生物叢の違いが含有成分の種類や組成に影響していると考えられた。以上、神麴市場品の共通性と多様性が明らかになるとともに、神麴の品質を評価する上で微生物管理の重要性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 日本漢方生薬製剤協会, 日本生薬連合会, 『公定規格に記載されていない生薬の規格及び試験法』, 2012.
- 2) Ou S., Kwok K. C., Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261-1269, 2004.
- 3) 奥津果優, 門岡千尋, 小城章裕, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 中国及び韓国の市場品「神麴」における菌叢と含有成分の実態調査, *生薬学雑誌*, 71 (1), 41-48, 2017.
- 4) 渡辺和夫, 柴田昌裕, 矢野真吾, 蔡陽, 渋谷博孝, 北川勲, 屋久島産ガジュツ抽出物及び単離成分の抗潰瘍作用, *薬学雑誌*, 106 (12), 1137-1142, 1986.
- 5) 小林章夫, 久保田紀久枝, 調理と加熱香気, *調理科学*, 22 (3), 156-163, 1989.
- 6) 金桶光起, 清酒中の 4-ビニルグアイアコール生成要因, *日本醸造協会誌*, 109 (5), 320-326, 2014.

和漢薬の骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）の調節作用とその意義

申請代表者	堀江 一郎	東京理科大学薬学部 応用薬理学研究室 (現 山口東京理科大学薬学部 生体防御学分野)	助教
所外共同研究者	磯濱 洋一郎	東京理科大学薬学部 応用薬理学研究室	教授
所内共同研究者	早川 芳弘	病態制御研究部門 病態生化学分野	教授

■背景・目的

十全大補湯や補中益気湯、人参養栄湯などの補剤は西洋薬では認められない「免疫賦活作用」を有し、がん、感染症および慢性炎症といった様々な病態に対して薬効を示す。特に、がんでは、これら補剤は腫瘍免疫系を活性化し、劇的に転移・浸潤を抑制することが報告されているものの、その詳細な作用点は不明なままであった。

一方、近年、免疫抑制に関わる新たな細胞として、骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）が注目を集めている。MDSCは未成熟な骨髄由来の細胞であり、単球、顆粒球、樹状細胞などに特徴的な表面抗原を発現するヘテロな細胞集団である。MDSCは様々な病態や刺激に応じて誘導されるが、特にがん病態時に過剰に増加・活性化し、腫瘍組織に集積する。このMDSCはIL-10、アルギナーゼ（arg-1）、一酸化窒素（NO）や活性酸素種（ROS）を分泌することで、T細胞の増殖・活性化の抑制、NK細胞やマクロファージの活性化を抑制するだけでなく、これまで免疫抑制において中心的な役割を果たしていると考えられてきた制御性T細胞を誘導するといった一面も有し、がん悪性化の原因の一つであると考えられている。すなわち、MDSCはがん免疫療法を考える上で重要な標的細胞であることに間違いはないが、MDSC機能の薬理的調節については未だ確立されていない。しかし、これまでに明らかにされた補剤の作用を考えると、これら補剤が免疫系の上流に存在するMDSC機能を阻害することで、担がん状態での免疫抑制を解除し、その結果として免疫賦活作用を示している可能性が想定できる。

我々はこれまでの共同研究から、十全大補湯がMDSCを抑制することを明らかにしてきた。すなわち、十全大補湯のMDSC抑制作用は本方剤によるがん免疫賦活作用の重要な機序であり、補剤の作用特性の違いに影響する可能性がある。そこで本研究では、十全大補湯によるMDSC抑制作用の詳細な機序や、各補剤のMDSCに対する作用についてより詳細に検討した。

■結果・考察

【方法】

1. MDSCの分化誘導および薬物処理

C57BL/6J系雄性マウス（8-10週齢）の大腿骨および脛骨から骨髄細胞を単離し、40 ng/ml IL-6（PEPROTECH）および40 ng/ml GM-CSF（PEPROTECH）を含むRPMI-1640（10% FBS）にて4日間培養することでMDSCへと分化・誘導した。十全大補湯、補中益気湯（ツムラより供与）、人参養栄湯（クラシエより供与）および各種シグナル阻害薬はDMSOにて溶解し、MDSC分化誘導培地中にて処理した。

2. フローサイトメトリー

分化誘導したMDSC（ 1.0×10^6 cells）をrat anti-mouse CD16/CD32（BD Pharmingen™）にてFc blockingした後、rat anti-mouse CD11b-FITC（M1/70, BD Pharmingen™）およびrat anti-mouse Gr-1-PE（RB6-8C5, BD Pharmingen™）で染色し、BD FACSAria（BD Bioscience）にてCD11bおよびGr-1両陽性細胞をMDSC数として測定した。

3. Western blotting

分化誘導した MDSC から抽出した whole-cell lysates (20 μ g) を 10% polyacrylamide gel で SDS-PAGE で分離後、PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜は 5% skim milk でブロッキングし、phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP[®] rabbit mAb (Cell Signaling) または Stat3 (124H6) mouse mAb (Cell Signaling) にて 1 次抗体反応を行った (4°C, 8 時間)。その後、2 次抗体反応を行い、SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) により抗体反応を検出した。

【結果および考察】

1. 十全大補湯の MDSC 抑制作用の機序解明

まず、十全大補湯の MDSC 抑制作用の薬理的機序の解明を目指した。MDSC はその前駆細胞である未熟骨髄細胞 (IMC) から分化し、さらにマクロファージや顆粒球などの終末細胞へとさらに分化することが知られる。従って、十全大補湯の MDSC 抑制作用には、① IMC からの分化抑制、② MDSC の細胞死誘導、③ MDSC から終末細胞への分化 (脱分化) 促進、といった 3 つの可能性が考えられた。第一に MDSC の細胞死に対する十全大補湯の作用を調べるため、分化誘導後の MDSC を 7-aminoactinomycin D (7-AAD) で染色し、フローサイトメーターにて apoptosis 細胞数を測定したところ、陽性対照薬である mitomycin C (1 μ g/ml) で認められたような顕著な細胞死は、十全大補湯の処理 (0.1-1 mg/ml) では認められなかった (Fig. 1)。第二に、MDSC からその他の細胞への分化に対する作用を調べるため、分化誘導後の MDSC に十全大補湯を処理し、MDSC 数を調べた。その結果、コントロールの MDSC は、IL-6 および GM-CSF 存在下においても経時的に減少した。一方、この時十全大補湯を処理しても MDSC の減少率は変わらず、減少時間もコントロールとほぼ同じであった (Fig. 2) ことから、十全大補湯は MDSC の細胞死や脱分化に影響しないことが明らかとなった。第三に、IMC から MDSC への分化に対する十全大補湯の作用を詳細に解析した。MDSC には、顆粒球型 (PMN-MDSC: Ly-6G⁺) と単球型 (M-MDSC: Ly6C⁺) の 2 つのサブセットが存在し、これら 2 つの亜型は IMC からそれぞれ直接分化する。本培養系でも、骨髄から単離した直後は、PMN-MDSC が約 70%、M-MDSC が約 30% という割合で存在している。これら MDSC の割合は、*in vitro* での分化誘導の過程で逆転し、M-MDSC が優位となる (Fig. 3A)。この分化過程に対する十全大補湯の作用を検討したところ、M-MDSC が優位となる培養後 24~48 時間で、十全大補湯は M-MDSC 数を著明に減少させた (Fig. 3B)。一方、PMN-MDSC には著明な影響がなかった (データ示さず) ことから、十全大補湯は IMC から M-MDSC への分化を抑制し、MDSC 数を減少させることが明らかとなった。

次に、十全大補湯の MDSC 分化抑制作用に関わる機序を明らかにするため、MDSC 分化に関わるとされる様々な細胞内シグナルの阻害薬を用い、十全大補湯の作用と比較した。その結果、STAT3 阻害薬 cucurbitacin I, p38 阻害薬 SB203580, PI3-kinase 阻害薬 LY294002 が十全大補湯と同様に MDSC 数を有意に減少させた (Fig. 4)。そこで、これらシグナル分子の活性化についてリン酸化を指標として western blotting により調べたところ、十全大補湯は MDSC 中の p38 リン酸化にはほとんど影響しなかった。一方、コントロールの MDSC において、STAT3 のリン酸化は IL-6 および GM-CSF 処理 6 時間後という極めて初期化から著明に亢進したが、十全大補湯を処理した MDSC ではこの 6 時間後以降全てのタイムポイントにおいて STAT3 のリン酸化が抑制された (Fig. 5)。PI3-kinase に対する作用は現在検討中ではあるが、STAT3 のリン酸化が M-MDSC への分化に重要であることを考え併せると、少なくとも十全大補湯は一部 STAT3 の活性化を阻害することで IMC から M-MDSC への分化を抑制していると考えられた。

2. MDSC に対する各補剤の作用とその特性

続いて、代表的な補剤である十全大補湯、補中益気湯および人参養栄湯の MDSC に対する作用を比較検討した。各補剤の MDSC 分化に対する作用を検討したところ、補中益気湯 (0.1-1 mg/ml) はこれにほとんど影響しなかったものの、人参養栄湯 (0.05-0.5 mg/ml) は十全大補湯と同様に濃度依存的に MDSC 分化を抑制した (Fig. 6)。興味深いことに、MDSC の亜型に対する作用を検討したところ、前述のとおり十全大補湯の作用は M-MDSC に対する選択性が高かったのに対し、人参養栄湯は PMN-MDSC と M-MDSC に対して同様に減少作用を示した。この結果と一致して、PMN-MDSC の主な免疫抑制因子である ROS 産生に対しても、人参養栄湯は十全大補湯よりも強い抑制作用を示した (Fig. 7)。これらの結果から、補剤の中でも、十全大補湯と人参養栄湯は MDSC 分化抑制作用をもち、これが両補剤の腫瘍免疫賦活に伴う抗腫瘍効果に寄与する可能性がある。その一方で、この 2 つの補剤は抗腫瘍効果を示すがん種やマウス系統に違いがあることもわかっているため、MDSC の亜型に対する作用の違いがこうした補剤の作用特性を生み出す一要因となっていることも考えられ、非常に興味深い。

■結論

本研究の成績から、十全大補湯は未熟骨髄細胞から M-MDSC への分化を抑制することで MDSC を減少させ、その免疫抑制能までも低下させることが明らかとなった。さらに、補剤ごとに MDSC に対する作用の違いも認められ、これが補剤の作用特性に繋がる可能性が考えられた。現在、十全大補湯の MDSC 分化抑制作用と抗腫瘍効果の関係についてさらに追求しているが、本研究の成果は、がん化学療法の補助治療として補剤を用いることの有用性、さらには MDSC を標的とした新規がん免疫療法の開発に繋がるだけでなく、様々な病態に対して科学的な根拠に基づく補剤の使い分けの重要性を示唆する非常に意義深い知見であると考えている。

また、近年では腫瘍免疫の阻害因子である PD-1 に対する中和抗体である抗 PD-1 抗体（ニボルマブ）による新規がん免疫療法（免疫チェックポイント阻害薬）が一定の効果を挙げている一方で、その高額な医療費（3,000 万円/年）が問題となっている。本研究で見出した補剤の MDSC 抑制作用は、ニボルマブによる T 細胞抑制の解除とは全く異なるユニークなものであり、従って、この両薬物の併用は、腫瘍免疫の低下を引き起こす 2 つの要素を同時に解除する非常に効果的なコンセプトとなる可能性が高い。この併用療法の実効性を立証できれば、画期的ながん免疫療法になることはもちろん、ニボルマブの減量にも繋がり、医療経済学的な貢献は計り知れないと考えている。

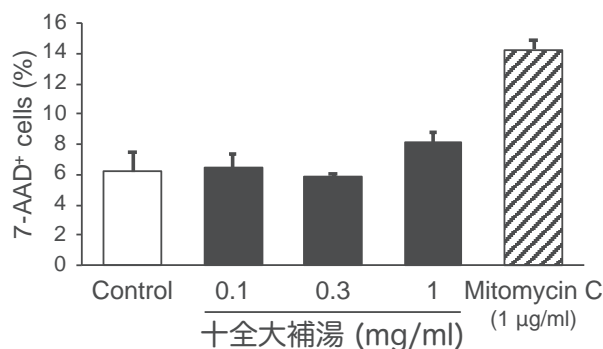


Fig. 1. 十全大補湯は MDSC の apoptosis を誘導しなかった

IL-6 および GM-CSF により骨髄細胞から MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.1-1 mg/ml) または mitomycin C (1 µg/ml) を添加処理し, 7-AAD 陽性細胞数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean ± S.E. (n=3).

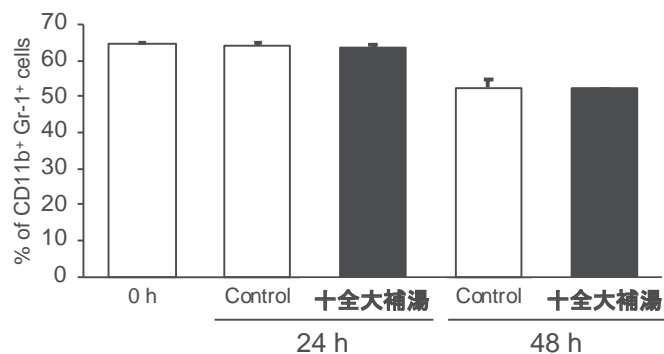


Fig. 2. 十全大補湯は MDSC の脱分化を誘導しなかった

IL-6 および GM-CSF を含む培地にて骨髄細胞を 4 日間培養し, MDSC を分化誘導した. 分化誘導後の細胞に十全大補湯 (1 mg/ml) を添加処理し, 24 または 48 時間後の MDSC 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean ± S.E. (n=3).

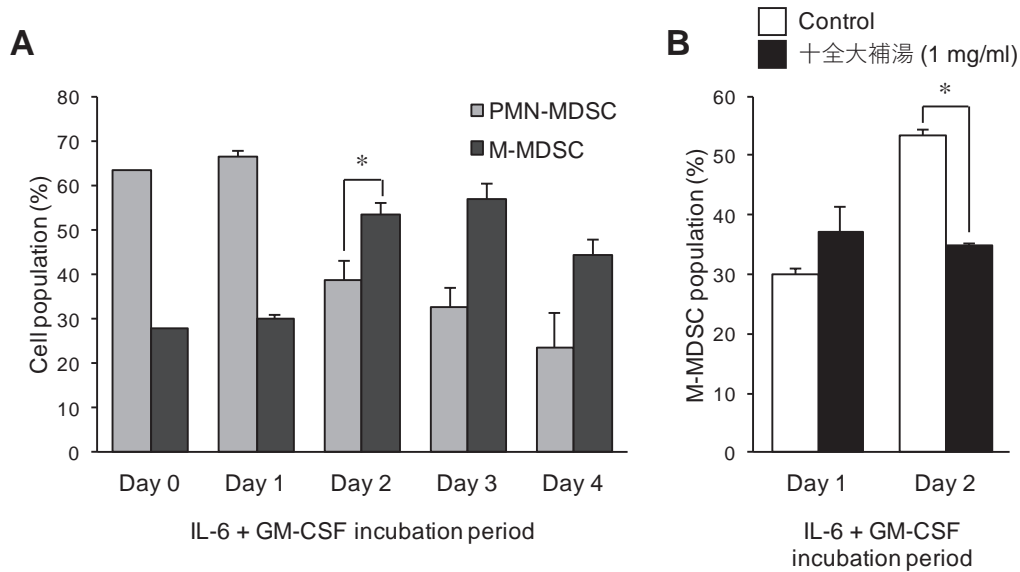


Fig. 3. 十全大補湯は M-MDSC の分化を抑制した

A: 骨髄細胞に IL-6 および GM-CSF を処理し, MDSC を分化誘導した. 分化誘導 1-4 日後に PMN-MDSC (Ly-6G⁺) および M-MDSC (Ly-6C⁺) 数をフローサイトメトリー法により解析した.

B: IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (1 mg/ml) を添加処理し, M-MDSC 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean \pm S.E. (n=4), *; $p < 0.05$.

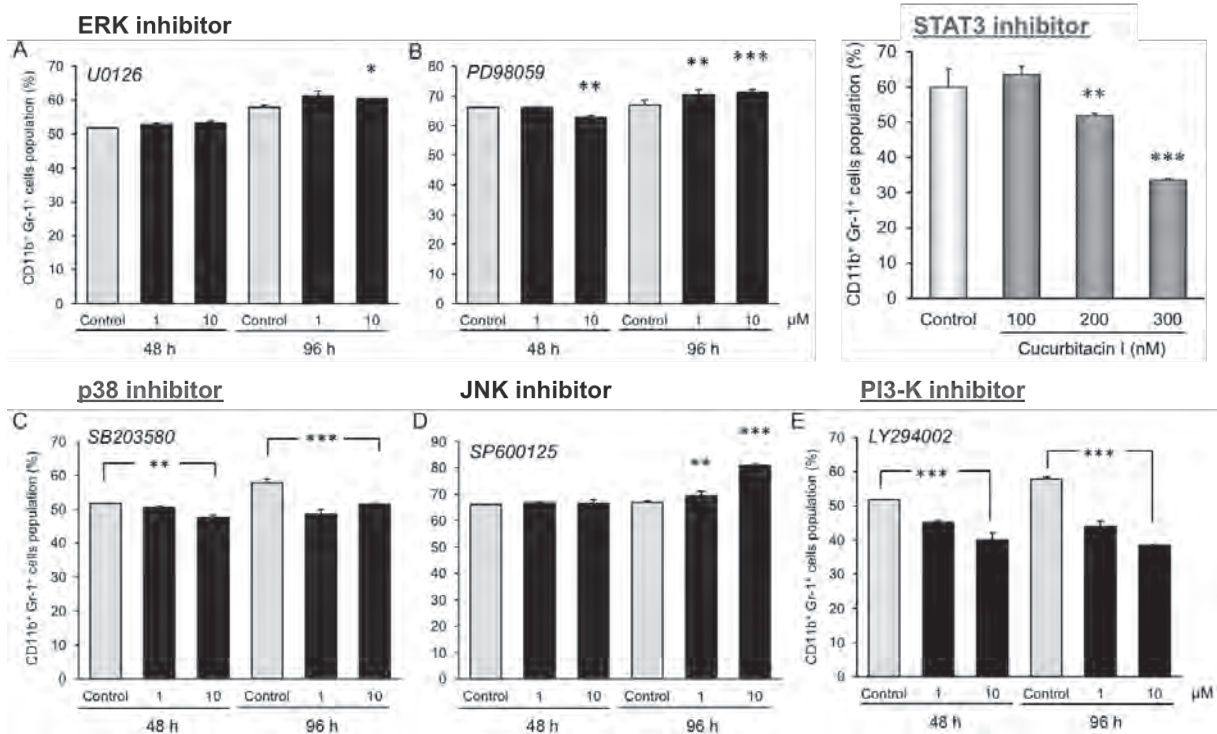


Fig. 4. STAT3 阻害薬は濃度依存的に MDSC の分化を抑制した

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の U0126, PD98059, cucurbitacin I, SB203580, SP600125 または LY294002 を添加処理し, MDSC 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean \pm S.E. (n=4), *, ** and ***; $p < 0.05$, 0.01, and 0.001 vs. control.

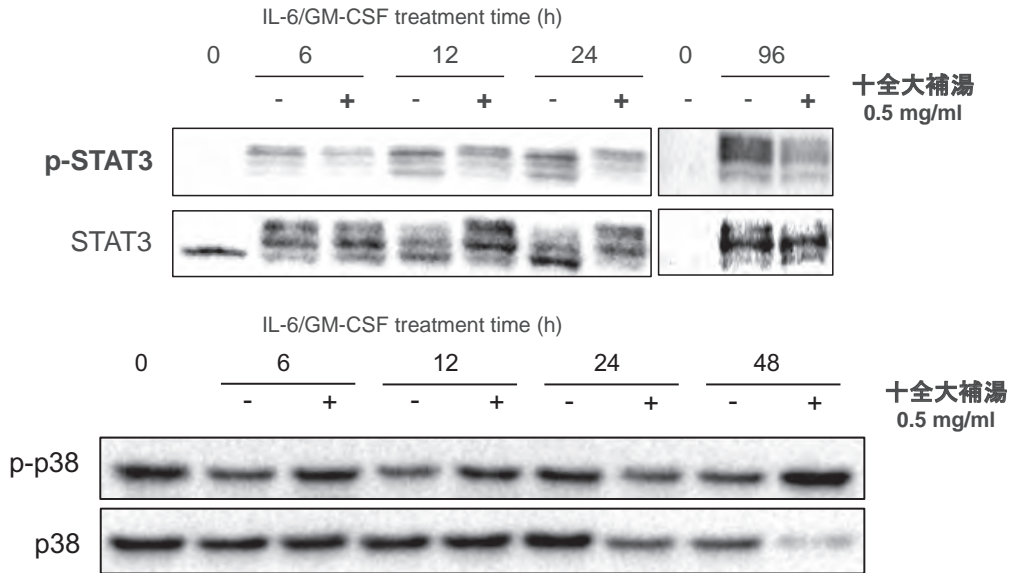


Fig. 5. 十全大補湯は MDSC の STAT3 リン酸化を抑制した

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.5 mg/ml) を添加処理し, whole-cell lysates を抽出した. リン酸化 STAT3 (p-STAT3), STAT3, リン酸化 p38 (p-p38) および p38 発現量は western blotting により検出した.

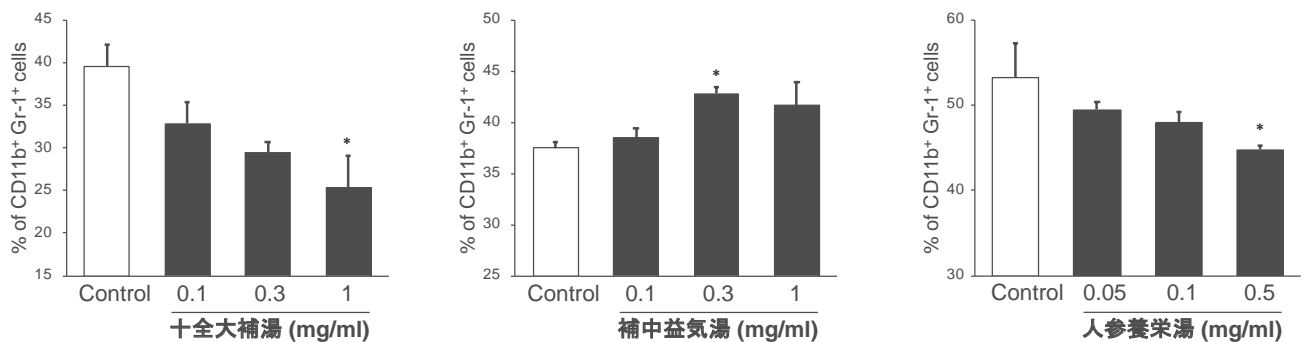


Fig. 6. 十全大補湯および人參養榮湯は MDSC の分化を抑制した

IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の十全大補湯, 補中益気湯または人參養榮湯を添加処理し, MDSC 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean \pm S.E. (n=4), *; $p < 0.05$ vs. control.

