

# 和漢医薬学総合研究所年報

---

富 山 大 学

第 47 卷 2020 年

Annual Report  
Institute of Natural Medicine  
University of Toyama  
Vol. 47, 2020



# 和漢医薬学総合研究所年報

富 山 大 学

第 47 卷 2020 年

**Annual Report of Institute of Natural Medicine**

**University of Toyama Vol. 47, 2020**

富 山 大 学

和漢医薬学総合研究所



## 目次

<b>巻頭言</b> .....	1
<b>総 説</b>	
研究開発部門資源開発分野「資源科学領域」	
小松 かつ子 .....	2
<b>各部門・センターの活動と業績</b>	
研究開発部門	
資源開発分野	
資源科学領域 .....	14
天然物創薬学領域 .....	21
病態制御分野	
神経機能学領域 .....	29
生体防御学領域 .....	35
複雑系解析分野 .....	45
未病分野 .....	48
国際共同研究分野 .....	51
臨床応用部門 .....	55
産官学連携部門 .....	57
和漢医薬教育研修センター .....	59
民族薬物資料館 .....	64
2020年度の活動記録 .....	65

## 2020年度 共同利用・共同研究活動

### 【特定研究】

軸索修復の血漿バイオマーカーの研究 .....	66
軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能を 評価する認知機能試験の研究 .....	72
がん免疫療法における補剤の有用性に関する基礎研究 .....	78
ラマン顕微鏡を用いた未病検出技術の開発 .....	81
植物二次代謝酵素の潜在的触媒活性を基盤とする カンナビノイド関連化合物の生合成工学.....	85
高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析 .....	89

### 【探索研究】

生薬エキス/漢方方剤由来新規抗トキソプラズマ薬の探索 .....	93
ゼブラフィッシュを用いた癌細胞転移抑制効果を有する漢方薬の探索 .....	95

伝統医学は人類が自然の摂理と天然の恵みを巧みに利用し、疾病の予防、治療にあたってきた経験知の集積です。和漢医薬学総合研究所は、現代の先端科学技術を駆使して、和漢薬をはじめとする伝統医学や伝統薬物を科学的に研究し、東洋医薬学と西洋医薬学の融合を図り、新しい医薬学体系の構築と自然環境の保全を含めた全人的医療の確立に貢献することを使命として、①天然薬物資源の確保と保全、②和漢医薬学の基礎研究の推進と東西医薬学の融合、③漢方医学における診断治療体系の客観化と人材の育成、④伝統医薬学研究の中核的情報発信拠点の形成 の重点課題を設けて、研究を推進してきました。

近年、世界的に問題になっている高齢化の進行、多因子性疾患の増加、及び天然資源の枯渇に鑑み、本研究所は新たに重点研究プロジェクト（高齢者疾患対策研究、未病・予防先制医療研究及び資源開発研究）を定め、推進し、その成果を社会実装するための組織へと、令和2年4月に改組しました。研究開発部門では5分野（資源開発、病態制御、複雑系解析、未病、国際共同研究）を設置し、それらが連携して、臨床研究への橋渡しを目指した、新規メカニズムに基づく創薬基盤の構築などに関する基礎研究を行います。さらに、臨床応用、産官学連携の2部門では、本学附属病院や企業と協力して臨床試験や医薬品候補の発掘を推進します。加えて、漢方医学教育を実践できる教員の育成とその教育研修システムの確立を目的とした和漢医薬教育研修センターを立ち上げました。これらの3部門1センターが互いに連携し、東西医薬学の融合を基盤とした次世代型医療科学を創生して、健康長寿社会の形成に貢献することを目指します。

今回の年報は新組織体制での初めての活動報告となります。また令和2年度でも前年度から引き続き重点研究課題に係る公募型共同研究を実施しましたので、この成果についても収載しました。

現在、新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより、我々の生命や生活が脅かされる状況が続いています。これに対応するべくワクチン接種と並行して、早急に新型コロナウイルス感染症に対する予防・治療薬の開発も求められています。我々人類が健康長寿社会を実現するためには、これまでに長きにわたり持続して保健医療に用いられてきた歴史を持つ伝統医薬学を活用することが肝要と考えられます。その実現のため、重要先端の生命科学・自然科学や科学技術を駆使して科学的エビデンスに基づく研究を念頭に、和漢医薬学領域と異分野領域との融合型共同研究を行うことが重要です。この方針の下、教育研究を進める所存ですので、皆様方の一層のご支援とご協力を、よろしくお願い申し上げます。

令和3年4月1日

和漢医薬学総合研究所 所長 早川芳弘





# 総説



# 伝統薬のサステナビリティと標準化を志向した薬用植物・生薬の多様性解析研究

和漢医薬学総合研究所 研究開発部門 資源開発分野 資源科学領域 小松かつ子

## 1. はじめに

日本では超高齢社会の訪れとともに様々な問題が顕在化している。それに対処すべく、医療においては高齢者疾患及び生活習慣病に代表される多因子性疾患に対する治療法の開発、健康寿命を延伸しかつ医療費を軽減するための保健医療の充実などが求められ、漢方薬や生薬のこれらへの応用が期待されている。ますます重要性を増している生薬ではあるが、地球的規模で出現する異常気象や人為的な自然破壊は生薬の供給源である天然資源の減少をもたらしている。中国でも国土の破壊は深刻で、自生する高等植物約 35,000 種のうち約 3,000 種が絶滅の危機に瀕しているとされる。このことは、漢方医学をはじめとする世界の伝統医学の存続にも係わる問題で、限りある天然薬物資源をいかに効率的かつ永続的に利用するか、さらにどのような基準を設けて栽培へと転換を図っていくのかが模索されている。中国では 2000 年のカンゾウとマオウの採取並びに輸出制限から始まった各種規制とともに、薬用植物の栽培化が進められ、現在、中華人民共和国薬典<sup>1)</sup> 収載の植物性生薬の約 46%は大規模栽培により賄われているとされる。日本では、漢方製剤、生薬製剤、保健機能食品、いわゆる健康食品などに配合される生薬の約 90%を主として中国から輸入しているため、中国の薬用資源の状況は注視しなければならない。

このような状況下、漢方薬・生薬の永続的利用を可能にする方策を考えると、国家レベルで計画的な薬用植物の採取と保全の管理計画を立てること、アジア全体で生薬の循環型社会を形成するために中国産生薬（漢薬）に匹敵する代替生薬を開発すること、また限りある生薬を品質上の特徴に応じて効率的に利用する方法を見出すことなどが挙げられる。しかし、最終的には薬用植物の栽培化が不可欠であり、このためには栽培すべき薬用植物の選択と効率的栽培方法の確立及び効果的調製加工法の開発が必要である。いずれの場合においても本来の薬効を果たし得る薬用植物を見出し生薬にすることが大前提であり、その基準を定める生薬の標準化とともに行わなければならない。ここで注意すべき点は、野生品に由来する生薬に関しては、厳格な標準化は資源枯渇に繋がることである。以上を鑑み、生薬の多様性を認める範囲を限定しながら生薬の標準化を図り、さらに栽培化への橋渡しを行う生薬・薬用植物の多様性解析研究に着手した。

研究方法としては、生薬の基原植物に分類学上の混乱が見られる場合は、最初に薬用植物の遺伝子多型を調べ、生薬の基原植物を同定するかまたは遺伝子型を決定し、同時に分子系統関係を明らかにする；次に、遺伝的に薬用植物・生薬を整理した上で、成分分析を行い、植物種または系統による特徴、産地間差異及び漢薬との同等性・相違性を明らかにする；さらに可能であれば植物種または系統による薬理学的特徴を明らかにする；という流れで行い、各々の薬用植物または生薬の品質上の特徴を見出すことを目標とした。この結果に基づき、生薬として公定書に収載すべき基原植物、規格等の提案、栽培化に推薦できる植物種または系統の提案、加工調製法の提案などを行った。

本稿では、モンゴル国における防風資源の開発、アジアにおけるウコン類生薬の整理、ブランド芍薬の開発に関する多様性解析研究について紹介する。

## 2. モンゴル国における防風の資源植物の探索と品質評価

「防風」は、駆風、解熱、消炎薬として、荊芥連翹湯、大防風湯、防風通聖散などに配合される重要な生薬である。中国及び日本で防風の需要が高まった結果、野生資源量が著しく減少し、これに代わって中国の栽培防風が流通するようになったが、希エタノールエキス含量が高い反面、薬理活性成分のクロモン類などの含量が低いという問題が生じている。そこで、防風の基原植物であるセリ科 *Saposhnikovia divaricata* の資源量が豊富で、国家政策として植物資源の保護と有効利用に力を入れているモンゴル国において、防風の新資源の開発と現地での栽培化に向けた情報の蓄積を目的として、現地調査を実施し、採集した *S. divaricata* の根について含有成分を網羅的に解析した。

### 1) LC-MS 分析によるメタボロームプロファイリング<sup>2)</sup>

クロモン類を中心に、鎮痛、抗炎症、抗酸化、抗アレルギー作用などが報告されている 17 化合物を防風から単離・同定し、また新規化合物として 3'-*O*-(6"-*O*-malonyl)-glucosylhamaudol (**14**)を見出し、これらを標準品として以下の研究に供した。

2015 年及び 2017 年にモンゴル国東部で採集した 43 標本の根及び中国産防風について 70%メタノールエキスを作製し、LC-IT-TOF-MS により成分プロファイリングを行い、クロモン類 13 化合物及びクマリン類 17 化合物を同定または推定した。モンゴル産 *S. divaricata* は中国産防風と同様の成分プロファイルを示し、さらに LC-MS データを多変量解析の判別分析 (OPLS-DA) に供した結果、中国産防風よりジヒドロフロクロモン類の prim-*O*-glucosylcimifugin (**1**) が高含量であった。モンゴル国内では極東部の Khalkhgol 産の標本で **1**, cimifugin (**2**) 及び 4'-*O*-β-D-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol (**3**) の含量が高く、また降水量の観点からも同地が栽培地に相応しいと判断した。

### 2) HPLC-DAD分析及び<sup>1</sup>H NMR分析による定量<sup>3)</sup>

LC-MS分析では各成分の含量を相対的に比較したのみであったため、クロモン類9化合物及びクマリン類4化合物についてHPLC-DAD分析による定量を、2019年の北東部での採集標本を含めて全8箇所の採集品及び中国産防風について行った。全44標本が **1** 及び **3** を含有し、その合計含量は5.04–25.06 mg/g であり、中華人民共和国薬典<sup>1)</sup> 規定の防風の基準値 (2.4 mg/g) 以上であった。化合物 **1** 及びジヒドロピラノクロモン類の3'-*O*-acetylhamaudol (**7**), ledebouriellol (**8**) 及び 3'-*O*-angeloylhamaudol (**9**) の含量は中国産防風より有意に高かった。特に北東部のNorovlin産の標本は **1** 及び **3** を含むジヒドロフロクロモン類の総含量が 12.20–26.80 mg/gで最も高かった。一方、高含量が予想されたKhalkhgol産の標本は 5.59–23.41 mg/gで変動幅が大きかった。ジヒドロピラノクロモン類の総含量は北東部のBayan-Uul産が高い傾向を示した。HPLCデータを判別分析に供した結果、全標本は産地別に3グループに分けられる傾向を示し、その区別にはクロモン類6化合物 (**1**, **2**, **3**, **5**, **9**, **14**) が寄与した (図1)。

<sup>1</sup>H NMRスペクトルではショ糖を含む糖質、panaxynol (**15**) を含むポリアセチレン類及びクロモン類9化合物が特徴づけられた。モンゴル産標本は中国産防風に比し、ショ糖の含量が低く、ポリアセチレン類をやや多く含む傾向にあった。中国の栽培防風はショ糖の含量に起因する70%メタノールエキス含量の増加とそれに伴うクロモン含量の相対的な低下が見られ、畑作での問題点が示された。

以上、モンゴル国に産する*S. divaricata*の根は、抗炎症作用などが報告されている **1** 及び **3**, その他

7, 8, 9, 15などの含量から、中国産防風と同等またはそれ以上の品質を有し、生薬「防風」の資源になり得ること、また北東部のNorovlin産のものが良質であることを明らかにした。これらの知見は、モンゴル国における計画的な *S. divaricata* 資源の利用と栽培化に貢献できるものである。

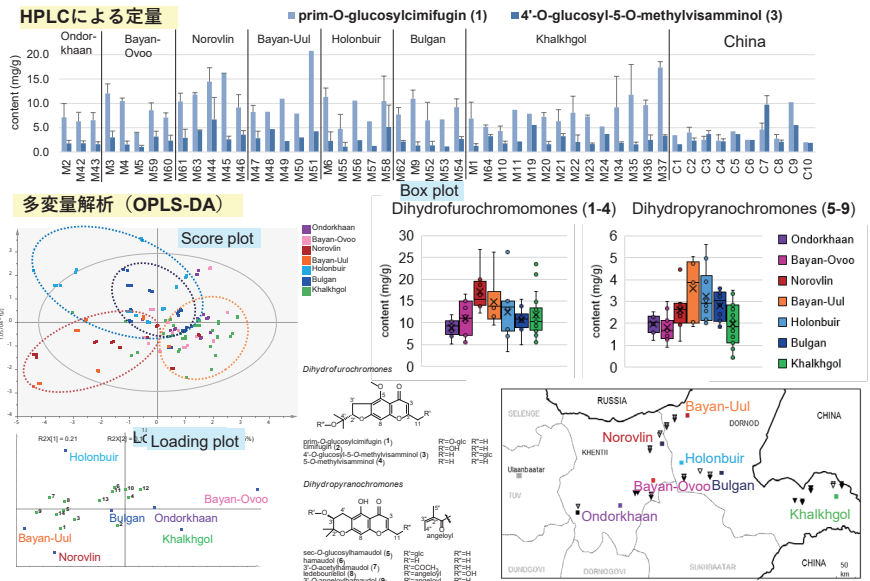


図 1. モンゴル産 *Saposhnikovia divaricata* 根の成分定量と多変量解析

### 3. *Curcuma* 属植物の多様性の解析とウコン類生薬の標準化

ショウガ科 *Curcuma* 属植物の根茎に由来するウコン類生薬には、漢薬の鬱金（中国では姜黄と称す）や莪朮、アーユルヴェーダ生薬の Haridra, ジャムーン生薬の Temu lawak などがあり、含有成分に抗炎症、抗酸化、抗がん作用など多彩な薬理作用が報告され、芳香性健胃薬、駆瘀血薬などとしてアジア各国で多用されている。一方、*Curcuma* 属植物は植物分類学的に未整理な部分が残されており、特に *C. aromatica* や *C. zedoaria* については国や地域によって異なる植物にこの学名が付けられている可能性がある<sup>4)</sup>。さらに、生薬の形態による区別も難しく、グローバル化した今日、同属生薬は基原植物が不明確なまま使用されている可能性があり、治療効果や健康維持に影響を及ぼしていると考えられた。そこで、*Curcuma* 属生薬の標準化を目的として、先ず中国産及び日本産生薬について遺伝的・成分的多様性の解析と薬理作用の検討を行い、その後アジア産の同属植物へと対象を広げた。

#### 1) 中国及び日本産 *Curcuma* 属植物の遺伝子多型と生薬の基原

中国及び日本に自生もしくは栽培されている主要な 6 種について、核遺伝子（二親性遺伝）の 18S rRNA 遺伝子と葉緑体遺伝子（母系遺伝）の *trnK* 遺伝子を解析した<sup>5,6)</sup>。18S rRNA 遺伝子は全長 1810 塩基対で保存性が高く、上流から 234 番目の塩基がチミン(T)かシトシン(C)かにより区別された。さらにチミンであった *C. kwangsiensis* と日本産 *C. zedoaria* (ガジュツ)ではこの位置にヘテロ型塩基(T&C)が確認され、交配が起きている可能性が示唆された。*trnK* 遺伝子は全長 2698~2705 塩基対で、イントロン領域に 9 箇所の塩基置換と 3 箇所の挿入/欠失が認められた。*C. longa* (ウコン), *C. phaeocaulis*, *C. aromatica* (ハルウコン)〔*C. aromatica* (JA)と記す〕は種固有の配列を示したが、*C. kwangsiensis* には配列の異なる 2 タイプ (pl, gl) が存在し、外形的に pl タイプは葉の上面の主脈部に沿って紫色の帯状斑が認められ、花序は葉鞘から離れて根茎から直接出るものであり、一方 gl タイプは葉に紫色の帯状斑が無く、花序は葉鞘から出るものであった。pl タイプの塩基配列は *C. zedoaria* と、また gl タイプの塩基配列は *C. wenyujin* とそれぞれ相同の配列であった。以上、*trnK* 配列は 5 タイプ (Ltk, Ptk, Atk, K(pl)Ztk,

K(gl)Wtk) にまとめられた。 *C. kwangsiensis* に関しては栽培地 (広西壮族自治区) で詳細な調査を行い、栽培植物はすべて K(gl)Wtk タイプの塩基配列を示すものであったが、植物形態は多様であり、圃場には *C. wenyujin* の混生も見られた。さらに根茎の精油成分組成においても個体差が大きいことを確認した<sup>7)</sup>。

*Curcuma* 属生薬についても同様に解析し、同属植物の配列と比較して基原を調べた結果、中国産鬱金 (姜黄) は *C. longa* の根茎、中国産片姜黄は *C. wenyujin* の根茎であった。日本産莪朮は *C. zedoaria* の根茎、日本に広く流通する中国産莪朮のうち四川省産は *C. phaeocaulis* の根茎の単一品であったが、広西壮族自治区産莪朮は *C. kwangsiensis* (gl) の根茎の単一品からなるものは少なく、ほとんどが異なる遺伝子配列タイプをもつ根茎の混合品であった。その中には K(gl)Wtk タイプ、Ptk タイプ及び両配列の 1 または 2 塩基置換、K(pl)Ztk タイプの 1 または 2 塩基置換などの配列が認められた。さらに精油成分分析の結果からも広西壮族自治区産莪朮は均一性を欠いていた<sup>8)</sup>。

*trnK* 遺伝子の塩基配列だけでは *C. kwangsiensis* (gl) と *C. wenyujin* が区別できなかったため、クルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子のイントロン長多型 (ILP) を検討した。*C. longa* の重要な成分であるクルクミノイドはジケタイド CoA 生合成酵素 (DCS) とクルクミノイド生合成酵素 (CURS) が関与して生合成される。また、基質特異性の異なるアイソザイムが存在し、DCS をコードする遺伝子に 2 つ (*DCS1*, 2), CURS をコードする遺伝子に 3 つ (*CURS1-3*) が報告されている。*DCS* と *CURS* には 3 つのイントロン領域 (*DCS* intron I, II; *CURS* intron) が存在することから、これらの領域を挟むエキソン領域に 3 対のプライマーを設計し、これらのイントロン長多型に基づく分類法を検討した。その結果、上記 2 種が明確に区別できるとともに、*C. kwangsiensis* は数種類の ILP パターンを示した。このように、父系遺伝も関与する核遺伝子の *DCS*, *CURS* で多型が認められるという結果からも、*C. kwangsiensis* が交配雑種集団である可能性を示唆している<sup>9)</sup>。以上により、クルクミノイドが検出されない植物種においても上記生合成酵素遺伝子イントロン長多型に基づく分類が適応可能であったことから、アジア産 *Curcuma* 属植物に本法を適用した。

## 2) アジア産 *Curcuma* 属植物の遺伝子多型と生薬の基原<sup>10)</sup>

日本の薬用植物園等に系統保存されているアジア 7 ヶ国から導入した *Curcuma* 属植物について形態観察を行い、*C. longa* (L), *C. aromatica* (JA), *C. zedoaria* (Ze), *C. phaeocaulis* (P), *C. aeruginosa* (Ae), *C. wenyujin* (W), *C. kwangsiensis* (gl)(K), *C. zanthorrhiza* (Za), *C. amada* (Am), *C. manga* (M) 及び *C. petiolata* (Pe) を同定または推定し、これに富山大学和漢医薬学総合研究所民族薬物資料館保有の 3 ヶ国の植物標本及び 7 ヶ国の生薬標本を加えて材料とした。生薬標本は現地調査及び各国の文献調査の情報から基原植物を推定したところ、上記の種のほかに *C. comosa* (C) が認められ、全 12 種 100 検体を解析した。

クルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子の *DCS* と *CURS* のイントロン長多型解析を行った結果、ILP パターンは各種に固有であり、種内多型がほとんどない種 (JA, Ze, P, Ae, W, Za) と多型性がある種 (L, K, Am, M, C) が認められた。ILP パターンに基づいて構築した樹状図では Pe と C からなるクレード、L のクレード、その他の種からなるクレードに分かれ、後者はさらに 4 サブクレード (JA; Ze, Ae 及び P; W 及び K; Za, Am 及び M) に分かれた (図 2)。L のクレードはさらに 3 サブクレードに分かれ、産地との関連性が推測された。ILP パターンが多型性を示す原因として、L では多様な栽培品種の存在が、Am, M 及び C では K と同様に交配雑種の形成が考えられる。

*trnK* 遺伝子の塩基配列にはこれまでに述べた 5 タイプの他に、K(pl)Ztk に類似しているが上流から 205 番目から連続するアデニンの数と 502 番目から連続するチミンの数が Ze に認められる 6 個と 14 個 [K(pl)Ztk(6A14T)] ではない K(pl)Ztk(7A15T)タイプと K(pl)Ztk(7A13T)タイプが認められた。Ae, Am 及び M は Ptk タイプ、Za は K(pl)Ztk(6A14T)タイプ、C は K(pl)Ztk(7A15T)タイプであり、Za と C の一部に K(pl)Ztk(7A13T)タイプが認められた。

*Curcuma* 属生薬の解析結果を、植物の ILP パターン及び *trnK* 配列と比較して基原を検討した結果、文献記載と異なるものが存在し、タイ生薬 Wan nam kum とインド生薬 Kasturi manjal は *C. aromatica* ではなく Za であると同定し、タイ生薬 Kamin oi は *C. zedoaria* ではなく K(pl)Ztk(7A13T)タイプの配列を持つ種と L との交配種由来である可能性が示唆された。さらに日本産ガジュツはインドネシアやインドの *C. zedoaria* と関連性があることが示された。

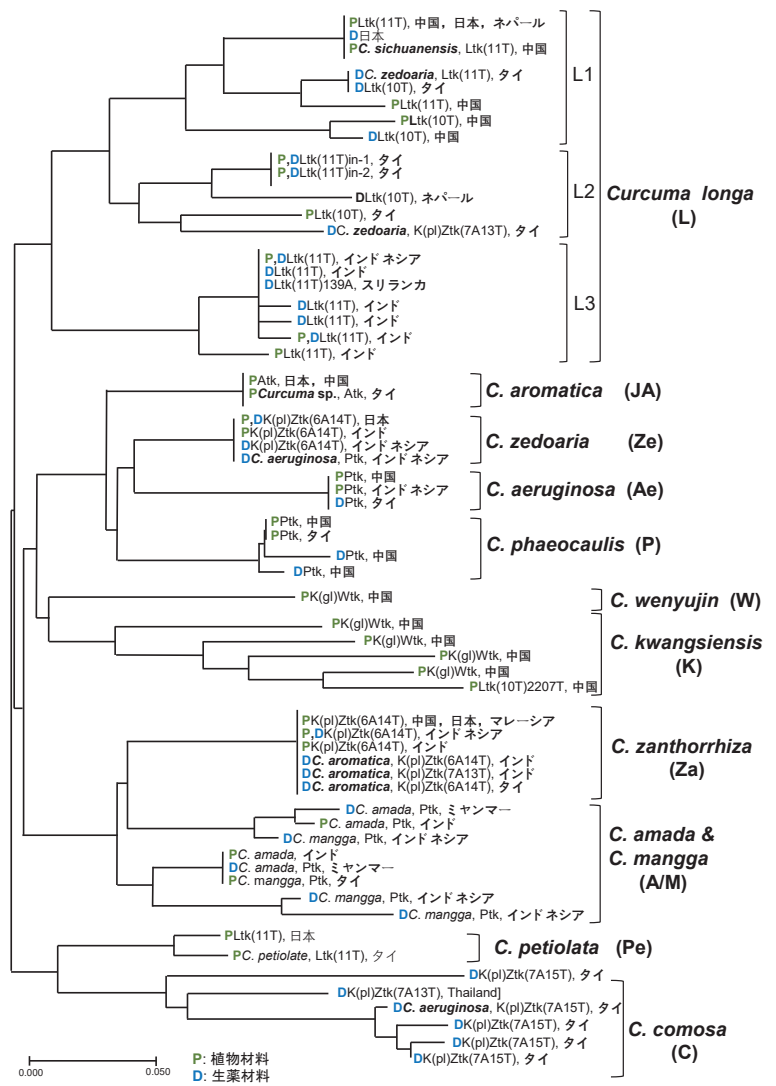


図 2. *Curcuma* 属植物の DSC 及び CURS イントロン長多型に基づく樹状図 (NJ 法)

### 3) アジア産 *Curcuma* 属植物の根茎と生薬の精油成分組成

ILP パターン及び *trnK* 配列の解析から客観的に同定した植物 11 種の根茎の乾燥品及び生薬の粉末を低極性のファイバーを用いて固相マイクロ抽出し、GC-MS で分析した。含有される精油成分について、化合物の保持時間及び MS データを NIST ライブラリーと照合することにより検討した結果、約 60 種類を同定できた。*Curcuma* 属植物は各種に特徴的な成分組成を示し、大きく 7 タイプ (L ; Ze, P 及び Ae ; Za ; JA 及び W ; K ; Am 及び M ; C) に分けられ、それぞれ bisabolane 型 ; curzerene 型・germacrane 型・guaiane 型 ; bisabolane 型・germacrane 型・curzerene 型 ; germacrane 型・curzerene 型 ; curzerene 型・germacrane 型 ; caryophyllane 型 ; santalene 型・bisabolane 型のセスキテルペノイドを含有した。なお、生合成酵素遺伝子の ILP パターンに多型性がある種では基本的組成は一致するものの変動が見られたが、原産地国による違いは少なかった。各タイプが示す成分パターンは、生合成酵素遺伝子の ILP パターン及び *trnK* 配列が一致する生薬であれば、植物とほぼ同様であった。さらに、遺伝子解析で交配が示唆された生薬については、両親の植物種を反映したと思われる精油成分組成を示した。

クルクミノイド生合成に関与する酵素遺伝子の ILP パターン及び *trnK* 配列に、精油成分パターンの情報を加えることにより、*Curcuma* 属植物・生薬の同定が確実にできるのみならず、交配種であれば両親の植物種が推定可能となり、植物分類並びにアジアの同属生薬の学名の整理に有用であると考えられる。このように *Curcuma* 属生薬の標準化に寄与するであろう成果が得られた。

#### 4) *Curcuma* 属生薬のクルクミノイド含量

*C. longa* の根茎にはジアリルヘプタノイドに属するクルクミノイドと総称されるクルクミン、デメトキシクルクミン及びビスデメトキシクルクミンが含有される。これまでに報告された薬理作用によると、抗がん活性はデメトキシ体が他の 2 成分より強く<sup>11)</sup>、抗腫瘍転移活性はデメトキシ体とビスデメトキシ体がクルクミンよりも強く<sup>12)</sup>、一方、抗炎症活性はクルクミン、デメトキシ体、ビスデメトキシ体の順である<sup>13)</sup>とされており、医薬品としての「ウコン」の薬効を考える上では 3 成分はともに重要である。日本、中国、インド及びタイ市場に流通している *C. longa* 由来生薬について HPLC 法でクルクミノイド 3 成分を定量した結果、総含量はそれぞれ 0.24~3.64%、0.56~4.47%、2.02~4.08%及び 3.28~4.92%であり、その内クルクミンが 54~72%を占めた。その他の生薬では *C. aromatica* (JA)由来のハルウコンが約 0.1%、*C. zanthorrhiza* 由来のインド産 *Kasturi manjal* とインドネシア産 *Temu lawak* がそれぞれが約 1.0%、約 0.5%のクルクミノイドを含有し、これらの生薬でもクルクミンが主であった。一方、遺伝子解析の結果、文献記載の *C. zedoaria* 由来ではなく、K(pl)Ztk(7A13T)タイプの配列を持つ種と *C. longa* との交配種由来と考えられたタイ産 *Kamin oi* は 1.2~2.0%のクルクミノイドを含有し、デメトキシ体がクルクミンより多く含まれていた<sup>8)</sup>。この研究結果などを受けて日本薬局方でも「ウコン」のクルクミノイドの定量が検討された。標準品として定量用クルクミンのみを使用して総クルクミノイドの量を求める方法を提案し、15 局第 2 追補から本定量法が収載され、含量規格として「本品は換算した生薬の乾燥物に対し、総クルクミノイド含量 1.0~5.0%を含む」こととされた。さらに確認試験に、*C. longa* 以外の同属生薬の使用を防ぐための規定が設けられている<sup>14,4)</sup>。