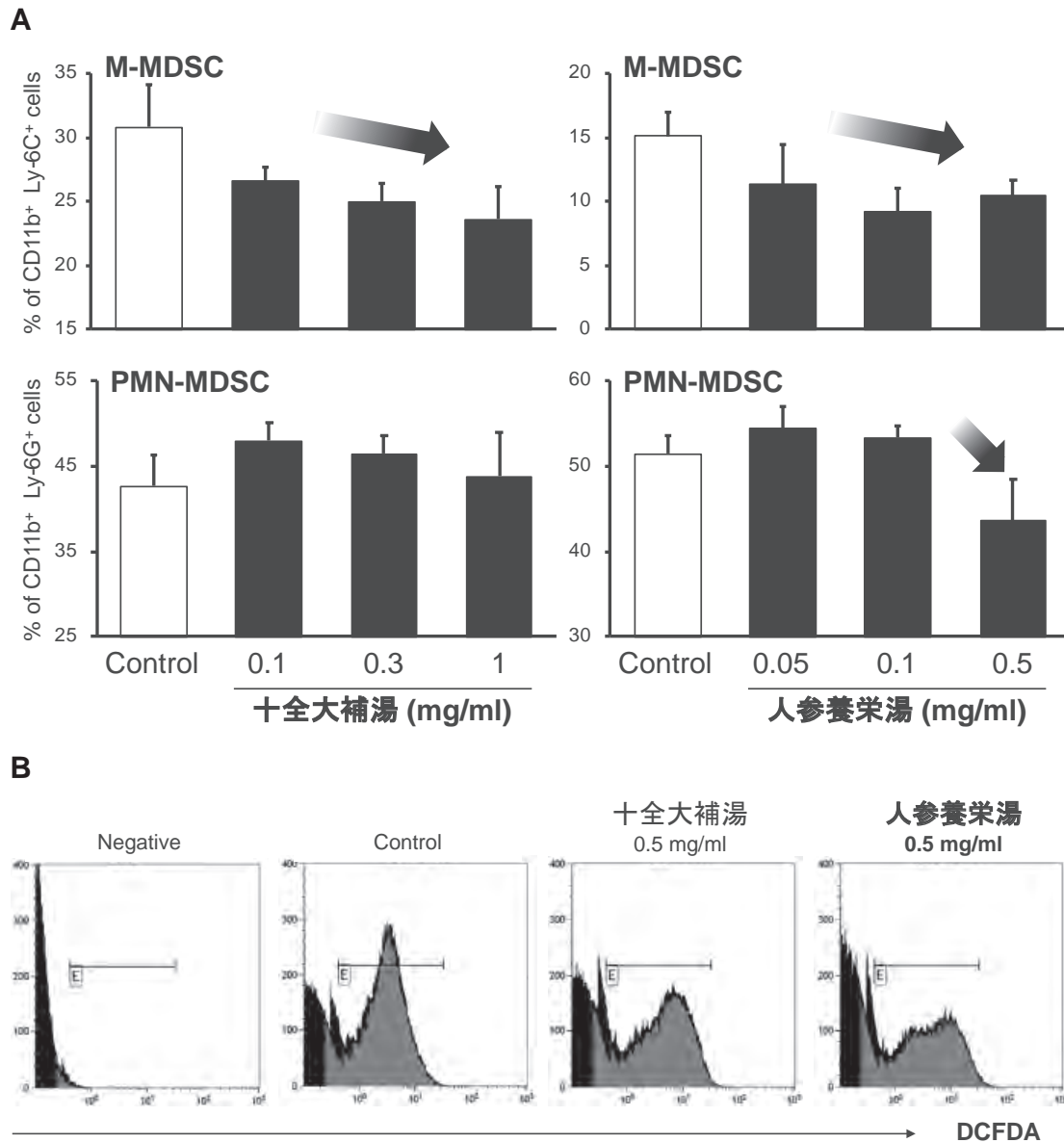


Fig. 7. 人參養榮湯は PMN-MDSC の分化を抑制し, ROS 産生を低下させた

A: IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に各濃度の十全大補湯または人參養榮湯を添加処理し, PMN-MDSC (Ly-6G⁺) および M-MDSC (Ly-6C⁺) 数をフローサイトメトリー法により解析した. Mean \pm S.E. (n=4).

B: IL-6 および GM-CSF により MDSC を分化誘導中に十全大補湯 (0.5 mg/ml) または人參養榮湯 (0.5 mg/ml) を添加処理し, DCFDA 陽性細胞数をフローサイトメトリー法により解析し, ROS 産生を評価した.

靈芝由来漢方成分生合成酵素の機能解析とその物質生産への応用

申請代表者	淡川 孝義	東京大学大学院薬学系研究科	講師
所外共同研究者	中村 仁美	東京大学大学院薬学系研究科	助教
所外共同研究者	尾関 雅弘	東京大学大学院薬学系研究科	大学院生
所内共同研究者	森田 洋行	資源開発研究部門天然物化学分野	教授

■背景・目的

漢方薬の活性成分研究はこれまで単離、精製と言った天然物化学的な手法が主であった。しかし、これらの手法においては、検出が不可能な微量成分の同定は困難である。また、長年研究されてきた生薬から新たな成分を見出すのは容易ではなく、新たな手法が必要である。このような手法として、ゲノム情報を利用した生合成酵素の同定、およびその利用といった手段が考えられる。酵素を用いた物質生産には、*in vitro*、*in vivo* の手法が考えられるが、*in vivo* の微生物生体内で物質生産を行う場合には、酵素の精製の手間がかからないこと、微生物の代謝系を基質供給源として用いることができること、高収量の生産が期待できること、等の利点がある。よって、生合成酵素を利用して漢方成分の生合成経路を微生物生産系に構築することができれば、漢方中の有効成分の安定供給が可能となり、実用性の高い漢方成分合成プラットフォームの構築につながる。また、変異酵素の利用により、非天然型生合成経路を構築し、新規な漢方成分を合成することも可能となる。そのためには、漢方成分の生合成酵素の詳細な機能解析が不可欠である。

本研究では、細菌の翻訳系という特異な作用点を持つ真菌由来のステロイド系化合物に注目した(図1)。フジジン酸、ヘルボール酸などのステロイド系抗生物質は、その生合成経路は *oxidosqualene* からの初期の数ステップが明らかになっていたものの、その全容は謎に包まれていた。そこで、ヘルボール酸の生合成に関わる遺伝子群に注目し、それらを糸状菌宿主 *Aspergillus oryzae* で異種発現することで、オキシドスクアレンからヘルボール酸に至る生合成ステップの全てを明らかにし、それぞれの中間体を単離することで、非天然型のステロイド生産系抗生物質を取得することを目的とした。また、稀少漢方薬資源である担子菌靈芝に含まれるステロイド化合物ガノデリン酸は高度に修飾を受けたステロールであり、酸化状態の異なる数十の類縁体が存在する。その中のガノデリン酸 A、B は抗ウイルス作用、血圧降下作用、腫瘍細胞毒性作用、抗アレルギー作用、コレステロール低下作用、肝障害改善作用といった、多様な有用活性が報告されている。そこで、ガノデリン酸生合成酵素の機能解析を行い、有用ステロイド化合物の醗酵生産系を構築することについて目的とした。靈芝 *Ganoderma lucidum* のゲノム情報は近年公開され、ゲノム情報を元にして酵素遺伝子の探索を行うことが可能である(Chen, S. et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 913)。また、生合成酵素の解析を行い、その基質特異性や反応性を調べることで、酵素反応改変による天然では得られない新規ガノデリン酸生産系の構築を目指す。

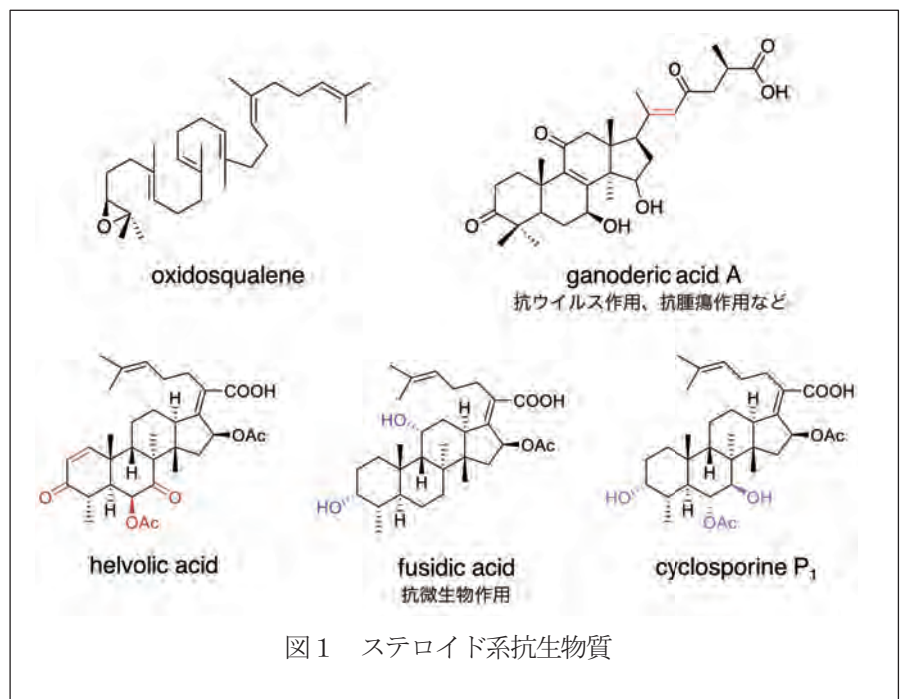
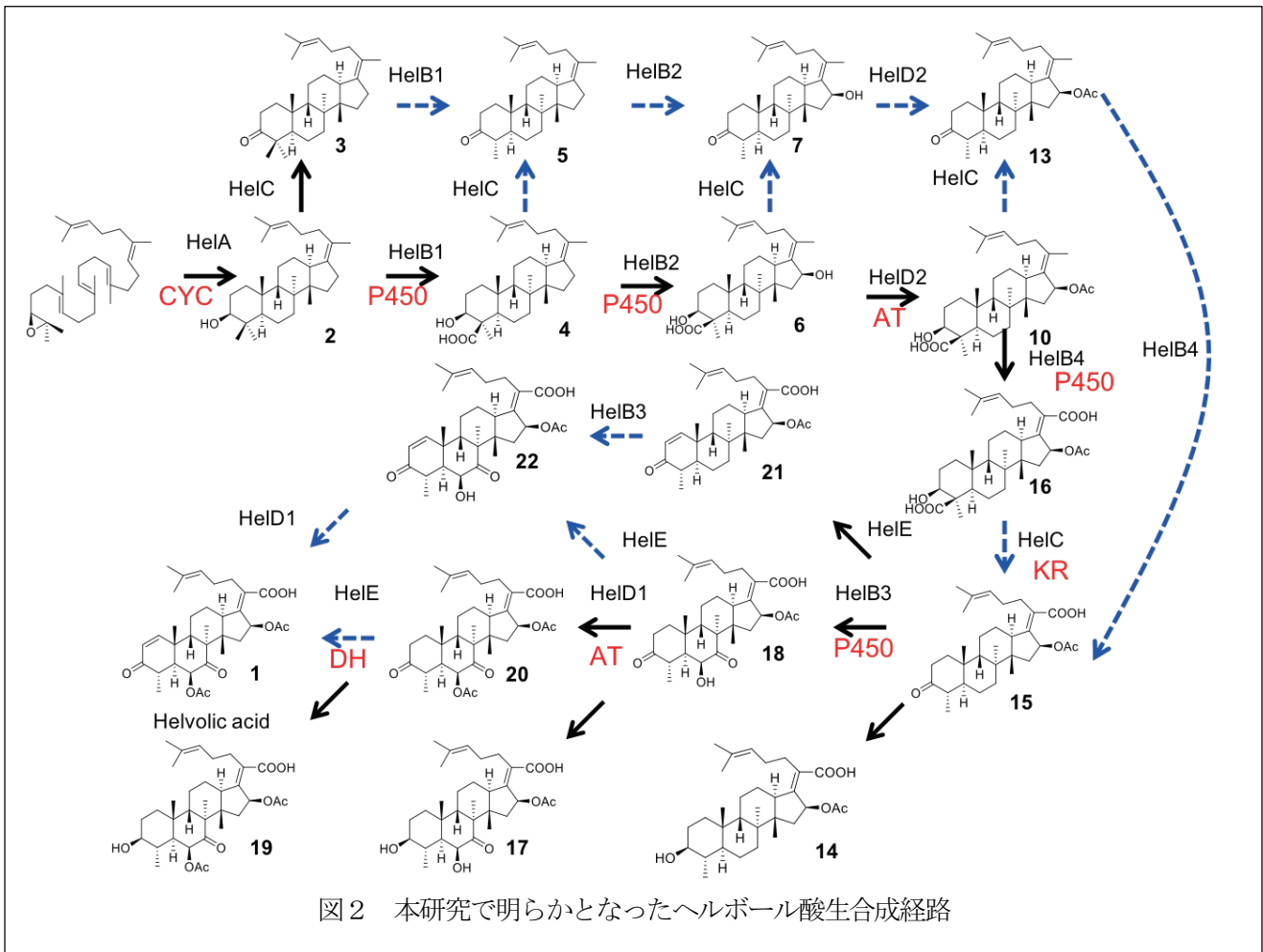


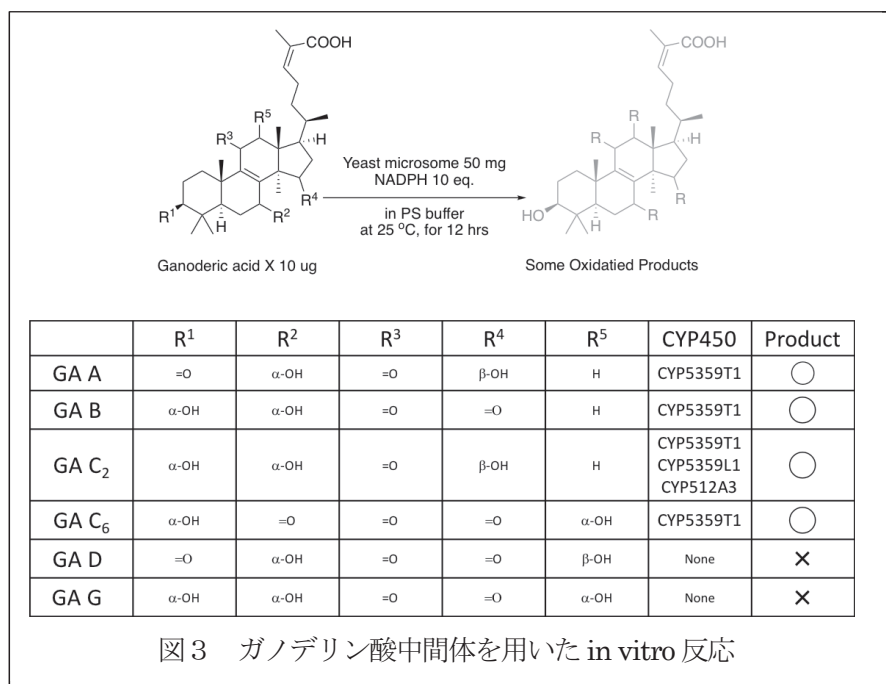
図1 ステロイド系抗生物質

■結果・考察

ヘルボール酸合成はこれまで、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* において、環化酵素 HelA が oxidosqualene を環化し protostadienol を与え、HelB 1 が脱メチル化へとつながるメチル基の酸化を触媒し、HelC が A 環水酸基の脱水素反応を触媒する生合成ステップが明らかになっていたが、それ以降の反応は未知であった(Mitsuguchi H, Seshime Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Kushiro T. Biosynthesis of steroidal antibiotic fusidanes: Functional analysis of oxidosqualene cyclase and subsequent tailoring enzymes from *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 6402)。そこで HelAB1C とクラスターを形成する HelB2, HelB3, HelB4, HelD1, HelD2, HelE を全て糸状菌宿主 *A. oryzae* NSAR1 株にて異種発現することで、生合成遺伝子の同定を行い、ヘルボール酸の合成を達成した。続いて、それぞれの遺伝子を個々に発現することで、oxidosqualene より環化、4 段階の酸化、2 段階のアセチル化、二回の脱水反応を経てヘルボール酸が生合成されることを示した(図 2)。また、それぞれの中間体を単離することで、13 種の非天然型のヘルボール酸を取得することに成功した。その中には、ヘルボール酸よりも高い抗ブドウ球菌活性を持つ中間体(化合物 18, 21, 22)が存在することを明らかにし、ステロイドの A、B 環の構造が活性に寄与することを示した。さらに、その過程で、P-450 酸化酵素と還元酵素が協奏的に働くことで、4 位の脱メチル化を行う新規な生合成経路を示すことに成功した。(Biosynthesis of helvolic acid and identification of an unusual C-4-demethylation process distinct from sterol biosynthesis, Lv JM, Hu D, Gao H, Kushiro T, Awakawa T, Chen GD, Wang CX, Abe I, Yao XS, *Nat. commun.*, **2017**, *21*, 1644)。



ガノデリン酸は A から Z まで数十種類の類縁体が存在するが、その生合成に関わる酵素はどれ一つとして同定されていない。生産菌の霊芝 *Ganoderma lucidum* は菌糸体、原基体、子実体といくつかの生育段階を経るが、そのうち子実体の時に発現する P450 酸化酵素をターゲットとしてその活性を試験することを計画した。中国科学院武漢植物園 Zhang Yansheng 教授より 9 種の霊芝 P450 cDNA を分与頂き、それを *Arabidopsis* 由来の CPR 酵素(ヘムの還元、P-450 の活性維持に関与)と共に酵母 *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 にてそれぞれ発現し、ガラスビーズにて酵母細胞壁を破碎、得られたタンパク質含有各分を 100000 x g 70 分で超遠心することで、P450 酵素を含むミクロソーム膜図分を取得した。このミクロソーム図分 50 mg をラノステロール、またラノステロールから $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 を用いた酸化にて調製したラノステロンと NADPH 存在下インキュベートしたが、残念ながら生成



物と思われる酸化体のピークは LC-MS 分析において検出されなかった。そこで、市販のガノデリン酸 A,B,C₂,C₆,D,G を購入し、それぞれ基質として用いて、これらの反応を試験した所、P-450 CYP5144 を含むミクロソームは、ガノデリン酸 B,A,C₆ と反応し、それぞれ、+14, +16, +36 m/z の増加したものを与える事が、LC-MS 分析により明らかとなった(図3)。これらは分子量より、新規化合物であると予想された。現在構造決定のためにこれらの大量調製を行っている。

■結論

本研究では、真菌由来のステロイド抗生物質の生合成酵素を同定し、酵素を用いた物質生産への道を切り開いた。ヘルボール酸生合成においてはその全貌を明らかにし、野生型の生成物より高い活性を持つ非天然型化合物を取得した。本研究で構築した *A. oryzae* ステロイド抗生物質生産系を元に、天然物を超える活性を持つ抗生物質を迅速簡便に生合成するシステムが構築されることで、創薬研究に大きく貢献することが期待される。また、多様な薬用活性を持つガノデリン酸 A の酸化を行う酸化酵素を見出し、これによって活性ガノデリン酸の生産のための基盤を構築した。本研究を行うにあたり、富山大学和漢医薬学総合研究所より助成を頂きまして、大変感謝しております。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

植物の防御反応を利用した水耕栽培薬用植物の機能性強化に関する研究

申請代表者 田中 謙 立命館大学薬学部 教授
所内共同研究者 渡辺志朗 病態制御研究部門栄養代謝学分野 准教授

■背景・目的

我が国で漢方方剤の製造原料として使用される生薬の約 90%は、主として中国などの海外からの輸入に依存している。しかしながら、近年の中国の経済成長を背景とする中国国内需要の増加や世界的健康志向の高まりによる欧米諸国での需要が増加に対して、環境変化や乱獲に伴う野生資源の枯渇により資源の減少が進んでおり、我が国が今後も安定して品質の高い生薬資源を確保することができるか危惧されている。一方、我が国での生薬生産量は、農業従事者の高齢化の進展、生薬価格の低迷の影響により依然として改善されていない。こうした状況を改善することを目的として、現在、農林水産省・厚生労働省は、共同で薬用植物の産地形成を進め「医福食農連携」事業として進めており、全国で水耕栽培を利用した薬用植物の栽培実験が展開されている。

生薬の有効成分とされる二次代謝物の多くは、本来ストレスに対する耐性や防御のために生産されているものと考えられる。従って、水耕栽培などの低ストレス環境で栽培すると植物体の成長は見込めるものの、二次代謝物の蓄積については必ずしも良好でない。これまでに、富山県で水耕栽培されたエゴマと路地植えのエゴマの成分比較を行った結果、水耕栽培では rosmarinic acid、flavonoid 類及び oleanolic acid などのトリテルペンの含有量が極めて低いことを明らかにした（図 1、2）。

研究代表者らはこれまでに、セリ科植物の主要な害虫であるキアゲハ幼虫の吐き戻し液から見出した脂肪酸誘導体のエリシターが、セリ科薬用植物のボウフウの培養植物で、防御に関する二次代謝物を誘導することを明らかにした。本研究では、このエリシターを無菌発芽させたエゴマ植物体に接種して、揮発性成分量の変動について研究し、水耕栽培による高機能性薬用植物栽培の実用化に資する知見を集積する。

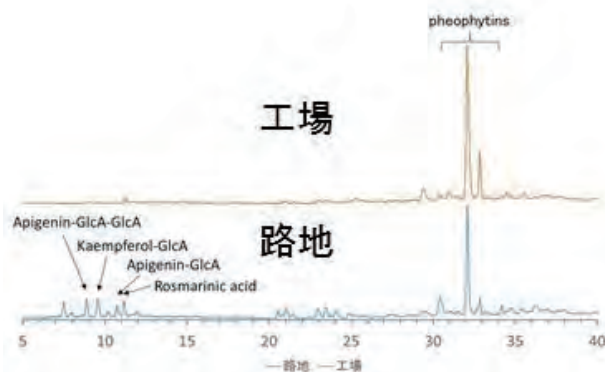


図 1 水耕栽培と路地栽培のエゴマメタノールエキスの LC-MS TIC

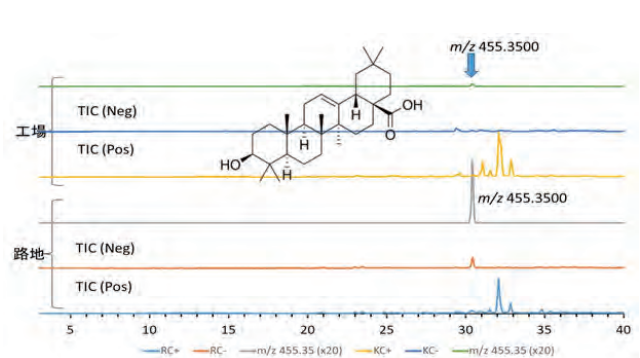


図 2 水耕栽培と路地栽培のエゴマクロロホルムエキスの GC-MS TIC

■方法

(1) 無菌培養エゴマの調製

エゴマの種を 70%エタノールで 1 分間混和後、0.1%PPM を含む滅菌液で 16 時間処理を行った。これらの種子を 0.5 %スクロース、0.8%寒天、1%PPM を含む寒天培地に播種し、25°C、明条件下で発芽させた。発芽した個体の種皮を除去し、3%スクロース、0.8%寒天、1%PPM、MS 培地を pH5.8 に調整した寒天培地に移し替え、25°C、明条件下で培養した。約 2 週間後、3%スクロース、0.8%寒天、MS 培地を pH5.8 に調整した寒天培地に移し替え、さらに 2 週間植物体を目的の大きさに成長させ実験に使用した。

(2) 揮発性成分量の分析

一週間に二回、エゴマの葉 3 枚にハサミで切りつけ、エリシター 10%溶液 20 μ l を塗布した。これを 8 週間

にわたって行い、植物体の抽出を行った(n=3)。植物体を液体窒素凍結下粉碎後、水-メタノール-クロロホルムを用いて抽出し、クロロホルム層を GC-MS で分析した。

GC-MS 条件 装置：島津 QP 2010GC-MS, カラム：DB-5MS (30 m×0.25 mm 膜厚 0.25 μm), 注入口温度 270℃, カラム温度：40℃ (3 分間保持) →300℃ (10℃/min で昇温), キャリアーガス：He 1 mL/min. EI モード; イオン化電流：60μA, イオン化電圧：70eV.

(3) エリシターに対する応答の解析

エゴマの葉 3 枚をはさみで切りつけ、そこに水または 10%エリシター溶液を 20 μl ずつ塗布した。その後、SPME を用いて 25℃、30 分で捕集した揮発成分を GC/MS で測定した。この分析を 1 時間毎に塗布 5 時間後まで行った。同様の実験を三日間連続して行い、葉から放出される成分を分析した。

GC-MS 条件は上記と同じ。

■結果・考察

エゴマ培養植物に対し、他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分量の変化を SPME GC-MS で解析したクロマトグラムを図 3 に示す。さらに、エゴマ特有の香り成分である perillaketone 及び植物の防御に関与することが知られている caryophyllene について、エリシター接種の有無による含有量を測定した結果を図 4、5 に示す。

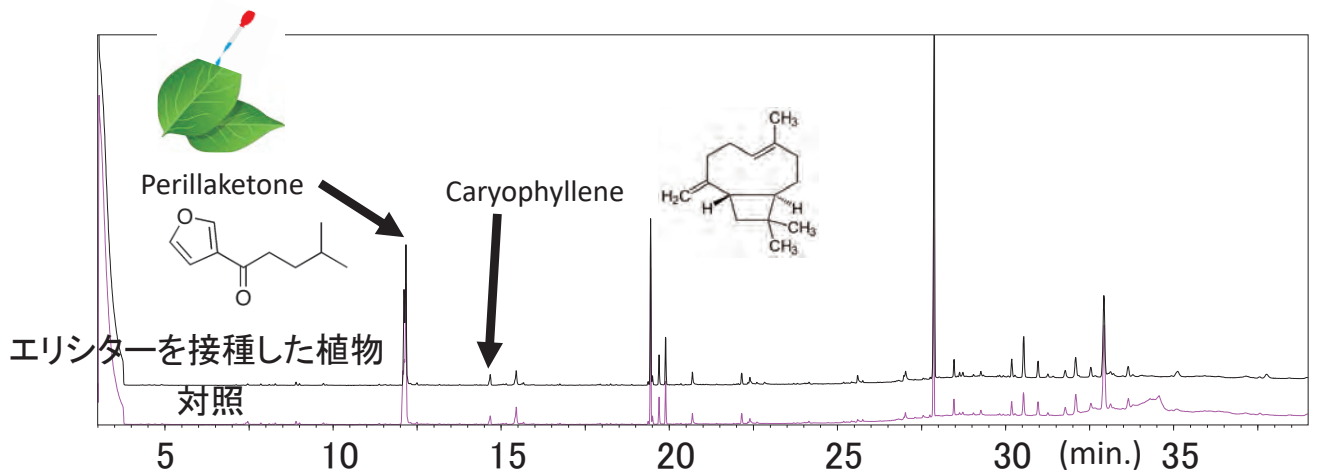


図 3 エリシターを長期間接種したエゴマの主要な揮発性成分量の変化を SPME GC-MS で解析したクロマトグラム

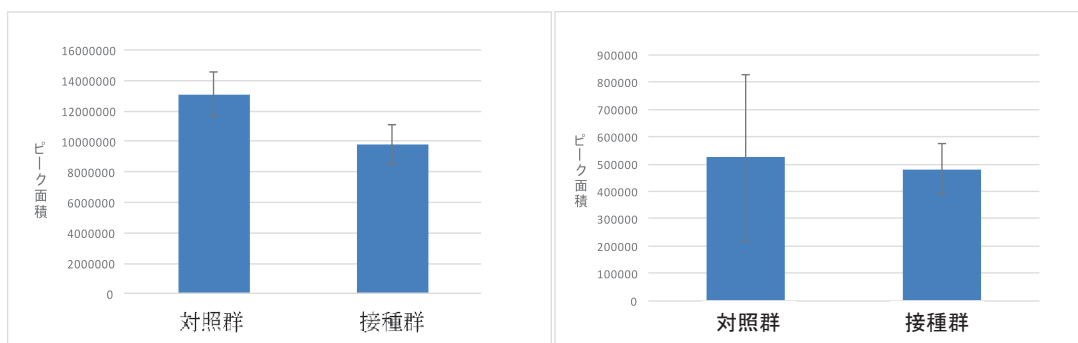


図 4 エリシターを長期間接種したエゴマの perillaketone 量変化

図 5 エリシターを長期間接種したエゴマの caryophyllene 量の変化

他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分である perillaketone 及び caryophyllene については、期待される代謝物量の増加は認められなかった。

植物は生態系からのストレスに耐えるためタンパク質の合成などを行い、防御機構を発動させる。そのためには、植物ホルモンがシグナル伝達物質として重要な役割を果たす。環境の変動 (乾燥・低温・高塩濃度など)

に対してはアブシジン酸が、病原菌抵抗性にはサリチル酸が、虫の食害などに対してはジャスモン酸が初期段階で関与することが知られている。さらに、ジャスモン酸が、植物防御に関与する二次代謝物合成を誘導することも報告されている[1]。

ジャスモン酸は、食害等による細胞の構造的破壊から生じるリノレン酸が、13-リポキシゲナーゼによって生成されるリノレン酸 13-ヒドロペルオキシドから生成されるが、この過程で、リノレン酸 13-ヒドロペルオキシドは一部 12-オキシ-9-ドデセン酸を経て3-ヘキセナールなどのオキシリピン類に変換され、近隣の植物に対し外敵の接近を知らせるシグナルとして放出される。今回実験に使用したエリシターが、ジャスモン酸シグナル経路による植物の二次代謝誘導に関与していることをメタボローム解析により裏付けるためには、葉からオキシリピン類が放出されるか否か明らかにする必要がある。そこで、エリシター接種後、葉から放出されるオキシリピン類を SPME-GC-MS 法により分析した。その結果を図6に示す。

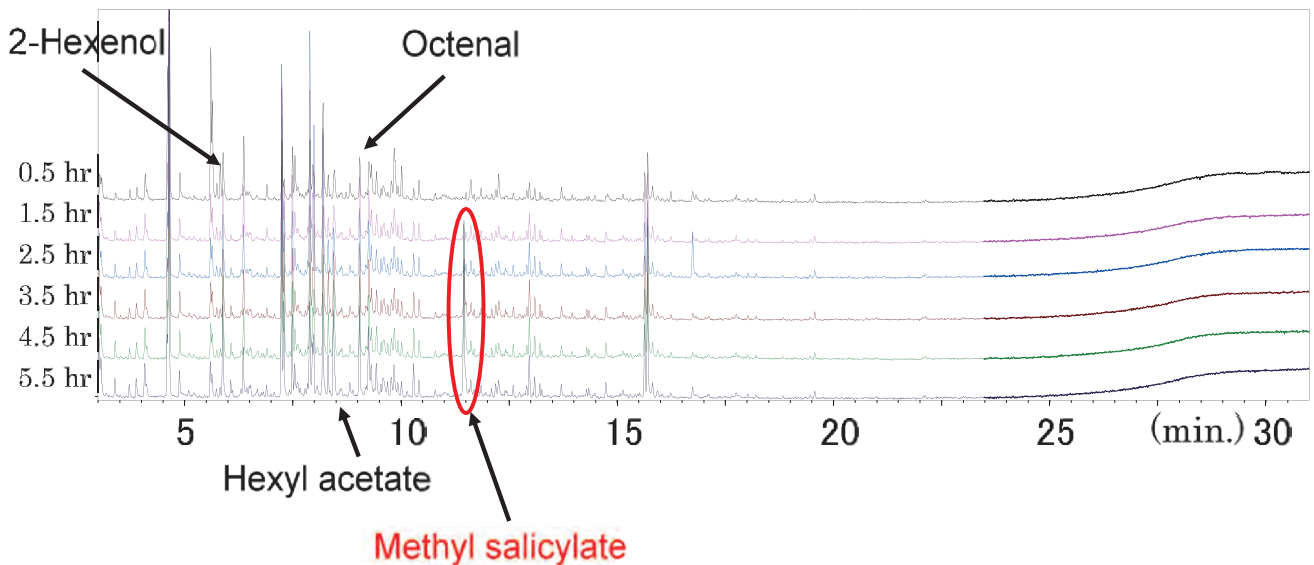


図6 エリシターを投与したエゴマ葉からの揮発成分の経時変化

エリシター投与後、ジャスモン酸シグナル経路活性化の指標となるオキシリピン類は検出されず、投与後 1.5 時間以降で病原菌などの感染防御に関与するサリチル酸メチルの放出が確認された。Heil らの報告によれば、植物体内でサリチル酸類は、ジャスモン酸の生合成及びジャスモン酸で誘導される二次代謝物合成を抑制し、全身獲得抵抗性を誘導する引き金となる[2]。

この結果から、今回実験で使用したエリシターでエゴマに対して有用な二次代謝物合成を誘導できなかった要因として、サリチル酸シグナル系が関与するジャスモン酸シグナル系の抑制が考えられた。

一方で、今回使用したエリシターで病原抵抗性を誘導できることが示唆されたが、サリチル酸類による全身獲得抵抗性の誘導後に見られる抵抗性は広い範囲の病原体に有効であり、現在、このような全身獲得抵抗性の誘導による病気に強い農作物の栽培を目的として、プロバナゾールなど 4 種の「プラントディフェンスアクティベーター」が農薬登録されている。今回の実験で使用したエリシターを新たなプラントディフェンスアクティベーターとして応用することも可能であると考えられた。

■結論

エゴマ培養植物に対し、他種の薬用植物で二次代謝物の誘導効果のある脂肪酸誘導体のエリシターを長期間接種し、エゴマの主要な揮発性成分量の変化を解析したが、期待される代謝物量の増加は認められなかった。その原因を明らかにするため、エリシター接種後、葉から放出されるシグナル伝達物質を分析した。その結果、虫害などの防御に関与するオキシリピン類及びジャスモン酸類の放出は検出されず、病原菌などの感染防御に関与するサリチル酸メチルの放出が確認された。

サリチル酸類は、ジャスモン酸の生合成に対して拮抗的に働くことから、二次代謝産物に変化がなかったと考えられる。一方で、今回使用したエリシターで病原抵抗性を誘導できることから、病気に強い植物の栽培へ応用することが可能であると考えられた。

■文献

- [1] 松井健二, & 有村源一郎. (2003). 情報化学物質として機能する植物揮発性成分の合成と制御 (特集 植物が放つ揮発性物質を介した動植物の相互作用—その生態機能と誘導のメカニズム). 蛋白質核酸酵素, 48(13), 1793-1800.
- [2] Heil, M., & Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of botany*, 89(5), 503-512.

漢方方剤・生薬由来新規抗マalaria薬の探索

申請代表者	平山 謙二	長崎大学 熱帯医学研究所	免疫遺伝学分野	教授
所外共同研究者	水上 修作	長崎大学 熱帯医学研究所	免疫遺伝学分野	助教
	Awet Alem Teklemichael	長崎大学 熱帯医学研究所	免疫遺伝学分野	大学院生
所内共同研究者	當銘 一文	資源開発研究部門	生薬資源科学分野	准教授
	小松 かつ子	資源開発研究部門	生薬資源科学分野	教授

■背景・目的

マalariaは代表的な蚊媒介性の感染症であり、マalaria原虫が宿主の肝臓内で増殖した（肝内期）後に赤血球に感染する（血中期）という生活環を持つ。2015年のWHOによる報告では、全世界で32億人もの人々がマalaria感染のリスクに晒されており、年間約2億件の感染と40万人以上の死亡者が報告されている。また、その大多数がサハラ以南アフリカで生じている（感染症例数の89%、マalaria関連死者数の91%）。現在、マalariaに対して十分な有効性を持つワクチンは開発されておらず、そのため、これまでに多くの抗マalaria薬が使用されてきた。しかしながら、耐性を獲得しやすいマalariaの性質の為、近年多く使用されているアルテミシニンに対しても既に耐性株が発見されており、未だに新たな抗マalaria薬が求められているのが現状である。

前述のアルテミシニンがヨモギ属の植物クソニンジン（チンハオス）から生まれたように、感染症分野においても、伝承医薬は医薬品ソースの宝庫と考えられている。我々も、国内外の伝承薬物について、抗マalaria薬になり得るのではないかと長年興味を持っていた。本研究開始までに、平成27-28年度に和漢医薬学総合研究所から提供された和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物・生薬熱水抽出エキス）を用いた抗マalaria活性のスクリーニング研究を行った。その結果、ライブラリーに含まれる複数の化合物・抽出エキスが抗マalaria活性を有することが明らかになった。

今回我々は、富山大学和漢医薬学研究所提供の和漢薬ライブラリーに含まれる抗マalaria活性を持つ化合物・生薬のより詳細な検討を行った。また、これに加えて、抗マalaria活性を持つ化合物・生薬を含む漢方方剤の抗マalaria効果を、*in vitro*及び*in vivo*（マウス）の実験系を用いて検討した。これは、既存の漢方方剤をマalaria対策に利用できるならば、抗マalaria薬開発を通常の医薬品開発と比べて短期間で行なえる可能性があると考えたためである。本研究の結果は、新規抗マalaria薬開発に大きく寄与するものとする。

■結果・考察

① 和漢薬ライブラリーの抗マalaria活性の検討： 各サンプル（化合物96種、生薬エキス120種）の抗マalaria活性を、赤血球期マalariaのモデルとなる*in vitro*実験系を用いて検討した。

方法：まず熱帯熱マalaria原虫（クロロキン/メフロキン感受性(3D7A)株）に感染したヒト赤血球（ヘマトクリット2%、感染率0.75%）を96ウェルクリアボトムブラックプレートに準備した。ここに、和漢薬ライブラリーに含まれる化合物及び生薬エキスを加え、37%インキュベーター内に置かれた混合ガス（90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂）で満たされたジャーの中で48時間培養を行った。その後、SYBR Green Iを用いたDNA蛍光染色によりマalaria原虫を検出し、コントロールとの蛍光強度の比較により、各サンプルのマalaria阻害率を算出した。

この検討は 2 段階で行われ、1 次試験 (スクリーニング) では一定濃度のサンプル (化合物 10 μM ・生薬エキス 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いた処理を行った。その結果、50 %以上の阻害活性を示したサンプルのみを続く 2 次試験で検討した。2 次試験では、段階希釈した各サンプルでマラリア感染赤血球を処理し、1 次試験同様に阻害率を算出した。この結果から、マラリアを 50%阻害する濃度(IC₅₀: 50% inhibitory concentration)を算出した。

2 次試験では、各サンプルの持つ細胞傷害性の検討も adult mouse brain (AMB)細胞を用いて行った。本実験でも段階希釈したサンプルでの細胞の処理を行い、細胞を 50%傷害する濃度(CC₅₀: 50% cytotoxic concentration)及び安全性の指標としての selectivity index(SI, CC₅₀/IC₅₀)の算出を行った。

また、これらの実験結果から優れた抗マラリア活性を持ちかつ安全性も高いと考えられた化合物・生薬エキスについては、クロロキン/メフロキン耐性(Dd2)株に対しての活性検討も行った。

結果: 2 次試験に用いたサンプルのうち化合物 7 種、生薬エキス 27 種について (化合物<10 μM 、生薬エキス<500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の) IC₅₀ が得られた。(この内、IC₅₀が化合物で 10 μM 以下、生薬エキスで 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のサンプルの結果を、表 1, 2 に示した。(なお一部化合物・生薬エキス名は、今後の特許出願の可能性のため、伏せた。)

考察: 化合物では、IC₅₀が 10 μM 以下を示した 7 化合物のうち、coptisine chloride, shikonin, berberine chloride, alkanin の IC₅₀が 5 μM 未満であったが、coptisine chloride 以外の 3 化合物は、CC₅₀も低値であったため、安全性が懸念された。これに対して coptisine chloride は、IC₅₀が最も低く CC₅₀も他の化合物と比較して高かったことに加えて、Dd2 に対しても抗マラリア活性を示した。その IC₅₀は、3D7A に対してのものよりは高値であったが、クロロキンではその数値が 10 倍程度高くなる (実験結果非掲載) ことを考えると、その数値は十分に低いものであると考えられた。Compound X および palmatine chloride は、IC₅₀は他と比べて低いものではないが、CC₅₀は 100 μM より大きく、安全性は高いものと考えられた。また、coptisine chloride, berberine chloride に palmatine chloride を加えた 3 種の berberine 誘導体化合物がいずれも低い IC₅₀を示したことも、特筆すべき実験結果であったと考える。

生薬エキスでは、IC₅₀が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下を示した 7 生薬エキスのうち、黄連の IC₅₀のみが 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であり、また強い細胞傷害性も認められなかった。

黄連は成分として coptisine, berberine, palmatine を含むことから、化合物・生薬エキスを用いたそれぞれの実験結果にも相関が認められた。このため、続いて黄連を含む漢方方剤から、今後の検討に使用する漢方方剤を選定することとした。

化合物名	IC ₅₀ (μM)		CC ₅₀ (μM)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
Coptisine chloride	1.1	3.1	41.6	37.8	13.2
Shikonin	1.9		5.1	2.7	
Berberine chloride	2.6		8.5	3.3	
Alkanin	2.9		5.8	2.0	
Compound X	5.3	13	> 100	> 18.9	> 7.6
Palmatine chloride	6.0	12	> 100	> 16.7	> 8.7
Costunolide	9.4		18.2	1.9	

表 1: 抗マラリア活性を示した化合物一覧 (IC₅₀< 10 μM)

生薬名	IC ₅₀ (μg/mL)		CC ₅₀ (μg/mL)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
黄連	2.5	3.2	> 500	> 200	> 153.8
生薬 Y	10.0		> 500	> 50.0	
黄柏	10.3		23.5	> 2.3	
丁子	26		> 500	> 19.2	
樸榔	62		> 500	> 8.1	
大黄	77		> 500	> 6.5	
胡麻	78		> 500	> 6.4	

表 2 : 抗マラリア活性を示した生薬エキス一覧 (IC₅₀ < 100 μg/mL)

② 黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果の検討:

1) 漢方方剤の選定

黄連を含む漢方方剤 (表 3) から、今回はその含有率を基準に、三黄瀉心湯及び黄連解毒湯を検討に使用する方剤として選定した。

生薬名	方剤名	黄連含有率 (%)
黄連	三黄瀉心湯	40.00
	黄連解毒湯	33.30
	黄連湯	13.60
	柴胡清肝湯	8.10
	荊芥連翹湯	7.70
	温清飲	6.25
	半夏瀉心湯	4.76
	竹筴温胆湯	3.30

表 3 : 黄連を含む漢方方剤とその黄連含有率

2) *In vitro* 実験での抗マラリア活性の検討

方法: ①と同様の方法で、三黄瀉心湯及び黄連解毒湯の抗マラリア活性及び細胞傷害性の検討を行った。

3D7A 及び Dd2 に対する IC₅₀ と AMB 細胞に対する CC₅₀ を決定し、SI の算出を行った。

結果: 2つの漢方方剤は、同等の抗マラリア活性を示し、ともに強い細胞傷害性は検出されなかった。また、Dd2 に対しても抗マラリア活性を示した (表 4)。

考察: 両者はほぼ同等の効果を示したが、続く動物実験にはより多量の方剤が必要であったため、必要量の入手が可能であった黄連解毒湯を、まず検討に用いることとした。

漢方方剤名	IC ₅₀ (μg/mL)		CC ₅₀ (μg/mL)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
三黄瀉心湯	41.0	89.0	> 1000	> 24.4	> 11.2
黄連解毒湯	36.0	104.0	> 1000	> 27.8	> 9.6

表 4 : 黄連を含む漢方方剤の抗マラリア活性検討結果 (*in vitro*)

3) *In vivo* 実験での抗マラリア効果の検討：黄連解毒湯及び黄連の抗マラリア効果をマウスを用いて検討した。

方法：マウスマラリア *Plasmodium yoelii* を C57BL/6 マウスに感染させ、同日から黄連解毒湯及び黄連の感染マウスへの経口投与を開始した。黄連解毒湯の投与量は、ヒトへ用いられる際の体重当たり投与量の 10 倍とし、黄連は（黄連解毒湯の黄連含有率から）その 1/3 量とした。サンプルは 200 μ L の純水に溶解し、投与はゾンデを用いて 1 日 2 回行った。また、感染翌日より採血を行い、ギムザ染色により赤血球のマラリア感染率を測定した（図 1）。本実験系実験では、感染 6~7 日後より、純水コントロール群でマラリア感染赤血球の溶血が始まり赤血球数が減少する。このため、マラリア感染率が抗マラリア効果の指標として使用できるのは 6 日目までと考えている。また、これらの実験に先立ち、別のサンプル投与マラリア（非感染）マウス群を準備し、投与 1 時間後のマウスから採取した血漿について ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)により分析を行い、黄連含有化合物が検出されるかを検討した。

結果：LC-MS を用いた解析は、サンプル投与から採血までの時間など実験条件の最適化が出来ておらず、プレリミナリー実験として行ったものではあるが、berberine, palmatine, coptisine, の 3 化合物が検出された（表 5）。

また、マウスマラリアの治療実験では、純水コントロール群と比較して、黄連解毒湯及び黄連投与群でマラリア感染率の低下が認められた。しかしこの内、黄連投与群での感染率低下はわずかなものであった。また、投与期間中にマウスの活動性や体温の低下など問題点も認められた。これに対して、黄連投与群では、黄連解毒湯投与群よりも大きな感染率低下が認められ、また見た目には目立った問題点も見受けられなかった（図 2）。

考察：黄連解毒湯は、投与量が原因と考えられる問題が生じ、抗マラリア効果もそれほど強くなかったため、今後開発を継続するのかは検討が必要である。

これに対して、黄連投与群では黄連解毒湯投与群で見られたような問題も無く、またより大きな感染率の低下が確認された。しかしながら、この効果も既存薬であるクロロキンに比べると弱いものであったため、プロトコールの再検討など改善が必要であると考えられた。

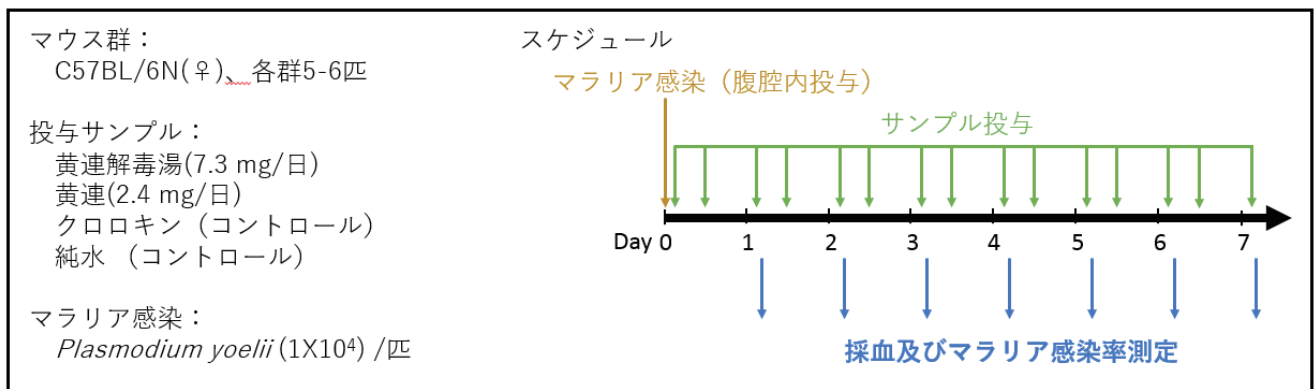


図 1：黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果検討(*in vivo*) 実験方法サマリー

化合物	m/z	黄連解毒湯投与マウス血漿					黄連投与マウス血漿				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
berberine	336.1	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○
palmatine	352.1	○	○	○	-	-	○	○	-	-	○
coptisine	320.1	△	-	○	-	△	○	○	-	-	○

表 5：黄連解毒湯・黄連投与マウス血漿中の黄連含有化合物の検出

C57BL/6 マウスに治療時と同量の黄連解毒湯・黄連経口投与を 1 回行い、投与後 1 時間後に採血を行った。血漿を分離し、化合物の検出を LC-MS を用いて行った。○：化合物シグナルを検出、△：化合物のものと考えられるシグナルを検出。

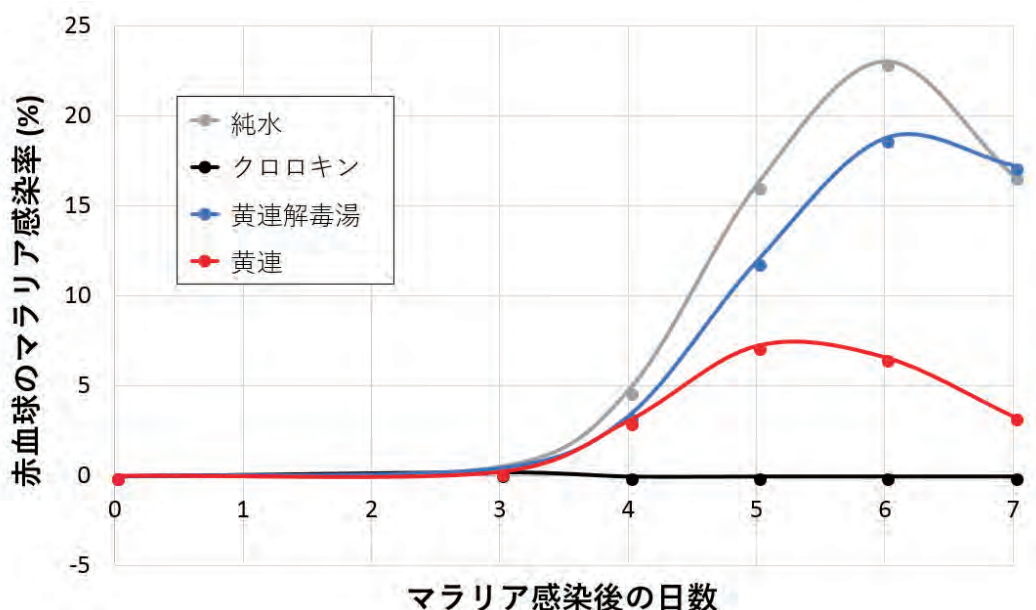


図 2：黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果検討(*in vivo*) 実験結果

■結論

本研究の結果、まず、和漢薬ライブラリーに含まれる多くの化合物・生薬エキスが抗マラリア活性を有することが分かった。特に、黄連及び関連する化合物(coptisine chloride, berberine chloride, palmatine chloride)が優れた抗マラリア薬につながる可能性が見出された。