#### 5) 中国産 *Curcuma* 属生薬の薬理作用の比較

中国では *Curcuma* 属生薬は駆瘀血薬とされることから、1)で基原を明らかにした 5 種類の生薬についてラット胸部大動脈リング状標本を用いた血管作動性の検討を行い、すべてのメタノール及び熱水抽出エキスに NO 非依存性血管弛緩作用があり、さらに *C. zedoaria* 由来の日本産莪朮の熱水抽出エキス（多糖類画分）のみに NO 依存性血管弛緩作用があることを見出した<sup>15)</sup>。一方、瘀血病態には炎症も関与していると考えられることから、アジュバント関節炎モデルマウスを用いて *C. aromatica* (JA)を加えた 6 種類の生薬の抗炎症作用を比較した。*C. phaeocaulis* 由来四川省産莪朮のメタノールエキスは後肢の腫脹と血清中の炎症マーカータンパク質 *haptoglobin* の増加を有意に抑制し、また *in vitro* 実験において COX-2 活性の有意な抑制作用を示した<sup>16)</sup>。LC-MS 分析によるクロマトグラムと COX-2 阻害活性から主成分回帰分析を行い、活性成分として *furanodienone* と *curcumenol* を同定した。これらのうち *furanodienone* は COX-2 阻害活性が強く (IC<sub>50</sub> 値 4.6 μM) また選択性も高かった (SI 値 11.7) ことから、莪朮を評価する際の指標成分の一つになるものとする<sup>17)</sup>。

以上から、莪朮としては遺伝的にも成分的にも安定し、駆瘀血作用が期待できる *C. zedoaria* と *C.*



*phaeoaulis*に由来する莪朮の使用が望ましい。ただし、アジュバント関節炎モデルマウスの実験で*C. kwangsiensis*のエキスも炎症前投与でhaptoglobinの増加を有意に抑制したことから、安定性確保を前提として、日本市場の主流品である*C. kwangsiensis*の使用も考慮することができる。これらの研究成果等の基盤のもとで局方「ガジュツ」の基原植物が17局第2追補で改訂され、従来の*C. zedoaria*に*C. phaeoaulis*と*C. kwangsiensis*が追加された<sup>14)</sup>。

局方収載の医薬品「ウコン」や「ガジュツ」は現在中国産の *Curcuma* 属植物がその供給源であるが、一連の研究により、他のアジア産同属植物も使用できる可能性がある。保健機能食品等の原材料も含め、多様性解析研究で明らかになった種固有のDCS, CURSのILPパターン及び成分組成は、それらを原料として使用する際の指標になるものと考えられる。

#### 4. 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

芍薬はボタン科の *Paeonia lactiflora* (シャクヤク)の根を基原とする生薬で、日本では中国からの輸入品と少量の日本産芍薬(全体の1.2%)を鎮痛、鎮痙、収斂薬として漢方処方に配合して使用する。一方、中国では芍薬に「白芍」と「赤芍」の別があり、白芍は日本と同様の用途で用い、赤芍は活血化瘀薬として婦人科疾患などに応用する。白芍は*P. lactiflora*の根を湯通しした後に外皮を除去したもの又は外皮を除去した後湯通しして乾燥したものであり、赤芍は*P. lactiflora*または*P. veitchii*の根の乾燥品であると規定されている<sup>1)</sup>が、*P. veitchii*は資源量が限られるため、ほとんど市場性がない。したがって、同一種に由来する白芍と赤芍をどのように区別するかは長い間の懸案であった。さらに日本では*P. lactiflora*の薬用品種その他、多くの園芸品種が栽培されており、それらの一部が生薬に加工されるが、その品質は不明であった。そこで、先ず中国産の白芍と赤芍、日本産芍薬の分類学上の異同を明らかにする目的で、上記2種と*P. anomala*, *P. japonica*及び日本と中国の芍薬類市場品を材料にして遺伝的・成分的多様性を解析した。次に富山県薬用植物指導センターと共同で、同センターが保有する園芸用及び薬用の約100品種についても同様の解析を行った。その後、付加価値のある品種を選抜して、「富山ブランド芍薬」を開発するための検討を行った。

##### 1) *Paeonia* 属植物及び芍薬類の遺伝的多様性

*Paeonia* 属4種の核遺伝子のInternal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基配列を解析した結果、ITS1-5.8S-ITS2領域は長さ653 bpで、各領域はそれぞれ267 bp, 164 bp, 222 bpであった。全ての植物及び生薬材料の塩基配列に基づいてClustalW法を用いて系統樹を作成した結果、*P. lactiflora*は1つのグループを形成し、他の3種から明確に区別された。*P. lactiflora*のグループはさらに2つのサブグループに分けられ、

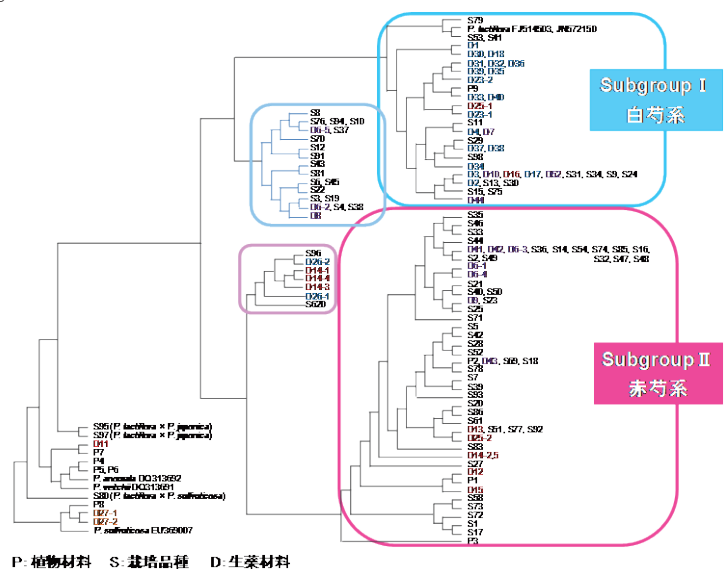


図3. ITS配列の類似度に基づくクラスター解析

その内の1つに中国南部で栽培されている *P. lactiflora* と中国市場の白芍が属し（白芍系と称す）、残りの1つに中国北部及びモンゴルに自生する *P. lactiflora* と中国市場のほとんどの赤芍が属した（赤芍系と称す）<sup>18)</sup> (図3)。赤芍の内、四川省産1検体のみ *P. veitchii* 由来であった。国際塩基配列データベースには2タイプの ITS 配列が登録されており、それらは上流から69番目、458番目及び523番目の塩基で区別されることから、これらの3箇所の塩基に着目すると、白芍系に属する検体はチミン(T)-アデニン(A)-Tの配列を示し、赤芍系に属する検体はヘテロ型塩基である Y(T&C)-M(A&C)-Yの配列を示した。日本で開発された薬用品種の梵天と北宰相及び生薬の大和芍薬3検体は白芍系に、一方、大和芍薬2検体及び新潟県産芍薬などは赤芍系の配列を示した。園芸品種の多くは赤芍系の配列を示したことから、後者の生薬は園芸品種由来である可能性が示唆された。

## 2) *Paeonia* 属植物及び芍薬類の成分的多様性

薬効に関与する成分を含む8成分

〔paeoniflorin (PF), albiflorin (AF), pentagalloyl glucose (PGG), (+)-catechin (CC), paeonol (PN), gallic acid (GA), methylgallate (MG), benzoic acid (BA)〕をHPLCで定量した結果、*P. lactiflora* 基原とする生薬では赤芍がPF含量、PN含量ともに白芍より高く、反対にAF含量は低かった<sup>18)</sup> (図4)。さらに、中国市場の白芍では古来の加工法である硫黄燻製を行うことにより paeoniflorin sulphonate (PFS) が生成し、これによりPF含量が低下し、局方基準の2.0%に満たないものが認められた。ただし、日本市場の中

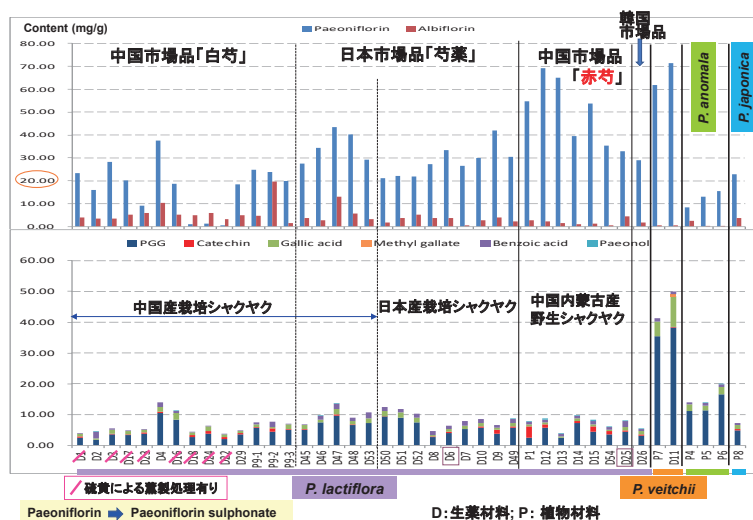


図4. 芍薬類市場品と *Paeonia* 属植物の根の8成分の含量

国産芍薬ではPFSは検出されなかった。そこで、PFSが検出された検体を除き、*Paeonia* 属4種と生薬の6成分(MG, BA以外)の定量データを用いて主成分分析を行った結果、*P. lactiflora* 基原の生薬は赤芍からなるグループと、白芍(日本市場の中国産芍薬を含む)及び大多数の日本産芍薬からなるグループに分かれた。また、*P. veitchii* と *P. anomala* はそれぞれグループを形成した。以上から、白芍と赤芍は遺伝的にも成分的にも、さらに地理的にも区別できることがわかった。

さらにLC-ESI-IT-TOF-MSによりモノテルペノイドのプロファイル解析を行いピーク同定と15成分の定量を行ったところ、新規化合物のpaeoniflorol及び既知のPF-タイプのモノテルペノイド化合物(PF, salicylpaeoniflorin, mudanpioside C, mudanpioside J等)の含量が赤芍で高いことが判明した<sup>19)</sup> (図5)。一方AF-タイプのモノテルペノイド(AF, 4-epi-albiflorin, paeonivayin)の含量は低かった。その他の種では *P. veitchii* 及び同種を基原とする赤芍でPF, salicylpaeoniflorin, galloylpaeoniflorin及びPGGが高含量であった。園芸品種では検討した約80%の品種が局方<sup>14)</sup>規定のPF含量2.0%以上であった。また8成分の含量では、ITS配列で分けられた白芍系品種と赤芍系品種の間で、生薬の白芍と赤芍に見られたよ

うな成分的差異は認められなかった。

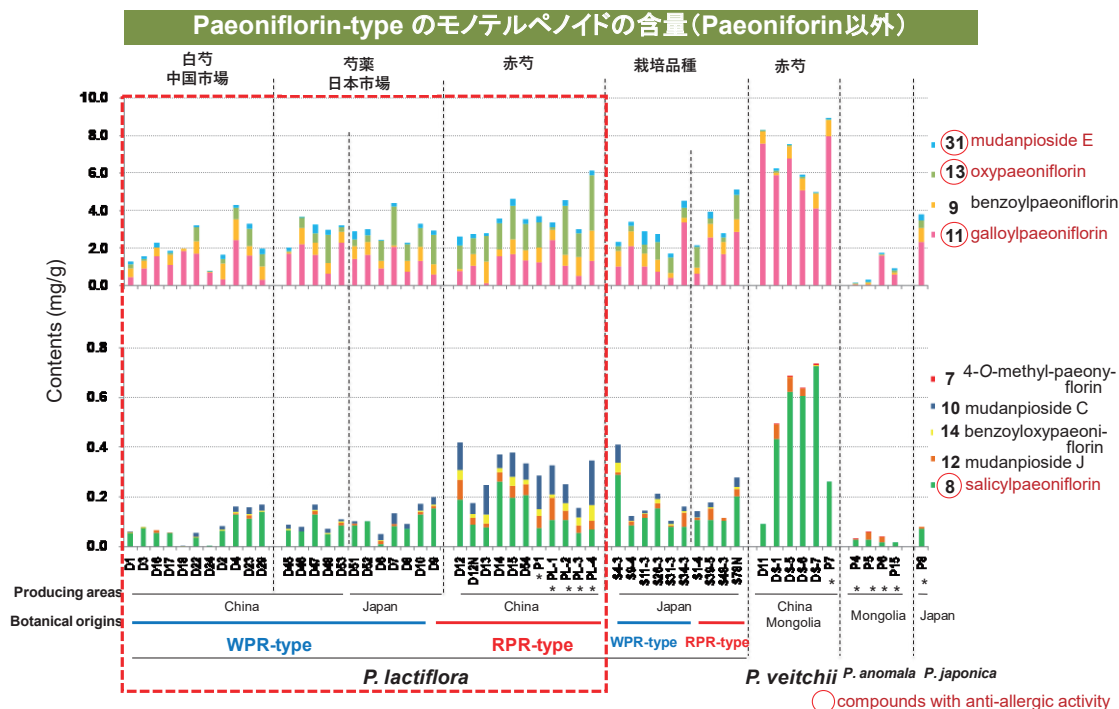


図 5. 芍薬類及びその関連 *Paeonia* 属植物に含まれるモノテルペノイド 15 成分の定量

### 3) 芍薬類及び園芸品種の抗アレルギー作用と活性成分

赤芍，日本産芍薬及び園芸用 17 品種の熱水抽出エキスについて RBL-2H3 細胞を用いて抗原刺激脱顆粒抑制作用を検討した結果，赤芍及び遺伝的に赤芍系に属する 2 品種（A，B）に抗原刺激脱顆粒抑制作用が認められた。赤芍では新規 3 化合物を含むモノテルペノイド 17 化合物，フラボノイド 5 化合物及びその他 7 化合物を単離し，その内 paeoniflorol, salicylpaeoniflorin, galloylpaeoniflorin, PGG 及び MG が<sup>20)</sup>，また品種 B（エジュリスパーバ）では新規ノルネオリグナンの paeonibenzofuran 他，モノテルペノイド，フラボノイド等 25 化合物を単離同定し，その内 mudanpioside E, quercetin とその配糖体がそれぞれ中程度の抗原刺激脱顆粒抑制作用を示すことが明らかになった<sup>21)</sup>。

### 4) 富山ブランド芍薬の開発—園芸品種の選抜と加工調製法の確立

富山県では白芍系の薬用品種「梵天」が栽培されていることから，これとは異なる赤芍系園芸品種で付加価値のあるものを選抜する目的で，先ず PFS が検出された検体を除いて，*Paeonia* 属 4 種と生薬，及び園芸用・薬用品種の 6 成分の定量データを用いて主成分分析を行い，赤芍と同じグループに属する赤芍系品種を 3 品種選抜した。これらの内 2 品種（A，B）に抗アレルギー作用が認められたことから，これらをブランド芍薬候補とした。

次に，*P. lactiflora* の品種について高品質を保つための加工調製法を開発する目的で，様々な貯蔵・加工・乾燥法を検討した。材料として「梵天」，品種 A（春の粧）及び品種 B の栽培 4 年目以降の新鮮な根を用いて，15 通りまたは 8 通りの加工調製法を行い，主要 8 成分の含量の変動を調べた（図 6）。

その結果、新鮮な根を低温貯蔵することにより PF 含量が安定すること、加えて湯通し処理を行うことにより PGG 及び GA (梵天では MG を含む) の含量が顕著に増加することを明らかにした<sup>22)</sup>。さらに PGG の含量は、低温貯蔵した根を湯通し処理したもものでは周皮を付けたまま乾燥した方が周皮を除いてから乾燥したものより、また室温での自然乾燥より 30°C で乾燥した方がやや高い傾向を示した。一方、品種 B に存在した PN は湯通し処理により消失した。AF 含量は周皮を除くことによりわずかに減少する傾向がみられた。CC については低温貯蔵したもものでは加工調製法による含量の変化がほとんど認められなかった。以上の結果から、PF、AF、PGG、GA 及び MG に着目するのであれば、新鮮な根を低温貯蔵し、水洗後湯通しして、周皮を付けたまま 30°C で乾燥する方法が適している。ただし、

PGG ではなく精油成分の PN に着目するのであれば、湯通し処理は避けた方がよい。なお、3 品種の比較では、PF と AF の含量は、品種 B > 品種 A > 梵天の順であり、CC 含量は品種 A > 品種 B > 梵天の順であった。PGG 含量はほぼ同様であったが、梵天には MG が、また品種 B には PN が存在した。以上により選抜した品種の成分特性が明確になった。

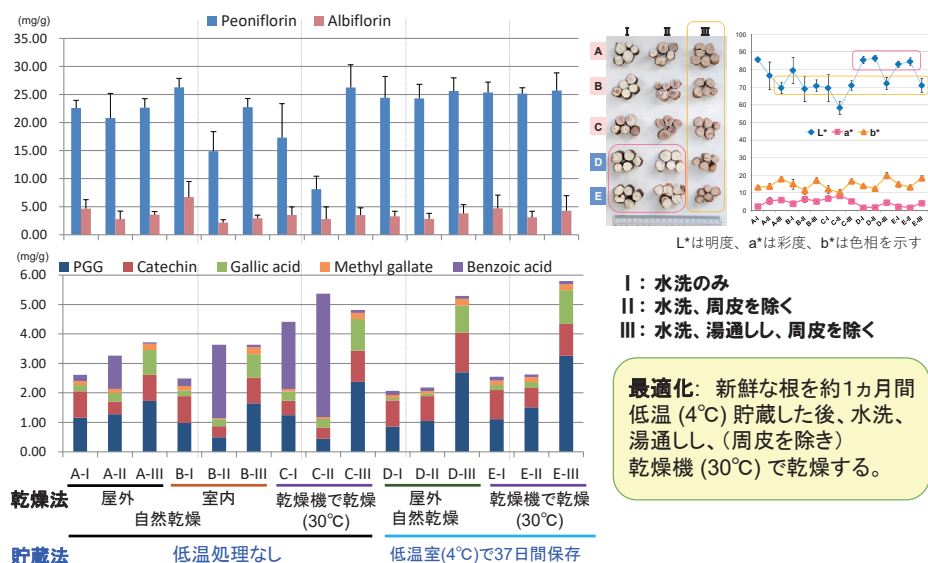


図 6. 15 通りの加工調製法を行った梵天の根の 7 成分の含量

品種 A については上記の加工調製法を某企業に依頼し、日局「シャクヤク」(富山芍薬)に仕上げていただき、それを用いた臨床研究を共同研究者に実施していただいた。富山芍薬含有芍薬甘草湯(富山芍甘)の腓返り及び月経痛に対する効果をそれぞれ対象者を別にして、一般市場品芍薬含有芍薬甘草湯(一般芍甘)と比較したところ、一般芍甘との間に有意差は認められなかったものの、服薬期間における腓返り平均発生回数の有意な減少、また月経痛自覚日数の有意な減少、さらに自覚的有用度では富山芍甘が有用であるとする被験者が多くみられたとのことであった。このように富山芍薬の安全性・有用性が臨床において確かめられたことから、現在富山県では農水部・厚生部の施策のもと、農家での栽培が推進されている。

以上、3 課題で生薬の持続的利用(SDGs)と標準化を志向した多様性解析研究の成果を紹介した。生薬のSDGsに必要なことは、科学的根拠に基づいた多様性の容認である。公定書では医薬品として守らなければならない最低限の基準を提示して生薬の標準化を達成している。この基準は、ある程度の余裕をもって決められているので、きめ細かな医療を実現するためには、個々の生薬の特徴を科学的かつ的確に捉えて、目的に応じた選択を可能とするといった自主規格による標準化が望まれる。標準化と同時

に持続可能性を実現する最良の手段が生薬の資源植物の栽培化である。日本国内で栽培が可能な資源植物はさらに栽培を拡充し、一方国内での栽培が難しい生薬についてはアジア各国での栽培化に協力するといった体制ができることを希望する。また、これを実現する上では生薬とその資源植物の多様性解析研究が必要であり、多くの生薬について行われることを切望する。

## 謝辞

本研究は、朱 妹助教、當銘一文准教授をはじめとする多くの国内共同研究者、学生諸氏、海外共同研究者の努力によって得られた成果であり、ここに厚く感謝申し上げます。また、JSPS科研費JP14406030, JP17406004, JP21406004, JP24406005, JP15H05268及びJP18K06714, 文部科学省地域イノベーションクラスタープログラム「ほくりく健康創造クラスター」広域化プログラム、平成24年度厚労科研費・創薬基盤推進研究事業、平成28年度AMED創薬基盤推進研究事業（JP17ak0101046h0002）、富山県受託研究「和漢薬・バイオテクノロジー研究」、富山大学運営費交付金機能強化費などの助成を受けて行われました。ここに記して感謝の意を表します。

## 引用文献

1. 国家薬典委員会編、『中華人民共和国薬典』, 2020年版 一部, 中国医薬科技出版社, 北京, 2020, p. 156 (防風), 276 (姜黄), 286-287 (莪朮), 76 (片姜黄), 108 (白芍), 165-166 (赤芍).
2. Batsukh Z., Toume K., Javzan B., Kazuma K., Cai S.Q., Hayashi S., Kawahara N., Maruyama T., Komatsu K.: Metabolomic profiling of *Saposhnikovia* Radix from Mongolia by LC-IT-TOF-MS/MS and multivariate statistical analysis. *J. Nat. Med.*, 74: 170-188, 2020.
3. Batsukh Z., Toume K., Javzan B., Kazuma K., Cai S.Q., Hayashi S., Atsumi T., Yoshitomi T., Uchiyama N., Maruyama T., Kawahara N., Komatsu K.: Characterization of metabolites in *Saposhnikovia divaricata* root from Mongolia. *J. Nat. Med.*, 75: 11-27, 2021.
4. 小松かつ子, 喜田智子: ウコン, 薬用 *Curcuma* 属植物及びウコン類生薬, *Foods & food ingredients journal of Japan*, 220: 298-308, 2015.
5. Cao H., Sasaki Y., Fushimi H., Komatsu K.: Molecular analysis of medicinally-used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and *trnK* gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, 24: 1389-1394, 2001.
6. Sasaki Y., Fushimi H., Cao H., Cai S.Q., Komatsu K.: Sequence analysis of Chinese and Japanese *Curcuma* drugs on the 18S rRNA gene and *trnK* gene and the application of amplification-refractory mutation system analysis for their authentication. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1593-1599, 2002.
7. Komatsu K., Sasaki Y., Tanaka K., Kuba Y., Fushimi H., Cai S.Q.: Morphological, genetic and chemical polymorphism of *Curcuma kwangsiensis*. *J. Nat. Med.*, 62: 413-422, 2008.
8. 小松かつ子, 佐々木陽平, 東田千尋, 田中謙, ウコン類生薬の基原と品質, *Foods & food ingredients journal of Japan*, 212: 345-356, 2007.
9. Kita T., Komatsu K., Zhu S., Iida O., Sugimura K., Kawahara N., Taguchi H., Masamura N., Cai S.Q.: Development of intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase for discriminating *Curcuma* species. *Food Chem.*, 194: 1329-1336, 2016.

10. Liu Q.D., Zhu S., Hayashi S., Iida O., Takano A., Miyake K., Sukrong S., Agil M., Balachandra I., Nakamura N., Kawahara N., Komatsu K.: Discrimination of *Curcuma* species from Asia using intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase. *J. Nat. Med.*, 2021.
11. Simon A., Allais D.P., Duroux J.L., Basly J.P., Fontanier S.D., Delage C.: Inhibitory effect of curcuminoids on MCF-7 cell proliferation and structure-activity relationships. *Cancer Lett.*, 129: 111-116, 1998.
12. Yodkeeree S., Chaiwangyen W., Garbisa S., Limtrakul P.: Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin differentially inhibit cancer cell invasion through the down-regulation of MMPs and uPA. *J. Nutrit. Biochem.*, 20: 87-95, 2009.
13. Sandur S.K., Pandey M.K., Sung B., Ahn K.S., Murakami A., Sethi G., Limtrakul P., Badmaev V., Aggarwal B.B.: Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*, 28: 1765-1773, 2007.
14. 厚生労働省編, 『第十八改正日本薬局方』, 東京, 2021, p. 2048 (ボウフウ), 1869-1870 (ウコン), 1892 (ガジュツ), 1956-1957 (シヤクヤク).
15. Sasaki Y., Goto H., Tohda C., Hatanaka F., Shibahara N., Shimada Y., Terasawa K., Komatsu K.: Effects of *Curcuma* drugs on vasomotion in isolated rat aorta. *Biol. Pharm. Bull.*, 26: 1135-1143, 2003.
16. Tohda C., Nakayama N., Hatanaka F., Komatsu K.: Comparison of anti-inflammatory activities of six *Curcuma* rhizomes: a possible curcuminoid-independent pathway mediated by *Curcuma phaeocaulis* extract. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 3: 255-260, 2006.
17. Tanaka K., Kuba Y., Ina A., Watanabe H., Komatsu K.: Prediction of cyclooxygenase inhibitory activity of *Curcuma* Rhizome from chromatograms by multivariate analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, 56: 936-940, 2008.
18. Zhu S., Yu X.L., Wu Y.Q., Shiraishi F., Kawahara N., Komatsu K.: Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*, *J. Nat. Med.*, 69: 35-45, 2015.
19. Shi Y.H., Zhu S., Toume K., Wang Z., Batkhuu J., Komatsu K.: Characterization and quantification of monoterpenoids in different types of peony root and the related *Paeonia* species by liquid chromatography coupled with ion trap and time-of-flight mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 129: 581-592, 2016.
20. Shi Y.H., Zhu S., Ge Y.W., He Y.M., Kazuma K., Wang Z.T., Yoshimatsu K., Komatsu K.: Monoterpene derivatives with anti-allergic activity from red peony root, the root of *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia*, 108: 55-61, 2016.
21. Shi Y.H., Zhu S., Tamura T., Kadowaki M., Wang Z.T., Yoshimatsu K., Komatsu K.: Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora*. *J. Nat. Med.*, 70: 234-240, 2016.
22. Zhu S., Shirakawa A., Shi Y.H., Yu X., Tamura T., Shibahara N., Yoshimatsu K., Komatsu K.: Impact of different post-harvest processing methods on the chemical compositions of peony root. *J. Nat. Med.*, 72: 757-767, 2018.