本研究では、抗マラリア活性を有する生薬やそれを含む方剤を抗マラリア薬として用いる可能性を検討した。*In vitro*において、黄連を多く含む方剤である三黄瀉心湯・黄連解毒湯(及び黄連)が、薬剤感受性マラリア株のみならず耐性株にも抗マラリア活性を示したのは良好な結果であった。

今回は、時間的な制約のため、黄連解毒湯と黄連のみマウスマラリアモデルで抗マラリア効果を検討した。

ヒトへ用いられる際の体重当たり投与量の 10 倍量を使用した影響からか、黄連解毒湯投与マウスでは活動性・体温の低下が見られた。また、コントロール群と比較したマラリア感染率の低下も大きくなかったことから、今後も研究に用いるかは検討が必要となった。これに対して、黄連投与群では上記のような問題点は確認されず、

様式 1-5

種目（一般研究 I）

抗マラリア効果も黄連解毒湯投与群より強かった。しかし、その効果もコントロールとして使用した既存薬であるクロロキンよりは弱かったため、投与量や投与間隔などプロトコルの再検討が必要と考えられた。

今後、黄連を含む方剤及び黄連の単味生薬を抗マラリア薬候補として考え、いかにこの和漢薬に基づいた抗マラリア薬開発を進展させて臨床に還元させるかを、引き続き検討していく予定である。

原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析

申請代表者	加藤 健太郎	帯広畜産大学 原虫病研究センター	准教授
所外共同研究者	野中 基弘	帯広畜産大学 原虫病研究センター	学部生
所外共同研究者	韓 永梅	帯広畜産大学 原虫病研究センター	特任研究員
所内共同研究者	門脇 真	病態制御研究部門 消化管生理学分野	教授

■背景・目的

本研究の対象であるマラリア原虫とトキソプラズマは、ともにアピコンプレックス門原虫に分類されている。マラリアは、結核、エイズとともに世界三大感染症の一つに数えられる。蚊の吸血によってヒトに感染する原虫による循環器疾患であり、赤血球内での原虫の増殖・破壊による貧血を主症状とする。その感染者は、亜熱帯・熱帯地域に多く存在し、年間約 2 億人、死亡者は約 60～70 万人にのぼると報告され、その対策が急務とされている。既存の抗マラリア剤耐性株の出現のため、多くの新しい抗マラリア剤が開発され、また、マラリアワクチン開発の研究が世界規模で試みられているが未開発であり、マラリア撲滅には至っていない。

一方で、トキソプラズマ症はネコを終宿主とする人獣共通感染症である。感染動物由来の食肉を加熱不十分のまま生食したり、ネコの糞中のオーシスト（虫卵）が口の中に入ることによって感染する。臨床上問題となるのは妊婦の初感染であり、胎児に経胎盤感染することにより流産や胎児の脳症等を引き起こす。2012 年に我が国において患者会が設立され、NHK でもその被害が取り上げられた。ユッケやレバ刺しの食用等の近年の食習慣の変化に伴い、先天性トキソプラズマ症が拡大し、思春期に症状が出ることもあることから無自覚のものも含めると我が国の新生児において年間数百件の被害があると推定されている。現在のトキソプラズマ薬では病態を引き起こす急性感染虫体（栄養型）を潜伏感染虫体（休眠型）へと移行させるだけで根本的な駆虫に至らない。

我々の研究グループは、富山大学和漢医薬学総合研究所の平成 27 年度の探索研究において、「トキソプラズマ原虫の増殖及び潜伏感染を抑制する生薬由来化合物及び生薬エキスの探索」という研究課題で採択された。この研究成果から、抗トキソプラズマ薬のシーズとして、いくつかの有望な生薬由来化合物及び生薬エキスを同定することに成功した。

このような背景から、一般研究 I の目的は、探索研究で同定された生薬由来化合物及び生薬エキスについて、それらの抗トキソプラズマ効果の作用機序の解析を行う。さらに、マラリア原虫も対象とすることで、抗マラリア効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明を行うことである。

■結果・考察

本研究は、和漢医薬学総合研究所から分与された和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物、生薬エキス）を使用して行った。

1) 抗トキソプラズマ効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明

i) 抗トキソプラズマ原虫活性を持つ生薬の選抜

【方法 1】抗トキソプラズマ原虫活性の評価

バクテリア型 β -Galactosidase を発現した原虫株である RH_2F 株 (ATCC:50839) をヒト初代繊維芽細胞である HFF 細胞に感染させ、生薬由来化合物 10 μ M または生薬エキス 100 μ g/ml 存在下で 48 時間培養し、溶媒対照である DMSO 群と比較した際の β -Galactosidase 活性の減少を、生薬による原虫増殖阻害効果として測定した。

【方法 2】 宿主細胞毒性の評価

HFF 細胞を方法 1 と同じ濃度の生薬由来化合物および生薬エキス存在下で 48 時間培養し、宿主細胞数を測定した。

【結果】

生薬由来化合物 96 種類のうち、原虫数を反映する β -Galactosidase 活性を 70%以上低下させた化合物は 7 種類であった (表 1)。また、生薬エキス 120 種類の中で同様に 70%以上低下させたものは 6 種類であった (表 2)。これらのうち、同濃度で宿主細胞に対して 50%以上の毒性を示したものは、原虫数の減少は宿主細胞の死滅によるものと考えられるため、Timosaponin A-III とゴウカンピについては、以降の検討からは除外した。その結果、6 種類の生薬由来化合物および 5 種類の生薬エキスを抗トキソプラズマ原虫活性をもつヒット化合物として同定した。

表 1. 生薬由来化合物のスクリーニング結果

compound	Parasite inhibition (%)	Host cell inhibition (%)
shikonin	87.3	43.4
Alkannin	86.9	-0.3
Timosaponin A-III	81.4	98.3
Berberine Chloride	85.5	-3.0
Baicalein	80.1	3.3
Luteolin	74.3	-7.9
Coptisine Chloride	73.3	6.4

表 2. 生薬エキスのスクリーニング結果

extract	Parasite inhibition (%)	Host cell inhibition (%)
オウゴン	86.7	-4.4
マンケイシ	83.5	22.7
カンゾウ	83.1	-3.4
ゴウカンピ	82.6	97.6
オウバク	81.5	11.7
オウレン	76.6	14.7

ii) 生薬由来化合物及び生薬エキスの原虫に対する選択性評価

【方法】

i)と同様の原虫株および宿主細胞に対する生薬の 50%増殖阻害濃度をそれぞれ算出し、比較した。50%原虫増殖阻害濃度 / 50%宿主細胞増殖阻害濃度の値が 10 以上である化合物を新規薬剤候補とした。

【結果】

6 種類の生薬由来化合物のうち、50%原虫増殖阻害濃度 / 50%宿主増殖阻害濃度の値 (選択性) が 10 倍以上である化合物は 4 種類であった。Shikonin は原虫に対する選択的阻害があるが、宿主に対しても比較的低い濃度でも毒性を示すため除いた。また、Baicalein, Luteolin, Coptisine Chloride は今回のアッセイで最高濃度の 50 μ M でも宿主に対して毒性を示さなかったことから、原虫に対して高い選択的阻害を持つと考えられる (表 3)。

5 種類の生薬エキスは、いずれも今回のアッセイで最高濃度である 500 μ g/ml で宿主細胞毒性を示さなかった。カンゾウは選択性が 10 倍以下であったため、除いた。オウゴン、マンケイシ、オウバク、オウ

レンは原虫に対する 50%阻害濃度が低く、原虫に対する選択的な毒性が強いことが分かった (表 4)。

表 3. 生薬由来化合物の原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

Compound	IC ₅₀ for parasite growth (μM)	IC ₅₀ for host cell (μM)	選択性
Shikonin	1.4	17.8	12.7
Alkannin	1.3	5.4	4.1
Berberine Chloride	2.2	2.8	1.3
Baicalein	5.0	50<	>10
Luteolin	5.7	50<	>8.8
Coptisine Chloride	2.1	50<	>23.8

表 4. 生薬エキスの原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

Extract	IC ₅₀ for parasite growth (μg/ml)	IC ₅₀ for host cell (μg/ml)	選択性
オウゴン	7.1	500<	70.4
マンケイシ	14.9	500<	33.6
カンゾウ	96.9	500<	5.2
オウバク	14.6	500<	>34.2
オウレン	7.3	500<	>68.5

【考察】

以上の結果より、生薬由来化合物である Baicalein, Luteolin, Coptisine Chloride の 3 種および、生薬エキスである オウゴン、マンケイシ、オウバク、オウレンの 4 種を新規の抗トキソプラズマ原虫活性をもち、今後薬剤として使用できる可能性のある物質として同定した。今後は、感染動物実験や潜伏感染虫体への薬剤効果の解析を行っていきたい。

2) 抗マラリア効果を持つ生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とそれらの作用機序の解明

i) 抗熱帯熱マラリア原虫活性を持つ生薬の選抜

【方法 1】抗原虫作用の測定

一次スクリーニングとして D-sorbitol 処理により初期トロホゾイトに同調させた熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum* 3D7 株) を 0.3% parasitemia、1% hematocrit に調製し、化合物 10μM or エキス 100μg/ml となるように候補薬剤を添加した培養液 150μL を用いて 37°C、5% O₂、5% CO₂ の条件で 96 時間培養した。途中 48 時間で培養液を 50μL 加えた。96 時間後に回収して塗抹を作成し、検鏡によって parasitemia を測定し、薬剤添加群とコントロール群と比較することで抗原虫作用を評価した。陽性コントロールには Pyrimethamine、陰性コントロールには滅菌水を用いた。

一次スクリーニングで抗原虫作用を示した化合物について、より低濃度での抗原虫作用を評価するため、薬剤濃度を複数段階 (化合物 : 50、10、2、0.4μM / エキス : 100、20、4、0.8μg/ml) にふった培養液を用意し、一次スクリーニングと同様の実験を二次スクリーニングとして行なった。二次スクリーニングにおいて低濃度で抗原虫作用を示した化合物およびエキスについては IC₅₀ (50%阻害濃度) を測定した。

【方法 2】宿主細胞生存率の評価

熱帯熱マラリア原虫の宿主であるヒトの細胞のうち、ヒト胎児腎臓上皮由来 293T 細胞に薬剤を添加した 10%FBS 含 DMEM 培地で 37°C、5%O₂、5%CO₂ の条件で 48 時間培養し、溶媒対照群と比べた際の細胞数の変化を宿主細胞生存率として測定した。

【結果】

スクリーニング実施済みである 96 化合物および 120 エキスは抗熱帯熱マラリア作用を示し、そのうち

90%以上の増殖阻害率を示した 9 化合物および 19 エキスが抗熱帯熱マラリア活性を示す化合物として選択された。選ばれた 9 化合物および 19 エキスについて、化合物については全 9 種類、エキスについては上位 9 種類を選抜し、以下の実験を進めた。9 化合物および 9 エキスについて、低濃度 (0.4 μ M および 20 μ g/ml) での抗原虫作用を検討した。その結果低濃度においても 80%以上の抗原虫作用を示す 4 化合物および 4 エキスを得た。この 4 化合物および 4 エキスについて原虫に対する IC₅₀ を測定した (表 5, 6)。

4 化合物および 4 エキスについては宿主細胞への毒性を評価し、宿主細胞生存率の分布が得られた。薬剤濃度 1 μ M 以下および 1 μ g/ml 以下では、4 化合物および 4 エキスのすべてで宿主細胞の生存率は 70%以上であった。

ii) 生薬由来化合物及び生薬エキスの原虫に対する選択性評価

4 化合物および 4 エキスについて、宿主細胞に対する IC₅₀ を測定した (表 5, 6)。これらの結果より、4 化合物および 4 エキスの原虫への選択性指標 (宿主細胞生存 50%阻害濃度 /原虫増殖 50%阻害濃度) を計算した (表 5, 6)。選択性指標が 10 倍以上である化合物は 4 種類、エキスは 2 種類であった。チョウジ、モツヤクについては、選択性指標が 10 倍未満であるため、除外した。

表 5. 生薬由来化合物の原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

生薬由来化合物	原虫 IC ₅₀ (nM)	宿主 IC ₅₀ (μ M)	選択性
Berberine Chloride	34.6	7.5	217
Coptisine Chloride	34.1	>10	>293
Dehydrocorydaline Nitrate	76.0	>10	>132
Palmatime Chloride	51.5	>10	>194

表 6. 生薬エキスの原虫および宿主に対する 50%阻害濃度と選択性

生薬エキス	原虫 IC ₅₀ (μ g/ml)	宿主 IC ₅₀ (μ g/ml)	選択性
オウバク	0.3133	30.9	99
オウレン	0.5942	6.4	11
チョウジ	11.9	30.6	3
モツヤク	23.4	>100	>4

【考察】

以上の結果より、生薬由来化合物である Berberine Chloride, Coptisine Chloride, Dehydrocorydaline Nitrate, Palmatime Chloride の 4 種および、生薬エキスであるオウバク、オウレンの 2 種を新規の抗マラリア原虫活性をもち、今後薬剤として使用できる可能性のある物質として同定した。

iii) 選抜された生薬由来化合物及び生薬エキスの効果のある原虫ステージの解析

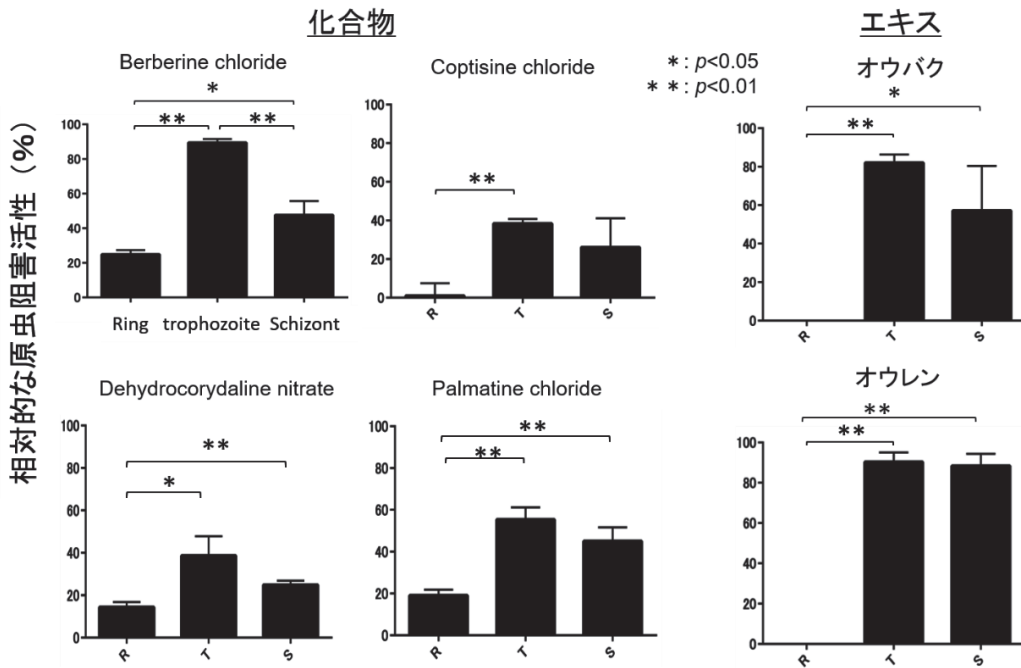
【方法】薬剤を添加した各原虫ステージでの原虫感染率の測定

ここまで選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類について、マラリア原虫の赤内型の各ステージ (Ring, Trophozoite, Schizont) のどのステージの虫体に効果を示しているか解析を行った。同調培養したマラリア原虫について、Ring 期 (侵入後 0-24 時間)、Trophozoite 期 (侵入後 24-36 時間)、Schizont 期 (侵入後 36-48 時間) において薬剤を添加し、侵入後 48 時間後に感染率の計測を行った (図 1)。

【結果】

選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類については、各々の阻害率に差があるものの Trophozoite 期及び Schizont 期において原虫に対する増殖阻害効果があることが明らかとなった (図 1)。

図 1. 生薬由来化合物及び生薬エキスの効果のある原虫ステージの解析



【考察】

以上の結果から、選抜された化合物 4 種類、エキス 2 種類は、原虫の増殖に関わる遺伝子発現や DNA 複製を阻害していると考えられる。今後は薬剤耐性株での薬剤効果について解析を行っていききたい。

■結論

抗トキソプラズマ原虫活性を持つ生薬由来化合物、生薬エキスと抗マラリア原虫活性を持つ生薬由来化合物、生薬エキスの同定を行った。両者で同定された化合物とエキスには重複したものが明らかに多かったため、原虫類において共通の増殖抑制機構がある可能性がある。このことから、今後はクリプトスポリジウム原虫等、他の原虫についても今回同定された薬剤での増殖阻害効果を解析していききたい。さらに、同定した薬剤のターゲットとなっている原虫蛋白質の同定とこれらの遺伝子発現機構について解析を行う必要がある。

精神疾患モデル動物のエピジェネティクス異常に対する和漢薬の作用の解析

申請代表者	荒木 良太	摂南大学薬学部 複合薬物解析学研究室	助教
所内共同研究者	藤原 博典	病態制御研究部門 複合薬物薬理学分野	助教
	松本 欣三	病態制御研究部門 複合薬物薬理学分野	教授

■背景・目的

近年、うつ病や不安障害などの精神疾患が急増しており、早急な対策が求められている。これら疾患の治療においては西洋薬による薬物療法が主流となっているが、副作用が高頻度で見られることや薬物に反応しない治療抵抗性患者が多数存在することなど問題点も多く、西洋薬による薬物療法とは異なる治療戦略が必要と考えられる。一方で漢方薬などの和漢薬のなかには、精神機能の異常に対して有効性を示すものがいくつか知られている。しかしながら、これら和漢薬は作用機序の詳細が不明であることから、科学的なエビデンスを求める現代医療において十分に活用されているとは言い難い。こうした点から、和漢薬の作用機序に関する科学的なエビデンスを蓄積することは、和漢薬の活用を促し、より良い精神疾患治療につながるものと考えられる。

精神疾患は遺伝要因と環境要因の相互作用により発症するものと考えられているが、その分子基盤として、DNA のメチル化やヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな機序が注目されている。これまでに申請者と共同研究者の松本らは、精神機能の異常に関連するエピジェネティックな変動を明らかにするために、隔離環境での飼育したマウスを用いた研究を進めてきた。その結果、本マウスではうつ・不安様の行動が見られること、GABA_{B1a}（GABA_B 受容体サブユニットの 1 つ）をコードする遺伝子のプロモーター領域における DNA メチル化の減少とヒストンアセチル化の増加が背側縫線核で見られることを明らかにしてきた。さらに、こうしたエピジェネティックな変動に伴って GABA_{B1a} の mRNA 発現量が増加していること、背側縫線核の GABA_B 受容体が隔離飼育マウスの異常行動に関与することも示してきた¹⁾。

こうした背景から我々は、漢方薬の作用機序を明らかにすることを目的に、行動薬理的解析に加えてエピジェネティクス解析、神経化学的解析を行っている。前年度までの検討から、漢方薬の加味温胆湯は、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動を抑制するのに対し、GABA_{B1a} 遺伝子のエピジェネティックな発現調節には影響を与えないことを見出してきた。そこで本研究では、神経化学的な側面から加味温胆湯の詳細な作用機序の解析を試みた。また前年度の検討から、エピジェネティックな作用を有する可能性が高いと想定された漢方薬である酸棗仁湯についても同様に、行動薬理的解析、遺伝子発現解析、神経化学的解析を行った。

■方法

隔離飼育マウスの作製

雄性の ddY 系マウス（Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan）を 3 週齢から 6~8 週間、集団飼育マウスは透明なケージ（24×17×12 cm）にて 5 匹で、隔離飼育マウスは同じサイズの周囲が灰色のケージにて 1 匹で飼育して実験に用いた。動物は、室温 23±1℃で明期 8:00~20:00、暗期 20:00~8:00 の 12 時間明暗サイクルで飼育した。水および飼料は自由に摂取させた。

漢方薬エキスの投与

加味温胆湯エキス、酸棗仁湯エキスは 300 mg/kg または 1000 mg/kg の用量で精製水に溶解し、10 ml/kg の用量で経口投与した。単回投与の実験は試験の 1 時間前に投与した。長期投与の実験は、集団飼育あるいは隔離飼育の 6 週目から 1 日 1 回 14 日間投与し、最終投与の翌日に各種解析を行った。

mRNA 発現量の解析

TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて、マウスの背側縫線核から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1 μg から cDNA を合成した。合成した cDNA の解析は、表 1 のプライマーを用いて real-time PCR 法により行い、 β -actin の mRNA 発現量で補正した。

表 1. mRNA 発現量の解析に用いたプライマー

mRNA	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA _{B1a}	ACGTCACCTCGGAAGGTTG	CACAGGCAGGAAATTGATGGC
β -actin	ACCCACACTGTGCCCATCTA	GCCACAGGATTCCATACCCA

他のマウスと遭遇した際の行動の解析

透明なアクリルケージ (30×30×35 cm) に網目状の仕切りを設置し、解析マウスを大きい区画に入れ 3 時間馴化させた。その後、同週齢の新奇マウスを小さい区画に入れ、ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて 20 分間の解析マウスの行動を解析した (図 1)。

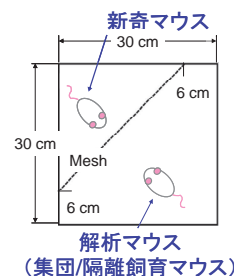


図 1. 他のマウスと遭遇した際の行動解析のケージ

新奇環境下における運動量の解析

透明なアクリルケージ (30×30×35 cm) に解析マウスを入れ、ANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL) を用いて 30 分間の移動距離を解析した。

攻撃行動の解析

解析マウスと同週齢の ddY 系雄性マウスを測定用ケージ (24×17×12 cm) に入れ、20 分間行動をビデオ撮影した。解析マウスが示した噛み付き行動を攻撃行動と定義し、攻撃行動の時間を測定した。

In vivo 脳微小透析法

ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, i.p.) 麻酔下、マウスの大脳皮質前頭前野 (ブレグマより 1.9 mm 前方、0.5 mm 右側方、頭蓋表面より深さ 0.8 mm) にガイドカニューレ (深さ 4 mm: Eicom, Kyoto) を挿入固定した。術後、マウスに鎮痛薬としてブプレノルフィン (0.01 mg/kg, i.p.) を投与し、個別ケージにて飼育した。測定時は透析プローブ (膜長 3 mm: Eicom, Kyoto) をガイドカニューレに挿入し、リンゲル液 (147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂) を流速 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ で灌流した。サンプルは 20 分単位で回収し、直ちに高速液体クロマトグラフィー/電気化学検出器 (HPLC/ECD) システムに連続自動注入した。薬物は、プローブ挿入後、基礎遊離量の安定化を確認してから投与した。なお、測定は術後 3 日以内に実施した。NA、DA、5-HT の分析には、HPLC/ECD システムを用い、以下の条件で測定を行った。カラムには Eicompak CAX-ODS (4.6 mm i.d. × 30 mm: Eicom, Kyoto) を用いた。解析にはデータ解析システム Power Chrom[®] (eDAQ Pty., Ltd. Nagoya) を用い、サンプル中のノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量を内部標準物質との面積比により算出した。各神経伝達物質遊離量の変化は、測定開始から数時間後にマウスの基礎遊離量が安定したことを確認し、処置前の 3 サンプルの基礎遊離量の平均を 100% とし、その割合で表した。