## 各部門・センターの活動と業績





## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 資源開発分野

Division of Medicinal Resources

## 資源科学領域

Section of Pharmacognosy

教授	小松 かつ子	Prof. Katsuko KOMATSU
准教授	當銘 一文	Assoc. Prof. Kazufumi TOUME
助教	朱 姝	Assist. Prof. Zhu SHU
技術補佐員	バートル ゴルボ	Research Assist. Zolboo BATSUKH (7月～)

## ◆研究目的

本領域では、生薬資源の持続的利用を目指して、アジア産薬用植物の遺伝学的、成分化学的、薬理学的多様性の解析を行い、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、及び栽培薬用植物の選択に応用します。特に高齢者疾患や予防先制医療に応用可能な薬用植物を対象とし、それらを医薬品とするための品質保証の基盤を作るとともに、当該生薬の栽培化を図り国内での生薬生産に結びつける。

## ◆2020年の研究成果、進捗状況及び今後の計画

## 1. アジアにおける資源調査と薬用植物・生薬の多様性の解析

1) ウコン類：アジア9カ国産の *Curcuma* 属 12 種に由来する植物及び生薬についてクルクミノイド生合成酵素遺伝子イントロン長多型 (ILP) 及び葉緑体 *trnK* 遺伝子の塩基配列の解析を行った。ILP パターンは各種固有であり、種内多型がほとんどない種 (*C. aromatica*(JA), *C. zedoaria*(Ze), *C. phaeocaulis*(P), *C. aeruginosa*(Ae), *C. wenyujin*(W), *C. zanthorrhiza*(Za)) と多型性がある種 (*C. longa*(L), *C. kwangsiensis*(K), *C. amada*(Am), *C. manga*(M), *C. comosa*(C)) が認められた。ILP パターンに基づいた樹状図では Pe と C からなるクレード, L のクレード, その他の種からなるクレードに分かれ、後者はさらに 4 サブクレード (JA; Ze, Ae 及び P; W 及び K; Za, Am 及び M) に分かれた。*trnK* 配列には主に 6 タイプがあった。ILPs パターンによる植物分類とウコン類生薬の基原種の同定を可能にし、アジア産 *Curcuma* 属植物の学名の整理に繋がった (論文投稿中)。

2) サラシア：保健機能食品の原料として利用されるアジア産 *Salacia* 属の薬用種 3 種 (*S. chinensis*, *S. reticulata*, *S. oblonga*) について核リボソーム DNA ITS 領域の遺伝子多型を明らかにし、簡便な同定法として制限酵素 *Cac8I* を用いた PCR-RFLP 法を開発した。オンラインストアで入手した「サラシア」などの健康食品 10 点について本法を適用したところ、表示とは異なり全て *S. chinensis* であった。*Salacia* 属の分類並びに同属基原の保健機能食品等のレギュレーションに知見を与えた (Zhu et al, J. Ethnopharmacol. 2021)。

3) 縮砂：漢方薬に配合されるシュクシャについて、東南アジア・中国産生薬の基原の客観的同定法の開発、基原植物各種の植物分類学的関連性の解明及び日本流通生薬の同定と精油成分組成の解明を目的とした。*Amomum* 属 6 分類群について核 DNA の ITS 領域及び葉緑体 DNA の *matK-trnK* 遺伝子の部分領域と *trnH-psbA* Intergenic spacer (IGS) 領域の塩基配列を決定した結果、4 グループ (ミャンマー産 *A. xanthioides*; 中国産 *A. villosum* とその変種; ラオス産 *A. villosum* var. *villosum* と *A. longiligulare*; *A. uliginosum*) に分けられた (Sone et al., J. Nat. Med., 2021)。各グループの特徴的塩基配列を指標としてシュクシャ市場品を同定した後、精油成分を分析した結果、市場品はグループ 1~4 の種が主であり、各種特徴的な成分を含むものの、共通して camphor, bornyl acetate, borneol を主成分とした。本研究により、分類学

的に同種とされている *A. xanthioides* と *A. villosum* var. *xanthioides* が別種であることを示した。

## 2. 国内での薬用植物の栽培拡充を志向した研究

エゾウコギ：培養苗作製から水耕栽培、馴化工程を経た圃場栽培までの方法を確立した。H.26 年水耕栽培後、富山県で圃場栽培し、31 年に 3 県に移動し栽培した株等及び水耕栽培株からそれぞれ葉を採取し、認知機能改善効果が期待されるサポニン 3 成分 (ciwujianosides B, C<sub>3</sub> 及び eleutheroside M) を定量した結果、水耕栽培株及び青森県栽培株の葉で合計含量 100 mg/g 以上の値を示した。高含量を得るための栽培方法、栽培適地、収穫時期などについて知見が得られた。

## 3. ケモメトリックス的手法を活用した和漢薬複合成分のプロファイリング技術の開発

芍薬：基原・産地・加工方法が異なる各種芍薬の成分的差異を見出すことを目的にして、定量 NMR 条件で抽出物のスペクトルを測定し、内標準法によりシグナルの規格化を行い、メタボローム解析を行った。*P. lactiflora* を基原とする日本産芍薬・中国産芍薬と中国産赤芍は明確に区別され、前者には albiflorin, 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose, gallic acid, sucrose, 後者には paeoniflorin などのモノテルペン類が寄与した。また、基原が異なる 2 種の赤芍については、paeoniflorin などのモノテルペン類は *P. lactiflora* を基原とする赤芍に、1,2,3,4,6-pentagalloylglucose や gallic acid は *P. veitchii* を基原とする赤芍の区別に寄与した。HPLC 法による品質評価に比し本法は、生薬成分の網羅的解析を簡便に行えることに利点があった。

## 4. 伝統薬物の活性成分の探索と構造解析

1) コンゴボロロの抗マラリア作用：コンゴボロロ (*Morinda morindoides*) の葉部について抗マラリア作用を指標とした成分探索を行い、新規フェニルプロパノイド縮合型イリドイド 2 種とともに、2 種の関連する既知イリドイドを含む 9 種の既知化合物を単離・構造決定した。このうち、既知イリドイドの molucidin 及び prismatomerin は強い抗マラリア作用を示し (IC<sub>50</sub> 0.96 及び 0.80 μM)、新規化合物 2 種及び pinoresinol は中程度の活性を示した (IC<sub>50</sub> 40.9, 20.6, 24.2 μM)。本研究により、抗マラリア作用を期待して使用されているコンゴボロロ葉部のアフリカでの伝統的な用法の科学的エビデンスを提供した (Hashim et al, J. Nat. Med., in press)。

2) 車前子と蔓荊子の抗アロディニア作用：牛車腎気丸と車前子及び蔓荊子を対象にした探索研究で見出した抗アロディニア作用を持つイリドイド 4 種について、生薬中での含量を調べる目的で LC-MS 法による定量を行った。aucubin についてはイオン化効率の顕著な減弱が認められたため、UV 法で行った。日本市場の蔓荊子 (中国産) 及びその基原の 1 種であるハマゴウ (*Vitex rotundifolia*) の種子について定量した結果、ハマゴウの種子には aucubin が高含量 (1.5-1.8 mg/g) 含まれていたが、蔓荊子では半分以下であった。一方、蔓荊子には pedicularis-lactone, viteoid I, II が含まれていたが、ハマゴウの種子では検出限界以下であった。このことから、中国産蔓荊子の基原植物は別種であることが推察された。また、車前子には aucubin, pedicularis-lactone が含まれていたが、viteoid I, II は検出されなかった。

## ◆原著論文

- 1) Yoshitomi T., Wakana D., Uchiyama N., Tsujimoto T., Kawano N., Yokokura T., Yamamoto Y., Fuchino H., Hakamatsuka T., Komatsu K., Kawahara N., Maruyama T.: Identifying the compounds that can distinguish between Saposchnikovia root and its substitute, *Peucedanum ledebourielloides* root, using LC-HR/MS metabolomics. J. Nat. Med., 74: 550-560, 2020. doi: 10.1007/s11418-020-01409-6.
- 2) Nakamura K., Zhu S., Komatsu K., Hattori M., Iwashima M.: Deglycosylation of isoflavone C-glucoside puerarin by combination of two recombinant bacterial enzymes and 3-oxo-glucose. Appl. Environ. Microbiol., 86(14):e00607-20, 2020. doi: 10.1128/AEM.00607-20.
- 3) Teklemichael A.A., Mizukami S., Toume K., Mosaddeque F., Kamel M.G., Kaneko O., Komatsu K., Karbwang J., Huy N. T., Hirayama K.: Anti-malarial activity of traditional Kampo medicine Coptis Rhizome extract and its major active compounds. Malar. J., 19(1): 204, 2020. doi: 10.1186/s12936-020-03273-x.
- 4) Wang Z.T., Okutsu K., Futagami T., Yoshizaki Y., Tamaki H., Maruyama T., Toume K., Komatsu K., Hashimoto F.: Microbial community structure and chemical constituents in Shinkiku, a fermented crude drug used in Kampo medicine. Front. Nutr., 7: 115, 2020.

doi:10.3389/fnut.2020.00115.

- 5) Meng H. C., Zhu S., Fan Y. H., Ye R., Hattori M., Komatsu K., Ma C. M.: Discovery of prenylated dihydrostilbenes in *Glycyrrhiza uralensis* leaves by UHPLC-MS using neutral loss scan. *Ind. Crops Prod.*, 152: 112557, 2020. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112557.
- 6) Yamaji S., Sato T., Cai S.Q., Komatsu K.: Pharmacognostical Studies of *Salvia* Radicis. Morphological and anatomical characteristics on the underground part of seven *Salvia* species (Lamiaceae). *J. Jpn. Bot.*, 95(4): 220-234, 2020.
- 7) Batsukh Z., Toume K., Javzan B., Kazuma K., Cai S.Q., Hayashi S., Atsumi T., Yoshitomi T., Uchiyama N., Maruyama T., Kawahara N., Komatsu K.: Characterization of metabolites in *Saposhnikovia divaricata* root from Mongolia. *J. Nat. Med.*, 75(1):11-27, 2021. doi: 10.1007/s11418-020-01430-9.
- 8) Yu H.H., Toume K., Kurokawa Y., Andoh T., Komatsu K.: Iridoids isolated from *Vitidis Fructus* inhibit paclitaxel-induced mechanical allodynia in mice. *J. Nat. Med.*, 75(1):48-55, 2021. doi: 10.1007/s11418-020-01441-6.
- 9) Zhu S., Liu Q.D., He J.Y., Nakajima N., Samarakoon S.P., Swe S., Zaw K., Komatsu K.: Genetic identification of medicinally used *Salacia* species by nrDNA ITS sequences and a PCR-RFLP assay for authentication of *Salacia*-related health foods. *J. Ethnopharmacol.*, 274: 113909, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2021.113909.

#### ◆著書

- 1) 小松かつ子. 富山の置き薬. 富山市発行. 鎌倉市: かまくら春秋社; 2021 Mar. 富山の置き薬に使われる生薬 ①熊胆, ②黄連, ③センブリと胡黄連, ④和漢医薬学総合研究所; p.56-57, 60-61, 64-65, 68-69.

#### ◆総説

- 1) 小松かつ子. 生薬を巡る現状と生薬・薬用植物研究の展望, ファルマシア ミニ特集 セミナー, 57(2):89-93, 2021. doi: 10.14894/faruawpsj.57.2\_89.

#### ◆学会報告

(国内学会)

- 1) 合田幸広, 小松かつ子, 伊藤美千穂, 黒川洵子, 堤 康央. 食品の品質保証に関する薬学教育の現状と課題. 日本食品化学学会第 26 回総会・学術大会; 2020 May 28-29; 奈良 (誌上開催).
- 2) 田山雄基, 當銘一文, 水上修作, 小松かつ子, 稲岡健ダニエル, 北 潔, 平山謙二. 生薬を用いたクルーズトリパノソーマに対する新規抗原虫薬の探索研究. 第 89 回日本寄生虫学会大会; 2020 May 30-31; 北海道 (誌上開催).
- 3) 黒川洵子, 合田幸広, 小松かつ子, 伊藤美千穂, 堤 康央. 医薬品・食品の品質保証に関する薬学教育の現状と課題. 第 142 回日本薬理学会関東部会; 2020 Jun 6; 松戸 (オンライン).
- 4) 劉 群棟, 朱 姝, 林 茂樹, 川原信夫, 三宅克典, 高野昭人, Balachandran Indira, Agil Mangestuti, Viswanathan M. V., Sukrong S., 安食菜穂子, 飯田 修, 小松かつ子. Intraspecific polymorphism of *Curcuma longa* and *C. phaeoaulis* using ILP markers in DCS & CURS genes. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).
- 5) Batsukh Zolboo, 當銘一文, Javzan Batkhuu, 数馬恒平, 林 茂樹, 渥美聡孝, 丸山卓郎, 川原信夫, 小松かつ子. Characterization and quantification of metabolites in *Saposhnikovia divaricata* roots from Mongolia. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).
- 6) Yu Huanhuan, 當銘一文, 黒川葉好, 安東嗣修, 小松かつ子. Iridoids showing anti-allodynic activity from *Vitidis Fructus*. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オン

- ライン).
- 7) 山本祥雅, 劉 群棟, 當銘一文, 朱 姝, 安食菜穂子, 河野徳昭, 川原信夫, 小松かつ子. ミャンマー産 *Salacia* 属植物の同定と  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).
  - 8) 小松かつ子, 合田幸広, 黒川洵子, 伊藤美千穂, 堤 康央. 医薬品・食品の品質保証に関する薬学教育の現状と課題. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).
  - 9) 田山雄基, 當銘一文, 水上修作, 小松かつ子, 稲岡健ダニエル, 北 潔, 平山謙二. 生薬を用いたクルーズトリパノソーマに対する新規抗原虫薬の探索研究. 第 37 回和漢医薬学会学術大会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).
  - 10) 董 昱卓, 當銘一文, 朱 姝, 田村 隆幸, 吉松嘉代, 小松かつ子. NMR データに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).
  - 11) ヤスンジャン アシム, 當銘一文, 北見駿典, 水上修作, 葛 躍偉, 谷口真由美, Awet Alem Teklemichael, Nguyen Tien Huy, Vangu Kilukidi Blaise Van, José Nzunzu Lami, Joseph M. Bodi, 平山謙二, 小松かつ子. 抗マラリア薬開発を指向したコンゴボロロの成分探索. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).
  - 12) 新屋和花, 徳本廣子, 林 茂樹, 安食菜穂子, 高浦佳代子, 袴塚高志, 丸山卓郎, 森田洋行, 川原信夫, 小松かつ子, 高橋京子, 木内文之. インドジャボクの鏡検による鑑別. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).
  - 13) 曾根美佳子, 朱 姝, 成 暁, Ketphanh Sounthone, Swe Swe, Zaw Khin, 河野徳昭, 川原信夫, 小松かつ子. 生薬シュクシャの基原植物の遺伝的多様性の解明. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).

#### ◆その他

- 1) 小松かつ子. 歴史秘話ヒストリア#386「富山の薬売り 知恵とまごころの商売道」NHK 総合 (番組出演) 2020 May 27.
- 2) 小松かつ子. 越中とやま SP「富山の薬売り 300 年の秘話」NHK 富山 (番組出演) 2020 Jun 5.
- 3) 小松かつ子. 「和漢薬を健康に活かす」NPO 法人富山のくすし, 令和 2 年度漢方医学と生薬講座 (第 2 回) 2020 Jul 4.
- 4) 小松かつ子. 富山大学 WEB オープンキャンパス 2020「和漢医薬学総合研究所」. 2020 Aug 4-16.
- 5) 當銘一文. 「くすり・毒になる天然の成分」令和 2 年度富山市民大学「生活医学薬学を学ぶ」(富山市教育委員会市民学習センター) 2020 Sep 4.
- 6) 小松かつ子. 「世界の民族薬物 和漢医薬学総合研究所附属民族薬物資料館の紹介」富山大学サマースクール〈創薬・製剤コース〉2020 on WEB. 2020 Sep 7-26.
- 7) Katsuko Komatsu. 「Quality Evaluation of Crude drugs (Herbal Drugs)」講義と質疑応答, PMDA-ATC Quality Control (Herbal Medicine) Webinar 2020 ((独) 医薬品医療機器総合機構アジア医薬品・医療機器トレーニングセンター) 2020 Sep 9.
- 8) 小松かつ子. 「富山の歴史と大地に学ぶ」富山・水・文化の財団 30 周年記念対談番組, 富山テレビ放送 (番組出演) 2020 Oct 3.
- 9) 小松かつ子. 野外で薬草を観察する会, 富山県薬事総合研究開発センター. 2020 Oct 4.
- 10) 小松かつ子. 「和漢薬を健康に活かす」令和 2 年度富山市民大学「生活医学薬学を学ぶ」(富山市教育委員会市民学習センター) 2020 Oct 30.
- 11) 小松かつ子. 富山大学杉谷キャンパス 高大連携企画 かけがえのない「いのち」を守る座談会. 2020 Nov 8.
- 12) 當銘一文. 「くすり・毒になる天然の成分」NPO 法人富山のくすし, 令和 2 年度漢方医学と生薬講座 (第 7 回) 2020 Dec 5.

◆受賞

- 1) 當銘一文, 小松かつ子: 令和元年度日本生薬学会 JNM・生薬学雑誌 論文賞「Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen, a crude drug ingredient of Kampo formula "Goshajinkigan"」2020 Sep.
- 2) 董 昱卓: 日本薬学会第 141 年会学生優秀発表賞 (ポスター発表の部) 「NMR データに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析」2021 Mar.

◆共同研究

(海外)

- 1) 蔡 少青 (中国・北京大学薬学院): 中国の薬用植物資源と生薬の標準化に関する研究, 2018～
- 2) Dr. Khin Zaw (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～

(国内)

- 1) 丸山卓郎, 袴塚高志, 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): 薬用植物種苗供給の実装化を指向した開発研究, 2018～
- 4) 田村隆幸 (富山県薬用植物指導センター): 早期生薬生産・成分評価システムの構築, 2018～
- 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) 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～
- 8) 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～
- 9) 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): 麹菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立, 2017～
- 10) 丸山卓郎 (国立医薬品食品衛生研究所): 高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析, 2019～
- 11) 高野昭人 (昭和薬科大学), 三宅克典 (東京薬科大学): 日本薬局方収載生薬の基原植物の学名に関する課題の検討, 2018～

(学内)

- 1) 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～
- 2) 東田千尋 (和漢医薬学総合研究所): 高齢者疾患を制する和漢薬研究: 製品化に向けた臨床研究と品質研究, 2020～
- 3) 早川芳弘 (和漢医薬学総合研究所): 抗腫瘍エフェクター細胞の機能に作用する生薬成分の探索, 2019～
- 4) 久米利明 (大学院医学薬学研究部): 生体内抗酸化酵素を誘導する生薬成分に関する研究, 2019～

#### ◆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(C)（第3年度）（代表：小松かつ子，分担：當銘一文，朱 妹）「グローバル社会に対応した医薬品・食品素材「ウコン属生薬」の多様性解析による標準化」
- 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）「和漢薬複合成分の精密プロファイリング技術の確立」
- 3) 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：朱 妹）「遺伝子解析を活用したサラシアの資源探索：中国産 *Salacia* 属の多様性解析」
- 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：小松かつ子，朱 妹，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，協力：當銘一文，朱 妹）：「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30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「薬用植物種苗供給の実装化を指向した開発研究」（分担：小松かつ子，協力：當銘一文，朱 妹）：「早期生薬生産・成分評価システムの構築」
- 7) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団令和元年度「日本薬局方の試験法等に関する研究」（分担：小松かつ子）：「日本薬局方収載生薬の基原植物の学名に関する課題の検討」
- 8) 第8回（令和元年度）公益財団法人小林財団 研究助成（代表：當銘一文，分担：小松かつ子，朱 妹）「単味生薬製剤の開発を指向した有用生薬からの活性成分探索とその定量分析法の確立」
- 9) 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 妹）「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
- 10) 令和2年度和漢医薬学総合研究所公募型共同研究，特定研究（総括：小松かつ子，分担：當銘一文，朱 妹）「高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析」
- 11) 富山県受託研究「アカデミア創薬支援事業（アンメットメディカルニーズ創薬・製剤研究）」（分担：小松かつ子，當銘一文，朱 妹）「高齢者疾患を制する和漢薬研究：製品化に向けた臨床研究と品質研究」
- 12) 令和2年度（第37回）公益財団法人富山第一銀行奨学財団 研究活動に対する助成（代表：當銘一文）「NMR メタボローム技術を応用した芍薬成分の成分プロファイリング，品質評価」

#### ◆研究室在籍者

学部3年生：木本花音，堀田知里

学部4年生：小菅智正

大学院修士1年：川崎亮平

大学院修士2年：山本祥雅，北見駿典

大学院博士1年：董 昱卓（10月入学）

大学院博士3年：Yasinjan Hashim（10月入学），劉 群棟（10月入学），今井美佳子，喻 歆歆（9/30まで）

客員研究員：Zolboo Batsukh（6/30まで）

研究支援員：福田寛美

協力研究員：高橋京子（大阪大学，2020,5/1～2021,3/31），中村賢一（鈴鹿医療科学大学，2020,4/1～2021,3/31），嶋舞（同志社女子大学，2020,11/1～2021,3/31）

◆学位（修士，博士）取得者

修士論文

董 昱卓：NMR データに基づく芍薬の成分プロファイリングと多変量解析

北見駿典：桂皮の成分的多様性の解析による品質評価

山本祥雅： $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を指標としたミャンマー産 *Salacia* 属植物の有用性評価

博士論文

喻 歡歡：Iridoids showing anti-allodynic activity from *Plantaginis Semen* and *Viticis Fructus*

（車前子及び蔓荊子からの抗アロディニア作用を持つイリドイドに関する研究）

Zolboo BATSUKH：Characterization of metabolites in Mongolian *Saposhnikovia divaricata* roots by means of various analytical methods（モンゴル産ボウフウ根の各種機器分析による成分化学的解析）





## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 資源開発分野

Division of Medicinal Resources

## 天然物創薬学領域

Section of Natural Products &amp; Drug Discovery

## 【天然物化学ユニット】

教授	森田 洋行	Prof. Hiroyuki Morita
助 教	ウォン チン ピアウ	Assist. Prof. Wong Chin Piow (～5月)
助 教	児玉 猛	Assist. Prof. Takeshi Kodama
助 教	中嶋 優	Assist. Prof. Yu Nakashima (1月～)
研究員	ネット ネット ウィン	Postdoctoral Fellow Nwet Nwet Win

## 【天然薬物開発ユニット】

准教授	スレス アワレ	Assoc. Prof. Suresh Awale
研究員	キム ミンジョ	Postdoctoral Fellow Kim Minjo
研究員	アシュラフ モハムド オマル	Postdoctoral Fellow Ashraf Mohammed Omar (10月～)
研究員	チェン ジョアー	Postdoctoral Fellow Chen Zhuoer (10月～)

## ◆研究目的

2つの研究ユニットがそれぞれの視点に基づき、和漢薬をはじめとする世界の天然資源から有用天然物を探索し、医薬品等開発シードを世に提供することを主たる目的とする。さらに、それぞれのユニットが異なった研究手法を用いて、さらなる有用化合物の開発と作用機序の解明を図る。

## 天然物化学ユニット

- ・ 天然有機化合物の生合成経路の解明
- ・ 二次代謝酵素の立体構造基盤の確立
- ・ 新規医薬品開発を目指した酵素機能の改変
- ・ 植物、微生物、海洋生物からの生理活性物質の探索
- ・ アジアにおける未利用薬用資源の探索

## 天然薬物開発ユニット

- ・ ヒト膵臓がん細胞（例、PANC-1, MIA Paca2, KLM-1, NOR-P1, Capan-1, PSN-1など）を利用して、がん細胞の栄養飢餓耐性を標的とした (antiausterity strategy), 各地の伝統生薬（漢方生薬, アユルヴェーダ生薬など）の抗がん活性のスクリーニング
- ・ 活性を指標にして最先端のクロマトグラフ及び分光分析 (NMR, MS, UV, IR, CD など) 技術を活用し, 成分を分離・精製ならびに同定による天然薬物資源から栄養飢餓耐性を解除する活性物質 (antiausterity agent) の探索。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行う
- ・ 活性天然化合物の構造活性相関研究ならびに栄養飢餓耐性を解除する機序の解明
- ・ Orbitrap-MS および FT-NMR 手法の活用による, 活性物質 (antiausterity agent) の膵臓がん細胞の代謝に対する影響の解析

## ◆2020 年度研究概要

### 天然物化学ユニット

#### 1. トウゲシバ由来Ⅲ型ポリケタイド合成酵素の機能の解析

トランスクリプトーム解析において見いだされたトウゲシバ *Huperzia serrata* 由来新規Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) にマロニル CoA を基質として作用させると、トロパンアルカロイドの生合成に見られるように、3-オキシグルタル酸を生産することを明らかにした。さらに、本酵素反応系に  $\Delta^1$  ピペリジンをマロニル CoA とともに加えると、リコポジウムアルカロイドの生合成中間体と考えられるペレチエリンを生産することを示した。今後、トランスクリプトーム解析において、本Ⅲ型 PKS との関連が示唆された他の生合成酵素について機能解析を行うことで、リコポジウムアルカロイドの生合成の解明を目指す。

#### 2. 院内感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* に有効な抗菌活性化合物の探索

*S. maltophilia* は、一般の細菌とは異なり、UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu が SmltD によって結合した後に、その L-Glu が SmltE によってエピメリ化することでペプチドグリカンを生合成する。ミャンマーにて採集したミソハギ科植物の *Woodfordia fruticosa* の花から得たメタノール抽出液が、SmltD に対して阻害活性を示すことを明らかにした。さらに、本抽出液から活性を指標にして化合物を単離・精製することで、SmltD に対して阻害活性を示す 3 種のフラボノール配糖体、ケンフェロール 3-O-(6"-ガロイル)- $\beta$ -D-グルコピラノシド (**1**)、ケンフェロール 3- $\beta$ -D-グルコピラノシド (**2**)、及びケンフェロール 3-O- $\alpha$ -L-アラビノピラノシド (**3**) を得、単離した化合物の中で、ガロイル基を有する **1** が最も強い阻害活性を示すことを明らかにした。今後、これらの化合物と SmltD の複合体 X 線結晶構造解析を行うことで、それらの阻害様式を解明し、それらの情報をもとにより強い活性を有する化合物の創出を目指す。

### 天然薬物開発ユニット

During the fiscal Year 2020, Natural Drug Discovery Laboratory has extensively focused on the discovery of anti-austerity agents from medicinal plants of wide different origins, clarification of the molecular mechanism, and *in vivo* evaluation of selected agents. Aside from that, this laboratory has achieved broader international collaboration in anticancer drug discovery and development, and have published 19 research papers in collaboration with the University of Würzburg (Germany), University of Innsbruck (Austria), University of Bath (England), National Chiayi University (Taiwan), Vietnam National University (Ho Chi Minh, Vietnam) and National Institute of Technology (India). Briefly, the research activities can be summarized as follows.

1. Phytochemical investigation of eight selected plant extracts (*Anneslea fragrans*, *Callistemon citrinus*, *Calotropis gigantean*, *Ferula hezarlalehzarica*, *Ancistrocladus abbreviatus*, *Boesenbergia pandurata*, *Sedum sarmentosum*, and *Kaempferia parviflora*) resulted in the isolation of 121 compounds, including 38 new compounds. Among these, the newly discovered compounds, callistrilones L–O represents structurally unique meroterpenoids isolated from *Callistemon citrinus*. These compounds showed unprecedented anti-austerity activities with a PC<sub>50</sub> value at the nanomolar range. These compounds were found to inhibit the migration of PANC-1 human pancreatic cancer cells and colony formation. Mechanistically, these compounds were found to inhibit the Akt/mTOR and autophagy activation pathway.
2. From Thai *Anneslea fragrans*, a first member of an entirely new class of compounds comprising a unique 45 carbon skeleton having six stereocenters, including two unprecedented spiro-chiral centers, named fragranol A have been discovered. Similarly, first natural seco-type naphthylisoquinoline alkaloids, named Ancistrosecolines A–F, from African *Ancistrocladus abbreviatus* were discovered.
3. 富山くすりコンソーシアム Project: We evaluated over 200 synthetic compounds (T-Series, N-Series) for their anti-austerity activity against human pancreatic cancer cells. Selected compounds have been investigated for their mode of action against PI3K/Akt/mTOR/Autophagy, AMPK-ULK1 pathways, including its activity against cancer stem cell markers (SOX-2, cMYC, OCT-4). *In vivo* evaluation of selected investigational drugs including those for “Goboshi” extract against MIA PaCa-2 CDX model have been completed.

**Future direction:** Natural Drug Discovery Laboratory will continue to expand the international collaboration and explore new natural anticancer agents, investigate the effect of newly discovered compounds against cancer cell metabolism using Orbitrap-MS and ZipChip technology, continue research under 富山くすりコンソーシアム project for the drug development against pancreatic cancer, and thus contributing better health to the global human society.

◆原著論文

【天然物化学ユニット】

- 1) Prema, Kodama T., Wong C.P., El-Desoky A.H., Nyunt H.H.W., Ngwe H., Abe I., Morita H. : Anti-Vpr activities of homodrimane sesquiterpenoids and labdane diterpenoids from *Globba sherwoodiana* rhizomes. *Fitoterapia*, 146: 104705, 2020. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104705.
- 2) Ki D.W., Kodama T., El-Desoky A.H., Wong C.P., Nguyen H.M., Do K.M., Thai Q.M., Ton Nu L.H., Morita H.: Chemical Constituents of the Vietnamese Marine Sponge *Gelliodes* sp. and Their Cytotoxic Activities. *Chem. Biodivers.*, 17(9): e2000303, 2020. doi: 10.1002/cbdv.202000303.
- 3) Prema, Wong C.P., Kodama T., Nugroho A.E., El-Desoky A.H., Awouafack M.D., Win Y.Y., Ngwe H., Abe I., Morita Hiroshi, Morita Hiroyuki: Three new quassinoids isolated from the wood of *Picrasma javanica* and their anti-Vpr activities. *J. Nat. Med.*, 74(3): 571–578, 2020. doi: 10.1007/s11418-020-01411-y.
- 4) Ho D.V., Hoang H.N.T., Vo H.Q., Nguyen K.V., Pham T.V., Le A.T., Van Phan K., Nguyen H.M., Morita H., Nguyen H.T.: Three new steroidal saponins from *Aspidistra letreae* plants and their cytotoxic activities. *J. Nat. Med.*, 74(3): 591–598, 2020. doi: 10.1007/s11418-020-01395-9.
- 5) Nguyen K.V., Ho D.V., Nguyen H.M., Do T.T., Van Phan K., Morita H., Heinämäki J., Raal A., Nguyen H.T.: Chiro-inositol derivatives from *Chisocheton paniculatus* showing cytotoxic activity and inhibition of NO production. *J. Nat. Prod.*, 83: 1201-1206, 2020. doi: doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01239.
- 6) Nguyen H.M., Nguyen H.T., Win N.N., Wong C.P., Huynh K.L.V., Hoang N.N., Do K.M., Nguyen H.T., Ho D.V., Nguyen M.D., Morita H.: Antimelanogenic activity of ocotillol-type saponins from *Panax vietnamensis*. *Chem. Biodivers.*, 17(5):e2000037, 2020. doi: doi.org/10.1002/cbdv.202000037.
- 7) Ki D.W., El-Desoky A.H., Kodama T., Wong C.P., Ghani M.A., El-Beih A.A., Mizuguchi M., Morita H.: New cytotoxic polyacetylene amides from the Egyptian marine sponge *Siphonochalina siphonella*. *Fitoterapia*, 142: 104511, 2020. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104511.
- 8) Shalabi A.A., El Halawany A.M., Choucry M.A., El-Sakhawy F.S., Morita H., Ki D.W., Abdel-Sattar E.: New pregnane glycosides from *Caralluma hexagona* Lavranos and their in vitro  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory effects. *Phytochem. Lett.*, 36: 49-57, 2020. doi: doi.org/10.1016/j.phytol.2020.01.015.
- 9) Wang J., Zhang Z.K., Jiang F.F., Qi B.W., Ding N., Hnin S.Y.Y., Liu X., Li J., Wang X.H., Tu P.F., Abe I., Morita H., Shi S.P.: Deciphering the Biosynthetic Mechanism of Pelletierine in *Lycopodium* Alkaloid Biosynthesis. *Org. Lett.*, 22(21):8725-8729, 2020. doi: 10.1021/acs.orglett.0c03339.
- 10) Lee Y.E., Kodama T., Win N.N., Ki D.W., Hoang N.N., Wong C.P., Lae K.Z.W., Ngwe H., Dairi T., Morita H.: Flavonoids from *Woodfordia fruticosa* as potential SmltD inhibitors in the alternative biosynthetic pathway of peptidoglycan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 36:127787, 2021. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.127787.
- 11) Win N.N., Kodama T., Htoo Z.P., Hnin S.Y.Y., Ngwe H., Abe I., Morita H.: Shanpanootols A-F, diterpenoids from *Kaempferia pulchra* rhizomes collected in Myanmar and their Vpr inhibitory activities. *Fitoterapia*, in press. doi: 10.1016/j.fitote.2021.104870.

【天然薬物開発ユニット】

- 1) Omar A.M., Sun S., Kim M.J., Tawila A.M., Dibwe D.F., Phrutivorapongkul A., Toyooka N., Awale S.: Highly oxygenated spiro-biflavanoids from *Anneslea fragrans* twigs. *Phytochem. Lett.*, 40: 21-25, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.09.005>.
- 2) Fathy M., Sun S., Zhao Q.L., Abdel-Aziz M., Abu-Rahma G.E.A., Awale S., Nikaido T.: A New Ciprofloxacin-derivative Inhibits Proliferation and Suppresses the Migration Ability of HeLa Cells. *Anticancer Res.*, 40(9):5025-5033, 2020. doi:10.21873/anticancer.14505.
- 3) Tawila A.M., Sun S., Kim M.J., Omar A.M., Dibwe D.F., Awale S.: A Triterpene Lactone from *Callistemon citrinus* Inhibits the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cells Viability through Suppression of Unfolded Protein Response. *Chem. Biodivers.*, e2000495, 2020. doi: 10.1002/cbdv.202000495.
- 4) Chen H.C., Awale S., Wu C.P., Lee H.H., Wu H.T.: Co-cultured bone marrow mesenchymal stem cells repair thioacetamide-induced hepatocyte damage. *Cell. Biol. Int.*, 44(12):2459-2472, 2020. doi: 10.1002/cbin.11453.
- 5) Balakrishnan N., Haribabu J., Dhanabalan A.K., Swaminathan S., Sun S., Dibwe D.F., Bhuvanesh N., Awale S., Karvembu R.: Thiosemicarbazone(s)-anchored water soluble mono- and bimetallic Cu(ii) complexes: enzyme-like activities, biomolecular interactions, anticancer property and real-time live cytotoxicity. *Dalton Trans.*, 49(27):9411-9424, 2020. doi: 10.1039/d0dt01309a.
- 6) Tawila A.M., Sun S., Kim M.J., Omar A.M., Dibwe D.F., Ueda J.Y., Toyooka N., Awale S.: Highly Potent Antiausterity Agents from *Callistemon citrinus* and Their Mechanism of Action against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J. Nat. Prod.*, 83(7):2221-2232, 2020. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00330.
- 7) Nguyen M.T.T., Nguyen K.D.H., Dang P.H., Nguyen H.X., Awale S., Nguyen N.T.: A new cytotoxic cardenolide from the roots of *Calotropis gigantean*. *Nat. Prod. Res.*, 1-6, 2020. doi: 10.1080/14786419.2020.1781114.
- 8) Tawila A.M., Sun S., Kim M.J., Omar A.M., Dibwe D.F., Ueda J.Y., Toyooka N., Awale S.: Chemical constituents of *Callistemon citrinus* from Egypt and their antiausterity activity against PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30(16):127352, 2020. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127352.
- 9) Omar A.M., Dibwe D.F., Sun S., Tawila A.M., Kim M.J., Phrutivorapongkul A., Toyooka N., Awale S.: Fragranone C: a new dihydrochalcone glucopyranoside from *Anneslea fragrans* twigs. *Nat. Prod. Res.*, 1-6, 2020. doi:10.1080/14786419.2020.1747459.
- 10) Alilou M., Dibwe D.F., Schwaiger S., Khodami M., Troppmair J., Awale S., Stuppner H.: Antiausterity Activity of Secondary Metabolites from the Roots of *Ferula hezarlalehzarica* against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line. *J. Nat. Prod.*, 83(4):1099-1106, 2020. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01109.
- 11) Fayez S., Bruhn T., Feineis D., Assi L.A., Awale S., Bringmann G.: Ancistrosecolines A-F, Unprecedented *seco*-Naphthylisoquinoline Alkaloids from the Roots of *Ancistrocladus abbreviatus*, with Apoptosis-Inducing Potential against HeLa Cancer Cells. *J. Nat. Prod.*, 83(4):1139-1151, 2020. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01168.
- 12) Kohyama A., Yokoyama R., Dibwe D.F., El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Awale S., Matsuya Y.: Synthesis of guggulsterone derivatives as potential anti-austerity agents against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30(7):126964, 2020. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.126964.
- 13) Nguyen M.T.T., Nguyen H.X., Le T.H., Do T.N.V., Dang P.H., Pham T.V., Giang T.T.M., Sun S., Kim M.J., Tawila A.M., Omar A.M., Awale S., Nguyen N.T.: A new flavanone derivative from the rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Nat. Prod. Res.*, 1-7, 2020. doi:10.1080/14786419.2020.1837822.
- 14) Doan D.X., Sun S., Omar A.M., Nguyen D.T., Hoang A.L.T., Fujiwara H., Matsumoto K., Pham

- H.T.N., Awale S.: Chemical constituents and absolute configuration of megastigmanes' isolated from *Sedum sarmentosum* Bunge. Nat. Prod. Res., 1-8, 2020.  
doi: 10.1080/14786419.2020.1834549.
- 15) Dang P.H., Dao T.H.X., Le V.T., Nguyen C.M., Ly T.T., Nguyen H.X., Le T.H., Do T.N.V., Nguyen M.T.T., Sun S., Awale S., Nguyen N.T.: Synthesis of Alkyl Triphenylphosphonium Ostruthin Derivatives as Potential Cytotoxic Candidates. ChemistrySelect, 5: 12636–12640, 2020.  
doi: 10.1002/slct.202003152.
- 16) Omar A.M., Sun S., Kim M.J., Tawila A.M., Dibwe D.F., Phrutivorapongkul A., Toyooka, N., Awale, S.: Fragranol A: A new class of spiro-triflavanoid hybrid with an unprecedented carbon skeleton from *Anneslea fragrans*. Tetrahedron Lett., 61: 152099, 2020.  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.152099>.
- 17) Nguyen M.T.T., Nguyen H.X., Dang P.H., Le T.H., Do T.N.V., Omar A.M., Awale S., Nguyen N.T.: Panduratin Q-Y, dimeric metabolites from *Boesenbergia rotunda* and their antiausterity activities against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. Phytochemistry, 183:112646, 2021. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112646.
- 18) Fayez S., Cacciatore A., Sun S., Kim M., Aké Assi L., Feineis D., Awale S., Bringmann G.: Ancistrobrevindines A-C and related naphthylisoquinoline alkaloids with cytotoxic activities against HeLa and pancreatic cancer cells, from the liana *Ancistrocladus abbreviatus*. Bioorg. Med. Chem., 30:115950, 2021. doi:10.1016/j.bmc.2020.115950.
- 19) Sun S., Kim M.J., Dibwe D.F., Omar A.M., Athikomkulchai S., Phrutivorapongkul A., Okada T., Tsuge K., Toyooka N., Awale S.: Anti-Austerity Activity of Thai Medicinal Plants: Chemical Constituents and Anti-Pancreatic Cancer Activities of *Kaempferia parviflora*. Plants (Basel), 10(2):229, 2021. doi:10.3390/plants10020229.

#### ◆著書

##### 【天然物化学ユニット】

- 1) Awoufack M.D., Wong C.P., Tane P., Morita H. “Prenylated flavonoids in Food” In *Handbook of Dietary Phytochemicals*, Springer, Singapore. Xiao J., Sarker S., Asakawa Y. (eds). pp. 1–23 (2020) DOI: [org/10.1007/978-981-13-1745-3\\_12-1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1745-3_12-1).
- 2) Wong C.P., Morita H. Bacterial Type III Polyketide Synthases. *Comprehensive Natural Products Chemistry III: Chemistry and Biology*, Vol. 1, Elsevier, eds, H. -W. Liu & B. Tadhg, pp. 250–265 (2020)

#### ◆学会報告

##### 【天然物化学ユニット】

(国内学会)

- 1) 綿貫智也, 針原智美, 宮崎優佳, Win Nwet Nwet, 森田洋行, 加藤敦. スダチ (*Citrus sudachi*) の果皮に含まれるセラミダーゼ阻害成分について. 第 37 回和漢医薬学会学術大会 ; 2020, 8,29-30; 広島 (オンライン).

##### 【天然薬物開発ユニット】

(国内学会)

- 1) Sijia Sun, Mio Aoike, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Ahmed M. Tawila, Sirivan Athikomkulchai, Suresh Awale. Panduratin A: a potential anti-austerity agent against PANC-1 human pancreatic cancer cell line. 日本薬学会第 141 年会 ; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).

#### ◆その他

##### 【天然薬物開発ユニット】

ニュース

- 1) La flor tropical ofrece una nueva ruta potencial para tratar el cáncer de páncreas.

<https://saludyoncologia.com/tipos-cancer/cancer-de-pancreas/la-flor-tropical-ofrece-una-nueva-ruta-potencial-para-tratar-el-cancer-de-pancreas>. Spain, Jul 11, 2020.

#### ◆共同研究

##### 【天然物化学ユニット】

(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, 2016～
- 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, 2016～
- 3) Dan Hu (中国・暨南大学薬学部) : メチル基転移酵素の結晶構造解析と機能同定, 2019～
- 4) 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, 2019～
- 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, 2016～
- 6) Bui Thi Buu Hue (ベトナム・カントー大学自然化学部) : 細胞毒性を有する新規アルカロイドの合成, 2019～

(国内)

- 1) 大利 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, 2017～
- 2) 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, 2018～
- 3) 荒川賢治 (広島大学大学院先端物質科学研究科) : 新規マクロライド環化酵素の触媒機構の解析, 2019～

(学内)

- 1) 田浦太志 (薬学部) : 大麻カンナビノイド生合成の改変, 2018～

##### 【天然薬物開発ユニット】

(海外)

- 1) Prof. Gerhard Bringmann (Institut fuer Organische Chemie, Universitat Wuerzburg, Germany) : Discovery of potential natural anticancer agents, 2016～
- 2) Prof. Heiko Ihmels (Universitaet Siegen, Germany): Synthesis of naphthylisoquinoline alkaloids as potential anticancer agent against pancreatic cancer, 2020～
- 3) Prof. Hermann Stuppner (Institute of Pharmacy/Pharmacognosy, University of Innsbruck, Austria): Discovery of novel secondary metabolites from higher plants with anticancer activities, 2017～
- 4) Prof. Simon Lewis (Department of Chemistry, University of Bath, United Kingdom): Synthesis of grandifloracin analogues as the potential anticancer agents, 2017～
- 5) 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～
- 6) 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～
- 7) 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～
- 8) 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～
- 9) 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～
- 10) Prof. Jakob Magolan (Department of Chemistry, University of Idaho, USA (Current affiliation, Chemistry & Chemical Biology, McMaster University)): Synthesis of coumarin derivatives as

antiausterity agents, 2012, 4～

- 11) Prof. Mark Coster (Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University, Australia): Total synthesis of antiausterity agents, 2015, 10～
- 12) 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～
- 13) Prof. Yu-Jang Li (Department of Applied Chemistry, National Chiayi University, Taiwan): Synthesis of antiausterity strategy based anticancer agents, 2015, 9～

(国内)

- 1) 上田純也 (広島国際大学薬学部) : 天然物由来 antiausterity 化合物の検索, 2015～

(学内)

- 1) 藤井 努 (医学部), 奥村知之 (附属病院) : 選択した化合物の抗膵臓癌活性に関する研究, 2018～
- 2) 豊岡尚樹 (工学部・生命工学科) : 天然物から着想を得た抗がん剤の合成, 2016～
- 3) 渡辺志朗 (和漢医薬学総合研究所) : エゴマ葉の成分分析とその新に関する研究その新規活用法, 2016～
- 4) 松谷裕二 (薬学部) : 合成 Guggulsterone 誘導体の antiausterity 評価, 2018～
- 5) 田浦太志 (薬学部) : 生合成された CBGA 誘導体の抗膵臓癌活性, 2020～
- 6) 高崎一朗 (工学部・生命工学科) : NR4a1 拮抗薬の antiausterity 活性に関する研究, 2018～

#### ◆研究費取得状況

【天然物化学ユニット】

- 1) 新学術領域 (研究領域提案型) (代表: 森田洋行) 「ポリケチド閉環酵素とバイヤービリガー酵素の機能改変と新規化合物の創出」
- 2) 若手研究 (代表: ウォン チン ピアウ) 「酸性雲霧林及びアルカリ性湖微生物からの新規シデロフォアの探索と生合成の解明」
- 3) 基盤研究 (C) (代表: Nwet Nwet Win) 「ヘム結合依存的二量化蛋白質PGRM1の阻害アッセイ系の開発と天然阻害剤の探索」
- 4) 若手研究 (代表: 児玉猛) 「沈香芳香成分フェニルクロモンの骨格形成酵素の精密機能解析と機能の拡張」
- 5) 研究活動スタートアップ支援 (代表: Nwet Nwet Win) 「ミャンマー産植物と海綿からの HIV 多機能性タンパク質阻害活性物質の探索」

【天然薬物開発ユニット】

- 1) 2020 富山くすりコンソーシアム (代表: Suresh Awale) 「Development of novel antiausterity chemotherapy for pancreatic cancer」
- 2) 2020 Kobayashi International Scholarship Foundation (代表: Suresh Awale) 「アジア伝統薬用植物から膵臓がん細胞の栄養飢餓耐性を解除する天然抗がん化合物の探索」

#### ◆研究室在籍者

【天然物化学ユニット】

学部 5 年生: 三宅弘士

大学院修士 2 年: Hoang Nam Nhat (10 月入学)

大学院修士 2 年: 邊 輝庸

大学院修士 2 年: Battengel Nomin-Erdene (9 月修了)

大学院修士 2 年: 陳 昕蕊 (9 月修了)

大学院博士 1 年: Kiep Minh Do

大学院博士1年：高 準徽  
大学院博士1年：劉 倩倩（9月退学）  
大学院博士2年：Yuan-E Lee  
大学院博士2年：Sherif Ahmed Muhammed Ahmed Hamdy  
大学院博士3年：Prema  
大学院博士3年：奇 大源（9月修了）  
外国人客員研究員：Battsengel Nomin-Erdene（10月～1月）  
研究生：韓 嘯傑（8月～3月）  
研究生：Saw Yu Yu Hnin（10月～3月）  
研究生：Zin Paing Htoo（12月～3月）

【天然薬物開発ユニット】

学部3年生：佐藤真央  
学部4年生：溝口美生  
学部4年生：高橋郁衣  
学部5年生：青池 滢  
学部6年生：藤野春香  
大学院博士3年：Sijia Sun（10月入学）

◆学位（修士，博士）取得者

【天然物化学ユニット】

修士論文

Battsengel Nomin-Erdene : Studies on novel antibacterial compounds produced by actinomycetes isolated from soil samples obtained from unique habitat in Malaysia.

陳 昕蕊 : Engineering of olivetolic acid cyclase to generate new olivetolic acid analogs.

邊 輝庸 : Crystal structure analysis of orcinol synthase from *Rhododendron dauricum*.

博士論文

奇 大源 : Studies on chemical constituents of three marine sponges, *Siphonochalina siphonella* in Egypt and *Arenosclera* sp. and *Gelliodes* sp. in Vietnam.

Prema : Studies on chemical constituents of *Picrasma javanica*, *Globba sherwoodiana* and *Kaempferia candida* collected in Myanmar and their anti-Vpr activities.

【天然薬物開発ユニット】

博士論文

Ahmed Mohammed Tawila : Highly potent antiausterity agents from *Callistemon* species from Egypt and their mechanism of action against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line.

Ashraf Mohammed Omar : Discovery of potential antiausterity agents from selected Southeast Asian medicinal plants.



## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 病態制御分野

Division of Bioscience

## 神経機能学領域

Section of Neuromedical Science

## 【神経機能学ユニット】

教授	東田 千尋	Prof. Chihiro Tohda
助教	楊 熙蒙	Assist. Prof. Ximeng Yang
助教	稲田 祐奈	Assist. Prof. Yuna Inada (11月～)
研究員	アンドレイ デ トレド	Andreia De Toledo (～6月)
研究支援員	野本 かおり	Kaori Nomoto

## 【和漢薬知統合学ユニット】

准教授	東田 道久	Assoc. Prof. Michihisa Tohda
-----	-------	------------------------------

## ◆研究目的

## 神経機能学ユニット

- ・神経機能の恒常・向上に関わる神経回路形成機序
- ・アルツハイマー病, 脊髄損傷, 頸椎症, サルコペニアに対する根本的治療を目指した和漢薬研究
- ・神経機能を制御する, 中枢神経と末梢臓器のクロストークの分子基盤
- ・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臨床研究
- ・ヒトの心身の健康状態に影響する要因分析とバイオマーカーの探索

## 和漢薬知統合学ユニット

- ・和漢薬理論に対するエビデンスの提供とそれを基盤にした新たな研究戦略の提供
- ・生体反応に寄り添った和漢薬独自の作用の解明とそれに基づく超低濃度作用薬の開発
- ・和漢薬理論に立脚したうつ病の分類, 発症機序の解明と, 新規抗うつ薬の開発
- ・「抗がん薬副作用による心不全」「致死性再発心筋梗塞」を予防する和漢薬処方の開発

## ◆2020年度研究概要

## 1) 認知症に関する研究

我々がこれまでに記憶障害改善作用を示すことを見出した化合物ジオスゲニンに関して, 常法で作製した山薬エキス中にはジオスゲニンは含有されていないことを確認した。一方, ジオスゲニン濃度が高まるように加工処理した山薬エキスでのみ記憶障害作用が認められたこと等から, 山薬エキス中のジオスゲニン以外の成分は記憶障害改善には関与しないことを示した (論文 1)。また, 経口投与後のジオスゲニンが脳移行するための適切な溶媒を検討しオリーブ油が優れていることを示した (論文 3)。

フェヌグリークの主要成分として知られているトリゴネリンをアルツハイマー病モデルマウスに経口投与すると, トリゴネリンは脳移行し, 記憶障害が改善され脳内の軸索が修復される効果も示唆されることを見出した (論文 2)。フェヌグリークエキスをアルツハイマー病モデルマウスに経口投与すると脳内にトリゴネリンが移行し, 記憶障害が改善されることも見出した (論文採択済み, 印刷中)。

## 2) 脊髄損傷に関する研究

前年度までの研究で、脊髄損傷の運動機能改善に neuroleukin 投与が有効であることを見出していた。今年度は、neuroleukin による軸索伸展作用の分子メカニズムを検討し、受容体様の分子が GRP78 であること、その下流で Akt 活性化が起きることを明らかにした(論文 4)。

脊髄損傷急性期に投与することで機能を回復させる生薬エキスを探索し、遠志エキスを見出した。遠志エキス経口投与により損傷部位の M2 マイクログリアが増加することを示した。さらに遠志エキス経口投与後に脊髄に移行する化合物を LC-MS 法にて検出した結果 sibiricose A5, 3,6'-disinapoyl sucrose, poly-galaxanthone III を見出しこれら化合物が M2 増加作用を有することも確認し、活性化化合物として同定した(論文 5)。

前年度までの研究で、acteoside の骨格筋投与により、慢性期脊髄損傷の運動機能が改善することを見出し、その理由として骨格筋から分泌され中枢に移行する pyruvate kinase M2(PKM2)が軸索を伸展させることによると結論づけた。今年度は、慢性期精髄損傷マウスの運動機能が PKM2 脳室内投与により回復することを証明し、さらに PKM2 が軸索伸展をもたらす分子機序として、valosin-containing protein に結合することによることを初めて明らかにした(論文 6)。

## 3) 基礎研究を植物性医薬品開発に繋げるための臨床研究

前年度までの研究で、脊髄損傷慢性期のマウスにニクジュヨウエキスを経口投与すると運動機能が改善すること、廃用性筋萎縮マウスにニクジュヨウエキスを経口投与すると歩行機能が改善することを見出していた。それに基づき本研究ではヒトでの効果を検証するため、臨床研究として「ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの予防及び改善効果の研究」を行い結果を解析した。60 歳以上の層別解析を行うと、プラセボ群と比較してニクジュヨウエキスの投与群では歩行機能が有意に示された。また、血液検査においても自覚アンケートにおいても、ニクジュヨウエキス投与による有害事象は検出されなかった。以上の結果より、ニクジュヨウエキスはロコモティブシンドロームの抑制に効果があるものと示唆された(論文 7)。

## 4) 和漢薬作用の独自性に関する研究 (和漢薬知統合学ユニット)

和漢薬・漢方薬の独自の特長として a) 生体に作働薬として作用(純薬のほとんどが抑制薬), b) 生薬の組み合わせ効果(対薬), c) 超微量成分の有効性, が考えられる。これらを明らかにすることにより、和漢薬に関する新しい研究戦略の提供とそれに基づく治療戦略の構築を目指した研究を推進している。2020 年度は、その基盤となる 120 種生薬個々の成分プロファイルと細胞作用の基礎的検討(形態変化観察と発現遺伝子ライブラリーの構築)を行った。それに基づき、抗うつ効果と関連する可能性のある遺伝子の発現への補気・抗気逆効果薬の検討を進めている。対薬効果に関しては、大黄と黄連の相互作用や麻黄に組み合わせる生薬による逆転効果などを分子生化学的視点から検討している。またセロトニン受容体に作働薬として作用する分子量 283.14 の微量物質を升麻中に電気生理学的手法で見出し(構造未決定)、柴胡との相互作用の検討を続け、2つの”分子”の相乗効果をあきらかにすることを目指している。その他、心臓保護の視点からの和漢薬作用に関しバイタルサインを指標にした研究を行うことで新規和漢薬処方の開発を目指すとともに、和漢薬による気への効果が全身性作用を介している可能性を MRI を用いて示すことに関して、その基礎的検討と手法取得を続けている。

## ◆原著論文

### 【神経機能学ユニット】

- 1) Yang X., Nomoto K., Tohda C.: Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of yam extracts. *J. Nat. Med.*, 75(1):207-216,2021.doi: 10.1007/s11418-020-01451-4.
- 2) Farid M.M., Yang X., Kuboyama T., Tohda C.: Trigonelline recovers memory function in Alzheimer's disease model mice: evidence of brain penetration and target molecule. *Sci. Rep.*, 10(1):16424, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-73514-1.
- 3) Tohda C., Yang X., Nomoto K.: Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *日本食品化学学会誌*, 27(2): 102-105,2020.
- 4) Tanie Y., Kuboyama T., Tohda C.: GRP78-Mediated Signaling Contributes to Axonal Growth

Resulting in Motor Function Recovery in Spinal Cord-Injured Mice. *Front. Pharmacol.*, 11:789, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00789.

- 5) Kuboyama T., Kominato S., Nagumo M., Tohda C.: Recovery from spinal cord injury via M2 microglial polarization induced by Polygalae Radix. *Phytomedicine*, 82:153452, 2020. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153452.
- 6) Kikuchi T., Tohda C., Suyama M.: Recovery of motor function of chronic spinal cord injury by extracellular pyruvate kinase isoform M2 and the underlying mechanism. *Sci. Rep.*, 10(1):19475, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-76629-7.
- 7) Inada Y., Tohda C., Yang X.: Effects of *Cistanche tubulosa* Wight Extract on Locomotive Syndrome: A Placebo-Controlled, Randomized, Double-Blind Study. *Nutrients*, 13(1):264, 2021. doi: 10.3390/nu13010264.

#### 【和漢薬知統合学ユニット】

- 1) Tohda M., Zhao Q.F.: Profiling of 120 types of herbal extracts and their effects on morphology in cultured neuronal or glial cell lines, followed by RNA extraction for a cDNA library: Consideration for use in studies based on Kampo theories. *Traditional Kampo Medicine*. 8(1):75-82, 2021, <https://doi.org/10.1002/tkm2.1274>.

### ◆総説

#### 【神経機能学ユニット】

- 1) 東田千尋, 楊熙蒙, 稲田祐奈. ジオスゲニンの認知機能改善効果. *Functional Food* (2021) 40号 15(1), 10-16. 2021 Mar 31.
- 2) Kuboyama T., Yang X., Tohda C.: Natural Medicines and Their Underlying Mechanisms of Prevention and Recovery from Amyloid  $\beta$ -Induced Axonal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Int. J. of Mol. Sci.*, 21(13), 4665, 2020. doi: 10.3390/ijms21134665.

### ◆学会報告

#### 【神経機能学ユニット】

##### (国際学会)

- 1) Farid M. Mai, Yang X, Kuboyama T, Tohda C. Trigonelline: A promising compound for the treatment of Alzheimer's Disease. *International Conference on Medicinal Plants, Pharmacognosy, Phytochemistry and Natural Products*. 2020 Oct 15-16 ; Rome, Italy (オンライン).

##### (国内学会)

- 1) 楊熙蒙, 東田千尋. Diosgenin はアルツハイマー病モデルマウスの脳内において軸索を再伸長させ記憶障害を改善する. 日本薬学会第 141 年会 2021 Mar 26-29 ; 広島 (オンライン).
- 2) 久保山友晴, 小湊誠也, 南雲美咲, 東田千尋. Recovery from spinal cord injury via M2 microglial polarization induced by Polygalae Radix. 遠志によるマイクログリア M2 化を介した脊髄損傷からの回復. 第 94 回日本薬理学会年会 ; 2021 Mar 8-10 ; 札幌 (オンライン).
- 3) Chino K, Izuo N, Kuboyama T, Tohda C, Nitta A. Recovery of memory deficits by overexpression of Shati/Nat81 in the hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease. 第 94 回日本薬理学会年会 ; 2021 Mar 8-10 ; 札幌 (オンライン).
- 4) 千野翔, 泉尾直孝, 久保山友晴, 東田千尋, 新田淳美. 海馬での Shati/Nat81 の過剰発現はアルツハイマー病モデルマウスの認知機能低下を改善する. 富山薬学研究会 2020 ; 2020 Nov 15 ; 富山 (オンライン).
- 5) 須山真聡, 東田千尋. 新規マイオカイン PKM2 の慢性期脊髄損傷改善作用と分泌様式の検討. 富山薬学研究会 2020 ; 2020 Nov 15 ; 富山 (オンライン).
- 6) 真継理子, 楊熙蒙, 東田千尋. 緑内障における視神経の保護および修復に対する diosgenin の作用. 富山薬学研究会 2020 ; 2020 Nov 15 ; 富山 (オンライン).
- 7) 長瀬綸沙, 東田千尋. 認知症発症を加速する新規骨格筋分泌因子. 富山薬学研究会 2020 ;

- 2020 Nov 15 ; 富山 (オンライン).
- 8) 東田千尋. 脊髄損傷慢性期の機能回復に有効な薬物と分子. 第 63 回日本神経化学会大会 シンポジウム「脊髄損傷の機能回復に迫る分子と治療薬」; 2020 Sep 10-12 ; 八王子 (オンライン).
  - 9) 楊熙蒙, 東田千尋. Diosgenin がアルツハイマー病モデルマウスの脳内において軸索を再伸長させる分子メカニズムの解明. 第 63 回日本神経化学会大会 ; 2020 Sep 10-12 ; 八王子 (オンライン).
  - 10) 長瀬綾沙, 東田千尋. 認知症発症を加速する骨格筋分泌性因子. 第 63 回日本神経化学会大会 ; 2020 Sep 10-12 ; 八王子 (オンライン).
  - 11) 須山真聡, 菊池高広, 中野葵, 東田千尋. 新規マイオカインの PKM2 は慢性期脊髄損傷の運動機能を回復する. 第 63 回日本神経化学会大会 2020 Sep 10-12 ; 八王子 (オンライン).
  - 12) 真継理子, 楊熙蒙, 中野葵, 東田千尋. ジオスゲニンによってアルツハイマー病の記憶障害が回復することに関与する, 脳内の内分泌的作用の探索. 第 63 回日本神経化学会大会 ; 2020 Sep 10-12 ; 八王子 (オンライン).
  - 13) 稲田祐奈, 蝦名昂大, 佐藤邦子, 松井三枝. 成人における余暇活動 3 要素の年代と性の影響. 日本心理学会第 84 回大会 2020 Sep 8-Nov 2 ; 文京区 (オンライン).
  - 14) 久保山友晴, 楊熙蒙, 東田千尋. アミロイド  $\beta$  による軸索変性に着目したアルツハイマー病予防・治療法の開発. 第 37 回和漢医薬学会学術大会 シンポジウム「認知症と水滞」; 2020 Aug 29-30 ; 京都 (オンライン).
  - 15) 東田千尋, 松井三枝, 稲田祐奈, 楊熙蒙, 久保山友晴, 金原嘉之, 渡り英俊. エゾウコギ葉エキスと骨碎補エキスの合剤による認知機能とストレス抵抗性に対するランダム化二重盲検試験. 第 37 回和漢医薬学会学術大会 ; 2020 Aug 29-30 ; 京都 (オンライン).
  - 16) 楊熙蒙, 東田千尋. Diosgenin はアルツハイマー病の脳内において軸索を正しく再伸長させる. 第 37 回和漢医薬学会学術大会 ; 2020 Aug 29-30 ; 京都 (オンライン).