統計解析

データは全て「平均値±標準誤差」として表し、統計学的処理には Stat View 5.0[®] (SAS Institute Inc, Tokyo) を使用した。In vivo 脳微小透析法 (図 2, 4, 5, 8) の統計解析には、反復測定二元配置分散分析を行った。その他の統計解析は、二元配置分散分析の後に多重比較検定として Dunnett 検定 (図 3) または Tukey-Kramer 検定 (図 6, 7) を行い、 $p < 0.05$ のものを有意差ありとした。

■結果・考察

加味温胆湯が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

前年度の行動薬理的検討から、加味温胆湯は抗うつ薬に類似した作用を有するものと推測された。そこで本研究では、加味温胆湯が抗うつ薬と同様に細胞外モノアミン量を増加させるかを明らかにするために、*in vivo* 脳微小透析法により大脳皮質前頭前野の細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量を解析し、選択的セロトニン再取り込み阻害作用を持つ抗うつ薬であるフルオキセチンの作用と比較した。正常マウスに加味温胆湯 (1000 mg/kg, p.o.) を投与したところ、40 分後をピークとした一過性で選択的な細胞外セロトニン量の増加が確認された。一方でフルオキセチン (30 mg/kg, p.o.) は、細胞外セロトニン量の顕著で持続的な増加と、細胞外ノルアドレナリン量と細胞外ドパミン量の緩やかな増加を引き起こした (図 2)。本結果から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を選択的に増加させる作用を有することが明らかとなった。しかしながら、加味温胆湯による細胞外セロトニン量増加作用はフルオキセチンの作用と比べると増加率も小さく、持続性も見られなかったことから、加味温胆湯による細胞外セロトニン量増加作用はセロトニン再取り込みの阻害によるものではない可能性が考えられた。

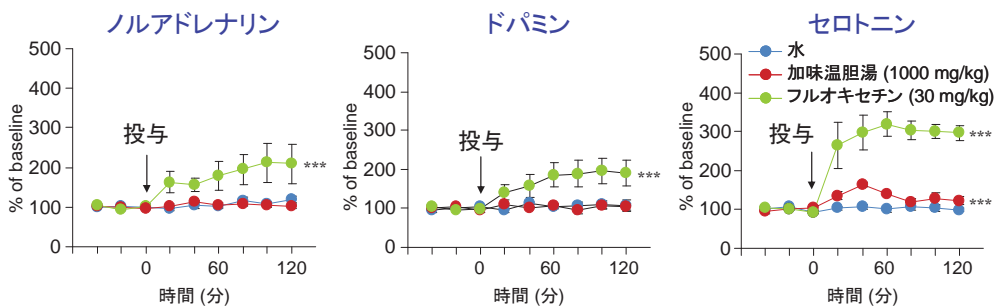


図 2. 加味温胆湯、フルオキセチンが大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (***) $p < 0.001$ vs 水, $n=5$)

加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に関与する構成生薬の同定

加味温胆湯の投与により大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量が増加したことから、次に加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に関与する構成生薬の同定を試みた。加味温胆湯を構成する生薬 (半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜、竹筴、枳実、遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参) のうち、いずれか 1 つを除いた一味抜き処方を作製し、大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を *in vivo* 脳微小透析法により解析した。投与後から 1 時間における細胞外モノアミン量の変化率を Net-AUC で評価した結果、竹筴抜き処方 (1000 mg/kg, p.o.) において細胞外セロトニン量増加作用の著しい減弱が見られた。他の一味抜き処方 (1000 mg/kg, p.o.) では、細胞外セロトニン量増加作用に大きな変化は見られなかった (図 3)。本結果から、加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用には、竹筴が重要な役割を担う可能性が示された。

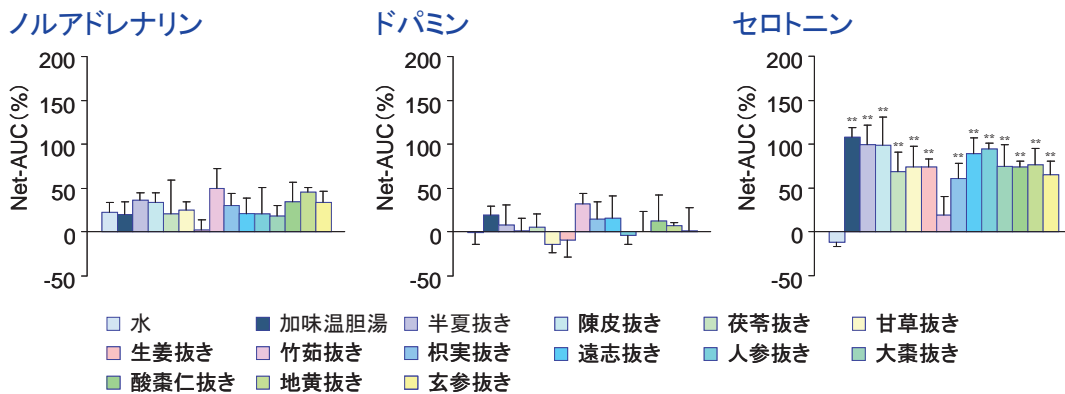


図 3. 加味温胆湯一味抜き処方が大脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (**) $p < 0.01$ vs 水, $n=3-5$)

竹筴エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用に竹筴が重要な役割を担う可能性が示されたことから、次に、竹筴単味エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。エキス作製時の収率をもとに、加味温胆湯 (1000 mg/kg) に含まれると想定される竹筴エキス量 (66.5 mg/kg, p.o.) を算出した。算出された竹筴エキス量 (66.5 mg/kg, p.o.) を投与したところ、細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量のいずれも変化は見られなかった (図 4)。本結果から、細胞外セロトニン量増加作用には竹筴だけでは十分でない可能性が考えられた。

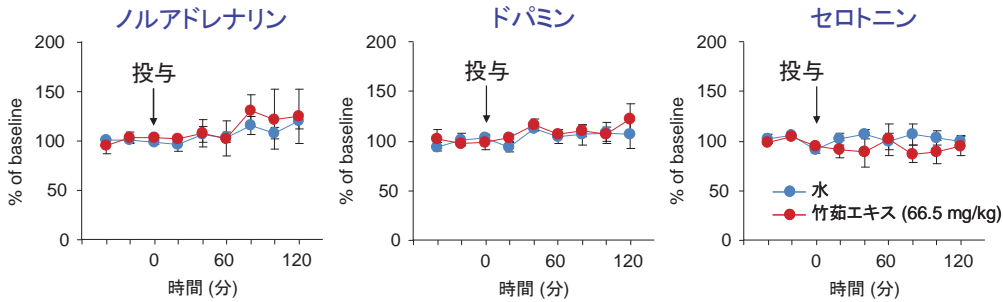


図 4. 竹筴エキスが脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (n=3-4)

二陳湯と温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

竹筴エキスのみでは細胞外セロトニン量増加作用がみられないことから、細胞外セロトニン量増加作用には竹筴と他のなんらかの生薬との組み合わせが重要である可能性が考えられる。そこで、加味温胆湯の構成に注目した。加味温胆湯は二陳湯の加減方であり、半夏、陳皮、茯苓、甘草、生姜の 5 つの生薬からなる二陳湯に、竹筴と枳実の 2 つの生薬を加えることで温胆湯となる。この温胆湯にさらに 6 つの生薬 (遠志、人参、大棗、酸棗仁、地黄、玄参) を加えることで加味温胆湯となる。この 3 つの漢方処方 の効能・効果を見てみると、二陳湯は体力中等度で悪心・嘔吐があるものの胃部不快感等に対して用いられるのに対し、温胆湯と加味温胆湯は体力中等度以下で胃腸が虚弱なものの不眠・神経症に対して用いられる。このように、竹筴と枳実が加えられて温胆湯となることで不眠・神経症などの神経精神症状に対して効果を発揮することからも、中枢神経系に対する作用における竹筴の重要性が伺える。そこで次に、竹筴を加える前の処方である二陳湯と竹筴を加えた後の処方である温胆湯において、脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を比較した。その結果、二陳湯 (1000 mg/kg, p.o.) は細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量のいずれにも影響を及ぼさなかったのに対し、温胆湯 (1000 mg/kg, p.o.) は細胞外セロトニン量を選択的に増加させた (図 5)。以上の結果から、細胞外セロトニン量増加作用には、温胆湯を構成する生薬が重要であるものと考えられた。また、不眠や神経症に対して用いられる温胆湯と加味温胆湯の両方において細胞外セロトニン量増加作用が見られたことから、この細胞外セロトニン量増加作用が不眠や神経症に対する作用において重要である可能性が考えられた。

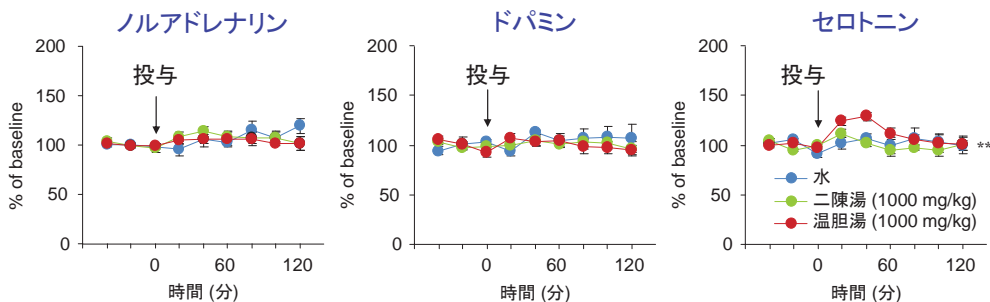


図 5. 二陳湯、温胆湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (** $p < 0.01$ vs 水, n=3-4)

隔離飼育マウスで見られる多動や GABA_{B1a} の発現増加に対する酸棗仁湯の影響

これまでの検討から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量を一過的に増加させることを見出した。一方で、前年度までの検討から、加味温胆湯は隔離飼育マウスの背側縫線核で見られる GABA_{B1a} のエピジェネティックな発現調節異常に対しては改善作用を示さないことが明らかとなっている。

そこで次に、エピジェネティックな作用を有する漢方薬の見出すことを目的に、新たな漢方薬として酸棗仁湯の作用を解析した。これまでに共同研究者の藤原らにより、酸棗仁湯の慢性投与が隔離飼育マウスの社会性行動異常などの異常行動を改善することが報告されていることから²⁾、酸棗仁湯は隔離飼育マウスで見られるエピジェネティックな異常を改善する可能性が考えられる。そこで、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動や、隔離飼育マウスの背側縫線核における GABA_{B1a} mRNA 発現増加を指標に、酸棗仁湯の 14 日間投与が行動異常やエピジェネティックな遺伝子発現調節異常に及ぼす影響を検討した。その結果、酸棗仁湯 (1000 mg/kg, p.o. 1 日 1 回 14 日間投与) は隔離飼育マウスで見られる多動や GABA_{B1a} mRNA の増加に対して、改善作用を示さなかった (図 6)。

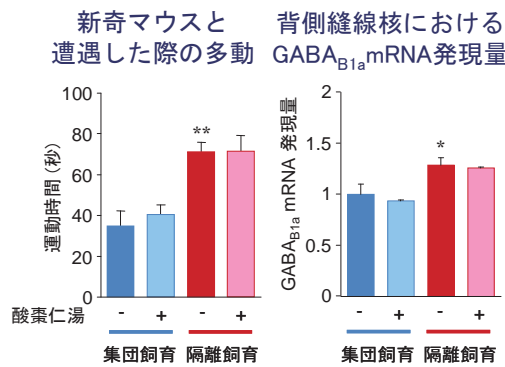


図 6. 隔離飼育マウスで見られる多動や GABA_{B1a} の発現増加に対する酸棗仁湯の影響 (** $p < 0.01$ vs 水, $n = 5-9$)

酸棗仁湯の単回投与の影響に関する行動薬理的解析

酸棗仁湯の 14 日間投与では、隔離飼育マウスで見られる行動異常ならびに遺伝子発現異常の改善が見られなかったことから、次に酸棗仁湯の単回投与の影響を行動薬理的に解析した。その結果、酸棗仁湯 (300, 1000 mg/kg, p.o.) は、隔離飼育マウスが他のマウスと遭遇した際に示す多動や攻撃行動、新奇環境下における多動を用量依存的に改善するといった抗不安様作用を示した (図 7)。

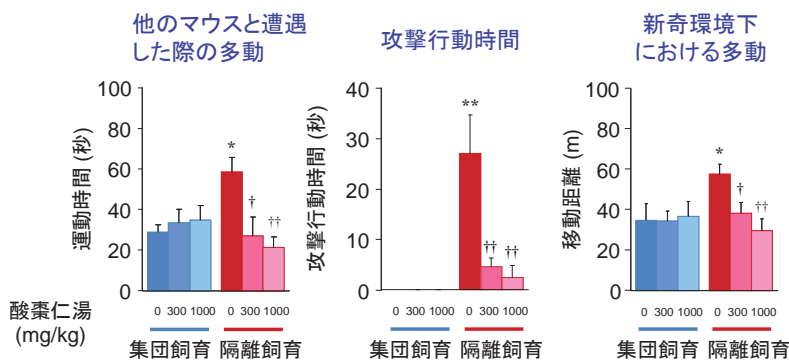


図 7. 隔離飼育マウスで見られる異常行動に対する酸棗仁湯の影響 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 集団飼育, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs 水, $n = 5-7$)

酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響

酸棗仁湯の単回投与により抗不安様作用が見られたことから、酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響を解析した。その結果、酸棗仁湯 (1000 mg/kg, p.o.) は、細胞外ノルアドレナリン量、ドパミン量、セロトニン量に対してなんら影響を及ぼさなかった (図 8)。

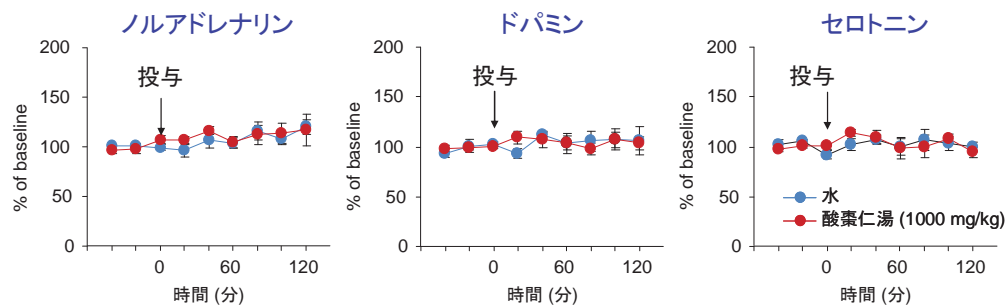


図 8. 酸棗仁湯が脳皮質前頭前野の細胞外モノアミン量に及ぼす影響 (n=5)

■結論

前年度と今年度を実施した漢方薬の 14 日間投与による作用の解析からは、加味温胆湯および酸棗仁湯のエピジェネティックな作用は見出すことができなかった。しかしながら行動薬理的解析および神経化学的解析から、加味温胆湯は細胞外セロトニン量増加作用を介して抗うつ様作用を示す可能性が考えられた。この加味温胆湯の細胞外セロトニン量増加作用には、竹筴が重要であることが示唆された。また、酸棗仁湯は細胞外モノアミン量の変化を介さずに抗不安作用を示すものと考えられた。

■引用文献

1. Araki R., Hiraki Y., Nishida S., Kuramoto N., Matsumoto K., Yabe T. Epigenetic regulation of dorsal raphe GABA(B1a) associated with isolation-induced abnormal responses to social stimulation in mice. *Neuropharmacology*, **101**, 1-12, 2016.
2. Fujiwara H, Tsushima R, Okada R, Awale S, Araki R, Yabe T, Matsumoto K.. Sansoninto, a traditional herbal medicine, ameliorates behavioral abnormalities and down-regulation of early growth response-1 expression in mice exposed to social isolation stress. *J Tradit Complement Med.*, **12**, 81-88, 2017.

植物メロテルペノイド生合成酵素の立体構造解析を基盤とする新規天然薬物資源の開拓

申請代表者	田浦 太志	富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	准教授
所外共同研究者	飯島 未宇	富山大学大学院医学薬学教育部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	大学院生
所外共同研究者	中川 竜一	富山大学大学院医学薬学教育部 (薬学) 薬用生物資源学研究室	大学院生
所内共同研究者	森田 洋行	資源開発研究部門天然物化学分野	教授

■背景・目的

メロテルペノイドとは部分テルペノイドを意味し、おもにイソプレノイドとフェノール類がカップリングして生じる一群の化合物であり、その構造多様性と特徴的な生理活性から高い注目を集める天然医薬資源である。本研究ではカンナビノイド及びダウリクロメン酸という代表的な植物有用メロテルペノイドの生合成酵素を研究対象とする。カンナビノイド合成酵素及びダウリクロメン酸合成酵素の反応機構は類似しているが、基質のアルキル側鎖及びプレニル基の鎖長が異なっており、また各酵素はそれぞれ単一の閉環反応産物を与えることから「基質を正確に認識し、独特な閉環反応を触媒するための構造因子」を備えていると推察される。

各生合成酵素が触媒する反応の構造基盤を X 線結晶解析により詳細に解明し、論理的な触媒活性コントロールにつなげることは天然及び非天然型有用メロテルペノイドの効率的生産に発展する可能性を有している。

本研究は未だ途上ながら興味深い成果を得るに至っており、本レポートでは研究基盤となるメロテルペノイド生合成マシナリーに関する成果を中心とし、構造生物学的な知見についても可能な限り紹介する。

■結果・考察

1. カンナビノイド合成酵素に関する基礎研究及び結晶化

大麻 (*Cannabis sativa*) のカンナビノイドはポリケチドとモノテルペンから構成され、その強い生理活性から古くより薬理学的研究が盛んに行われてきた。従来申請者はカンナビノイドの生合成研究を推進し、主成分である THCA 及び CBDA の生合成酵素 (THCA synthase 及び CBDA synthase) の遺伝子クローニングに成功した (Sirikantaramas and Taura, 2017)。両酵素は補酵素 FAD と共有結合したオキシダーゼであり、共通の基質 cannabigerolic acid の酸化閉環により異なる環構造を形成する。各酵素の反応は FAD によるヒドリドの引き抜きに始まりイオン性の中間体を経て進行すると推察しているが、プロトンの引き抜き位置が異なる環構造を構築する鍵となる。なお FAD オキシダーゼは生物種を問わず広く分布するが、プレニル基を酸化閉環する事例はカンナビノイド合成酵素が初めてである。

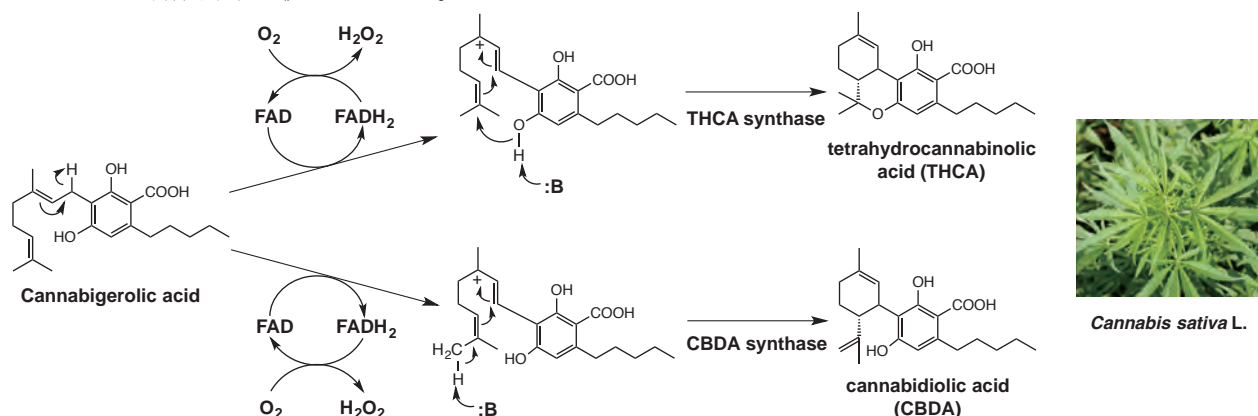


図1 カンナビノイドの生合成反応

様式 1-5 種目 (一般研究 I)

近年 THCA synthase に関して昆虫細胞で発現した組み換え酵素の X 線結晶解析が報告されたが、リガンド複合体の解析には至っておらず、酵素反応の詳細な構造基盤は未解明である (Sirikantaramas and Taura, 2017)。カンナビノイド合成酵素は後述する DCA synthase とともに分泌タンパクであり、高度に糖鎖修飾されていることが安定な結晶化を妨げていた。そこで本研究では発現系の再検討を行うとともに糖鎖除去の方策に重点を置いて試料調製を行うこととした。これまでに得られた知見は以下の通りである。

- 1) 植物細胞 BY-2 発現系では昆虫細胞以上の発現量 (4~5 mg/L) を安価に得ることができた。しかしながら昆虫細胞発現系と同様、hybrid 型の糖鎖を除去することは不可能であった。
- 2) N 型糖鎖結合配列 (Asn-x-Ser, or Thr) を除いた人工遺伝子を用い BY-2 での発現を試みたが、発現量が著しく低下した。糖鎖付加は分泌経路における正常な sorting に必須と考えられた。
- 3) 酵母 *Pichia pastoris* での発現量は 100 µg/L 程度であるが、カンナビノイド合成酵素及び DCA synthase はともに、活性を完全に保持したまま Endo H で糖鎖除去可能であった。

以上から *Pichia* を主な宿主として結晶化試料の調製に取り組んでいる。なお *Pichia* では組込む遺伝子コピーを増やすことが発現量の増大に直結する。そこで Gibson Assembly により発現カセットを 3 コピー含むベクターを調製し、最近 *Pichia* への導入を完了した。また効率的糖鎖除去のため Endo H の共発現を計画、準備している。

2. ダウリクロメン酸の生合成マシナリー解明

エゾムラサキツツジ (*Rhododendron dauricum*) が生産するダウリクロメン酸 (DCA) は orsellinic acid とセスキテルペンから構成されるメロテルペノイドであり、強力な抗 HIV 活性を示すことから注目を集めてきた。DCA とカンナビノイドの生合成経路は互いに類似し、ポリケチド形成、プレニル化、及び酸化閉環の三つのステップを経て生成する。以下、近年私が取り組んできた DCA 生合成マシナリーに関する成果を紹介する。

DCA synthase の遺伝子クローニング及び生化学的性質 (Iijima et al., 2017)

DCA synthase は基質 grifolic acid の farnesyl 基を立体選択的に酸化閉環することにより DCA を合成する (図 2)。各カンナビノイド合成酵素とは約 50% のアミノ酸が一致する高いホモロジーを示し、これらと同様、FAD 及び酸素に依存した反応機構で DCA を産生する。

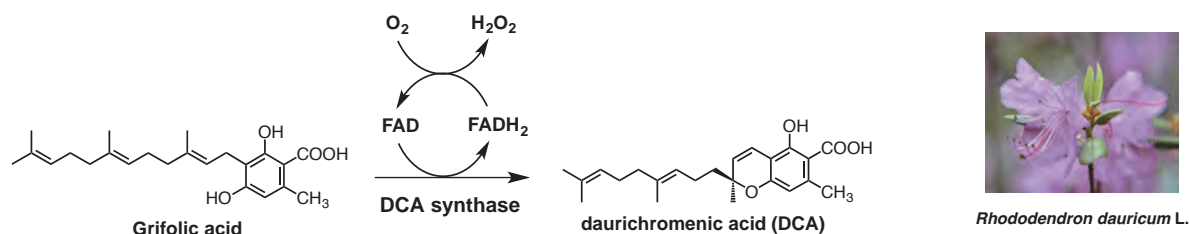
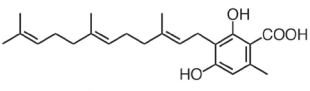
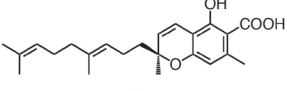
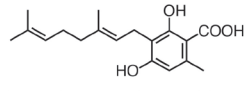
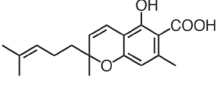
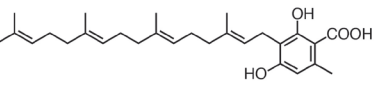
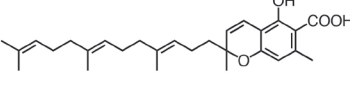