#### ◆特許

##### 【神経機能学ユニット】

- 1) 東田千尋, 楊熙蒙, inventor ; 国立大学法人富山大学, assignee. 軸索伸展剤. 出願日 : 2020 Aug 21.
- 2) 甲斐田大輔, 東田千尋, 伊野部智由, inventor ; 国立大学法人富山大学, assignee. ユビキチン-プロテアソーム系の活性化剤, およびその利用. 出願日 : 2020 Jul 1.

#### ◆その他

##### 【神経機能学ユニット】

- 1) 東田千尋. HEALTH METHOD 和漢薬のちから 3 脳の健康寿命を延ばす. CREER LIFE 2021 春号. P.14-15. 2021 Mar 19.
- 2) 和漢薬ニクジュヨウ ロコモ改善に効果 富大研究所が発表. 富山新聞 朝刊. 2021 Mar 12.
- 3) 楊熙蒙. 和漢薬研究により見出されたアルツハイマー病の新規治療戦略. A novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease: discovery from natural medicine research. アイドリング脳科学研究センター 第 6 回センターセミナー. 2020 Dec 21.
- 4) 東田千尋. 脊髄損傷の運動機能障害を回復させるくすり. 令和 2 年度富山市民大学「生活医学を学ぶ」2020 Sep 18.
- 5) 東田千尋. 慢性期脊髄損傷の機能改善に有効なニクジュヨウエキスとその成分 Acteoside : 基礎研究の成果を臨床研究へ. 2020 Jun 26.
- 6) 楊熙蒙. アルツハイマー病の脳内において萎縮した軸索が正しく再伸長する分子メカニズムの解明. 令和 2 年度富山大学杉谷地区 第 1 回基礎研究発表会 2020 Jun 22.
- 7) 生薬「骨碎補」「エゾウコギ葉」エキス 認知症予防に効果. 北日本新聞 (社会・地域).

- 2020 Feb 15. (※昨年度未記載)
- 8) 生薬と薬用植物の服用 認知機能の向上確認 富大和漢医薬学研. 富山新聞 (北陸総合). 2020 Jan 25. (※昨年度未記載)
  - 9) 東田千尋. HEALTH METHOD 和漢薬のちから 2 認知症に希望の光 CREER LIFE 2020 年 夏・秋号. P.18. 2020 Aug 28.
  - 10) 東田千尋. HEALTH METHOD 和漢薬のちから CREER LIFE 2020 年 冬・春号. P.14-15. 2020 Jan 15. (※昨年度未記載)

#### ◆受賞

##### 【神経機能学ユニット】

- 1) 東田千尋. 2020 年度富山大学杉谷地区第 1 回臨床研究発表会 優秀賞「慢性期脊髄損傷の機能改善に有効なニクジュヨウエキスとその成分 Acteoside : 基礎研究の成果を臨床研究へ」2020, 6.
- 2) 楊熙蒙. 第 37 回和漢医薬学会学術大会 優秀発表賞「Diosgenin はアルツハイマー病の脳内において軸索を正しく再伸長させる」2020, 8.
- 3) 楊熙蒙. 第 63 回日本神経化学学会大会 若手道場優秀発表賞「Diosgenin がアルツハイマー病モデルマウスの脳内において軸索を再伸長させる分子メカニズムの解明」2020, 9.
- 4) 長瀬綸沙. 第 63 回日本神経化学学会大会 若手道場優秀発表賞「認知症発症を加速する骨格筋分泌性因子」2020, 9.
- 5) 須山真聡. 第 63 回日本神経化学学会大会 若手道場優秀発表賞「新規マイオカインの PKM2 は慢性期脊髄損傷の運動機能を回復する」2020, 9.

#### ◆共同研究

##### 【神経機能学ユニット】

(国内)

- 1) 松井三枝 (金沢大学国際基幹教育院) : 軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能を評価する認知機能試験の研究, 2019~
- 2) 徳田隆彦 (量子科学技術研究開発機構) : 軸索修復の血漿バイオマーカーの研究, 2019~
- 3) 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, 2015~

(学内)

- 1) 小松かつ子 (和漢医薬学総合研究所) : 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, 2010~
- 2) 鈴木道雄 (神経精神科) : 特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験, 2020~
- 3) 小松かつ子 (和漢医薬学総合研究所), 渡り英俊 (和漢診療科), 鈴木道雄 (神経精神科), 田渕明子 (薬学部) : 富山大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」2016~

#### ◆研究費取得状況

##### 【神経機能学ユニット】

- 1) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 B (代表 : 東田千尋) 「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) 富山大学運営費交付金機能強化費 (代表 : 東田千尋, 分担 : 楊熙蒙) 「漢方薬による認知症予防への取り組みと地域活性化」
- 3) 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」
- 4) 文部科学省研究費補助金 基盤研究 C (代表 : 久保山友晴, 分担 : 東田千尋) 「マイクログリアの M2 化によるアルツハイマー病根本的治療法の開発」
- 5) 文部科学省研究費補助金 挑戦的研究 (萌芽) (代表 : 甲斐田大輔, 分担 : 東田千尋) 「ユ

- ビキチン-プロテアソーム系活性化剤を用いた新規アルツハイマー病治療法の開発」
- 6) 富山県アンメットメディカルニーズ創薬・製剤研究（代表：東田千尋）「高齢者疾患を制する和漢薬研究：製品化に向けた臨床研究と品質研究」
  - 7) 文部科学省研究費補助金 若手研究（代表：楊熙蒙）「脳内の軸索再伸長をターゲットとしたアルツハイマー病の根本的治療法の開発」
  - 8) 一般財団法人 鷹野学術振興財団 2019 年度研究助成（代表：楊 熙蒙）「運動機能に対する“末梢神経—器官”双方の修復を介した新規機能性表示食品の開発」
  - 9) アイドリング脳科学研究センター 2020 年度（第 1 回）「研究（創作）助成」（代表：楊熙蒙）「アルツハイマー病におけるアイドリング脳の機能改善：デフォルト・モード神経回路の修復に基づく治療薬開発」
  - 10) 文部科学省研究費補助金 若手研究（代表：稲田祐奈）「言語発達を考慮した幼児用嗅覚検査の開発」
  - 11) ミズノスポーツ振興財団 2020 年度スポーツに関する科学的・学術的・医学的研究に対する助成（代表：稲田祐奈）「運動習慣がメンタルヘルスに及ぼす生理学的・脳機能的関連機序の検討」

#### ◆研究室在籍者

##### 【神経機能学ユニット】

学部 3 年生：渋江省吾  
学部 4 年生：須山真聡, 真継理子  
大学院修士 1 年：近藤麻布  
大学院修士 2 年：長瀬綸沙  
大学院博士 3 年：谷江良崇

##### 【和漢薬知統合学ユニット】

学部 4 年生：鈴木玲奈  
学部 5 年生：細貝春香  
学部 6 年生：安藤慶顕  
大学院博士 2 年：趙慶峰 (生命融合所属)

#### ◆学位（修士，博士）取得者

##### 【神経機能学ユニット】

修士論文

長瀬綸沙：認知症発症を加速する新規骨格筋分泌性因子の研究

博士論文

谷江良崇：Neuroleukin による脊髄損傷改善作用の研究

## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 病態制御分野

Division of Bioscience

## 生体防御学領域

Section of Host Defences

## 【がん・免疫ユニット】

教授 早川 芳弘

Prof. Yoshihiro Hayakawa

助教 薄田 健史

Assist. Prof. Takeshi Susukida

## 【腸管疾患ユニット】

助教 山本 武

Assist. Prof. Takeshi Yamamoto

助教 林 周作

Assist. Prof. Shusaku Hayashi

## 【脂質代謝ユニット】

准教授 渡辺 志朗

Assoc. Prof. Shiro Watanabe

## ◆研究目的

## 【がん・免疫ユニット】

がん・免疫ユニットでは病態における生体防御機構の役割に関する研究、和漢薬の生体防御機構に及ぼす効果に関する研究について、特に免疫システムに着目して研究することを目的とする。生体防御システムを制御して疾患の発症予防や疾患の悪性化進展を阻止しうる薬効を生薬エキス、漢方方剤、天然物由来化合物、食物由来成分等から探索し、それらを活用して予防先制医療へと応用することを目指す。特に免疫疾患（がん・炎症・アレルギー病態）の制御について、生体防御に重要な自然免疫細胞に着目し、なかでもナチュラルキラー（Natural Killer: NK）細胞のバイオロジーや疾患制御における重要性について研究を進める。また、遠隔転移に代表されるがん進展における免疫応答の役割について、病態モデルや *in vivo* イメージングを用いた解析に加え、和漢薬による免疫疾患の制御に関する研究を行う。

## 【脂質代謝ユニット】

脂質代謝ユニットの研究目的は、和漢薬ならびにその主要成分が有する病態生理制御効果を、脂肪酸と胆汁酸の網羅的分析をとおして、それらの新しい作用機構の概念を提唱することである。

## 【腸管疾患ユニット】

腸管疾患ユニットでは、生体防御の最前線で働く消化管において高度に発達した腸管粘膜免疫系および腸管神経系に着目し、これらのバランスの異常が大きく関与する腸管免疫性疾患の病因・病態解明を行っている。特に、近年患者数が増加し、根治療法が確立していない炎症性腸疾患および食物アレルギーを対象疾患として、和漢薬を臨床予測性の高い創薬リソースとして用い、病態解明研究に基づいた有用な治療薬の創出を目的とする。

## ◆2020 年度研究概要

## 【がん・免疫ユニット】

がん・免疫ユニットの 2020 年度の研究成果の概要

## 1. 免疫疾患における生体防御機構の役割に関する研究

NK 細胞は腫瘍免疫監視、特に遠隔転移の制御における重要なエフェクター細胞であることが知られているが、一方で各臓器・組織に分布する異なる NK 細胞サブセットの転移抑制における役割は明確ではない。そこで NK 細胞の免疫監視に高い感受性を示すマウス T 細胞リンパ腫（BW5147.3）の全身播種モデルにおいて、生物発光イメージングを用いた病態評価系を確立し、各臓器・組織に分布する NK 細胞サブセットのがん転移制御における役割について解析した。NK 細胞除去マウスでは BW5147.3 細

胞の皮下移植による腫瘍増殖の促進に加え、尾静脈接種後の各臓器での播種・増殖の促進が認められた。今後は各組織・臓器におけるNK細胞サブセットの免疫監視における役割についてさらに詳細に解析する。

## 2. 生体防御システムをターゲットとした和漢薬による疾患制御に関する研究

がん悪性化進展に関わる炎症性シグナルをターゲットとして和漢薬ならびに天然物由来化合物、またその誘導体の薬効について探索研究を行った。その結果、バイカレイン、クルクミン誘導体、桑白皮、玄米発酵性食品などの有用性について明らかにした。また、多発性骨髄腫治療薬として用いられているImmunomodulatory drugs (IMiDs)のNK細胞に対する免疫調節作用について明らかにした。IMiDs投与群ではフローサイトメトリー解析により末梢組織中でNK細胞、特に成熟型のCD27<sup>lo</sup>サブセットが増加し、加えてNK細胞の分化・成熟化や機能発現に関わる転写因子であるT-betの発現上昇が見られた。またIMiDs投与マウスのNK細胞ではエフェクター機能の上昇が認められた。さらにマウスメラノーマ細胞の肺転移がIMiDs投与で有意に抑制され、この転移抑制作用はNK細胞依存的であった。以上の結果から、IMiDsのNK細胞を介した免疫調節作用と抗転移効果にはT-betの発現調節によるNK細胞のエフェクター機能の上昇を伴う分化・成熟化の誘導が重要である可能性が示唆された。今後はNK細胞の機能成熟化に着目した新たな免疫制御の可能性についてさらに検討する。

### 【脂質代謝ユニット】

防己黄耆湯をマウスに投与すると、肝臓の中性脂肪含量が低下することを明らかにした。このとき糞便中のコレステロール濃度が高くなっていた。また防己黄耆湯の投与は、肝臓中の胆汁酸構成には影響を及ぼさなかったが、糞便中の主な2次胆汁酸であるデオキシコール酸の濃度を低下させることもわかった。以上の結果から、防己黄耆湯は腸管での糞コレステロールの吸収を抑制して、肝臓への脂質の蓄積を軽減すると推測できた。また防己黄耆湯による糞便中のデオキシコール酸の濃度の低下は、腸管での胆汁酸受容体活性の低下を来すと推測でき、これが肝臓での中性脂肪含量の低下の一因になっていると考えた。以上の結果は、漢方薬が腸管内での脂質代謝を制御することで、遠隔臓器である肝臓の脂質代謝に影響する可能性を初めて示したものである。今後防己黄耆湯以外の漢方薬の脂質代謝制御効果ならびに、それにおける腸管内脂質代謝の役割について明らかにしていきたい。

### 【腸管疾患ユニット】

#### 1. 炎症性腸疾患に関する研究

厚生労働省の指定難病である炎症性腸疾患（IBD）は寛解と再燃を繰り返す難治性の慢性炎症疾患であり、既存の薬剤では寛解を維持することができず再燃する症例も多いため、長期寛解維持を実現させる有用な新規治療薬の創出が強く求められている。近年、炎症によって破綻した腸管粘膜バリアの再構築が長期寛解維持に重要であると考えられるようになってきた。そこで、IBD病態モデルを用いた再燃予防に関する基礎研究を行い、和漢薬成分の一つであるベルベリンが再燃を抑制すること、疾病前状態の予測（DNB理論）により再燃予防のターゲット分子の候補を見出した。また、腸管粘膜バリアの機能制御におけるインターロイキン4受容体の重要性（Hertati et al. Front Pharmacol, 2020）および腸管神経系に発現するGタンパク質共役型受容体GPR41がIBD病態の形成に関与する可能性（Hertati et al. Heliyon, 2020）を報告した。今後は、ベルベリンが再燃を抑制する詳細な機序を解明し、また、DNB理論により見出した候補ターゲット分子の再燃予防への有効性について検証を行い、臨床応用に繋げる研究を進める。

#### 2. 食物アレルギーに関する研究

食物アレルギー疾患の患者数は増加傾向であると報告されているが、未だ治療法は原因食物の除去療法や、誤飲・誤食時に発症した症状に対応する対症療法に限られている。しかし、除去療法による成長や発育への影響や、誤食によるアナフィラキシー等のショック症状による死亡事故の報告もあり、根本的治療に至る治療法や治療薬の開発が強く望まれている。そこで、根本的治療法として考えられている経口免疫療法に葛根湯を併用する療法に関する臨床研究および基礎研究を行った。葛根湯は、基礎研究では経口免疫療法の治療効率を有意に亢進させたが、臨床研究では治療効率を亢進させる傾向を示したものの有意差は確認できなかった。また、葛根湯関連成分や生薬による腸管粘膜免疫系の抑制効果を明らかにした（Yamamoto et al. Biol Pharm Bull, 2020, Nagata et al. J Nutr Sci Vitaminol, 2020）。今後は、基礎研



究により治療効率をより亢進させる治療法を検討し、臨床応用を目指す。

#### ◆原著論文

##### 【がん・免疫ユニット】

- 1) Ucche S., Murwanti R., Ritmaleni, Hayakawa Y.: Anti-Metastatic Effects of Curcumin Analogues in a Mouse Breast Cancer Model. *B.P.B. Reports*,3(2):76-79,2020. doi:10.1248/bpbreports.3.2\_76.
- 2) Miyazato K., Tahara H., Hayakawa Y.: Antimetastatic effects of thalidomide by inducing the functional maturation of peripheral natural killer cells. *Cancer Sci.*, 111(8):2770-2778, 2020. doi: 10.1111/cas.14538.
- 3) Yokoyama S., Iwakami Y., Hang Z., Kin R., Zhou Y., Yasuta Y., Takahashi A., Hayakawa Y., Sakurai H.: Targeting PSMD14 inhibits melanoma growth through SMAD3 stabilization. *Sci. Rep.*, 10(1):19214, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-76373-y.
- 4) Hardianti B., Umeyama L., Li F., Yokoyama S., Hayakawa Y. :Anti-inflammatory compounds moracin O and P from *Morus alba* Linn. (Sohakuhi) target the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol. Med. Rep.*, 22(6):5385-5391, 2020. doi: 10.3892/mmr.2020.11615.
- 5) Umeyama L., Kasahara S., Sugawara M., Yokoyama S., Saiki I., Hayakawa Y.: Anti - inflammatory effect of fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* on mice. *Tradit. Kampo Med.* in press, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/tkm2.1270>.
- 6) Susmitha G.D., Miyazato K., Ogura K., Yokoyama S., Hayakawa Y.: Anti-metastatic Effects of Baicalein by Targeting STAT3 Activity in Breast Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 43(12):1899-1905, 2020. doi: 10.1248/bpb.b20-00571.
- 7) Kawaguchi M., Nukaga T., Sekine S., Takemura A., Susukida T., Oeda S., Kodama A., Hirota M., Kouzuki H., Ito K.: Mechanism-based integrated assay systems for the prediction of drug-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 394:114958, 2020. doi: 10.1016/j.taap.2020.114958.

##### 【腸管疾患ユニット】

- 1) Koizumi K., Oku M., Hayashi S., Inujima A., Shibahara N., Chen L., Igarashi Y., Tobe K., Saito S., Kadowaki M., Aihara K.: Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 9129134, 2020. doi: 10.1155/2020/9129134.
- 2) Yamamoto T., Nagata Y., Hayashi S., Kadowaki M.: Isoflavones Suppress Cyp26b1 Expression in the Murine Colonic Lamina Propria. *Biol. Pharm. Bull.*, 43(12):1945-1949, 2020. doi: 10.1248/bpb.b20-00355.
- 3) Yamamoto T., Zhang Y., Kigasawa A., Hayashi S., Kadowaki M.: Therapeutic Benefit in Allergic Dermatitis Derived from the Inhibitory Effect of Byakkokaninjinto on the Migration of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 9532475, 2020. doi: 10.1155/2020/9532475.
- 4) Hertati A., Hayashi S., Ogata H., Miyata K., Kato R., Yamamoto T., Kadowaki M.: Morphological elucidation of short-chain fatty acid receptor GPR41-positive enteric sensory neurons in the colon of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Heliyon*, 6(12):e05647, 2020. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05647.
- 5) Hertati A., Hayashi S., Ogawa Y., Yamamoto T., Kadowaki M.: Interleukin-4 Receptor  $\alpha$  Subunit Deficiency Alleviates Murine Intestinal Inflammation In Vivo Through the Enhancement of Intestinal Mucosal Barrier Function. *Front. Pharmacol.*, 11:573470, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.573470.
- 6) Nagata Y., Yamamoto T., Kadowaki M.: Ginger Increases ALDH1A1 Expression and Enhances Retinoic Acid Signaling in a Human Colonic Epithelial Cell Line. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 66(5):462-467, 2020. doi: 10.3177/jnsv.66.462.
- 7) Wang X., Yamamoto T., Kadowaki M., Yangi Y.: Identification of key pathways and gene

expression in the activation of mast cells via calcium flux using bioinformatics analysis. BIOCELL. 45(2): 395-415, 2021. doi:10.32604/biocell.2021.012280.

【脂質代謝ユニット】

- 1) Li F., Nishidono Y., Tanaka K., Watanabe S., Tezuka Y.: A new monoterpenoid glucoindole alkaloid from *Dipascus asper*. Nat. Prod. Commun., 15(4): 1-6, 2020. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X20917292>.
- 2) Morita M., Kaizawa T., Yoda T., Oyama T., Asakura R., Matsumoto S., Nagai Y., Watanabe Y., Watanabe S., Kobayashi H., Kawaguchi K., Yamamoto S., Shimozawa N., So T., Imanaka T.: Bone marrow transplantation into *Abcd1*-deficient mice: Distribution of donor derived-cells and biological characterization of the brain of the recipient mice. J. Inherit. Metab. Dis., 2020. doi: 10.1002/jimd.12346.
- 3) Chen Z., Watanabe S., Nishidono Y., Tanaka K.: Boiogito extract alters fecal bile acid profile in mice: Possible roles in changes in fecal and liver lipid levels. Trad. Kampo Med., 7(3):138-145, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/tkm2.1254>.
- 4) Kawaguchi K., Mukai E., Watanabe S., Yamashita A., Morita M., So T., Imanaka T.: Acyl-CoA thioesterase activity of peroxisomal ABC protein ABCD1 is required for the transport of very long-chain acyl-CoA into peroxisomes. Sci. Rep., 11(1):2192, 2021. doi: [doi.org/10.1038/s41598-021-81949-3](https://doi.org/10.1038/s41598-021-81949-3).
- 5) Morita M., Toida A., Horiuchi Y., Watanabe S., Sasahara M., Kawaguchi K., So T., Imanaka T.: Generation of an immortalized astrocytic cell line from *Abcd1*-deficient H-2K<sup>b</sup>tsA58 mice to facilitate the study of the role of astrocytes in X-linked adrenoleukodystrophy. Heliyon, 7(2):e06228, 2021. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06228.
- 6) Fujisaka S., Usui I., Nawaz A., Igarashi Y., Okabe K., Furusawa Y., Watanabe S., Yamamoto S., Sasahara M., Watanabe Y., Nagai Y., Yagi K., Nakagawa T., Tobe K.: Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of *Akkermansia muciniphila* and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity. Sci. Rep., 10(1):5544, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-62506-w. (昨年度未掲載)

◆著書

【がん・免疫ユニット】

- 1) 早川芳弘. 抗がん剤の開発における薬効評価モデル系. オペリスク ; 2020 jun. Vol.25 , p.2.

◆総説

【がん・免疫ユニット】

- 1) Miyazato K., Hayakawa Y.: Pharmacological targeting of natural killer cells for cancer immunotherapy. Cancer Sci., 111(6):1869-1875, 2020. doi:10.1111/cas.14418.
- 2) Susukida T., Aoki S., Shirayanagi T., Yamada Y., Kuwahara S., Ito K.: HLA transgenic mice: application in reproducing idiosyncratic drug toxicity. Drug Metab. Rev. 52(4):540-567, 2020. doi: 10.1080/03602532.2020.1800725.

【脂質代謝ユニット】

- 1) 渡辺志朗 : 胆汁酸による脂肪合成系の制御. 生化学, 92(5):680-687, 2020. doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920680.

◆学会報告

【がん・免疫ユニット】

(国際学会)

- \* 1) 早川芳弘. Pre-clinical animal models for studying cancer immunology. The 7<sup>th</sup> International Conference on Advanced Pharmaceutical Research (ICAPH 2020); 2020 Nov 5-6; Bangkok (オンライン) (招待講演).

(国内学会)

- \* 1) 早川芳弘. 若手・融合がもたらすがん研究ブレイクスルー. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (招待講演).
- 2) Amira A. Abdellatef., 早川芳弘. Anti-metastatic activity of synthetic imidazole compounds targeting cancer cell intrinsic STAT3 activity. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 3) 関戸景子, 早川芳弘. Pre-clinical study of combination therapy of Juzen-taiho-to and immune checkpoint inhibitor. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 4) 山前結, 宮里紀穂, 早川芳弘. The effect of protein phosphatase inhibitor on NK cell anti-tumor effector function. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 5) Min-Kyoung Shin, 早川芳弘. Exploration of biological activity of Ophiocordyceps fungi species by targeting NFκB-STAT3-IL-6 inflammatory pathway. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 6) Sisca Uche, Marija Mojic, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa. Acquired immune resistance mechanism of melanoma through GSTA4-dependent redox pathway. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 7) Satoru Yokoyama, Atsushi Takahashi, Yue Zhou, Yoshihiro Hayakawa, Hiroaki Sakurai. SOX10 negatively regulates PD-L1 expression in melanoma. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 8) Sutthorn Pothongrsit, Yoshihiro Hayakawa, Varisa Pongrakahanon. Erianthridin inhibits lung cancer cell metastasis vieregulating actin cytoskelton rearrangement and MMPs expression. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 9) 高橋篤司, 早川芳弘, 櫻井宏明, 横山悟. 悪性黒色種における SOX10 を介した PD-L1 の発現抑制機構. 第 79 回日本癌学会学術総会 ; 2020 Oct 1-3 ; 広島 (オンライン).
- 10) 青木重樹, 桑原佐季, 薄田健史, 伊藤晃成. HLA 多型特異的な薬物性の免疫毒性発症に対する免疫寛容系の関与. 第 47 回日本毒性学会 ; 2020 Jun 29 - Jul 1 (オンライン).
- 11) 桑原佐季, 薄田健史, 青木重樹, 伊藤晃成. アバカビルによる HLA 多型依存的な特異体質毒性の発現への免疫寛容系の関与. 第 27 回日本免疫毒性学会 ; 2020 Sep 26-27 (オンライン).
- 12) 桑原佐季, 薄田健史, 風岡顯良, 青木重樹, 伊藤晃成. HLA 多型依存的なアバカビル過敏症発症の個人差に対する免疫寛容系の関与. 日本薬学会第 141 回年会 ; 2021 Mar 27-29 (オンライン).

#### 【腸管疾患ユニット】

(国際学会)

- 1) Kato T., Ito Y., Yamamoto T., Shimizu M., Itazawa T., Adachi Y., Kadowaki M., Adachi Y.: An evaluation of the effects of Kakkonto in combination with dietary advice in children with food allergies through a non-randomized controlled trial. JSA/WAO Joint Congress 2020, 2020, 9, 17-20; Kyoto.

(国内学会)

- 1) 山本 武, 宋 夢婷, 後藤由佳, 門脇 真. 葛根湯併用経口免疫療法による食物アレルギー疾患の寛解維持誘導について病態マウスを用いた検討. 2020 第 37 回和漢医薬学会学術大会 ; 2020, 8, 29-30 ; 京都 (オンライン).
- 2) 山本 武, 宋 夢 婷, 後藤由佳, 門脇 真. 食物アレルギー病態マウスを用いた葛根湯と経口免疫療法の併用療法による寛解維持効果の検討. JSA/WAO Joint Congress 2020 (第 69 回日本アレルギー学会学術大会) ; 2020, 9, 17-20 ; 京都 (オンライン).
- 3) 加藤 諒, 緒方華子, 山本 武, 門脇 真. 腸内細菌叢は成熟マウスの腸管神経回路の形成維持に恒常的に寄与する. 富山薬学研究会 2020 (日本薬学会北陸支部例会代替会) ; 2020, 11, 15 ; 富山.
- 4) 小川雄大, 林 周作, 山本 武, 門脇 真. 腸管マクロファージでの IL-10 産生を亢進させ

るベルベリンは炎症性腸疾患モデルにおける再燃を抑制する. 富山薬学研究会 2020 (日本薬学会北陸支部例会代替会); 2020, 11, 15; 富山.

【脂質代謝ユニット】

(国内学会)

- 1) 渡辺志朗, 陳 卓爾. ヒオデオキシコール酸がマウスにおける糞便中への脂質排泄に及ぼす影響. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).
- 2) 道志 勝, 渡辺 志朗, 名取 雄人, 細山田 真, 赤江 豊. マウス脳虚血再灌流後の神経細胞死の発生に対するトリヨードチロニンの悪化作用. 日本薬学会第 141 年会; 2021 Mar 26-29; 広島 (オンライン).
- 3) 渡辺志朗, 陳 卓爾, 藤田恭輔. デキストラン硫酸ナトリウムによって誘導される大腸炎症状に及ぼすヒオデオキシコール酸の防御効果. 第 38 回日本生化学会北陸支部会; 2020 June 13; 福井 (誌上開催).
- 4) 渡辺志朗, 馬 青苗, 陳 卓爾. 五苓散がマウスの糞便中脂質プロファイルに及ぼす影響. 和漢医薬学会学術集会; 2020 Aug 29-30; 京都 (オンライン).

◆その他

【がん・免疫ユニット】

- 1) Amira A. Abdellatef, Yoshihiro Hayakawa. Anti-metastatic activity of synthetic imidazole compounds targeting cancer cell intrinsic STAT3 activity. 富山薬学研究会 2020; 2020 Nov 15; 富山.
- 2) 関戸景子, 早川芳弘. 十全大補湯の免疫チェックポイント阻害剤との併用効果の解析. 富山薬学研究会 2020; 2020 Nov 15; 富山. .
- 3) 山前結, 新宮領勇輝, 宮里紀穂, 早川芳弘. プロテインフォスファターゼ阻害剤による NK 細胞の抗腫瘍エフェクター昨日活性化メカニズムの解析. 富山薬学研究会 2020; 2020 Nov 15; 富山.
- 4) Min-Kyoung Shin, Yoshihiro Hayakawa. Exploration of biological activity of Ophiocordyceps fungi species by targeting NFκB-STAT3-IL-6 inflammatory pathway. 富山薬学研究会 2020; 2020 Nov 15; 富山.
- 5) Sisca Ucche, Marija Mojic, Satoru Yokoyama, Yoshihiro Hayakawa. Acquired immune resistance mechanism of melanoma through GSTA4-dependent redox pathway. 富山薬学研究会 2020; 2020 Nov 15; 富山.
- \* 6) 早川芳弘. がん免疫療法における漢方薬の可能性. 高知産婦人科漢方治療セミナー; 2021 Feb 4; 高知 (オンライン) (招待講演).

【腸管疾患ユニット】

- 1) 山本 武. アレルギー疾患と漢方薬. 放送大学 冬のオープンセミナー(公開講演会); 2020 Dec 13; 富山.

◆受賞

【がん・免疫ユニット】

- 1) Sisca Ucche: 富山薬学研究会 2020 優秀発表賞「Acquired immune resistance mechanism of melanoma through GSTA4-dependent rebox pathway」2020, 11.

【腸管疾患ユニット】

- 1) 小川雄大, 林 周作, 山本 武, 門脇 真: 富山薬学研究会 2020 (日本薬学会北陸支部例会代替会) 優秀発表賞「腸管マクロファージでの IL-10 産生を亢進させるベルベリンは炎症性腸疾患モデルにおける再燃を抑制する」2020, 11.

◆共同研究

【がん・免疫ユニット】

(海外)

- 1) Varisa Pongrakhananon ( Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand) : Collaboration in cancer metastasis research. 2018～
- 2) Pornthip Waiwut ( Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubon Ratchathani University, Thailand) : Collaboration in cancer metastasis research. 2017～
- 3) Meselhy Ragab M. Zayed ( Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2017～
- 4) Adnan A. Bekhit ( Faculty of Pharmacy, Alexandria University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2018～
- 5) Moustafa Fathy ( Faculty of Pharmacy, Minia University, Egypt) : Collaboration in cancer metastasis research. 2019～

(国内)

- 1) 磯濱洋一郎 (東京理科大学薬学部), 堀江一郎 (山口東京理科大学薬学部) : がん免疫療法における補剤の有用性に関する基礎研究, 2019～
- 2) 佐々木 史 (富山県農林水産総合技術センター森林研究所) : 冬虫夏草菌類の抗腫瘍活性に関する研究, 2017～
- 3) 田原秀晃 (東京大学医科学研究所) : がん免疫応答に関する研究, 2012～

【腸管疾患ユニット】

(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) 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～
- 3) 合原一幸 (東京大学 国際高等研究所 ニューロインテリジェンス国際研究機構) : 漢方医薬学と数理情報科学の融合による未病の科学的予測に基づく創薬研究 (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～
- 4) 山西芳宏 (九州工業大学大学院 情報工学研究院 生命化学情報工学研究系) : 和漢薬のターゲットタンパク質のインシリコ探索によるドラッグ・リポジショニング (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～

【脂質代謝ユニット】

(国内)

- 1) 古澤之裕 (富山県立大学) : 漢方薬による腸管内胆汁酸構成の改変における腸内細菌叢の役割の解明, 2019～
- 2) 能勢充彦 (名城大学薬学部) : 消化管に作用する漢方方剤の腸管内胆汁酸構成ならびに粘液分泌に及ぼす影響の解析, 2017～
- 3) 道志 勝 (帝京大学薬) : 動物胆構成胆汁酸による実験的脳虚血一再灌流後の神経細胞死の軽減効果の評価, 2018～

(学内)

- 1) 和田 努, 笹岡利安 (富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)) : 脂肪肝形成におけるペルオキシゾーム ABCD1 の役割の解明, 2018～
- 2) Suresh Awale (富山大学和漢医薬学総合研究所) : すい臓がん細胞移植マウスに対する天然化合物の効果に関する研究, 2019～
- 3) 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ゾーム極長鎖脂肪酸代謝の異常の機構解明に関する研究, 2015～

## ◆研究費取得状況

### 【がん・免疫ユニット】

- 1) 文部科学省科学研究費 新学術領域研究 (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」(H29.4.1～R4.3.31)
- 2) 文部科学省科学研究費 基盤(C)最終 R4/早川芳弘 (大橋) (分担：早川芳弘)「亜鉛トランスポーターを介した代謝制御機構の解明に基づく大腸がん治療戦略の創出」(R2.4.1～R4.3.31)
- 3) 文部科学省科学研究費 研究活動スタート支援 (代表：薄田健史)「自己抗原の異物化を介した腫瘍免疫原性の改善に基づく新規がん免疫療法の開発」(R2.4.1～R4.3.31)
- 4) 令和 2 年度産学連携等研究費 受託事業費 学術指導 早川(テルモ) (代表：早川芳弘)「癌研究に関する学術指導」(R2.4.1～R3.3.31)
- 5) 令和 2 年度共同研究費 共同研究 早川 (日本製薬工業) (代表：早川芳弘)「牛黄清心元ならびに FNK-2001(半枝蓮・白花蛇舌草・山参・冬虫夏草混合品)」(R2.9.8～R3.9.30)
- 6) 令和 2 年度共同研究費 共同研究 早川 (野田食菌工業) (代表：早川芳弘)「LEM (椎茸菌糸体培養培地抽出物) の抗がん作用に関する研究」(R2.8.18～R4.3.31)
- 7) 令和 2 年度共同研究費 共同研究 小松 (ツムラ) 薬理作用 (代表：早川芳弘)「漢方薬の免疫系に対する薬理作用研究」(R2.9.10～R4.3.31)
- 8) 公益財団法人安田記念医学財団 令和 2 年度癌研究助成 安田記念医学財団 (早川) (代表：早川芳弘)「糖代謝スイッチによるがん細胞の免疫不応答性獲得機構の解明」(R2.11.10～R4.1.15)
- 9) 公益財団法人田村科学技術振興財団 2020 年度下期助成 (代表：薄田健史)「HLA 遺伝子導入マウスを用いた HLA-薬物相互作用による薬物過敏症の発症因子の解明」(R3.3.31～R4.3.31)

### 【腸管疾患ユニット】

- 1) 2020 年度 日本学術振興会科学研究費 基盤研究 (C) (代表：山本 武)「漢方薬併用経口免疫療法による食物抗原耐性獲得の検討と治療評価血液マーカーの探索」
- 2) 2020 年度日本学術振興会科学研究費 基盤研究 (C) (代表：林 周作)「腸管マクロファージの IL-10 産生亢進作用をもつ炎症性腸疾患の新たな治療薬の開発」
- 3) 2020 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)「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」
- 4) 2020 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)「腸内細菌による腸管神経系を介した脳腸相関の制御機構の解明と喫煙の影響」

### 【脂質代謝ユニット】

- 1) 文部科学省科学研究費 基盤研究(C) (代表：渡辺志朗)「腸管内胆汁酸を介する漢方薬の新しいメタボリックシンドローム改善作用の実証」
- 2) 受託研究費 (代表：渡辺志朗)「猪胆囊の漢方およびサプリメントにおける利活用を目的とした調査」

## ◆研究室在籍者

### 【がん・免疫ユニット】

学部 3 年生：魚住茉紘, 山口叶大, 原大輔  
学部 4 年生：遠藤麻夜, 對比地遥, 山本奨也  
学部 6 年生：平田卓也  
大学院修士 1 年：山前結  
大学院修士 2 年：関戸景子  
大学院修士 2 年：菅原美紗  
大学院修士 2 年：大島知佳子  
大学院修士 2 年：鈴木亮哉

大学院修士2年：賀 卡 (10月入学)

大学院博士1年：Sisca Ucche

大学院博士3年：梅山凜

大学院博士3年：宮里紀穂

大学院博士3年：藤原俊幸

大学院博士3年：Min-Kyoung Shin

大学院博士3年：Amira Abdellatef Ahmed (10月入学)

学内研究生：明元佑司(富山大学医学部第一外科), 松尾光浩(富山大学医学部麻酔科学), Muhammad Irfan Rasul(富山大学医学部総合口腔科学), Nguyen Tien Dung(富山大学医学部臨床腫瘍部学)

協力研究員：網のぞみ(テルモ株式会社)

#### 【腸管疾患ユニット】

大学院修士1年：後藤由佳

大学院修士2年：小川雄大

大学院修士2年：加藤 諒

大学院博士3年：緒方華子

大学院博士3年：Hertati Ai

大学院博士3年：張 玥

大学院博士3年：金内優也

#### 【脂質代謝ユニット】

学部3年生：武田沙也香

学部3年生：坂本来那

学部5年生：杉村美愛

学部6年生：保岡漠

学部6年生：藤原大地

大学院修士2年：馬青苗(10月入学)

大学院博士3年：陳卓爾(10月入学)

### ◆学位(修士, 博士)取得者

#### 【がん・免疫ユニット】

##### 修士論文

関戸景子：十全大補湯の免疫チェックポイント阻害剤との併用効果の解析

菅原美紗：マウス皮膚炎モデルを用いた「証」の免疫学的解析

平田卓也：NK細胞のエフェクター機能強化作用を有する和漢薬の探索研究

大島知佳子：マウスメラノーマ細胞の免疫応答抑制性制御因子として Glutathione

S-Transferase Alpha 4 の役割

鈴木亮哉：がん細胞の免疫耐性獲得に伴う代謝変化とプリン核酸アナログ Fludarabine Phosphate の効果

##### 博士論文

梅山 凜：和漢薬による生体バリア機能制御と炎症性疾患への治療応用に関する研究

宮里紀穂：NK細胞のエフェクター機能制御をターゲットとした複合がん免疫薬物療法に関する研究

#### 【腸管疾患ユニット】

##### 修士論文

小川雄大：腸管マクロファージでの IL-10 産生亢進を標的とした長期寛解維持を実現する有用な新規炎症性腸疾患治療薬の探索研究

加藤 諒：成体における腸管神経回路の形成維持に対する腸内細菌叢の恒常的寄与

##### 博士論文

Hertati Ai : A study of pathophysiological roles of immune system-related receptors that regulate

intestinal mucosal barrier function in inflammatory bowel disease model

【脂質代謝ユニット】

修士論文

馬青苗：Alteration of fecal bile acid profiles by boiogito in mice and its possible roles in changes in fecal and liver lipid levels

博士論文

陳卓爾：Preventive effects of boiogito on cholestatic liver injury and hepatic lipid accumulation in mice through the modulation of intestinal bile acid metabolism



## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 複雑系解析分野

Division of Complex Biosystem Research

教授  
准教授中川 嘉  
金 俊達Prof. Yoshimi Nakagawa  
Assoc. Prof. Jundal Kim (1月～)

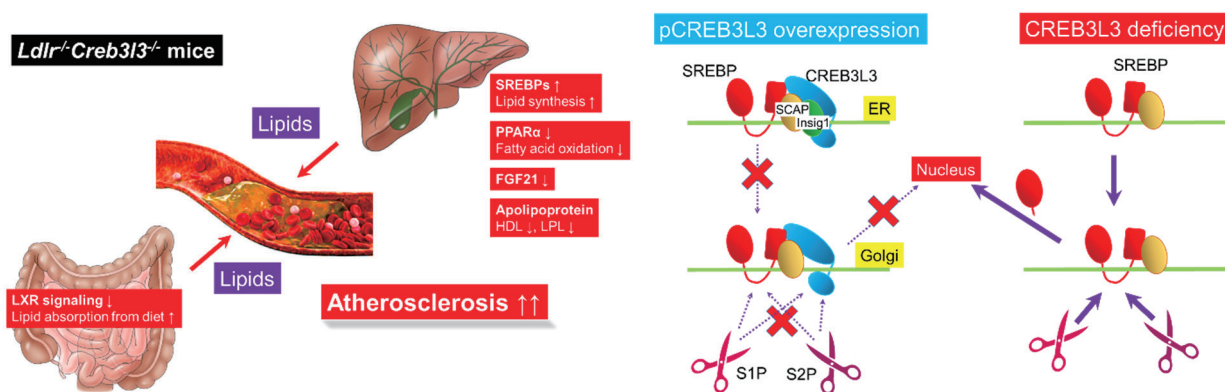
## ◆研究目的

生活習慣病の発症に係る分子メカニズムを解明するとともに、その知見を基に和漢薬による生活習慣病の改善作用を分子レベルで解明することを目的とし研究を行う。

## ◆2020年度研究概要

## 1. CREBHによるSREBPの競合抑制による動脈硬化発症抑制メカニズム

CREBHは肝臓、小腸にのみ発現する転写因子であり、脂質代謝改善に機能する。SREBPは脂質合成を促進し、脂質代謝異常を引き起こす転写因子である。CREBH過剰発現(Tg)、欠損(KO)マウスと動脈硬化モデルマウス(LDLR KOマウス)を交配し、動脈硬化病態を評価した。CREBH Tg/LDLR KOマウスでは動脈硬化は改善し、CREBH KO/LDLR KOマウスでは逆に動脈硬化が増悪化した。CREBHとSREBPはともに膜結合型タンパクとして、小胞体に存在する。本解析からCREBHとSREBPは小胞体上で結合し、活性化に必要な細胞内輸送、核への移行を阻害しあう関係にあることを見出した。この分子活性制御メカニズムが脂質代謝に係る遺伝子発現を制御し、脂質代謝異常、動脈硬化の発症を制御することを明らかにした(Nakagawa *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2020)。今後、CREBHを活性化する薬剤を開発することで、新たな治療戦略の構築が期待できる。



## 2. CREBHは栄養飢餓と成長遅延を繋ぐ分子メカニズム

CREBHは絶食時に発現が上昇し、転写因子として機能する。新たにCRISPR/Cas9システムを用い、活性化CREBHを組織特異的発現させられるマウス(CREBH flox Tgマウス)を作成した。さらに肝臓で発現するようにAlbumin Cre Tgマウスと交配し、肝臓特異的CREBH過剰発現マウスを作製した。このマウスは生後1か月の時点で明らかな成長遅延を示した。CREBH L-Tgマウス血中成長ホルモン(GH)が異常高値、IGF1がほぼ検出できないレベルであった。この状態は成長ホルモン抵抗性と言える。GHは肝臓に作用しGH受容体(GHR)からJAK2-STAT5を活性化し、IGF1の発現、血中への放出を促進させることで体の成長を促進させる。CREBH L-TgマウスではGHRのmRNAの著しい低下に伴い、タンパクレベルではほぼ検出できないレベルであった。CREBHの標的遺伝子の1つFGF21の過剰発現マウスでも成長ホルモン抵抗性を示し、成長遅延が生じることがすでに報告されている。確かにCREBH L-TgマウスではFGF21の発現上昇が認められた。そのため、

CREBH L-Tg マウスで見られる表現型が FGF21 に依存するかを, CREBH L-Tg マウスと FGF21 KO マウスを交配し, 確認した。しかしながら, CREBH L-Tg マウスで認められる肝臓での GH シグナル抑制, 成長遅延には影響を及ぼさなかった。本研究から CREBH による成長遅延は FGF21 に依存しないメカニズムで, 独自の作用によるものであること, CREBH が栄養飢餓と成長遅延を繋ぐ制御因子であることを見出した(*in Revision*)。

### 3. CREBH による食餌誘導性肝がん発症メカニズム

CREBH KO マウスに長期間, 高脂肪・高ショ糖食を負荷すると肝臓でがんが発症するデータを得た。CREBH は肝臓, 小腸でのみ発現し, 肝臓では脂質代謝を, 小腸では脂質吸収を担っていることを明らかにしてきている。現在, 肝臓での脂質代謝異常→炎症→線維化の悪化機構に対する CREBH の機能の解析, 小腸での脂質吸収, 構造異常による炎症, 腸内細菌叢の変化に対する CREBH の機能を解析している。今後, CREBH 欠損による肝がん発症のメカニズムが解明できれば, 生活習慣病を発端とする肝がん発症のメカニズムの解明, CREBH を標的とした肝がん治療薬開発に期待できる。

### ◆原著論文

- 1) Kobayashi M., Uta S., Otsubo M., Deguchi Y., Tagawa R., Mizunoe Y., Nakagawa Y., Shimano H., Higami Y.: Srebp-1c/Fgf21/Pgc-1 $\alpha$  Axis Regulated by Leptin Signaling in Adipocytes-Possible Mechanism of Caloric Restriction-Associated Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue. *Nutrients*, 12(7):2054,2020. doi:10.3390/nu12072054.
- 2) Matsuzaka T., Kuba M., Koyasu S., Yamamoto Y., Motomura K., Arulmozhiraja S., Ohno H., Sharma R., Shimura T., Okajima Y., Han S.I., Aita Y., Mizunoe Y., Osaki Y., Iwasaki H., Yatoh S., Suzuki H., Sone H., Takeuchi Y., Yahagi N., Miyamoto T., Sekiya M., Nakagawa Y., Ema M., Takahashi S., Tokiwa H., Shimano H.: Hepatocyte ELOVL Fatty Acid Elongase 6 Determines Ceramide Acyl-Chain Length and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice. *Hepatology*, 71(5):1609-1625,2020. doi: 10.1002/hep.30953.
- 3) Nakagawa Y., Wang Y., Han S.I., Okuda K., Oishi A., Yagishita Y., Kumagai K., Ohno H., Osaki Y., Mizunoe Y., Araki M., Murayama Y., Iwasaki H., Konishi M., Itoh N., Matsuzaka T., Sone H., Yamada N., Shimano H.: Enterohepatic Transcription Factor CREB3L3 Protects Atherosclerosis via SREBP Competitive Inhibition. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, S2352-345X(20)30183-1, 2020. doi:10.1016/j.jcmgh.2020.11.004.
- 4) Osawa T., Fujihara K., Harada Yamada M., Yamamoto M., Kitazawa M., Matsubayashi Y., Iwanaga M., Yamada T., Seida H., Kodama S., Nakagawa Y., Shimano H., Sone H.: Severity of hypertension as a predictor of initiation of dialysis among study participants with and without diabetes mellitus. *J. Investig. Med., jim-2020-001489*, 2020. doi: 10.1136/jim-2020-001489.

### ◆総説

- 1) 中川 嘉, 島野 仁. 糖尿病: 異所性脂肪に刮目せよ! 肝臓の異常脂肪蓄積. 糖尿病プラクティス, Vol. 37 (4):726-732, 2020 年 7・8 月. 医歯薬出版株式会社.

### ◆学会報告

(国内学会)

- 1) 中川 嘉. 腸管脂質代謝調節を制御する新たな転写調節制御機構の解明. 富山薬学研究会 2020 ; 2020, 11, 15 ; 富山大学.
- 2) 中川 嘉, 王 雨農, 韓 松伊, 水之江 雄平, 荒木雅弥, 関谷元博, 松坂 賢, 島野 仁. 腸肝転写因子 CREBH は SREBP の活性を制御し、動脈硬化発症を抑制する. 第 63 回日本糖尿病学会年次学術集会 ; 2020, 10, 5-16 ; Web 開催.
- 3) 松坂 賢, 久芳素子, 小安さおり, 本村香織, 大野 博, Rahul Sharma, 武内謙憲, 矢作直也, 宮本崇史, 関谷元博, 中川 嘉, 島野 仁. 肝臓特異的 Elovl6 欠損マウスの肝臓では C18-ceramide が減少することによりインスリン感受性が亢進する. 第 63 回日本糖尿病学

会年次学術集会 ; 2020, 10, 5-16 ; Web 開催.

#### ◆研究費取得状況

- 1) 科学研究費補助金 挑戦的研究 (萌芽)(代表：中川 嘉)「組織特異的 KO マウスを用いた SREBP-1a の小腸恒常性維持に対する機能解析」
- 2) 科学研究費補助金 基盤研究(C)(代表：金 俊達)「一酵素・二活性 (PRMT8) の生物学的意義の解明」
- 3) 科学研究費補助金 挑戦的研究(萌芽) (代表：島野 仁・筑波大学, 分担：中川 嘉)「脳形成におけるコレステロール合成系の生理意義の確定と病態への応用」
- 4) 科学研究費補助金 基盤研究(B)(代表：樋上賀一・東京理科大学, 分担：中川 嘉)「スプライシング調節によるエネルギー代謝の最適化を介した寿命制御」
- 5) 科学研究費補助金 基盤研究(C)(代表：岩崎 仁・筑波大学, 分担：中川 嘉)「非アルコール性脂肪肝発症における肝臓内細胞連関の解明」
- 6) 科学研究費補助金 基盤研究(C)(代表：韓 松伊・筑波大学, 分担：中川 嘉)「新規 SREBP-1 プロテアーゼ R4 による lipid-sensing 分子機構の解明」
- 7) 科学研究費補助金 基盤研究(C)(代表：牛木隆志・新潟大学, 分担：中川 嘉)「SOCS3 が制御する高脂肪誘発性 myeloid hematopoiesis の機序」
- 8) AMED CREST(代表：林 悠・京都大学, 分担：中川 嘉)「睡眠の質の変化が引き起こす個体の機能低下～睡眠構築の操作によるメカニズムの解明と応用～」
- 9) 科学研究費補助金 基盤研究(C)特設領域 (代表：岩崎 仁・筑波大学, 分担：中川 嘉)「血中エクソソームの脂質の量と質の変化からの生活習慣病病態の把握」
- 10) 科学研究費補助金 基盤研究(A)(代表：藤井宣晴・東京都立大学, 分担：中川 嘉)「運動の恩恵効果が骨格筋から分泌されるマイオカインによって媒介されることの証明」
- 11) 一般財団法人 代謝異常治療研究基金 研究助成金 (代表：中川 嘉)「過栄養応答脂質代謝調節と肝臓機能老化を繋ぐ新規機構の解明」
- 12) 公益財団法人 上原記念生命科学財団 研究助成金 (代表：中川 嘉)「栄養代謝異常から肝がん発症を繋ぐ栄養応答性制御因子」
- 13) 公益財団法人 先進医薬研究振興財団 循環医学分野研究助成 一般研究助成 (代表：中川 嘉)「腸肝脂質代謝と FGF21 による動脈硬化発症制御機構」
- 14) 公益財団法人 田村科学技術振興財団 上期研究助成金 (代表：中川 嘉)「新規栄養応答性がん関連遺伝子に着目した生活習慣病を起点とする肝がん発症メカニズムの解明」
- 15) 公益財団法人ひと・健康・未来研究財団 研究助成 (代表：中川 嘉)「高脂肪食誘導性肝がんを発症する新規モデルマウスの確立とその発症メカニズムの解明」

#### ◆研究室在籍者

学部3年生：松尾和哉

学部3年生：山田泰成



## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 未病分野

Division of Presymptomatic Disease

## 【未病創薬ユニット】

教授 小泉 桂一

Prof. Keiichi Koizumi

助教 条 美智子

Assist. Prof. Michiko Jo

研究員 犬嶋 明子

Postdoctoral Fellow Akiko Inujima

## 【情報科学ユニット】

特命准教授 奥 牧人

Spec. App. Assoc. Prof. Makito Oku

## ◆研究目的

日本の伝統医学（漢方医学）で未病として知られている疾病前状態は、東洋医学の概念であり、いまだ科学的に理解されていない。当分野では、発症過程における遺伝子、タンパク質、行動などの生体情報のゆらぎや発現変化を解析し、未病の状態を科学的に検出し、その生物学的意味を明らかにする研究を、富山大学未病研究センターと共同で行っている。メタボリックシンドロームなどの複合疾患の著しい増加に基づいて、現代の医薬品だけを使用してそれらを治療することは困難な状況である。一方で、疾病状態を標的とする現代の医薬品による治療とは対照的に、未病を標的とする医薬品は、予防および先制医療における大きな潜在的利点を持っている可能性がある。そのため、未病に対する医薬品の開発、ひいては新たな医療戦略を目指している。なお、本分野の研究は、富山大学未病研究センターと連携をとることで、効率的かつ迅速に遂行される仕組みとなっている。

<https://www.u-toyama.ac.jp/academics/rcpds/rcpds-center/>

## ◆2020 年度研究概要

## 1. 未病バイオロジーの深化

## 1. 生体情報のゆらぎの理解と医療応用

これまでに我々は、メタボリックシンドローム発症マウスにおいて、DNB 解析により発現量がゆらぐ遺伝子 (DNB 遺伝子) を検出した。現在、このゆらぎの状態を未病と捉え、その理解を行っている。本年度は、防風通聖散を投与したメタボリックシンドローム発症マウスにおいて、DNB 遺伝子の包括的な減少が明らかとなった (Koizumi et al., eCAM., 2020)。今後は、各臓器の DNB 遺伝子を検出することで、未病の臓器連関を解明する予定である。

## 2. 未病創薬

## 1. グルタミンナーゼ阻害剤の開発と疾患への医療応用

これまでに我々は、メタボリックシンドローム発症の超早期に発現するグルタミンナーゼ 1 (GLS1) を見出し、現在、未病状態での GLS1 の役割を解明している。本年度は、脂肪組織特異的 GLS1KO マウスを作製し、現在、高脂肪食摂取下での表現系の解析を実施中である。今後は、GLS1 と免疫活性化の関連性を解明する予定である。

## 2. 漢方薬から発見した免疫活性化ナノ粒子 (ナノソーム) の機能解明とその医療応用

これまでに我々は、漢方薬中にナノ粒子 (ナノソーム) を発見し、その薬効を解明している。本年度は、ナノソームが TLR4 を介してマウスマクロファージ細胞を活性化することが明らかとなった (Iitsuka et al., Biomed. Rep., 2020)。今後は、その他の受容体の関与さらには個体レベルでの免疫活性化効果を解明する予定である。

3. 漢方薬から発見した植物性の免疫活性化核酸断片 (BiND) の機能解明とその医療応用  
これまでに我々は、漢方薬中に熱安定性核酸を発見し、漢方薬の薬効におけるその機能を解析している。本年度は、BiND の由来生物種を次世代シーケンサーで解析した。BiND の免疫活性化機序および上記解析結果を含む論文を投稿準備中である。

#### ◆原著論文

##### 【未病創薬ユニット】

- 1) Koizumi K., Oku M., Hayashi S., Inujima A., Shibahara N., Chen L., Igarashi Y., Tobe K., Saito S., Kadowaki M., Aihara K.: Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2020: 9129134, 2020. doi:10.1155/2020/9129134.
- 2) Iitsuka H., Koizumi K., Suzaki M., Otsuka Y., Jo M., Shibahara N.: Immunostimulatory effects of cell wall-based nanoparticles in boiled Glycyrrhizae radix water extracts involves TLR4. *Biomed. Rep.*, 12(6):303-308, 2020. doi: 10.3892/br.2020.1294.

##### 【情報科学ユニット】

- 1) Koizumi K., Oku M., Hayashi S., Inujima A., Shibahara N., Chen L., Igarashi Y., Tobe K., Saito S., Kadowaki M., Aihara K.: Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2020: 9129134, 2020. doi:10.1155/2020/9129134.

#### ◆学会報告

##### 【未病創薬ユニット】

- 1) 吉田泰彦, 橋本統星, 平野真, 赤木淳二, 荒井哲也, 梶田恵介, 小泉桂一, 春木孝之. 肥満症の適応をもつ漢方薬および西洋薬の作用機序に関する網羅的な解析. 日本薬学会第 141 年会 ; 2021 Mar 29 ; オンライン.
- 2) 犬島明子, 小泉桂一, 柴原直利. 甘草の煎液に含まれる RNA は免疫調節機能をもつ. 日本薬学会第 141 年会 ; 2021 Mar 28 ; オンライン.

##### 【情報科学ユニット】

- 1) 奥牧人. 同期性揺らぎ遺伝子の二段階抽出におけるパラメータ調整法. 第 65 回バイオ情報学研究会 ; 2021 Mar 11 ; オンライン.

#### ◆その他

##### 【未病創薬ユニット】

- 1) 小泉桂一. DNB 理論によるメタボリックシンドロームの未病状態の検出と防風通聖散の効果. 第 41 回日本肥満学会 ・ 第 38 回日本肥満症治療学会学術集会アフタヌーンセミナー ; 2021 Mar 20 ; オンライン.

##### 【情報科学ユニット】

- 1) 三原弘, 岸裕幸, 足立雄一, 清水貴浩, 酒井秀紀, 奥牧人, 藤井厚子. 地方大学医療系キャンパスでのオンライン授業導入報告. *医学教育*, 51(3) : 255-257, 2020. doi: 10.11307/mededjapan.51.3\_255.
- 2) Oku M. Estimation of the critical transition probability using quadratic polynomial approximation. *Workshop on Critical Transitions in Complex Systems 2020*; 2020 Jul 31; online.

#### ◆受賞

##### 【情報科学ユニット】

- 1) 奥牧人 : SIGBIO 優秀プレゼンテーション賞「フローサイトメトリーデータ解析ための方

向制限付きアースムーバー距離の効率的な計算法」2020 Apr 7.