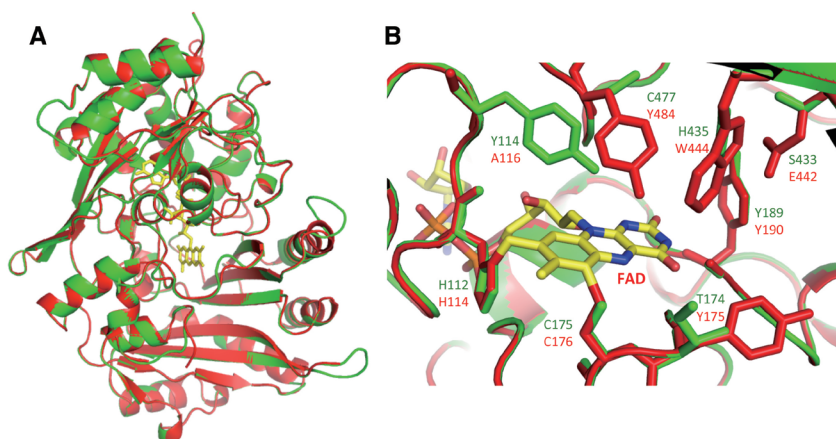
図 2 ダウリクロメン酸の生合成反応

Table 1 に各種の基質類似体を用いた際の生成物の構造及び反応速度定数を示している。本酵素は生理的な基質で、farnesyl 基 (C15) を有する grifolic acid に対して最も高い活性を示した一方、プレニル基が geranyl (C10) 及び geranylgeranyl (C20) の各基質アナログに対しても弱いながら活性を示し、側鎖長の異なる DCA アナログを生成した。本酵素の基質特異性から DCA 類縁体が植物中に存在するか興味を持たれたため、エゾムラサキツツジ若葉エキスを LC-ESI-MS で詳細に分析した結果、本植物は各 DCA アナログを微量成分として含有することを確認した。なおイソプレノイド部分が diterpene の diterpenodaurichromenic acid は新規化合物であった。このように複数の基質を酸化閉環する FAD オキシダーゼは DCA synthase が初めてである。

DCA synthase の構造基盤について手がかりを得るためカンナビノイド合成酵素 THCA synthase の結晶構造を鋳型に分子モデルを作製した。図 3A に示す両メロテルペノイド合成酵素の全体構造は良く類似していたが、活性部位には多くのアミノ酸置換が観察された (図 3B)。例えば THCA synthase においてプロトン脱離に関与する Y484 は DCA synthase では Cys に置換しており、一方 DCA synthase の Y114 は活性中心に存在し、プロトンの引き抜きに機能する可能性が考えられた。

Table 1. Steady state kinetic parameters of DCA synthase

Substrate structures	Product structures	K_m (mM)	k_{cat} (sec ⁻¹)	k_{cat}/K_m (sec ⁻¹ mM ⁻¹)
 Grifolic acid	 DCA	1.19	6.53	5.61
 Cannabigerorcinic acid	 Cannabichromeorcinic acid	66.1	2.14	0.032
 3-Geranylgeranyl orsellinic acid	 Diterpenodaurichromenic acid	7.46	0.131	0.018



DCA synthase 及び各カンナビノイド合成酵素の基質特異性及び反応性の違いを論理的に解釈するためには結晶構造解析が必須であり、上記の通り高品質な結晶を得るための各種検討を行っている。

図3 THCA synthase 結晶構造 (赤) 及び DCA synthase 分子モデル (緑)

(A) 全体構造 (B) FAD を含む活性部位

また有鱗片シヤクナゲの一種であるエゾムラサキツツジの鱗片と DCA 生合成の関連について興味深い知見を得た。本植物の若葉は鱗片と称される表皮組織に覆われているが、私は DCA が鱗片のみに蓄積することを確認した。DCA は蛍光性物質のため UV 照射下図 4 に示す自家蛍光を示し、本蛍光が網目状に観察されたことから DCA は鱗片のアポプラストに局在することが示唆された。

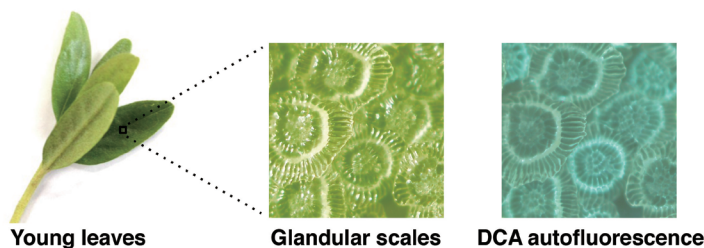


図4 エゾムラサキツツジの鱗片 明視野 (左) 及び自家蛍光 (右)

DCA は抗菌、抗カビ活性を有することから鱗片のアポプラストという植物の最外層に蓄積することで効率的な生体防御に寄与すると推察した。また DCA はエゾムラサキツツジ自身に細胞毒性を示すことを確認しており、分泌タンパクの DCA synthase により細胞外で生合成され、蓄積することで自己毒性を回避していると考えられる。

(Taura et al., 2018)

プレニル転移酵素の遺伝子クローニング及びイソプレノイドの由来

本研究の最終的な目標は酵素を用いたメロテルペノイド生産であり、生合成経路の全貌解明は合成生物学という呼称とともに近年注目される微生物生産を可能とする。そこで私は生合成経路上流のプレニル転移酵素及びポリケチド合成酵素に関しても検討を行った。先ずプレニル転移酵素に関しては、トランスクリプトームデータのスクリーニングを基盤として、RdPT1 と称する新規酵素の cDNA クローニングに成功した。

RdPT1 組み換え酵素は芳香族基質として orsellinic acid のみを受容し、プレニルドナーに関しては FPP を基質として grifolic acid を生成する反応に最も活性を示した一方 GPP 及び GGPP に対してもある程度の反応性を示した (図 5)。従って本酵素はエゾムラサキツツジにおいて DCA synthase と協動的に働くことで C10、C15 及び C20 メロテルペノイドの生合成に関与すると考えられた (Saeki et al., submitted 2018)。

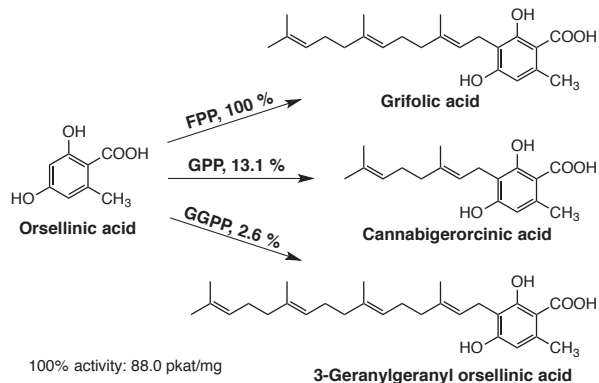


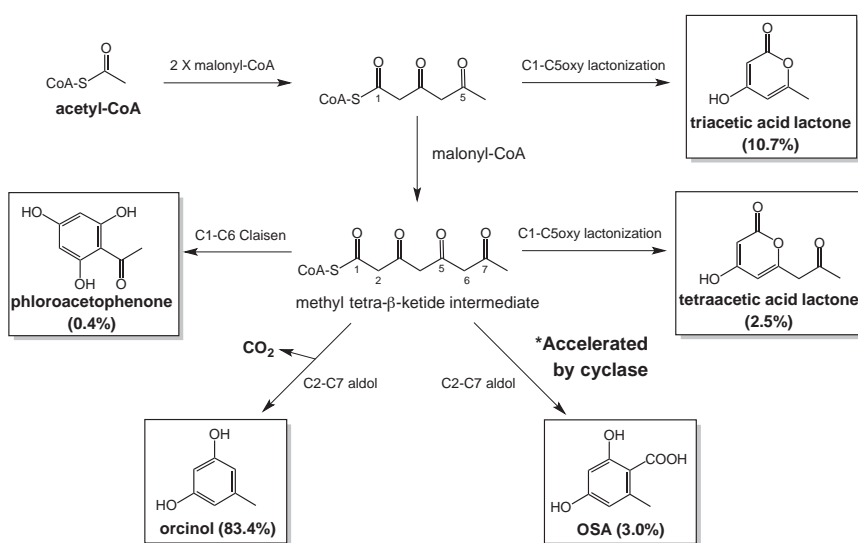
図5 プレニル転移酵素 RdPT1 の反応

RdPT1 は植物二次代謝における初めてのファルネシル転移酵素として興味深い研究対象である。また基質の FPP は一般に植物細胞の細胞質 (メバロン酸経路) で合成されるが、各種生化学的検討から RdPT1 は MEP 経路由来の基質を用い、鱗片のプラスチドで生合成反応を触媒することが示唆された (Saeki et al., submitted 2018)。

このため本植物におけるイソプレノイド供給経路は極めて興味深く、FPP synthase の構造機能を含め詳細な検討を行っている。

ポリケチド合成酵素の遺伝子クローニング及び orsellinic acid 生合成機構 (Taura et al., 2016)

Orsellinic acid (OSA) 生合成に関与するポリケチド合成酵素の候補として、orciniol synthase と称する新規酵素の cDNA をクローン化した。Orciniol synthase は acetyl-CoA をスターター基質とし OSA 脱炭酸体の orciniol を主



生成物として合成した他、OSA を含む 5 種の化合物を与える多機能酵素であった。また興味深いことに orciniol synthase の酵素反応に大麻由来ポリケチド環化酵素 olivetolic acid cyclase を共存させると OSA の合成が著しく促進された。以上から orciniol synthase はエゾムラサキツツジにおいて未知の cyclase と共に OSA の生合成に関与すると結論した。

図6 orciniol synthase の反応
(%は生成量の比率を表す)

■ 結論

以上最近の研究を通じ、特にメロテルペノイド生合成経路のマシナリー解明には興味深い成果を得ており、これらの研究により得られた知見及び各酵素遺伝子は合成生物学的研究への応用が期待される。また発現系のセットアップに時間を要したものの植物メロテルペノイド合成酵素の立体構造解明と論理的機能改変という本研究の目標達成に向けて研究期間終了後も最大限のエフォートをもって取り組む。

■ 参考文献

- 1) Sirikantaramas S, Taura F (2017) Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. In S Chandra, H Lata, M ElSohly, eds, *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*. Springer, Cham, Switzerland, pp183–206
- 2) Iijima M, Munakata R, Takahashi H, Kenmoku H, Nakagawa R, Kodama T, Asakawa Y, Abe I, Yazaki K, Kurosaki F, Taura F. (2017) Identification and characterization of daurichromenic acid synthase active in anti-HIV biosynthesis. *Plant Physiol* **174**: 2213–2230
- 3) Taura F, Iijima M, Kurosaki F (2018) Daurichromenic acid and grifolic acid: Phytotoxic meroterpenoids that induce cell death in cell culture of their producer *Rhododendron dauricum*. *Plant Sig Behav* **13**: e1422463
- 4) Saeki H et al., submitted for publication
- 5) Taura F, Iijima M, Yamanaka E, Takahashi H, Kenmoku H, Saeki H, Morimoto S, Asakawa Y, Kurosaki F, Morita H (2016) A novel class of plant type III polyketide synthase involved in orsellinic acid biosynthesis from *Rhododendron dauricum*. *Front Plant Sci* **7**: 1452

一般研究Ⅱ

Characterization of new type III polyketide synthase from *Dendrobium orchid*

Name of dispatched researcher (派遣研究者名)	Thaniya Wunnakup	Graduate Student
Instructor (指導教官, 研究指導者)	Wanchai De-Eknamkul	Associate Professor of Chulalongkorn University
Affiliation of Instructor (所属)	Chulalongkorn University	
Host Collaborator (受入研究者)	Hiroyuki Morita	教授

Abstract

Type III polyketide synthases (PKS) are a group of the enzymes that catalyze sequential condensations of malonyl-CoA and cyclization reaction to produce polyketide scaffold. Bibenzyl synthase (BBS), a type III PKS, is reportedly involved in the biosynthesis of dihydrostilbenes. In the previous study, we cloned a putative *bbs* gene (*DoBBS*) from *Dendrobium orchid*. To clarify the DoBBS function, the *DoBBS* gene was expressed in *Pichia pastoris* and the DoBBS *in vitro* enzyme reaction products derived from dihydro-*p*-coumaroyl-CoA and *p*-coumaroyl-CoA with malonyl-CoA were analyzed by LC-MS. The constructed *Pichia* expression system gave DoBBS as soluble protein with high efficacy. However, the recombinant DoBBS did not produce any products from the substrates used in this study, suggesting that further investigation using the other substrate are required.

Keywords: *Dendrobium orchid*, dihydrostilbene, polyketide, protein expression.

1. Introduction

Polyketides are structurally diverse and pharmaceutically important natural products. They show a wide range of bioactivities such as antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial activities, and many polyketides reportedly recognize as bioactive constituents in the traditional medicines. Previous studies of the biosynthesis of the plant polyketides revealed that the remarkable structural diversity of the plant polyketides are principally derived from differences of the starter substrate specificity, the number of malonyl-CoA condensations, and the type of cyclization reaction of structurally simple type III polyketide synthases (PKS) (Austin & Noel, 2003; Abe & Morita, 2010). For example, chalcone synthase (CHS), which is the pivotal enzyme in the biosynthesis of Flavonoid, produces naringenin chalcone from condensation of three molecules of malonyl-CoA with *p*-coumaroyl-CoA via the formation of the linear tetraketide intermediate and its C6-C1 Claisen type cyclization reaction (Figure 1). On the other hand, stilbene synthase (STS) generates resveratrol from the common linear tetraketide intermediate with CHS via an aldol type cyclization reaction. Nowadays, functionally distinct more than 40 type III PKSs have been identified from plants. Phylogentic analysis has demonstrated that STS evolves from CHS (Tropf et al., 1994). In addition, the site directed mutagenesis studies of CHS converted its function to STS (Austin et al., 2004).

Among the reported type III PKSs, bibenzyl synthase (BBS), which is specifically involved in the biosynthesis of the *m*-hydrophenylpropionate-derived dihydrostilbene derivatives, has been obtained from the Orchidaceae plants such as *Epipactis palustris* (Gehlert & Kindle, 1991), *Bletilla striata* (Reinecke & Kindl, 1993), *Phalaenopsis* sp (Preisigmüller et al., 1995), and *Cymbidium hybrida* (Wang et al., 2014). The enzyme catalyzes the STS-like C2-C7 aldol type cyclization reaction of the linear tetraketide intermediate derived from three molecules of malonyl-CoAs and dihydro-*m*-coumaroyl-CoA to generate dihydrostilbene scaffold (Figure 1).

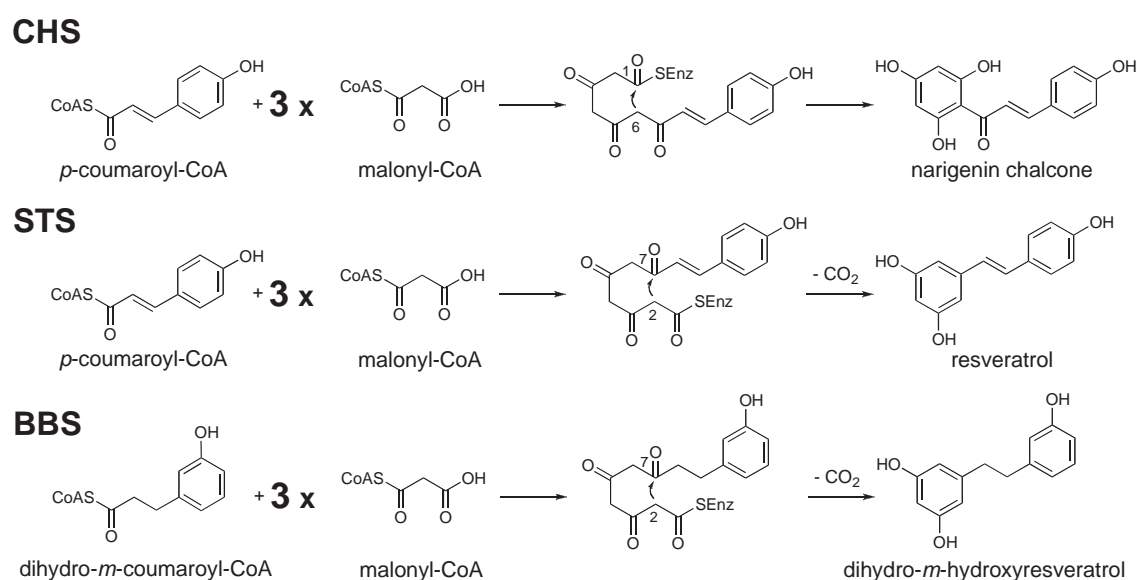


Fig. 1 The Biosynthesis of chalcone, stilben, and dihydrostilbene by type III PKSs

Bibenzyl derivatives such as Phenanthrenes and dihydrostilbenes have also been isolated from *Dendrobium* genus (Figure 2). However, the BBS enzymes in this genus have not been fully elucidated. We currently isolated putative *bbs* gene (*DoBBS*) from *D. orchid*. In this study, the putative *DoBBS* gene was expressed in *Pichia pastoris* and its function was evaluated by investigating *in vitro* reaction products of the recombinant DoBBS.

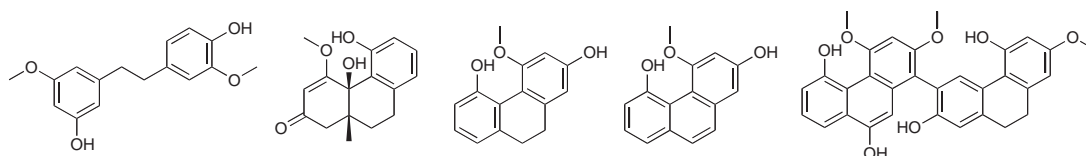


Fig. 2 Example of polyketides isolated from *Dendrobium* plants

2. Materials and Methods

2.1. Strains and culture conditions

The *E. coli* strain DH5 α was used in subcloning. The cells were cultured in LB medium containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zeocin and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. The *P. pastoris* strain X33 and KM71H was used for expression of

recombinant DoBBS. Yeast strains were cultured in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) and incubated at 30 °C.

2.2. Recombinant enzyme expression

pPICZA with DoBBS cDNA was transformed into the *P. pastoris* strain KM71H and X33 by using LiCl method, and cultured on YPD plate containing 100 µg/ml and 500 µg/ml Zeocin, respectively. The transformants were confirmed with PCR. The KM71H and X33 cells harboring DoBBS cDNA were cultured in BMGH medium (100 mM potassium phosphate, pH 6.8, 1.34% yeast nitrogen base, 4 x 10⁻⁵% biotin, 1% glycerol and 0.004% histidine) at 28 °C (200 rpm). After OD was reached to 2–6, the cells were harvested by centrifugation at 3,000 g for 10 min, and then the pellet were resuspended with BMMH medium (100 mM potassium phosphate, pH 6.8, 1.34% yeast nitrogen base, 4 x 10⁻⁵% biotin, 1% methanol and 0.004% histidine) to OD₆₀₀ = 1, and was further incubated at 28 °C (200 rpm) for 4 days. During the culture of the cell in BMMH medium, the 1% methanol was added for everyday to maintain the protein induction.

2.3. Extraction and purification of recombinant protein

The induced cells were harvested by centrifugation at 3,000 g for 10 min (4 °C), and the pellet was resuspended with 3 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol and 1 mM PMSF) per 1 g of cell. The cell suspension was mixed with 2 g acid-wash glass beads (sigma), and then vortex with high speed for 30 sec with interval for 30 sec on ice (≥ 7 times). The lysate was centrifuged at 2500 g for 3 min and the supernatant was centrifuged at 6,000 g for 10 min (4 °C) to prepare the crude enzyme solution. The crude enzyme solution was concentrated by 10K cutoff Macrosap Advance Centrifugal Device (Pall Life Sciences), and then subjected to Ni-NTA affinity column (GE healthcare). The recombinant DoBBS was eluted with 0.5 M imidazole. Fractions containing the DoBBS protein were determined on the basis of SDS-PAGE analysis, dialyzed, and concentrated. Protein concentration was measured by the Bradford method.

2.4. Enzyme assay

Crude enzyme (100 µg) or the purified DoBBS (20 µg) were incubated with 0.3 mM malonyl CoA, 0.2 mM *p*-coumaroyl CoA or 0.2 mM dihydro-*p*-coumaroyl CoA in 100 µl of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, at 20°C and 30 °C for 12 h and 24 h, respectively. The reaction was stopped by adding 10 µl 20% HCl and the enzyme reaction products were extracted with 200 µl ethyl acetate (triplicate). After the extract was dried under reduced pressure, the residue was resuspended with 50 µl methanol and subjected to LC/MS using water (A) and acetonitrile (B) containing 0.1% (v/v) TFA as mobile phase to analyze the enzyme reaction products. The gradient solvent system was follows: 0-5 min, 10% B; 5-20 min, 20% B; 20-30 min, 60% B; 30-50 min, 100% B; 50-60 min, 10%B. The flow rate was 0.5 ml/min and chromatograms were acquired at 290 nm.

Results and Discussion

The recombinant DoBBS was heterologously expressed in *P. pastoris* strain KM71H and X33 as a

fusion protein with His₆-tag at the C-terminus under controlling AOX1 promoter and purified with Ni-NTA affinity column, respectively. The recombinant DoBBSs expressed in KM71H and X33 migrated as a band with a molecular weight of 44.7 kDa on SDS-PAGE (Figure 3), which agree well with the calculated value of 44.5 kDa, respectively. Furthermore, the SDS-PAGE analysis indicated that DoBBS was expressed in KM71H with 19 times higher efficacy over X33 (Table 1). Thus, the functional analysis of DoBBS was performed with the recombinant DoBBS expressed in KM71H.

Table 1. Summary of protein purification

	Strain	
	X33	KM71H
Total protein (mg)	34.90	10.00
Ni-NTA column (mg/ml)	0.15	0.83
Target soluble protein (%)	0.22	4.16

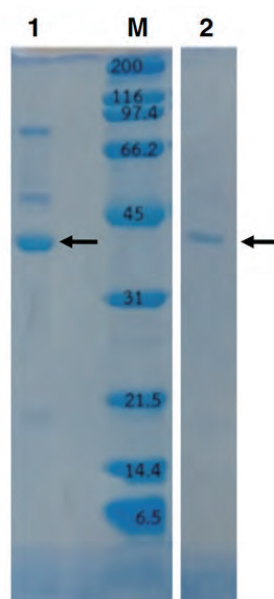


Fig. 3 Analysis of the DoBBS expression in *P. pastoris* strains KM71H and X33 by SDS-PAGE

The expression of DoBBS was evaluated after the recombinant DoBBS was purified by using Ni-NTA affinity column. M: Molecular weight marker, 1: DoBBS expressed by KM71H, 2: DoBBS expressed by X33. The recombinant BBS was indicated with arrows.

BBS has been reported to efficiently catalyze the iterative condensation of three molecules of malonyl-CoAs with dihydroxy-*m*-coumaroyl-CoA to generate dihydroresveratrol. Due to the lack of dihydroxy-*m*-coumaroyl-CoA, we utilized dihydro-*p*-coumaroyl-CoA as a substrate with malonyl-CoA in order to investigate the DoBBS reaction products. Since, functionally related STS has been known to utilize *p*-coumaroyl-CoA as a substrate with malonyl-CoA to produce resveratrol, we also carried out the DoBBS

enzyme reaction using *p*-coumaroyl-CoA and malonyl-CoA. Boiled DoBBS was used as the negative control. However, the recombinant DoBBS did not accept dihydro-*p*-coumaroyl-CoA and *p*-coumaroyl-CoA with malonyl-CoA to produce products. These observations suggested that either the recombinant DoBBS was expressed in *E. coli* as inactive enzyme or DoBBS accepts other CoA thioester substrate to produce compound.

Conclusion

DoBBS was expressed in *P. pastoris* strain KM71H and X33 as a fusion protein with His6-tag at the C-terminus and investigated the enzyme function. The KM71H strain efficiently expressed DoBBS as a soluble protein. However, the recombinant DoBBS did not produce any products. Thus, further functional analysis of DoBBS is needed.