#### ◆共同研究

##### 【未病創薬ユニット】

(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～
- 2) Luonan Chen (Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, China, Professor): Medical applications in DNB theory, 2014～

(学内)

- 1) 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 藤井一希 (研究推進総合支援センター): アクアポリン1 遺伝子改変マウスの作製と表現型解析, 2020～
- 2) 春木孝之 (都市デザイン学部), 大嶋佑介 (工学部): DNB 解析による未病の検出, 2020～
- 3) 森 寿 (医学部), 中川 崇 (医学部), 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 笹岡利安 (薬学部), 戸邊一之 (医学部), 豊岡尚樹 (工学部): 種々の疾患に対する GLS1 の役割の解明と医薬品開発, 2020～

#### ◆研究費取得状況

##### 【未病創薬ユニット】

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (C) (代表: 条美智子, 新規)「漢方方剤による二次性リンパ浮腫改善機序の解明」
- 2) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (代表: 小泉桂一, 継続)「漢複雑系数理モデル理論による「未病」の検出と漢方薬の薬効機序解明」
- 3) 令和2年度橋渡し研究シーズ A (AMED) (代表: 小泉桂一, 継続)「グルタミンナーゼ阻害を基盤とした新規抗肥満症薬の開発」
- 4) 科研費基盤 B (代表: 小泉桂一, 分担: 奥牧人)「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～」
- 5) 共同研究費, レビアスファーマ (代表: 小泉桂一, 新規)「新規ナノ粒子の特性解明とその応用」
- 6) 共同研究費, 協和発酵バイオ (代表: 小泉桂一, 継続)「アミノ酸分解酵素阻害化合物の研究」
- 7) 共同研究費, 第一工業製薬 (代表: 小泉桂一, 継続)「天然物由来ナノ粒子の生理活性に関する研究」

##### 【情報科学ユニット】

- 1) 科研費基盤 B (代表: 小泉桂一, 分担: 奥牧人)「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～」

#### ◆研究室在籍者

##### 【未病創薬ユニット】

学部3年生: 田原旬

学部4年生: 町田雄大, 山崎萌絵

学部5年生: 鈴木瑞帆, 竹内すずか

学部6年生: 島田諒





## 研究開発部門

Department of Research and Development

## 国際共同研究分野

Division of International Cooperative Research

教授（兼）	早川 芳弘	Prof. Yoshihiro Hayakawa
客員教授	Shao-Qing Cai	Visiting Prof. Shao-Qing Cai
客員教授	Rungpetch C. Sakulbumrungsil	Visiting Prof. Rungpetch C. Sakulbumrungsil
客員教授	Meselhy Ragab Meselhy Zayed	Visiting Prof. Meselhy Ragab Meselhy Zayed
客員教授	合田 幸広	Visiting Prof. Yukihiro Goda
客員教授	川原 信夫	Visiting Prof. Nobuo Kawahara
客員教授	紺野 勝弘	Visiting Prof. Katsuhiko Konno

## ◆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・16機関と部局間協定を締結している。

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) Kohyama A., Yokoyama R., Dibwe D.F., El-Mekkawy S., Meselhy M.R., Awale S., Matsuya Y.: Synthesis of guggulsterone derivatives as potential anti-austerity agents against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30(7):126964, 2020.  
doi: 10.1016/j.bmcl.2020.126964.
- 2) Madi Y.F., Choucry M.A., El-Marasy S.A., Meselhy M.R., El-Kashoury E.A.: UPLC-Orbitrap HRMS metabolic profiling of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt; neuroprotective effect against AlCl<sub>3</sub>-induced neurotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 259:112930, 2020.  
doi: 10.1016/j.jep.2020.112930.
- 3) Emad A.M., Ali S.F., Abdel-Rahman E.A., Meselhy M.R., Farag M.A., Ali S.S., Abdel-Sattar E.A.: Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Apium graveolens* L. extracts mitigate against fatal acetaminophen-induced acute liver toxicity. *J. Food Biochem.*, e13399, 2020.  
doi: 10.1111/jfbc.13399.
- 4) Huang S., Xu F., Wang Y.Y., Shang M.Y., Wang C.Q., Wang X., Cai S.Q.: Improvement and Application of Acute Blood Stasis Rat Model Aligned with the 3Rs (Reduction, Refinement and Replacement) of Humane Animal Experimentation. *Chin. J. Integr. Med.*, 26(4):292-298, 2020.  
doi: 10.1007/s11655-014-2008-y.
- 5) Batsukh Z., Toume K., Javzan B., Kazuma K., Cai S.Q., Hayashi S., Atsumi T., Yoshitomi T., Uchiyama N., Maruyama T., Kawahara N., Komatsu K.: Characterization of metabolites in *Saposhnikovia divaricata* root from Mongolia. *J. Nat. Med.*, 75(1):11-27, 2021.  
doi: 10.1007/s11418-020-01430-9.

- 6) Gegentana, Xu F., Li .F.C., Zhang Y.F., Shen S.J., Yang P., Yang X.X., Shang M.Y., Liu G.X., Li Y.L., XuanWang, Cai S.Q.: Discovery of the active compounds of Smilacis Glabrae Rhizoma by utilizing the relationship between the individual differences in blood drug concentration and the pharmacological effect in rats. *J Ethnopharmacol.*, 258:112886. doi: 10.1016/j.jep.2020.112886.
- 7) Liu G.X., Xu F., Shang M.Y., Wang X., Cai S.Q.: The Relative Content and Distribution of Absorbed Volatile Organic Compounds in Rats Administered Asari Radix et Rhizoma Are Different between Powder- and Decoction-Treated Groups. *Molecules*, 25(19):4441. doi: 10.3390/molecules25194441.
- 8) El-Sawi S.A., Ezzat S.M., Aly H.F., Merghany R.M., Meselhy M.R.: Neuroprotective effect of *Salvia splendens* extract and its constituents against AlCl<sub>3</sub>-induced Alzheimer's disease in rats. *ADVANCES IN TRADITIONAL MEDICINE*, 20(3):381-393, 2020. doi: 10.1007/s13596-019-00421-w.
- 9) Li H.F., Li T., Yang P., Wang Y., Tang X.J., Liu L.J., Xu F., Shang M.Y., Liu G.X., Li Y.L., Wang X., Yin J., Cai S.Q.: Global Profiling and Structural Characterization of Metabolites of Ononin Using HPLC-ESI-IT-TOF-MSn After Oral Administration to Rats. *J. Agric Food Chem.*, 68(51):15164-15175, 2020. doi:10.1021/acs.jafc.0c04247.
- 10) Liu L.J., Li H.F., Xu F., Wang H.Y., Zhang Y.F., Liu G.X., Shang M.Y., Wang X., Cai S.Q.: Exploring the In Vivo Existence Forms (23 Original Constituents and 147 Metabolites) of Astragali Radix Total Flavonoids and Their Distributions in Rats Using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn. *Molecules*, 25(23):5560, 2020. doi: 10.3390/molecules25235560.
- 11) Suwannaprom P., Suttajit S., Eakanunkul S., Supapaan T., Kessomboon N., Udomaksorn K., Sakulbumrungsil R.: Development of pharmacy competency framework for the changing demands of Thailand's pharmaceutical and health services. *Pharm. Pract (Granada)*., 18(4):2141, 2020. doi: 10.18549/PharmPract.2020.4.2141.
- 12) Tuntayothin W., Kerr S.J., Boonyakrai C., Udomkarnjananun S., Chukaew S., Sakulbumrungsil R.: Development and Validation of a Chronic Kidney Disease Prediction Model for Type 2 Diabetes Mellitus in Thailand. *Value Health Reg. Issues*, 24:157-166, 2021. doi: 10.1016/j.vhri.2020.10.006.
- 13) Hyuga S., Hyuga M., Amakura Y., Yangi J., Mori E., Hakamatsuka T., Goda Y., Odaguchi H., Hanawa T.: Effect of Ephedra Herb on Erlotinib Resistance in c-Met-Overexpressing Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line, H1993, through Promotion of Endocytosis and Degradation of c-Met. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.*, 2020: 7184129, 2020. doi: 10.1155/2020/7184129.
- 14) Yoshida H., Usui A., Abe Y., Goda Y., Izutsu K.-i.: Relationship Between Geometric and Aerodynamic Particle Size Distributions in the Formulation of Solution and Suspension Metered-Dose Inhalers. *AAPS. PharmSciTech.*, 21(5):158, 2020. doi:10.1208/s12249-020-01675-3.
- 15) Uchiyama N., Hosoe J., Miura T., Sugimoto N., Ishizuki K., Yamada Y., Iwamoto Y., Suematsu T., Komatsu T., Maruyama T., Igarashi Y., Higano T., Shimada N., Goda Y.: Determination of Absolute Purities of Hygroscopic Substances by Quantitative NMR Analysis for the Standardization of Quantitative Reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 1). *Yakugaku Zasshi*, 140(8):1063-1069, 2020. doi:10.1248/yakushi.20-00066.
- 16) Takechi-Haraya Y., Goda Y., Izutsu K.-i., Sakai-Kato K.: Instrument-Dependent Factors Affecting the Precision in the Atomic Force Microscopy Stiffness Measurement of Nanoscale Liposomes. *Chem. Pharm. Bull.*, 68(5):473-478, 2020. doi: 10.1248/cpb.c20-00067.
- 17) Miyazaki T., Kanno H., Yamamoto E., Ando D., Izutsu K.-i., Goda Y.: Cold Flow Evaluation in Transdermal Drug Delivery Systems by Measuring the Width of the Oozed Adhesive. *AAPS. PharmSciTech.*, 21(4):120, 2020. doi:10.1208/s12249-020-01661-9.
- 18) Miura T., Sugimoto N., Bhavaraju S., Yamazaki T., Nishizaki Y., Liu Y., Bzhelyansky A., Amezcua C., Ray J., Zailer E., Diehl B., Gallo V., Todisco S., Ofuji K., Fujita K., Higano T., Geletneky C., Hausler T., Singh N., Yamamoto K., Kato T., Sawa R., Watanabe R., Iwamoto Y., Goda Y.:

- Collaborative Study to Validate Purity Determination by  $^1\text{H}$  Quantitative NMR Spectroscopy by Using Internal Calibration Methodology. *Chem. Pharm. Bull.*, 68(9):868-878, 2020.  
doi:10.1248/cpb.c20-00336.
- 19) Ishii-Watabe A., Shibata H., Suetomo H., Ikeda Y., Telikepalli S., Kiyoshi M., Hayashi Y., Muto T., Tanaka Y., Ueda S., Iwura T., Saitoh S., Aoyama M., Harazono A., Hyuga M., Goda Y., Torisu T., Uchiyama S.: Recent Achievements and Current Interests in Research on the Characterization and Quality Control of Biopharmaceuticals in Japan. *J. Pharm. Sci.*, 109(5):1652-1661, 2020.  
doi: 10.1016/j.xphs.2020.01.001.
  - 20) Hakamazuka T., Kamakura H., Watanabe J., katori Y., Matsumoto K., Ishimaru M., Morota T., Goda Y.: Bioequivalence Test between Kakkonto Extract Granules and Tablets in Healthy Volunteers. *Shoyakugaku Zasshi*, 74: 89-97, 2020.
  - 21) Goda Y.: Role and expected future development of the Japanese Pharmacopoeia. *Yakugaku Zasshi*, 140(6): 759-761, 2020. doi: 10.1248/yakushi.19-00253-1.
  - 22) Fujii I., Hashimoto M., Konishi K., Unezawa A., Sakuraba H., Suzuki K., Tsushima H., Iwasaki M., Yoshida S., Kudo A., Fujita R., Hichiwa A., Saito K., Asano T., Ishikawa J., Wakana D., Goda Y., Watanabe A., Watanabe M., Masumoto Y., Kanazawa J., Sato H., Uchiyama M.: Shimalactone Biosynthesis Involves Spontaneous Double Bicyclo-Ring Formation with  $8\pi$ - $6\pi$  Electrocyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 59(22):8464-8470, 2020.  
doi: 10.1002/anie.202001024.
  - 23) Abe Y., Yamamoto E., Yoshida H., Usui A., Tomita N., Kanno H., Masada S., Yokoo H., Tsuji G., Uchiyama N., Hakamatsuka T., Demizu Y., Izutsu K.-i., Goda Y., Okuda H.: Temperature-Dependent Formation of N-Nitrosodimethylamine during the Storage of Ranitidine Reagent Powders and Tablets. *Chem. Pharm. Bull.*, 68(10):1008-1012, 2020.  
doi: 10.1248/cpb.c20-00431.
  - 24) Yoshida K., Teppabut Y., Sawaguchi R., Nakane Y., Hayashi E., Oyama K.-i., Nishizaki Y., Goda Y., Kondo T.: 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflav-2-en-3-ol 3-O-glucoside, a new biosynthetic precursor of cyanidin 3-O-glucoside in the seed coat of black soybean, *Glycine max.* *Sci. Rep.*, 10(1):17184, 2020. doi:10.1038/s41598-020-74098-6.
  - 25) Izutsu K.-i., Usui A., Yamamoto E., Abe Y., Yoshida H., Goda Y.: Effect of Complex Coacervation with Hyaluronic Acid on Protein Transition in a Subcutaneous Injection Site Model System. *Chem. Pharm. Bull.*, 68(11):1109-1112, 2020. doi: 10.1248/cpb.c20-00585.
  - 26) Uchiyama N., Hosoe J., Sugimoto N., Ishizuki K., Koide T., Murabayashi M., Miyashita N., Kobayashi K., Fujimine Y., Yokose T., Ofuji K., Shimizu H., Hasebe T., Asai Y., Ena E., Kikuchi J., Kiyota K., Fujita K., Makino Y., Yasobu N., Yamada Y., Iwamoto Y., Miura T., Mizui K., Asakura K., Suematsu T., Kohama A., Goda Y.: Absolute Purity Determination of a Hygroscopic Substance, Indocyanine Green, Using Quantitative NMR (qNMR). *Chem. Pharm. Bull.*, 69(1):118-123, 2021. doi:10.1248/cpb.c20-00728.
  - 27) Hirasawa Y., Agawa-Kakimoto M., Zaima K., Uchiyama N., Goda Y., Morita H.: Complandine F, a novel dimeric alkaloid from *Lycopodium complanatum*. *J. Nat. Med.*, 75(2):403-407, 2021.  
doi: 10.1007/s11418-020-01476-9.
  - 28) Uchiyama N., Hosoe J., Miura T., Sugimoto N., Ishizuki K., Yamada Y., Iwamoto Y., Suematsu T., Komatsu T., Maruyama T., Igarashi Y., Higano T., Shimada N., Goda Y.: Determination of Absolute Purities of Hygroscopic Substances by Quantitative NMR Analysis for the Standardization of Quantitative Reagents in the Japanese Pharmacopoeia (Part 2). *Chem. Pharm. Bull.*, 69(1):26-31, 2021. doi:10.1248/cpb.c20-00296.
  - 29) Yamamoto E., Taquahashi Y., Kuwagata M., Saito H., Matsushita K., Toyoda T., Sato F., Kitajima S., Ogawa K., Izutsu K.-i., Saito Y., Hirabayashi Y., Iimura Y., Honma M., Okuda H., Goda Y.: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu\text{m}$  aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass

- spectrometry imaging. *Int. J. Pharm.*, 120241, 2021. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241.
- 30) Yoshitomi T., Wakana D., Uchiyama N., Tsujimoto T., Kawano N., Yokokura T., Yamamoto Y., Fuchino H., Hakamatsuka T., Komatsu K., Kawahara N., Maruyama T.: Identifying the compounds that can distinguish between *Saposhnikovia* root and its substitute, *Peucedanum ledebourielloides* root, using LC-HR/MS metabolomics. *J. Nat. Med.*, 74(3):550-560, 2020. doi: 10.1007/s11418-020-01409-6.
  - 31) Arita M., Fuchino H., Kawakami H., Ezaki M., Kawahara N.: Characterization of a New Antienterovirus D68 Compound Purified from Avocado. *ACS. Infect. Dis.*, 6(8):2291-2300, 2020. doi: 10.1021/acsinfectdis.0c00404.
  - 32) Matsumoto T., Tanaka D., Yoshimatsu K., Kawano N., Kawahara N., Maki S., Yamamoto S., Niino T.: Application of cryobanking for *Platycodon grandiflorum* in vitro axillary buds using cryo-plate methods. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2020. doi: 10.1007/s11627-020-10119-3.
  - 33) Yoshimatsu K., Kawano N., Nozaki K., Tsubota K., Kawahara N.: Development of efficient micropropagation system in *Cinnamomum cassia* Blume through plant tissue culture. *Aroma Res.*, 21 (3): 211-219, 2020.
  - 34) Yang L., Kirikoshi J., Sato D., Takasugi M., Hishida A., Hayashi S., Kawahara N., Mizukami M., Wu M., Yamagishi T., Arai H.: New isoflavone glucosides in yabumame (*Amphicarpa bracteata* (L.) Fernald subsp. *edgeworthii* (Benth.) H. Ohashi var. *japonica* (Oliv.) H. Ohashi) and their effect on leukotriene B4 production in mast cells. *J. Nat. Med.*, 75(1):28-36, 2021. doi:10.1007/s11418-020-01439-0.
  - 35) Kawakami H., Fuchino H., Kawahara N.: Endotoxin Contamination and Reaction Interfering Substances in the Plant Extract Library. *Biol. Pharm. Bull.*, 43(11):1767-1775, 2020. doi: 10.1248/bpb.b20-00489.
  - 36) Nose M., Tsutsui R., Hisaka S., Akiyama H., Inui T., Kawano N., Hayashi S., Hishida A., Fuchino H., Kudo T., Kawahara N., Yoshimatsu K.: Evaluation of the safety and efficacy of *Glycyrrhiza uralensis* root extracts produced using artificial hydroponic and artificial hydroponic-field hybrid cultivation systems III: anti-allergic effects of hot water extracts on IgE-mediated immediate hypersensitivity in mice. *J. Nat. Med.*, 74(2):463-466, 2020. doi:10.1007/s11418-019-01378-5.
  - 37) Inui T., Kawano N., Araho D., Tamura Y., Kawahara N., Yoshimatsu K.: Development of selection method for *Glycyrrhiza uralensis* superior clones with high-glycyrrhizic acid contents using DNA sequence polymorphisms in glycyrrhizic acid biosynthetic genes. *Plant Biotechnology*, 38:1-9, 2021. doi: 10.5511/plantbiotechnology.21.0112a.
  - 38) Fuchino H., Murase S., Hishida A., Kawahara N.: Simultaneous UHPLC/MS quantitative analysis and comparison of *Saposhnikovia* constituents in cultivated, wild and commercial products. *J. Nat. Med.*, 2021. doi:10.1007/s11418-021-01486-1.
  - 39) Fuchino H., Iida O., Kawano N., Kawahara N., Yoshimatsu K.: One-pot discriminant LC/MS quantitative analysis of ephedrine and pseudoephedrine using Finger Masher and their distribution in the aerial stems of *Ephedra* plants. *J. Nat. Med.*, 2021. doi: 10.1007/s11418-021-01494-1.
  - 40) Rádís-Baptista G., Dodou H.V., Prieto-da-Silva Á.R.B., Zaharenko A.J., Kazuma K., Nihei K., Inagaki H., Mori-Yasumoto K., Konno K.: Comprehensive analysis of peptides and low molecular weight components of the giant ant *Dinoponera quadriceps* venom. *Biol. Chem.*, 401(8):945-954, 2020. doi:10.1515/hsz-2019-0397.

## 臨床応用部門

Department of Clinical Application

教授（兼）	嶋田 豊	Prof. Yutaka Shimada
准教授（兼）	藤本 誠	Assoc. Prof. Makoto Fujimoto
助教（兼）	渡り 英俊	Assist. Prof. Hidetoshi Watari
客員准教授（兼）	貝沼 茂三郎	Visiting Assoc. Prof. Mosaburo Kainuma（～12月）
客員准教授（兼）	田原 英一	Visiting Assoc. Prof. Eiichi Tahara

## ◆研究目的

本部門は、医療用漢方製剤の新たな応用を目指した臨床試験、植物性医薬品の開発を目指した臨床試験を推進する。即ち、和漢医薬学総合研究所における基礎研究から得られたシーズを基に、附属病院の臨床研究管理センターと連携し、トランスレーショナルリサーチの推進を図る。また、診療における疑問点を和漢医薬学総合研究所にフィードバックし、リバーstransレーショナルリサーチへの橋渡しを図る。

## ◆2020年度研究概要

- ・医療用漢方製剤の新たな応用を目指した臨床試験
  - (1) 特定臨床研究「軽度アルツハイマー型認知症を対象とする八味地黄丸の認知機能に対する有効性と安全性を確認する探索的オープン標準治療対照無作為化割付多施設共同試験」に関して、本学での倫理審査の承認を得て症例登録を開始した。（和漢診療科 貝沼茂三郎特命教授）
  - (2) 特定臨床研究「メニエール病に対する苓桂朮甘湯のプラセボ対照無作為化二重盲検試験」の倫理審査の承認を得て試験開始に向けて準備中である。（和漢診療科 嶋田 豊教授、耳鼻咽喉科 將積日出夫教授）
  - (3) 特定臨床研究として申請を予定していた「芍薬甘草湯によるパクリタキセル誘発筋肉痛・関節痛緩和効果に関する二重盲検クロスオーバー試験」を医師主導型治験に変更し倫理審査申請に向けて準備中である。（産科婦人科 中島彰俊教授）
- ・植物性医薬品の開発を目指した臨床試験
  - (1) 「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」の倫理審査の承認を得て症例登録を開始した。（和漢研 東田千尋教授）
  - (2) 「ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスのプラセボ対照無作為化二重盲検試験」の成績を国際誌に発表した。（和漢研 東田千尋教授）
  - (3) 既に国際誌に発表している「健常成人を対象とした認知機能およびストレス抵抗性に対する骨碎補エキスとエゾウコギ葉エキス合剤の効果に関するプラセボ対照無作為化二重盲検試験」の成果をもとに、機能性表示食品開発の準備中である。（和漢研 東田千尋教授）
  - (4) 特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」の倫理審査の承認を得て試験開始に向けて準備中である。（和漢研 東田千尋教授、整形外科 川口善治教授）

## ◆原著論文

- 1) Nogami T., Fujimoto M., Watari H., Takamura A., Mihara H., Kimbara Y., Shibahara N., Shimada Y.: A comparative study of simulation-based and lecture-based learning in traditional Japanese (Kampo) medical education. *Int. Med. J.*, 27: 1-6, 2020.
- 2) 前田絢子, 吉野鉄大, 片山琴絵, 堀場裕子, 引網宏彰, 嶋田 豊, 並木隆雄, 田原英一, 南澤 潔, 村松慎一, 山口 類, 井元清哉, 宮野 悟, 美馬秀樹, 三村 将, 中村智徳, 渡辺賢治: 虚実中間証を含む虚実証の予測モデル. *日東医誌*, 71: 315-325, 2020.

- 3) Kainuma M., Matsumura C., Kawashiri T., Kobayashi D., Murakami A., Nakaguchi T., Namiki T., Shimazoe T.: Assessing the efficacy of a tongue image analyzing system (TIAS) for the objective diagnosis of static blood: An observational, retrospective, single - center study of Japanese Kampo medicine. *Tradit. Kampo Med.*, 7(3):146-152, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/tkm2.1255>.
- 4) Kainuma M., Funakoshi K., Ouma S., Yamashita K., Ohara T., Yoshiiwa A., Murata M., Tsuboi Y.: The efficacy and safety of hachimijiogan for mild Alzheimer disease in an exploratory, open standard treatment controlled, randomized allocation, multicenter trial: A study protocol. *Medicine (Baltimore)*, 99(38):e22370, 2020. doi: 10.1097/MD.00000000000022370.
- 5) Takayama S., Namiki T., Ito T., Arita R., Nakae H., Kobayashi S., Yoshino T., Ishigami T., Tanaka K., Kainuma M., Nochioka K., Takagi A., Mimura M., Yamaguchi T., Ishii T.: A multi-center, randomized controlled trial by the Integrative Management in Japan for Epidemic Disease (IMJEDI study-RCT) on the use of Kampo medicine, kakkonto with shosaikotokakikyosekko, in mild-to-moderate COVID-19 patients for symptomatic relief and prevention of severe stage: a structured summary of a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 21(1):827, 2020. doi: 10.1186/s13063-020-04746-9.

#### ◆症例報告

- 1) 野上達也, 久永明人, 金原嘉之, 渡り英俊, 藤本 誠, 柴原直利, 嶋田 豊 : 烏頭赤石脂丸が奏効した3症例. *日東医誌*, 71: 131-136, 2020.
- 2) 北原英幸, 野上達也, 渡り英俊, 金原嘉之, 藤本 誠, 柴原直利, 嶋田 豊 : 桂枝去桂加茯苓白朮湯が奏効したパニック症の一例. *日東医誌*, 71: 137-142, 2020.
- 3) 田原英一, 後藤雄輔, 吉永 亮, 井上博喜, 矢野博美 : 四物湯を含む処方が精神症状を改善した6症例. *日東医誌*, 71(2):94-101, 2020.
- 4) Yoshinaga R., Nakayasu K., Tahara E.: An ankle sprain with long-term swelling and pain successfully treated with the traditional Japanese herbal medicine Jidabokuippo: A case report. *J. Gen. Fam. Med.*, 21(6):261-263. doi:10.1002/jgf2.354.
- 5) Yoshinaga R., Gotoh Y., Tahara E.: Extensive Dermatitis Neglecta with Severe Atopic Dermatitis: A Case that Presented as a Suicide Attempt. *Gloval Dermatology*, 7:1-3, 2020. doi: 10.15761/GOD.1000227.
- 6) Yoshinaga R., Maki T., Goto Y., Inoue H., Yano H., Tahara E.: Discontinuation or reduction in benzodiazepine use by treatment with the traditional herbal medicine Hangekobokuto, case reports. *J. Gen. Fam. Med.*, 21(4):143-145, 2020. doi: 10.1002/jgf2.313.
- 7) 牧野利明, 関根麻理子, 田中耕一郎, 嶋田沙織, 地野充時, 田原英一 : 漢方製剤に関する薬局ヒヤリ・ハット事例. *日東医誌*, 71(4):394-401, 2020.

## 産官学連携部門

Department of Academia-Industry-Government Collaboration

教授（兼） 小泉 桂一 Prof. Keiichi Koizumi

### ◆目的

当研究所の使命の1つは、新薬の発見と開発であり、これには産業、政府、学際領域の協力が必要である。産官学連携部門は、医薬品開発を促進するために研究室の医薬品候補を発掘し、他の企業や公的機関にその候補を紹介し、さらに、これら医薬品候補を基盤に、起業を希望する当研究所の職員に対してのサポートを行う。なお、本部門の業務は、富山大学学術研究・産学連携本部と連携をとることで、効率的かつ迅速に遂行される仕組みとなっている。

<https://www.u-toyama.ac.jp/collaboration/cooperation/about/>

### ◆2020 年度活動概要活動概要

- (1) 産業および公的機関への技術移転の促進
- (2) ベンチャー育成

2021年3月12日（金）、オンライン形式において、以下の講演内容の産官学連携部門啓蒙セミナーを開催した。

1. 所長挨拶
2. 自身のベンチャー起業の経緯と現状の問題点：産官学連携部門 教授 小泉 桂一
3. 『研究者ひとりひとりの「熱」が新たなビジネスを生み出す～研究者集団リバナエスの取り組み～』：株式会社リバナエス 代表取締役社長 COO 高橋 修一郎
4. まとめ  
今後は本セミナーで紹介のあったベンチャー起業の実例及びリバナエス社が有する企業とアカデミアの共同研究を促進する仕組みを基に、研究所教員の意識向上と上記（1）および（2）の達成が期待される。

### ◆原著論文

- 1) Koizumi K., Oku M., Hayashi S., Inujima A., Shibahara N., Chen L., Igarashi Y., Tobe K., Saito S., Kadowaki M., Aihara K.: Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2020: 9129134, 2020. doi:10.1155/2020/9129134.
- 2) Iitsuka H., Koizumi K., Suzaki M., Otsuka Y., Jo M., Shibahara N.: Immunostimulatory effects of cell wall-based nanoparticles in boiled Glycyrrhizae radix water extracts involves TLR4. *Biomed. Rep.*, 12(6):303-308, 2020. doi: 10.3892/br.2020.1294.