References

1. Abe, I. and Morita, H. (2010) Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep*, **27**, 809–838.
2. Austin, M.B., Bowman, M.E., Ferrer, J.-L., et al. (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases, *Chemistry & biology*, **11**, 1179–1194.
3. Austin, M.B. and Noel, J.P. (2003) The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases, *Natural product reports*, **20**, 79–110.
4. Gehlert, R. and Kindl, H. (1991) Induced formation of dihydrophenanthrenes and bibenzyl synthase upon destruction of orchid mycorrhiza, *Phytochemistry*, **30**, 457–460.
5. Preisigmuller, R., Gnau, P. and Kindl, H. (1995) The inducible 9,10-dihydrophenanthrene pathway: Characterization and expression of bibenzyl synthase and *S*-adenosylhomocysteine hydrolase, *Archiv Biochem Biophys*, **317**, 201–207.
6. Reinecke, T. and Kindl, H. (1993) Characterization of bibenzyl synthase catalysing the biosynthesis of phytoalexins of orchids, *Phytochemistry*, **35**, 63–66.
7. Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S., et al. (1994) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution, *J Mol Evol*, **38**, 610–618.
8. Wang, L., Albert, N.W., Zhang, H., et al. (2014). Temporal and spatial regulation of anthocyanin biosynthesis provide diverse flower colour intensities and patterning in *Cymbidium* orchid. *Planta*, **240**, 983–1002.

探索研究プロジェクト

生薬を用いた肝炎ウイルスの新しい制御法の探索

申請代表者 本田 知之 大阪大学大学院医学系研究科 感染症・免疫学講座 ウイルス学 准教授

所外共同研究者 西川 祐樹 大阪大学大学院医学系研究科 感染症・免疫学講座 ウイルス学 学部学生

■背景・目的

B型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎ウイルスは、肝臓に慢性炎症を引き起こす。実に、肝がんの75%が、これら肝炎ウイルスの慢性炎症に起因すると考えられている。日本のHBV感染者は未だに約150万人存在すると推定されており、HBV感染症の制御・克服は重要な課題である。生薬には、藁香など抗ウイルス活性を持つものが知られている。本研究では、B型肝炎ウイルス感染を制御する生薬を探索し、新しいB型肝炎ウイルスの制御法を開発することを目的とする。

■結果・考察

本研究では、HBV Pol タンパク質の *in vitro* 逆転写活性測定系を用いて、HBV Pol タンパク質阻害成分をスクリーニングし、得られた候補成分を効率的に細胞を用いた *in vivo* スクリーニング系でさらに絞り込む予定であった。しかし、より短期間で成果を出す必要性が生じたこと、また *in vitro* 系で得られた候補を再度 *in vivo* で検証するのは時間がかかることから、コスト・労力はかかるが時間の節約になりうる、細胞を用いたHBV複製の *in vivo* スクリーニング系を用いる計画に変更した。まず生薬由来エキス約60種類のうち、293細胞に細胞傷害性を示さなかったエキスについて、HBV プレゲノム RNA 発現ヒト肝細胞由来培養細胞 (HepAD38.7細胞) における細胞傷害性を検討した。その結果、100 µg/ml にて細胞傷害性を示さないエキス35種類を得た。現在、順次これらのエキスがHBV複製に与える影響を検証中である。現在までに、35エキスのうち20エキスについてHBV複製に対する効果を検討済みで、最大70%程度のHBV複製抑制活性を認めている。

■結論

本研究により、いくつかの生薬エキスがHBV複製抑制活性を持ちうることが明らかとなった。今後は、そのエキスの作用点を明らかにすること、薬効成分を絞り込むことを目指して解析を行う予定である。さらに、生薬由来化合物や方剤エキスについても同様のスクリーニングを行い、新しいB型肝炎ウイルス制御方法の開発につなげていきたい。

癌微小環境を標的とした生薬由来の抗癌物質の探索

申請代表者 寺林 健 大分大学 医学部 薬理学講座 助教
所外共同研究者 石崎 敏理 大分大学 医学部 薬理学講座 教授

■背景・目的

癌治療を困難にする要因の1つが癌の転移である。癌細胞は正常細胞を含めその周囲の環境（癌微小環境）と相互作用することで、転移に有利な性質を獲得する。このため、癌微小環境と癌細胞の相互作用を標的とした癌転移抑制薬は、癌治療において非常に有効なものとなる。現在使用されている抗癌剤には天然化合物を由来とするものが多数存在し、今後も多様な新規化合物の発見が見込まれる。本研究課題では、富山大学が所有する生薬由来化合物の中から、癌微小環境と癌細胞との相互作用を標的として癌細胞の運動抑制活性を有する物質の同定を目的とする。

■結果・考察

ヒト乳腺上皮由来細胞株 MCF10A 細胞の培養上清により、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞の運動能は亢進する。このとき MDA-MB-231 細胞は顕著な形態変化を呈示することから、この形態変化を指標にして乳癌細胞の運動能を抑制する生薬由来化合物のスクリーニングを行った。生薬由来化合物は 10 μ M で添加し、細胞形態変化抑制能を評価した。その結果、11 種の化合物で細胞形態変化の抑制効果が見られた(図 1)。生薬エキス・漢方方剤エキスについては 10 μ g/mL で添加し、それぞれ 11 種、2 種が抑制効果を示した。また、培養上清処理に対する効果に留まらず、細胞を Round up させるものや、細胞死を引き起こすものも散見された。細胞障害性のあるものに関しては、より低濃度での検討が必要になるだろう。

形態変化抑制能を示した生薬由来化合物のうち 1 種については、実際に細胞運動抑制能も示すことを確認した。MDA-MB-231 細胞は乳腺上皮細胞の培養上清によってラメリポディアを形成するが、この化合物はこのラメリポディア形成を阻害することで、細胞運動を抑制していた。また、常活性型 Rac1 の作用は阻害しないことから、Rac1 の上流のシグナルを阻害していると推察された。

■結論

今回のスクリーニングによって乳癌細胞の形態変化を抑制する多数の生薬由来化合物や生薬エキスが同定することができた。これらの化合物・エキスのうち半数は既に癌細胞の運動を抑制することが報告されており、“癌細胞の形態”を指標としたスクリーニングが、癌細胞の運動・転移を抑制する可能性を持つ化合物を同定するメソッドとして有用であることを示している。今後、今回得られた化合物の癌細胞運動抑制能について、その標的分子の同定も含め、作用機序について詳細な解析を行っていく予定である。

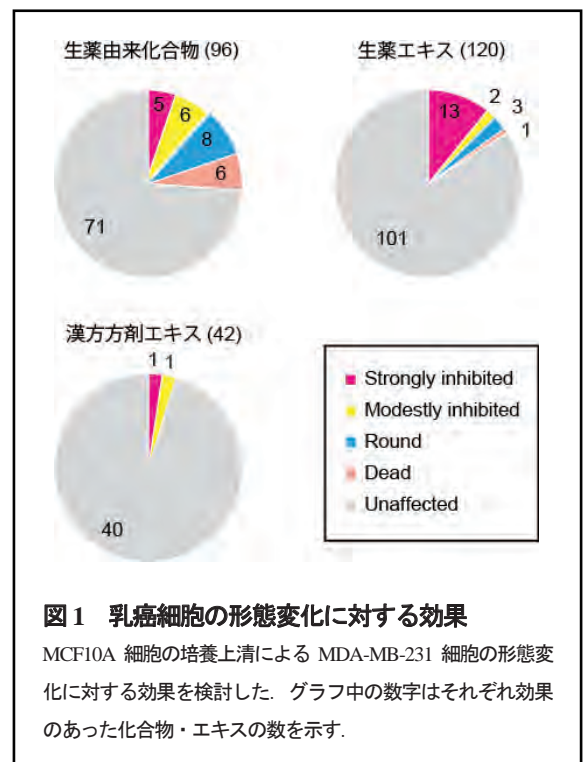


図 1 乳癌細胞の形態変化に対する効果

MCF10A 細胞の培養上清による MDA-MB-231 細胞の形態変化に対する効果を検討した。グラフ中の数字はそれぞれ効果のあった化合物・エキスの数を示す。

転写共役因子 YAP1/TAZ を活性化する生薬・漢方薬の多発性骨髄腫治療への応用

申請代表者	丸山順一	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	岩佐宏晃	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	畑裕	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	教授

■背景・目的

多発性骨髄腫は高齢者に多く発症するため、近年増加傾向にある。複数の新薬が開発されているが、高齢者に対しては強い副作用のため薬剤併用療法が行いにくく、死亡率が上昇している。転写共役因子 YAP1 を活性化すると多発性骨髄腫細胞の DNA 損傷応答が増強することが論文報告され、申請者も独自に獲得した YAP1 活性化作用をもつ低分子化合物でこのことを確認している (Maruyama et al. (2018) *Mol. Cancer Res.* **16** 197-211.)。本研究では、多発性骨髄腫患者に適用して薬剤感受性を高め低用量での治療を実現し高齢患者の治療成績の改善に寄与することを目指して、YAP1 活性化作用をもつ生薬・漢方薬の同定を試みた。

■結果・考察

予定していた線虫実験は実験系の安定的な運用が難しく断念し、哺乳類培養細胞を用いたスクリーニングに注力した。

前述の論文で報告・使用した、TEAD 応答性プロモータの下に Histone 2B-mCherry (以降、H2B-mCherry) を発現するカセットをヒト網膜色素上皮細胞由来細胞株 ARPE-19 に安定発現させ、H2B-mCherry 蛍光強度で YAP1-TEAD 転写因子複合体の活性をモニターできるようにした ARPE-19 レポーター細胞を、スクリーニング細胞として用いた。レポーター細胞に生薬由来化合物 (最終濃度 10 μ M) と生薬エキス・漢方方剤 (最終濃度 100 μ g/ml) を処理して三日間培養した。三日後、細胞をホルマリン固定し Hoechst33342 で核を染色して、Arrayscan VTI (Thermo Fisher) により各ウェルにおける H2B-mCherry 蛍光強度を測定した。コントロールウェルにおける蛍光強度に比較して 2 倍以上の強度を呈したウェルを陽性と判断した。

結果、Evodiamine とオウレン抽出液を処置したウェルにおいて 2 倍以上の蛍光強度増強が観察された。また、2 倍の増強は見られなかったもののオウバク抽出液においても 1.8 倍程度の蛍光強度増強が見られ、オウレンとオウバクの共通する含有成分である Berberine においても 1.4 倍程度の穏やかな蛍光強度の増強が見られたことから、オウレン抽出液とオウバク抽出液に含まれる Berberine が YAP1 活性化作用を有している可能性が示唆された。以上より、Evodiamine と Berberine に注目して以下の実験を進めた。

Evodiamine を東京化成から、Berberine を Sigma Aldrich から購入した。YAP1 が転写共役因子として正しく機能していることが知られているヒト骨髄腫由来細胞株 U2OS に各化合物を処理し、YAP1 の標的遺伝子である CTGF の発現量が増加するか否かを検討した。結果、CTGF の mRNA 量

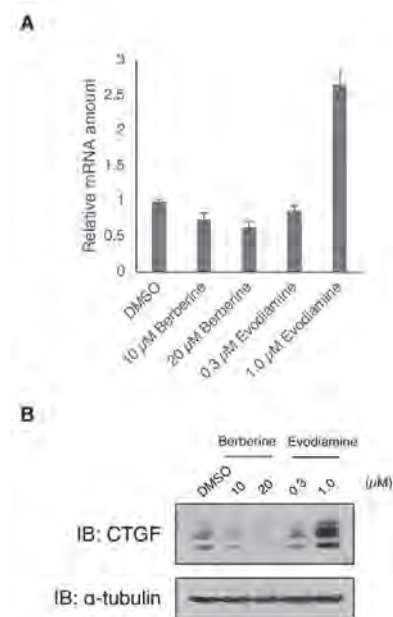


Figure 1 Berberine/EvodiamineのCTGF発現量に対する影響

(Fig.1A)・タンパク量 (Fig.1B) とともに Evodiamine 処置により増加する傾向が観察された。一方で、Berberine 処置によっては顕著な CTGF 発現誘導は見られなかった。この結果より、オウレン抽出液・オウバク抽出液で見られた H2B-mCherry 蛍光強度増強は、Berberine 以外の共通成分に起因した作用である可能性が考えられる。現在、Evodiamine 処置による CTGF 発現誘導が YAP1 活性化を介した効果であるか否かをノックダウン実験により検討中である。

■結論

YAP1-TEAD 転写因子複合体の活性を蛍光によりモニターできるレポーター細胞を用いることで、オウレン抽出液と Evodiamine に YAP1 活性化作用があることを見出した。特に、生薬抽出液のような混合物ではなく単一の化合物である Evodiamine を同定できたことは、活性化メカニズム解析のしやすさ・医薬品応用のしやすさ等から非常に興味深いと考えている。引き続き、Evodiamine による YAP1 活性化の分子機構を詳細に解析していく予定である。

エピジェネティックな作用機序を持つ抗癌生薬の探索

申請代表者	平崎 能郎	千葉大学大学院医学研究院・和漢診療学	特任講師
所外共同研究者	金田 篤志	千葉大学大学院医学研究院・分子腫瘍学	教授
所外共同研究者	篠原 憲一	千葉大学大学院医学研究院・分子腫瘍学	助教

■背景・目的

厚生労働省の統計によると、がんは日本人の死因第一位の疾患であり、国民の医療費に占める割合は年々増加している。

エピゲノム異常は一見正常に見える細胞に蓄積し、がんのイニシエーションの早期イベントとしてがん発症リスクを高める。がん細胞がエピゲノム情報を変えることで進化して、上皮間葉転換して転移を起こしたり、免疫機構から逃れたり、薬剤耐性を獲得したりする [Peter AJ, Nat Rev Genet 2016]。がんの発症や転移・再発の予防の観点からも、このエピゲノムを標的とした治療概念の開発は重要である。

近年、抗がん作用を持つ和漢薬やその成分化合物での抗腫瘍の報告は年々増えている。長年の歴史を経て生体に投与され、その効果が検証されてきた漢方薬であるが、安全性もある程度確保されており、抗がん薬物を探索する上では非常に有用な創薬のデータストックと言える。実際に、現代中国での抗がん療法は、和漢薬治療と西洋医学の併用が主流である [申請者著『中医オンコロジー』東洋学術出版社, 2016]。

一方で、和漢薬の抗がん作用機序については不透明な部分が多い。しかし、その部分にこそ「副作用の穏やかな新規の抗がん剤開発」への大きなヒントがあるはずだと申請者は着目した。

■結果・考察

提供していただいた化合物、生薬エキス、漢方方剤エキスに対し、HDAC Activity Assay Kit (abcam)を用いてHDAC阻害活性の評価を行った。化合物の結果を図1に示す。

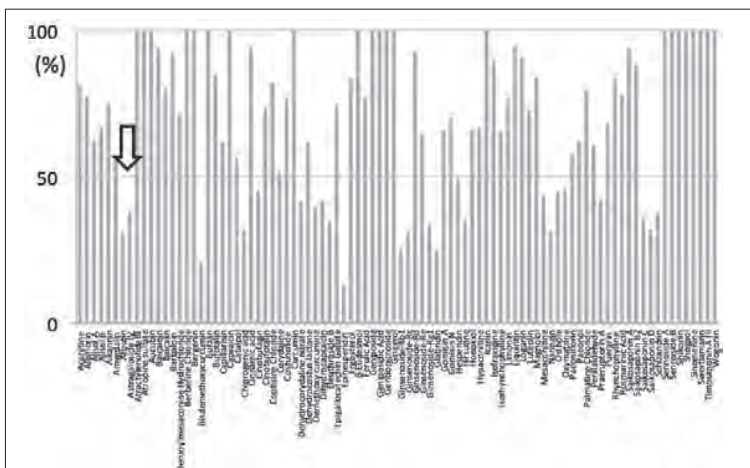


図1:HDAC 阻害活性の評価。横軸が各化合物(1 μ M)、縦軸が陰性コントロール(DMSO)に対する蛍光度の割合(%)。50%以下を阻害活性あり(矢印部位)とみなした場合、94種類のうち23種類に阻害活性を認めた。

次のがん細胞株を用いて、癌細胞増殖抑制作用を評価した。ヒト骨髄性白血病細胞HL60に対して提供薬物を用いて薬剤処理してWST-8 試薬を加えて細胞の生存を評価した。DMSOを用いたnegative control に対して細胞生存が50%以下になったものは、化合物9種類、生薬エキス24種類、漢方方剤エキス6種類であった。

このなかで細胞毒性と HDAC 阻害作用を同時に有するものが認められた。化合物では Alkannin, Cinobufagin, 生薬エキスでは地骨皮, 丁子, 檳榔子, 鷄血藤, 吳茱萸, 桜皮, 何首烏, 漢方方剤エキスでは防風通聖散, 半夏厚朴湯である。

これらの中で興味深い結果がみられる。たとえば、Alkannin は紫根に含まれるが、この生薬は紫根牡蠣湯の構成生薬でもあり、乳腺の腫瘍性疾患に用いられてきた。『神農本草経』には「心腹邪氣、五疸を治し、中を補い、気を益し、九竅を利し、水道を通ず」と記載されている。清熱涼血・解毒透疹の効能があり、血熱毒盛・瘀血阻滯の副鼻腔癌・咽頭癌・喉頭癌・肺癌・食道癌・胃癌・乳癌・子宮癌・白血病などに応用されている。成分で類似の化学構造を持つアセチルシコニンにはヒト肺癌細胞株 A549 やヒト肝臓癌細胞株 Bel-7402, ヒト乳癌細胞株 MCF-7, マウス肺癌細胞株 LLC に対して細胞増殖を抑制する作用があると報告されている [Wenbi X, Chin Med 2009] .

■結論

今回、提供薬物に対して HDAC 阻害効果, HL60 に対する細胞毒性の評価を行った結果、化合物では Alkannin, Cinobufagin, 生薬エキスでは地骨皮, 丁子, 檳榔子, 鷄血藤, 吳茱萸, 桜皮, 何首烏, 漢方方剤エキスでは防風通聖散, 半夏厚朴湯に HDAC 阻害効果と細胞増殖阻害が認められた。これらの薬剤は副作用の穏やかな新規の抗がん剤の候補にあげられる。

細胞増殖や浸潤シグナル経路を抑制する生薬成分の探索・同定

申請代表者	宮田 信吾	近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門	教授
所外共同研究者	石野 雄吾	近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門	助教
所外共同研究者	清水 尚子	近畿大学 東洋医学研究所 分子脳科学研究部門	助教

■背景・目的

ガン細胞特異的に細胞増殖異常に対する制御法の探求は、ガンからの克服を目標とする人類の大きな課題であるといっても過言では無い。細胞内のシグナル伝達経路制御による細胞増殖制御法の探索は p53 などのガン抑制遺伝子群や PI3K/Akt や ERK といったシグナル伝達因子、細胞周期の制御因子群を中心に非常に多くの検討が長年にわたり行われてきているものの、未だその確立には至っていないのが現状である。しかし、ようやく近年になりゲノム創薬技術を用いた分子標的薬の開発が加速度的に行われるようになったことで、以前よりはガン細胞を特異的な標的とした治療が可能になってきている。

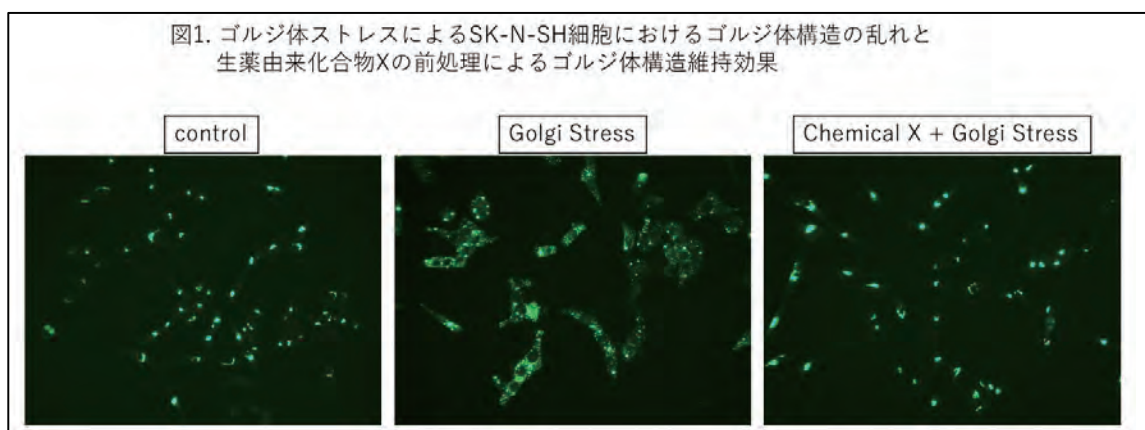
我々は「温故知新」という観点から、これまでに無い全く新たな視点からの細胞増殖を制御しうる天然物由来成分の探索・同定を本研究課題により行うことで、未知の化合物によるガン細胞への全く新たなアプローチ法や治療薬開発といった臨床応用に向けた基盤を築くことを目的とした。

一般的に細胞増殖過程で必須の現象として、細胞分裂時にはゴルジ体(ゴルジ装置)の層状構造がバラバラに変化する事が必要であることが既に報告されている。そこで、本検討課題では、このゴルジ体の層状構造変化に注目して、漢方方剤エキスセット、生薬エキスセット、生薬由来化合物セットのそれぞれでスクリーニングを実施し、living cell 中のゴルジ体構造変化を抑制しうる成分の同定を試みた。

■結果・考察

ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を用いて living cell の状態でゴルジ体構造を観察することにより、ゴルジ体ストレス負荷による層状構造の崩れを抑制し得る漢方方剤・生薬・化合物の同定を行った。

その結果、漢方方剤エキスセット 42 種類中、生薬エキスセット 120 種類中にはこのゴルジ体の層状構造の崩れを抑止出来る成分は見出されなかった。しかし、生薬由来の化合物セット 93 種類中、8 種の化合物の前処置においてゴルジ体ストレス負荷によるゴルジ体の層状構造の崩れを有意に抑制することを見出した。すなわち、細胞増殖時にみられるゴルジ体構造変化を抑制する可能性が示唆される化合物として 8 種を同定することが出来たと考えられた。



■結論

本研究課題では、「ゴルジ体ストレスによるゴルジ体構造制御不全」というこれまでほとんど検討されてこなかった細胞内小器官の現象に注目し、天然物由来成分からの主にガンを標的とした細胞増殖異常の制御機構の確立を目指した。

その結果、漢方方剤エキスセットと生薬エキスセット中にはゴルジ体ストレス抑制効果を示すものは見出されなかったが、生薬由来の化合物セット中、8種の化合物においてゴルジ体ストレス抑制効果と考えられるゴルジ体の層構造の崩れを有意に抑制することを見出した。本結果から類推されるのは、これら8種の化合物のいずれかがガン細胞の細胞増殖異常の制御をし得る可能性のある化合物であるのではないかとということであり、今後の更に詳細な検討を継続していく予定である。

迅速な NLRP3 インフラマソーム活性化検出法の開発とこれを制御する生薬もしくは漢方の探索

申請代表者 河西 文武

富山県立大学・工学部・医薬品工学科

講師

■背景・目的

NLRP3 インフラマソームと呼ばれる細胞内分子の複合体が、痛風、動脈硬化、肥満といった無菌性炎症惹起に関わる重要な自然免疫経路として注目されている。本研究では過分極により蛍光を発する膜電位感受性色素を用いることで、従来 Western Blotting 等で評価していた NLRP3 インフラマソームの活性化を簡便かつ迅速に検出できるのではないかと考え、以下のような研究を計画した。1)マウスマクロファージ細胞株である J774 に膜感受性色素である DiBAC₄(3) を取り込ませる。2)本申請で提供された生薬および漢方を各 well に加える。3)NLRP3 インフラマソームのアゴニストである ATP もしくは Nano-Silica で NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導する。4)膜電位変化により変化する蛍光強度を、マイクロプレートリーダーでモニターし、NLRP3 インフラマソーム活性化を抑制する阻害薬を同定する。これら一連の実験により新たな NLRP3 インフラマソームを制御する生薬もしくは漢方の同定を目的とした。

■結果・考察

生薬由来化合物セットは 10 μ M もしくは 30 μ M、生薬エキスセットおよび漢方方剤エキスセットは 10 μ g/mL もしくは 30 μ g/mL 濃度使用したところ、生薬由来化合物セットの No.23 (E)-Capsaicin、No.48 [6]-Gingerol、No.92 [6]-Shogaol 添加群で NLRP3 インフラマソームを活性化する傾向が見られた。これらは Transient Receptor Potential (TRP) V1 チャネルのアゴニストであることが知られている。また TRPV1 チャネルは酸性 pH 感受性のチャネルであり、アシドーシスによる NLRP3 インフラマソーム活性化に関与するとの報告もある (Rajamaki et al., JBC, 288:13410-13419, 2013)。一方乾姜、六君子湯などには上記の[6]-Gingerol、[6]-Shogaol が含まれていることが知られているが、今回の生薬エキスセット、漢方方剤エキスセットに含まれる乾姜、六君子湯ではこれらに含まれる濃度の違いがあるためか NLRP3 インフラマソーム活性化の傾向は見られなかった。

■結論

本研究により NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導する候補物質が新たに見つかった。今後は、IL-1 β を始めとする各種炎症性サイトカインの測定や動物実験の施行を含め検討を行うつもりである。また今回、候補に上がらなかった薬剤についても、引き継ぎ濃度の変更や、添加する細胞種を変更するなどしてスクリーニングについても詳細な検討を行う予定である。

伝統医薬由来の抗インフルエンザウイルス活性探索と作用機序解明

申請代表者	渡邊 健	長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科	助教
所外共同研究者	マカウ ジュリアン ジェンビ	長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科	大学院生

■背景・目的

インフルエンザが引き金となる死者は日本で年間 1 万人といわれる。今後新型コロナウイルスや高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトでの流行も懸念されるが、抗ウイルス薬にはすぐに耐性ウイルスが出現するなど、合成された化合物を用いた抗ウイルス薬開発が限界にきている。これまで歴史上長年用いられてきた生薬・和漢薬とその成分の抗ウイルス効果を明らかにする事は、国民の健康増進に寄与し、予防医学上極めて有用である。本研究では、培養細胞レベルにおいて 1, 活性のある化合物・エキスを見いだす 2, 様々なインフルエンザウイルスに対する活性の程度を定量 3, 作用機序の解明 4, 既存の抗ウイルス薬との相加相乗作用 を明らかにする。

■結果・考察

イヌ腎臓 MDCK 細胞を用いてインフルエンザウイルス標準株感染による細胞変性 (CPE) を抑制するか否かを指標としたアッセイ系を用いてスクリーニングを行った。方剤、生薬については 100ug/mL, 化合物ライブラリセットは 10uM の濃度で用いた。その結果、漢方方剤ではインフルエンザに処方される麻黄湯に活性が認められた。またインフルエンザに処方されることのない 3 種類の方剤 X, Y および Z についても活性が認められた。一方マウス実験で抗インフルエンザ効果が報告されている小青竜湯は今回の実験条件では活性を認めなかった。生薬エキスでは麻黄湯に含まれる生薬である麻黄および桂皮、および方剤 X の構成生薬である生薬 A を含む合計 18 種類に活性がみられた。また生薬由来化合物についての抗ウイルス活性試験は再現性に問題があったが、少なくとも没食子酸ほか化合物 B および C の合計 3 化合物が再現性をもって抗ウイルス活性が認められた。

以上でスクリーニングを終了し、以後の実験では特に活性の強かった漢方方剤 X について着目した。市販の方剤エキス散を用いて抗ウイルス試験を行い、漢方方剤 X の抗ウイルス活性の再現性を確認した。その方剤 X に含まれる生薬 A を単味で用いた場合、漢方方剤 X と同等の濃度で活性を示した。このことより漢方方剤 X の抗インフルエンザウイルス効果は生薬 A に由来するものと考えられた。漢方方剤 X および生薬 A は H1N1 亜型、H3N2 亜型の実験室株 A 型インフルエンザウイルスおよび 2009 年より流行している H1N1 亜型臨床分離株にも効果を示した。

■結論

本探索研究プロジェクトにおいてこれまでに抗インフルエンザウイルス効果の報告のない方剤 X を見出した。今後作用機序の解明、活性化化合物の同定、既存の抗ウイルス薬との相加相乗作用について研究を進めていく予定である。

生薬由来化合物をライブラリとした抗ウイルス剤の探索

申請代表者	袴田 航	日本大学 生物資源科学部 生命化学科	准教授
所外共同研究者	三浦 一輝	日本大学大学院 生物資源科学研究科	大学院生
所外共同研究者	小山 亮祐	日本大学大学院 生物資源科学研究科	大学院生

■背景・目的

現在、新型インフルエンザやトリインフルエンザのヒトへの感染など続々と出現する新興・再興ウイルス感染症は人類の脅威となっている。しかし、抗ウイルス薬は抗生物質に比べ、十分な作用機序・薬剤多様性を持つには至っていない。そのため、ウイルス感染機序に基づく分子標的が明確な抗ウイルス薬の探索・開発が急務となっている。そこで本研究では、ウイルスが細胞内で自己増殖する際に宿主機構を巧みに利用している事に着目し、多くのウイルスの感染・増殖に必須な宿主機構である、*N*結合型糖鎖プロセッシング酵素を分子標的とした。これらの酵素は、ウイルスコートタンパク質に糖鎖修飾を行う酵素であり、これらの阻害はウイルス粒子の成熟を阻害し、抗ウイルス活性を示す。これら糖鎖の合成を司る糖鎖プロセッシング酵素の阻害剤を生薬由来化合物よりスクリーニングし、抗ウイルス薬のリード化合物を得る事を目的とする。

■結果・考察

ヒト培養細胞において、糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼおよび関与されると推定されるグリコシダーゼ（ガラクトシダーゼおよびアロシダーゼ）の活性を検出可能な蛍光基質の開発に成功し、培養細胞レベルで標的酵素の酵素活性が評価可能となった。そこで、これらの基質を96穴プレートに培養した HeLa 細胞に添加し標的とした酵素阻害剤のハイスループットアッセイ系を開発するため、以下の点について検討を行った。

最適基質の決定：ハイスループットアッセイを効率的に行うため、励起波長および蛍光波長が異なる3色の蛍光団（赤・青・緑）を有する蛍光基質を96穴プレートに培養した培養細胞に加えて、それぞれの蛍光強度を蛍光プレートリーダーにより測定した。検出感度の検討を行い最適な基質を検討した結果、緑色蛍光基質が最適基質であると判断した。

既知阻害剤を用いたアッセイ系の評価：蛍光基質を96穴プレートに培養した培養細胞に緑色蛍光基質を投与し蛍光プレートリーダーを用いて蛍光を測定する系を確立した。その際は細胞レベルアッセイに必要な精度が維持されていることを確認した。

以上の結果より、細胞培養と蛍光測定が可能な96ウェルプレートに培養した HeLa 細胞に緑色蛍光基質と阻害剤を投与し、生じた蛍光を蛍光プレートリーダーにより測定する事により、化合物の阻害活性を測定可能な培養細胞を用いたハイスループット阻害剤スクリーニング系を確立した。

■結論

以上、本ハイスループットスクリーニング系を用いて、貴学の化合物ライブラリから阻害剤スクリーニングが可能となった。そこで生薬由来化合物については阻害剤スクリーニングを行い、小胞体グルコシダーゼを強く阻害する化合物が9種、ガラクトシダーゼを強く阻害する化合物が3種、アロシダーゼを強く阻害する化合物が5種得られた。しかしながら、生薬エキスおよび漢方剤エキスセットについては試料の自家蛍光が強く阻害剤探索は成功しなかった。

富山大学和漢医薬学総合研究所・
長崎大学熱帯医学研究所
第7回交流セミナー要旨

開催日：2017年12月4日

会 場：長崎大学グローバルヘルス
総合研究棟1階大セミナー室

主 催：長崎大学熱帯医学研究所
富山大学和漢医薬学総合研究所

樹状細胞の遊走抑制を新規創薬標的とした免疫抑制薬の漢方薬成分からの探索研究

富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野

門脇 真、張 玥、山本 武

【背景】

樹状細胞 (dendritic cell; DC) は強力な抗原提示能とサイトカイン分泌能を持ち、適切なタイミングで適切な感染部位やリンパ節へ遊走することにより自然免疫応答と獲得免疫応答を制御し、免疫応答の司令塔として恒常性維持や生体防御に重要な役割を果たしている。従って、DC が「適切な場所」に遊走することによって初めて、免疫制御機能を発揮することが可能となる。DC は通常型樹状細胞 (cDC) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) の 2 種類に大別されている。近年、炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎とクローン病の患者において、腸管粘膜層に分布する pDC が過剰に増加していることが報告された。しかし、腸管粘膜免疫系での免疫応答における pDC の役割は未だ解明されていない。そこで、本研究では pDC の遊走に着目し、pDC の遊走を制御する薬剤を漢方薬の構成生薬に含有される化合物から探索し、その化合物の炎症性腸疾患モデルに対する治療効果を検討した。

【方法】

BALB/c マウスの大腿骨及び脛骨より骨髓細胞を採取し、pDC 及び cDC に分化誘導した。そして、細胞動態測定装置(EZ-TAXIScan) を用いて、ケモカインによる遊走能に対する各化合物の作用を検討した。さらに、Blab/c を用いてマウスでデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘起炎症性腸疾患モデルを作製し、探索した化合物の治療効果を検討した。

【結果】

漢方薬の構成生薬の成分に由来する 80 種類の化合物を用いて pDC の遊走に対する効果を検討した。Astragaloside-IV (As-IV)、Berberine (Ber)、Curcumin (Cur)、Isofraxidin (Iso) 及び Oxymatrine (Oxy) は、遊走した pDC の細胞数を有意に減少させた。次に、これらの化合物を用いて cDC の遊走に対する効果を検討した。Ber、Cur、Iso は遊走した cDC の細胞数を減少させたが、As-IV と Oxy は cDC の遊走には影響を与えなかった。そこで、DSS 誘起炎症性腸疾患モデルに対する pDC 特異的遊走阻害薬である As-IV (50 mg/kg/day i.p.) と Oxy (100 mg/kg/day i.p.) の効果を検討した。As-IV 投与群では、未治療群と比較して体重の減少が有意に抑制され、腸管の短縮、腸炎の症状も有意に抑制された。また、Oxy 投与群でも、未治療群と比較して体重の減少が抑制され、腸炎の症状が抑制された。

【結論】

pDC は炎症性腸疾患の発症および病態形成に関与し、pDC の遊走抑制は炎症性腸疾患の新規治療標的となる可能性を示唆した。

北 潔

長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科

宿主体内の低酸素分圧環境に生息する寄生虫は宿主である哺乳類とは大きく異なった独自のエネルギー代謝系を用いて環境に適応している。すなわち寄生虫の種類、寄生環境また寄生様式によって、それぞれ特異的な系を発達させ、そのミトコンドリアの呼吸鎖も極めて多様なものとなっている。また、ほとんどの寄生虫は宿主内ではたとえ周囲の環境中に酸素があってもこの酸素を利用せず、酸化的リン酸化以外の系を用いてATPを合成している。これは酸素が充分存在する血液中に寄生するマラリア原虫やトリパノソーマでも同様である。

ミトコンドリアは好気性生物においてはATP合成の場であり、エネルギー転換反応に中心的な役割を果たすオルガネラである。一方、宿主体内に生息する寄生虫のミトコンドリアは宿主のそれとは大きく異なっており、独自のエネルギー代謝系を用いて環境に適応している。寄生虫の特徴はその生活環において、宿主外の自由生活性の時期と宿主内寄生の少なくとも二つの時期を持つことであり、多くの場合、自由生活性時の代謝は好氣的である。例えば、アフリカ睡眠病の病原体であるトリパノソーマなどではベクターであるツェツェバエ中の原虫ミトコンドリアは哺乳類型であることが判っている。また回虫は外界における受精卵の発生には酸素が必要であり、幼虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は哺乳類とほぼ同一である。これに対して宿主内に寄生している時期においては寄生虫の種類、寄生環境また寄生様式によって、それぞれ特異的な系を発達させており、その呼吸鎖も極めて多様なものとなっている。

最近の研究からこの寄生虫ミトコンドリアについて、エネルギー代謝系とそれに関わる酵素群の進化、さらにはわれわれ哺乳類も含む生物一般における酸素適応機構を理解するためのヒントが得られつつある。例えば、ある種のがん細胞は回虫成虫と同様の戦略で、低栄養・低酸素の環境に適応している事が判って来た。さらに宿主と大きく性質の異なる寄生虫ミトコンドリアは化学療法の格好の標的となる。本講演ではこの様な特殊な性質を持つ蠕虫や原虫ミトコンドリア呼吸鎖について、私達が研究を進めている蠕虫およびアフリカトリパノソーマ *Trypanosoma brucei brucei* を中心に化学療法剤の標的としての観点から、現在開発中で糸状菌が産生するアスコフラノンに焦点を絞り研究の現状を紹介する。

抗マalaria薬開発を指向した天然薬物研究

富山大学 和漢医薬学総合研究所
生薬資源科学分野 准教授 當銘 一文

マalariaはマalaria原虫により引き起こされる蚊媒介性の疾患であり、2015 年において約 100 の国と地域で流行が発生し、世界人口の約半数(約 32 億人)がそのリスクにさらされている。近年では年間 2 億万人を超えるマalaria患者と約 44 万人のマalaria死亡者が推定されている。

これまでに多くのマalaria薬が開発されてきたが、近年用いられている抗マalaria薬へ耐性を示すマalariaの出現が大きな問題となっており、継続的な新規抗マalaria薬の開発が求められている。我々は長崎大学熱帯医学研究所と共同で、熱帯マalaria発生地域で伝承的に抗マalaria治療に用いられているコンゴボロロと、日本、中国を中心に様々な疾患に用いられている和漢薬に着目し、天然薬用資源を活用した抗マalaria薬開発を目指している。本発表では、現在進めている抗マalaria薬開発を指向した研究について報告する。

1) コンゴボロロの抗マalaria薬開発を指向した研究

コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) は、アカネ科に属する植物で、コンゴなどのアフリカ諸国では、本植物の葉をお湯で煎じ、お茶のように用い、マalaria、破傷風などの感染症や糖尿病などの治療に利用してきた。これまでに長崎大学熱研 平山謙二教授らから提供されたコンゴボロロ葉の抽出物は抗マalaria作用をもつことが確認されており、これらから、抗マalaria作用が報告されているフェニルプロパノイド縮合型イリドイド化合物 2 種を含む 5 化合物を単離している。我々は、コンゴボロロ葉の抽出物を抗マalaria薬として開発すべく、以下の検討を進めた。

1) コンゴボロロ葉の最適な植物材料の選定をめざし、ロット間の成分組成について TLC 分析により検討を行った。その結果、これまで収集した植物材料のうち、乾燥状態で輸送されたものは、ほぼ同じスポットを示し、成分組成は同じであると考えられ、ロット間での大きな差は認められなかった。一方、湿った状態で輸送された植物材料は、前者と異なるスポットのパターンを示した。

2) 遺伝子レベルでの種の同定を行うべく、核 DNA の ITS 領域の塩基配列の解析を行った。その結果、これまでに収集したコンゴボロロ葉のうち KB001~003 の ITS 領域の塩基配列は互いにほぼ一致していた。また、GenBank に登録されている *M. morindoides*, *M. longiflora* の塩基配列にも高い相同性を示した。

今後は、収集した植物材料を用い活性成分の同定を進める。さらに抗マalaria作用の高い抽出法の確立および、品質評価法の確立を目指し研究を行う。

2) 和漢薬ライブラリーからの抗マalaria薬を指向した研究(血漿中薬物の解析)

長崎大熱研 平山教授らは、富山大和漢研が提供した和漢薬ライブラリーより *in vitro* で抗マalaria作用をもつ化合物 X とその類縁化合物および生薬 Y 抽出物を見出した(化合物 X は生薬 Y の構成成分である)。生薬 Y を構成生薬とする漢方方剤は数種あるが、その中で方剤 Z に着目し、マウスにおける抗マalaria作用を検討中である。

マウスにおいて、生薬 Y および方剤 Z をマalaria感染マウスモデルに経口投与し、1 時間後の採血より調製した血漿中に化合物 X およびその類縁体が存在するかを検討した。その結果、生薬 Y を投与では、化合物 X を含む 5 種が、方剤 Z の投与では化合物 X を含む 3 種の化合物が検出された。以上の結果より、生薬 Y および方剤 Z の抗マalaria作用には、化合物 X およびその類縁体が関与する可能性が示唆された。

*本内容は、特許出願準備中の為、化合物や生薬、方剤名を伏せている。

新興ウイルス感染症に対する創薬

安田 二郎

(長崎大学感染症共同研究拠点)

直近半世紀の間に新たに人類の脅威として出現した新興ウイルス感染症の数は30を超える。それらの中には、エボラウイルス病やラッサ熱など極めて高い致死率を示すものも少なくないが、これらの新興ウイルス感染症に対する治療薬（抗ウイルス剤）の開発は遅れている。

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）は、2013年以降わが国でも毎年患者が報告されている新興ウイルス感染症で致死率も極めて高い。SFTSに対する確立された治療法はなく、ワクチンや抗ウイルス剤も現時点では存在しない。我々は、現在複数の手法を使って、SFTSウイルスの増殖を阻害する化合物のスクリーニングを行っており、抗SFTS薬の開発を目指している。今回のセミナーではその成果の一部を紹介する。

Application of NMR metabolomics in understanding the physiological target of Kampo medicine

Suresh Awale
Institute of Natural Medicine, University of Toyama

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy is an indispensable tool for the structure elucidation of the compounds in natural products and organic chemistry. Recently, NMR is also becoming a major technique for the analysis of metabolites in bio-samples, and the biomarker discovery. A key advantage of NMR metabolomics is its high reproducibility and direct identification of the metabolites. Furthermore, it is a non-destructive technique, which can rigorously quantify major compounds present in both in vitro and in vivo bio samples. Given its simplicity of methodology, direct identification and quantitative information of the metabolites, we applied NMR metabolomics as a novel and powerful tool to determine the physiological target of the Kampo medicine in vivo. For this purpose, a Kampo medicine 'Gorei san' (五苓散) was used as the exploratory example in this study.

Gorei san (GRS) is one of the traditional Kampo medicine composed of five crude drugs (Alisma Rhizome, Chuling (猪苓), Poria Sclerotium (茯苓), Cassia (桂皮) and Atractylodes Rhizome (白朮). It is regarded as a typical water-retaining agent, and it has the function of regulating the metabolic abnormality of moisture in the body and returning it to normal. In the present study, male Wistar rats of 8 weeks of age were fed for four weeks with the regular diet (Cont group, n = 6) or a feed containing 1% GRS extract (1% GRS group, n = 6). Measurement of food intake, drinking water, body weight and urine volume was monitored each week. After the administration period, various organs and bio-fluids such as blood and urine were collected for the NMR analysis. In the present investigation, 26 primary fluctuating metabolites were identified and quantified. Administration of GRS was found to significantly alter the metabolites involved in pyruvate metabolism pathways, such as lactate, acetate, succinate, and citrate.

Acknowledgement: This study was supported by the President's discretionary expenses (Year 2016-2017), University of Toyama for the project 「次世代 KAMPO 科学の創成を志向した漢方オミックス(Kampo Omics)の基盤構築」.

Japanese Herbal Medicine (Kampo) Based Antimalarial Drug Development

Awet Teklemichael^{1,2}, Shusaku Mizukami^{1,3}, Kazufumi Toume⁴, Farhana Mosaddeque^{1,2}, Michiko Fukuda¹, Mahamoud Sama Cherif¹, Nguyen Huy Tien^{1,3}, Katsuko Komatsu⁴, Kenji Hirayama¹

¹Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), ²Leading Graduate School Program, and Graduate School of Biomedical Sciences, ³Department of Clinical Product Development, NEKKEN, Nagasaki University, ⁴Division of Pharmacognosy, Department of Medicinal Resources, Institute of Natural Medicine, University of Toyama.

Introduction: Malaria is critical global health issue especially tropical and subtropical countries. The emergence of resistance to the available antimalarial drug requires the urgent development of new medicine with new mechanisms of action. Herbal medicine, including Japanese (kampo) one, is still an attractive source of the antimalarial drug since the isolation of quinine and artemisinin. The aim of the study is to examine kampo as the source of new antimalarial drug utilizing a compound and crude extract library. In previous joint seminar, we showed our finding of antimalarial kampo compounds and crude drug extract. According to the finding, in parallel with the compound based drug development strategy, we sought a way of drug discovery based on already approved kampo formula which contains the effective kampo crude extract because it is proven to be enough safe.

Methods and Material: As reported in previous seminar, the antimalarial activity of 96 compounds and 120 extracts in the library provided by Institute of Natural Medicine, University of Toyama were evaluated using *in vitro* antimalarial assay against chloroquine/mefloquine sensitive (3D7A) and -resistant (Dd2) strain of *Plasmodium falciparum* in erythrocytic cycle. After the drug treatment, the red blood cells were stained with SYBR Green to detect the parasite. In addition, the cytotoxicity was also examined. We select the kampo formula based on the content of active crude drug extract, and evaluated using the *in vitro* assay. Moreover, active kampo crude drug extract and formula were further examined against mouse malaria *P. yoelii*. *In vivo* parasite growth suppression by them were evaluated in mice inoculated with parasite (1×10^4 /mouse). This *in vivo* antimalarial effect was examined in a 5-day suppressive test (drug treatment started 48 hr before and continued until 48 hr after challenge infection).

Result: As the result of *in vitro* assay with the library, coptisine chloride (compound, $IC_{50}=1.1 \mu M$, SI (selective index) =37.8) and coptise rhizome (crude drug extract, $IC_{50}=5 \mu g/mL$, $SI>200$) showed high antimalarial activity and its safety. Then, we examined two approved kampo formula, Sanohshashinto and Ohrengedokuto, containing coptis rhizome by the *in vitro* assay, and those exhibited good antimalarial activities (IC_{50} 36 and 40 $\mu g/mL$, respectively). Moreover, even in a preliminary experiment, both Ohrengedokuto and coptis rhizome showed a suppression of parasitemia in malaria mouse model.

Conclusion: High antimalarial activity with low cytotoxicity was observed from kampo formula which contain antimalarial kampo compounds and crude drug extract *in vitro* experiments. Furthermore, even as preliminary experiment, antimalarial effect of kampo crude drug extract and formula were observed *in vivo* experiment, suggesting kampo formula as a potential antimalarial drug. This study is an important input for the development of an antimalarial drug from kampo.



第7回交流セミナー



グローバルヘルス
総合研究棟
1階大セミナー室

平成29年12月4日(月) 14:00-17:20

1. 14:00-14:10 開催の挨拶
長崎大学 熱帯医学研究所 所長 平山 謙二
富山大学 和漢医薬学総合研究所 所長 松本 欣三
2. 14:10-14:35 富山大学 和漢医薬学総合研究所 教授 門脇 真
「樹状細胞の遊走抑制を新規創薬標的とした免疫抑制薬の漢方薬成分からの探索研究」
3. 14:35-15:00 長崎大学 熱帯医学・グローバルヘルス研究科長 北 潔
「抗がん・抗感染症薬アスコフラノン —自然からの贈り物—」
4. 15:00-15:25 富山大学 和漢医薬学総合研究所 准教授 菅銘 一文
「抗マラリア薬開発を指向した天然薬物研究」
- <休憩 15:25-15:30 >
5. 15:30-15:55 長崎大学 感染症共同研究拠点 教授 安田 二郎
「新興ウイルス感染症に対する創薬」
6. 15:55-16:20 富山大学 和漢医薬学総合研究所 准教授 スレス アワレ
「Application of NMR metabolomics in understanding the physiological target of Kampo medicine」
7. 16:20-16:45 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生
アヴェット アレム テクレミカエル
「Japanese Herbal Medicine (Kampo) Based Antimalarial Drug Development」
- <休憩 16:45-16:50 >
8. 16:50-17:20 総合討論

お問い合わせ: 長崎大学熱帯医学研究支援課 橋口・天野 TEL: (095) 819-7803
E-Mail: soumu_nekken@ml.nagasaki-u.ac.jp

熱帯医学と和漢薬研究の新展開
—新しい医療体系の構築をめざして—



和漢医薬学総合研究所年報

第44巻

平成30年3月31日

編集
発行所

富山大学和漢医薬学総合研究所

〒930-0194 富山市杉谷2630番地
TEL (076) 434-2281(代)

印刷所

(株) なかたに印刷

〒939-2741 富山市婦中町中名1554-23
TEL (076) 465-2341(代)