### ◆共同研究

(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～
- 2) Luonan Chen (Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, China, Professor): Medical applications in DNB theory, 2014～

(学内)

- 1) 高雄啓三（研究推進総合支援センター）、藤井一希（研究推進総合支援センター）：アクアポリン1遺伝子改変マウスの作製と表現型解析，2020～
- 2) 春木孝之（都市デザイン学部）、大嶋佑介（工学部）：DNB解析による未病の検出，2020～

- 3) 森 寿 (医学部), 中川 崇 (医学部), 高雄啓三 (研究推進総合支援センター), 笹岡利安 (薬学部), 戸邊一之 (医学部), 豊岡尚樹 (工学部): 種々の疾患に対する GLS1 の役割の解明と医薬品開発, 2020～

◆研究費取得状況

- 1) 文部科学省科学研究費, 基盤研究 (B) (代表: 小泉桂一, 継続)「漢複雑系数理モデル理論による「未病」の検出と漢方薬の薬効機序解明」
- 2) 令和 2 年度橋渡し研究シーズ A (AMED) (代表: 小泉桂一, 継続)「グルタミンナーゼ阻害を基盤とした新規抗肥満症薬の開発」
- 3) 科研費基盤 B (代表: 小泉桂一, 分担: 奥牧人)「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～」
- 4) 共同研究費, レビアスファーマ (代表: 小泉桂一, 新規)「新規ナノ粒子の特性解明とその応用」
- 5) 共同研究費, 協和発酵バイオ (代表: 小泉桂一, 継続)「アミノ酸分解酵素阻害化合物の研究」
- 6) 共同研究費, 第一工業製薬 (代表: 小泉桂一, 継続)「天然物由来ナノ粒子の生理活性に関する研究」



## 和漢医薬教育研修センター

Kampo Education and Training Center

教授	柴原 直利	Prof. Naotoshi Shibahara
教授（兼）	嶋田 豊	Prof. Yutaka Shimada
教授（兼）	加藤 敦	Prof. Atsushi Kato
准教授（兼）	藤本 誠	Assoc. Prof. Makoto Fujimoto
助教（兼）	渡り 英俊	Assist. Prof. Hidetoshi Watari

### ◆研究目的

文部科学省は医学・薬学・看護教育のモデルコアカリキュラムにおいて漢方教育について記載しており、2018年の医学教育モデルコアカリキュラムには、「漢方医学の特徴と主要な漢方処方への適応及び薬理効果を概説できる」とある。このモデルコアカリキュラムに基づき、多くの医療系学部が漢方教育に取り組んでいるが、漢方医学的概念を理解して漢方医学教育を実践できる教員はほとんどいない。したがって、漢方教育が可能な教員の育成が必要である。そこで本センターは、(1) 漢方医学教育における研修システムを確立すること、(2) 医師および薬剤師に漢方臨床研修を提供することを目的としている。

### ◆2020年度研究概要

#### (1) 漢方医学教育

##### ① 和漢医薬学入門

医学部医学科、看護学科、薬学部薬学科、創薬学科の2年次の全学生を対象として和漢医薬学について講義するもので、2020年度はリモート形式で「人を診る・漢方診断学 漢方医学総論」とのテーマで講義を行った。

##### ② 東洋医学概論

薬学部薬学科及び創薬学科の3年次の学生を対象に東洋医学の基本的概念や診断・治療法について講義するもので、2020年度は10月より1月にかけて対面形式で講義を行った。

##### ③ 薬学実務実習

薬学部薬学科の5年次の学生を対象に、漢方専門外来に陪席して症例を通して診療の実際や薬剤について学習するもので、2020年度は9月より11月にかけて対面で実習を行った。

2021年度は①～③を継続するとともに、卓越薬学教育プログラム・和漢薬コースとして、和漢医薬学演習及び和漢医薬学実習も開講予定である。

#### (2) 漢方医学研修

##### ① 疾患別漢方ショートレクチャー

学内初期研修医と後期研修医及び医師、薬剤師、学生を対象とし、疾患毎の漢方方剤のエビデンスおよび頻用漢方薬を解説するもので、コロナ渦の影響で4～6月は中止したが、7月より再開し、「咳嗽の漢方治療」、「風邪に対する漢方治療」、「皮膚疾患に対する漢方治療」、「イライラ・不安・抑うつに対する漢方」、「漢方薬を処方するときの考え方」、「脳血管障害の漢方治療」、「食欲低下に使用される漢方薬」のテーマで開催した。

##### ② 和漢医薬研修プログラム

医師・薬剤師・鍼灸師の資格を有する医学部及び薬学部の教員を対象に、漢方医学関連講義や症例検討会、外来陪席による研修プログラムを実施するものだが、コロナ渦の影響もあり、今年度は参加希望者がみられなかった。

##### ③ 漢方診療研修

漢方に興味のある医師・薬剤師・鍼灸師を対象に、漢方専門外来に陪席して症例を通じた漢方診療を研修するものであるが、コロナ渦の影響もあり、今年度は参加希望者がみられなかった。

##### ④ 漢方専門医臨床研修

漢方専門医の取得を希望する医師を対象とし、基本領域専門医取得後より週1回以上の外来及び入院診療を通した3年間の臨床研修を実施するものだが、コロナ渦の影響もあり、今年度は参加希望者がみられなかった。

#### ⑤ 漢方診断研修

漢方を扱う富山県内の医師・薬剤師・鍼灸師を対象とし、提示した症例について追加質問事項を含めて漢方医学的診断に基づいた治療を研修するものである。偶数月に開催を予定していたが、コロナ渦の影響で4~5月は中止し、6月より再開して研修を実施した(2021年2月は降雪の影響で中止)。

#### ⑥ 漢方薬剤師研修

富山県内の漢方薬を扱う薬剤師に対し、附属病院薬剤部の協力の下、生薬や漢方調剤・服薬指導を研修するものだが、コロナ渦の影響もあり、今年度は実施できなかった。

2021年度は①及び⑤を継続するとともに、コロナ渦の影響を考えながら、②③④⑥の研修を開催したいと考えている。

### ◆原著論文

- 1) Nogami T., Fujimoto M., Watari H., Takamura A., Mihara H., Kimbara Y., Shibahara N., Shimada Y.: A Comparative Study of Simulation-Based and Lecture-Based Learning in Traditional Japanese (Kampo) Medical Education. *Int. Medical J.*, 27(3): 334-338, 2020.
- 2) Iitsuka H., Koizumi K., Suzaki M., Otsuka Y., Jo M., Shibahara N.: Immunostimulatory effects of cell wall-based nanoparticles in boiled *Glycyrrhizae radix* water extracts involves TLR4. *Biomed. Rep.*, 12(6):303-308, 2020. doi: 10.3892/br.2020.1294.
- 3) Koizumi K., Oku M., Hayashi S., Inujima A., Shibahara N., Chen L., Igarashi Y., Tobe K., Saito S., Kadowaki M., Aihara K.: Suppression of Dynamical Network Biomarker Signals at the Predisease State (Mibyō) before Metabolic Syndrome in Mice by a Traditional Japanese Medicine (Kampo Formula) Bofutsushosan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 9129134, 2020. doi: 10.1155/2020/9129134.
- 4) 前田 絢子, 吉野 鉄大, 片山 琴絵, 堀場 裕子, 引網 宏彰, 嶋田 豊, 並木 隆雄, 田原 英一, 南澤 潔, 村松 慎一, 山口 類, 井元 清哉, 宮野 悟, 美馬 秀樹, 三村 将, 中村 智徳, 渡辺 賢治: 虚実中間証を含む虚実証の予測モデル. *日東医誌*, 71: 315-325, 2020.
- 5) Martínez-Bailén M., Carmona A.T., Cardona F., Matassini C., Goti A., Kubo M., Kato A., Robina I., Moreno-Vargas A.J.: Synthesis of multimeric pyrrolidine iminosugar inhibitors of human  $\beta$ -glucocerebrosidase and  $\alpha$ -galactosidase A: First example of a multivalent enzyme activity enhancer for Fabry disease. *Eur. J Med. Chem.*, 192:112173, 2020. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112173.
- 6) Yan X., Shimadate Y., Kato A., Li Y. -X., Jia Y. -M., Fleet G.W.J., Yu C.-Y.: Synthesis of Pyrrolidine Monocyclic Analogues of Pochonicine and Its Stereoisomers: Pursuit of Simplified Structures and Potent  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase Inhibition. *Molecules*. 25(7):1498, 2020. doi: 10.3390/molecules25071498.
- 7) Okada T., Ozaki T., Kato A., Adachi I., Toyooka N.: A divergent entry to 1,2,3,9-tetrahydroquinolizidines. *Tetrahedron Lett.* ,61 (25) 152030, 2020. doi: 10.1016/j.tetlet.2020.152030
- 8) Kato A., Nakagome I., Hata M., Nash R.J., Fleet G.W.J., Natori Y., Yoshimura Y., Adachi I., Hirono S.: Strategy for Designing Selective Lysosomal Acid  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors: Binding Orientation and Influence on Selectivity. *Molecules*, 25(12):2843, 2020. doi: 10.3390/molecules25122843.

### ◆総説

- 1) 小田口 浩, 石毛 達也, 伊藤 雄一, 若杉 安希乃, 関根 麻理子, 花輪 壽彦, 並木 隆雄, 村松 慎一, 新井 信, 三瀨 忠道, 嶋田 豊, 柴原 直利, 折笠 秀樹. 漢方診断ロジック形式知化に向けて解決すべき5つの課題と漢方診療専門医療機関6施設の合意形成による解決案の

提示. 日東医誌, 71(3): 284-295, 2020.

#### ◆症例報告

- 1) Nogami T., Fujimoto M., Watari H., Shibahara N., Shimada Y.: Methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorder in Two Patients with Rheumatoid Arthritis Whose Treatment Included Kampo Medicines. *Int. Medical J.*, 27(6): 740-742, 2020.
- 2) 野上達也, 久永明人, 金原嘉之, 渡り英俊, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊. 烏頭赤石脂丸が奏効した3症例. *日東医誌*, 71(2): 131-136, 2020. doi: 10.3937/kampomed.71.131.
- 3) 北原英幸, 野上達也, 渡り英俊, 金原嘉之, 藤本誠, 柴原直利, 嶋田豊. 桂枝去桂加茯苓白朮湯が奏効したパニック症の一例. *日東医誌*, 71(2): 137-142, 2020. doi: 10.3937/kampomed.71.137.

#### ◆学会報告

(国内学会)

- 1) 柴原直利, 渡り英俊, 藤本誠, 嶋田豊. 随証治療が奏功した慢性疲労症候群(疑診)の1例. 第46回日本東洋医学会北陸支部例会; 2020 Oct 18; 金沢.
- 2) 藤本誠, 渡り英俊, 柴原直利, 嶋田豊. 月経周期に合わせて出現する右季肋部と右恥骨付近の疼痛が四味膠艾湯加枳実で軽快した一例. 第46回日本東洋医学会北陸支部例会; 2020 Oct 18; 金沢.

#### ◆その他

- 1) 柴原直利. 症例検討. 第54回漢方診断研究会; 2020 Jun 18; 富山.
- 2) 柴原直利. 漢方医学の基本的概念. 富山のくすし 2020年度第1回漢方医学と生薬講座; 2020 Jun 20; 富山.
- 3) 柴原直利. 婦人科疾患の漢方治療. 富山のくすし 2020年度第2回漢方医学と生薬講座; 2020 Jul 4; 富山.
- 4) 柴原直利. 高齢者の漢方治療. 富山のくすし 2020年度第3回漢方医学と生薬講座; 2020 Aug 1; 富山.
- 5) 柴原直利. 症例検討. 第55回漢方診断研究会; 2020 Aug 20; 富山.
- 6) 柴原直利. 感染症と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第4回漢方医学と生薬講座; 2020 Sep 5; 富山.
- 7) 柴原直利. 風邪に使用される漢方薬. 第12回疾患別漢方ショートレクチャー; 2020 Sep 10; 富山.
- 8) 柴原直利. 感染症と漢方治療. 第109回富山県耳鼻咽喉科臨床研究会; 2020 Sep 17; 富山.
- 9) 柴原直利. 漢方医学の基本的な考え方. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2020 Oct 3; 富山.
- 10) 柴原直利. 耳鼻咽喉科疾患と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第5回漢方医学と生薬講座; 2020 Oct 3; 富山.
- 11) 柴原直利. 皮膚疾患に対する漢方治療. 第13回疾患別漢方ショートレクチャー; 2020 Oct 8; 富山.
- 12) 柴原直利. 風邪の漢方治療. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2020 Oct 15; 富山.
- 13) 柴原直利. 症例検討. 第56回漢方診断研究会; 2020 Oct 17; 富山.
- 14) 柴原直利. 不眠症の漢方治療. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2020 Nov 7; 富山.
- 15) 柴原直利. 臨床で頻用される10方剤. 富山のくすし 2020年度第6回漢方医学と生薬講座; 2020 Nov 7; 富山.
- 16) 柴原直利. 症例検討. 第85回富山漢方談話会; 2020 Nov 17; 富山.
- 17) 柴原直利. 冬場の呼吸器疾患に用いる漢方薬. 福井漢方臨床講座; 2020 Nov 18; 福井.
- 18) 柴原直利. 認知症の漢方治療. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2020 Nov 21; 富山.

- 19) 柴原直利. 漢方薬の副作用・資料館見学. 富山大学公開講座 健康と漢方医学; 2020 Dec 5; 富山.
- 20) 柴原直利. 循環器疾患と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第7回漢方医学と生薬講座; 2020 Dec 5; 富山.
- 21) 柴原直利. 認知症と漢方治療. 専門看護セミナー (認知症看護); 2020 Dec 9; 富山.
- 22) 柴原直利. 症例検討. 第57回漢方診断研究会; 2020 Dec 17; 富山.
- 23) 柴原直利. 循環器疾患と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第7回漢方医学と生薬講座; 2020 Dec 5; 富山.
- 24) 柴原直利. 症例検討. 第58回漢方診断研究会; 2021 Feb 18; 富山.
- 25) 柴原直利. 脳血管障害の漢方治療. 第15回疾患別漢方ショートレクチャー; 2021 Feb 25; 富山.
- 26) 柴原直利. 整形外科疾患と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第8回漢方医学と生薬講座; 2021 Feb 27; 富山.
- 27) 柴原直利. 腎・泌尿器疾患と漢方治療. 富山のくすし 2020年度第9回漢方医学と生薬講座; 2021 Mar 13; 富山.
- 28) 柴原直利. 症例検討. 第86回富山漢方談話会; 2021 Mar 16; 富山.

#### ◆共同研究

(海外)

- 1) 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~
- 2) 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~

(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(鳥県立医科大学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) クラシエ製薬株式会社: 瘀血における漢方処方有用性の薬理的検討, 2014~
- 3) 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~

(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~
- 2) 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), 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～

◆研究室在籍者

学部3年生：鳥山花甫

学部4年生：榎並魁人

学部6年生：酒井玲菜

大学院博士2年：李一帆（10月入学）

大学院博士2年：宋迦楠（10月入学）



## 民族薬物資料館

Museum of Materia Medica

館長（教授） 森田 洋行      Curator / Prof. Hiroyuki Morita  
技能補佐員 出口 鳴美      Research Assist. 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 30,500 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。

#### II) 「民族薬物資料館」英語ホームページ刷新

ホームページを刷新した。

### ◆その他

- 1) 越中富山スペシャル「富山の薬売り 300 年の秘話」NHK 富山. 2020 May 27 ; 富山.
- 2) 「偉人たちの健康診断 SP 麒麟がくる SP」NHK BS プレミアム. 2020 Sep 5 ; 東京.  
生薬画像提供.

### ◆記録

#### I) 見学者 (2020 年 4 月 1 日 ~2021 年 3 月 31 日)

来館者総数 : 180 名 (日本人 180 名)

案内総回数 : 17 回 (日本人 17 回)

【国内】 国公立大学 3 校, 国内公立高校 2 校, 富山大学公開講座, 富山県, 製薬企業他

#### II) 民族薬物データベース (2020 年 4 月 1 日 ~2021 年 3 月 31 日)

アクセス数 : 37,727 件

#### III) 証類本草データベース (2020 年 4 月 1 日 ~2021 年 3 月 31 日)

アクセス数 : 3,358 件

専門検索登録者数 : 40 名





# 活動記録



## 2020年度 和漢医薬学総合研究所活動記録

- 6月10日 令和2年度第1回東西医薬学交流セミナー（兼第422回和漢医薬学総合研究所セミナー）  
藤坂 志帆 博士（附属病院 第一内科 助教）  
肥満・糖代謝異常における腸内細菌叢の位置づけ～防風通聖散による腸内細菌叢を介した血糖改善作用～
- 6月16日 慶應義塾大学マイクロバイオームチーム・富山大学和漢医薬学総合研究所オンライン合同セミナー
- 7月28日 令和2年度第1回和漢医薬学総合研究所 重点研究プロジェクト等合同集会
- 11月5日 令和2年度第2回和漢医薬学総合研究所 重点研究プロジェクト合同集会
- 11月16日 第423回和漢医薬学総合研究所セミナー  
長谷 耕二 博士（慶應義塾大学薬学部 薬学研究科 教授）  
腸を起点とした多臓器連関と生命恒常性維持
- 12月9日 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第10回交流セミナー  
（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，民族薬物資料館3階会議室，2会場接続）  
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－
- 1月27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）
- 2月10日 令和2年度第2回東西医薬学交流セミナー（兼第424回和漢医薬学総合研究所セミナー）  
中島 彰俊 博士（医学部医学科 産科婦人科学 教授）  
パクリタキセル誘導筋肉痛・関節痛に関する芍薬甘草湯の効果に関する臨床試験について
- 3月2日 第425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 所長）  
薬学の基礎「品質保証」と、品質保証を指向した天然物のメタボロミクス  
田原 英一 博士（(株)麻生 飯塚病院 東洋医学センター 漢方診療科部長）  
四物湯が情動に与える意義  
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長）  
薬用植物スクリーニングプロジェクトにおける植物及び生薬エキスライブラリーの構築とその応用研究
- 3月12日 和漢医薬学総合研究所 産官学連携部門啓蒙セミナー  
高橋 修一郎 博士（株式会社リバネス代表取締役社長 COO）  
研究者ひとりひとりの「熱」が新たなビジネスを生み出す～研究者集団リバネスの取り組み～



**2020年度  
共同利用・共同研究活動**



## 軸索修復の血漿バイオマーカーの研究

申請代表者	徳田 隆彦	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所 脳機能イメージング研究部	医長
所外共同研究者	建部 陽嗣	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子生命・医学部門 量子医科学研究所 脳機能イメージング研究部	研究員
研究統括者	東田 千尋	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	教授
所内共同研究者	楊 熙蒙	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	助教
所内共同研究者	稲田 祐奈	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域 (2020, 11～)	助教

### ■背景・目的

【現状】現在開発中の、アルツハイマー病(AD)の原因物質である Aβ や tau を標的にした治験薬では、認知機能改善効果が明確には認められずまだ承認に至ったものはない。病因物質をターゲットにした治療薬開発だけではADの克服は難しい。研究統括者・東田は、これまでの研究において、ADの機能を回復する本質的な戦略として神経回路網の破綻を修復により記憶障害を回復させることを目標年、軸索の修復・再伸展活性を有する非常に有望な化合物として Diosgenin を同定し、動物モデルにおける記憶改善効果も確認してきた。

【課題】しかしヒトでの証拠、すなわち Diosgenin が軸索伸展によってAD患者の認知機能障害を改善させるかについては未検討であった。

【目的】そこで本研究は、以下の2項目を目的とする。(1) 脳内の軸索変性の程度と相関することがヒトで実証されている neurofilament light(NF-L)量をマウスでも定量する。(2) 軸索を修復する神経回路再構築型の薬物(Diosgenin)が、アルツハイマー病の記憶障害を回復させられることをヒトで実証し、新しいAD根本的治療薬の開発につなげる。以上の取り組みによって、脳機能回復に本質的に必要な、変性軸索の修復と回路再構築の分子メカニズムを解明し、新しいコンセプトの根本的AD治療薬を提示する。

	徳田	東田・楊・稲田	
2019年度	軸索マーカーとしての血漿NF-Lの研究	軸索マーカーとしてのNF-Lの検証	MCIおよびAD患者での臨床研究の準備
2020年度	血漿NF-Lを定量する	MCIおよびAD患者での臨床研究の実施	

## ■結果・考察

### (1) アルツハイマー病モデルマウスでの研究

NF-L は、ミエリン化軸索に発現している中間径フィラメントで、軸索が断裂・変性すると、脳脊髄液や血中に増加し比較的長時間安定に検出される。AD の軸索変性に伴って血漿中 NF-L が増加すること、しかも発症 10 年前から増加が始まることが示され(Nature Med. (2019) 25; 277-283)、血漿 NF-L は、ヒトでの軸索変性の程度を非侵襲で追跡できる優れたバイオマーカーと位置付けられている。このように、血漿 NF-L が AD の発症と進行に伴って増加することは多くのグループが示しているが、何らかの抗 AD 候補薬投与によって血漿 NF-L が減少することが示された例は未だない。

そこで、まずアルツハイマー病態の進行と血漿 NF-L 量の関係を調べるため、生後 3, 6, 11 か月齢のアルツハイマー病モデル 5XFAD マウスから血漿を採取し、NF-L 量を超高感度 ELISA である Simoa で定量した (図 1)。野生型マウスでは生後 11 か月齢、5XFAD マウスでは生後 6 か月齢から血漿 NF-L が増加することが示された (図 2)。

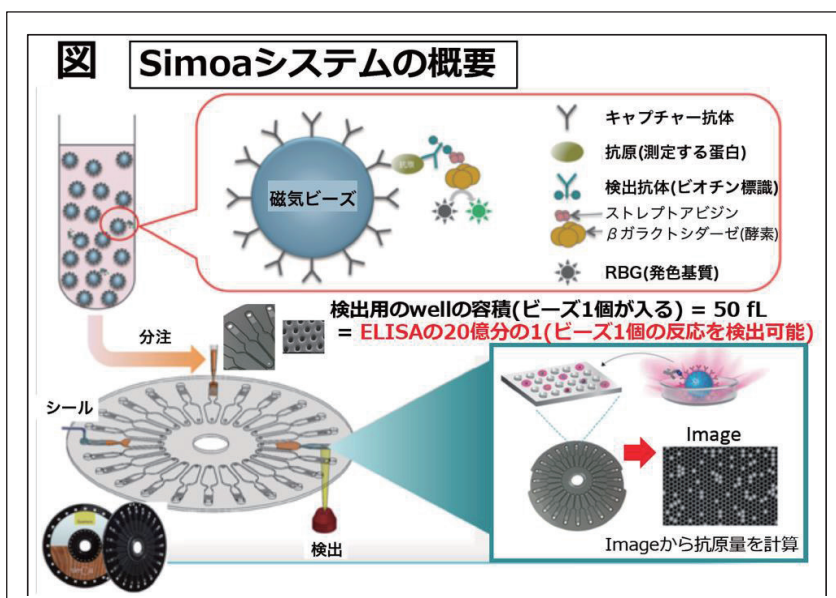


図 1 Simoa システムによる超高感度 ELISA

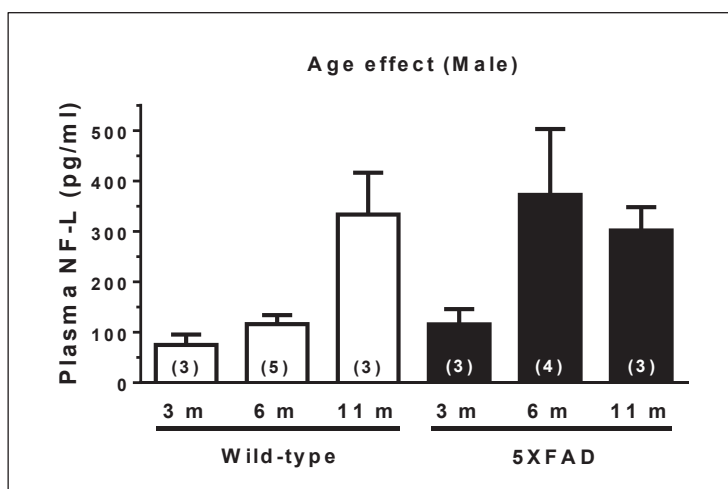


図 2 野生型マウスおよび 5XFAD マウスの月齢と血漿 NF-L



種目 (特定研究)

血漿中の NF-L が増加することは、脳内の NF-L 減少と関連すると考えられている。動物実験では安楽死後に脳を摘出し NF-L 発現量を調べることができる。そこで、Diosgenin ではないが、5XFAD マウスの記憶障害を改善する薬物を用いて脳内 NF-L 量の変化を調べた<sup>1)</sup>。Trigonelline を 9-11 か月齢の 5XFAD マウスに 14 日間経口投与すると、物体認知記憶障害、空間記憶障害が有意に改善された (図 3)。このマウスの大脳皮質および海馬の NF-L 発現量をウェスタンブロットにより定量したところ、野生型マウスに比べて 5XFAD マウス脳内で NF-L が減少すること、Trigonelline 投与群では NF-L が増加することが示された (図 4)。この結果は記憶障害改善と脳内 NF-L 増加が関連する可能性を示すものである。

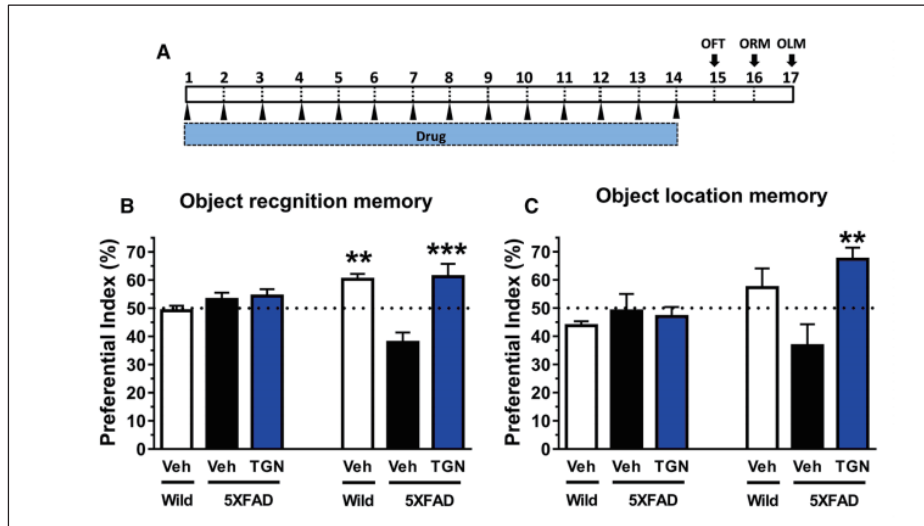


図 3 Trigonelline 経口投与による 5XFAD マウスの記憶障害改善 (論文 1 より引用)

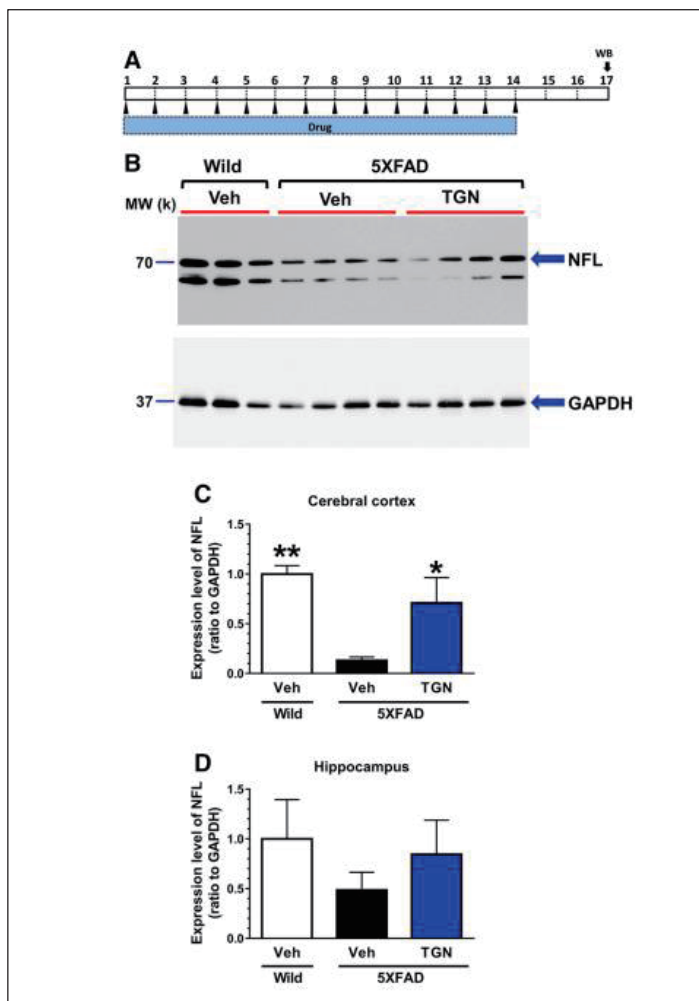


図 4 Trigonelline 投与による大脳皮質と海馬の NF-L 発現量 (論文 1 より引用)

## 種目（特定研究）

### （2）臨床研究

高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスを試験薬とした、特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」の申請を行い、富山大学倫理委員会の承認を受けた（2020年7月3日）。jRCTに登録の上、被験者リクルートを開始し、2021年3月31日現在、症例登録者数は4人、この後の初回スクリーニング予定者は約30人となっている（目標登録者数40人）。

#### 主要評価項目：

1) Mini Mental State Examination (MMSE)の質問項目の得点の合計を算出し、投与前後の得点の変化量を算出して群間比較する。

2) Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)を用い、記憶、言語、行為の3領域12項目（単語再生、単語遅延再生、口頭言語能力、言語の聴覚的理解、自発話における喚語困難、口頭命令に従う、手指及び物品呼称、構成行為、観念運動、見当識、単語再認、テスト教示の再生能力）の機能評価を行なう。これに加えて、前頭葉機能をより詳細に評価するため、Verbal Fluency Test (VFT) による「言語流暢性」の評価を行う。それぞれについて、投与前後の得点の変化量を算出し、群間比較する。

#### 副次評価項目：

1) 血漿 NF-L の定量を行う。NF-L は軸索を構成する中間系線維の一つであり、軸索変性に伴って血中に増えかつ安定的に検出され、しかもアルツハイマー病発症前から徐々に血漿中に増加し始めることが知られているバイオマーカーである。被験者脳内の神経軸索が器質的に修復されるかどうかを判断するものである。

#### 安全性の評価項目：

- 1) 一般血液検査を行う（検査項目：総タンパク、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、直接ビリルビン、間接ビリルビン、グルコース、総コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アミラーゼ、CK、ロイシンアミノペプチダーゼ、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼ、AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ、白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、血小板数、アルブミン、タンパク分画（ALB、A1-G、A2-G、B-G、G-G、A/G）。採血量は14 ml（5 ml、2 ml、7 ml の3本）とする。
- 2) その他有害事象

#### 試験薬の概要

研究薬名（一般名）：ヤマモ抽出物含有加工食品

剤形：ソフトカプセル

成分・含量：1日摂取目安量（6粒）あたり、機能性関与成分：ジオスゲニン 16.7 mg、添加物：オリーブ油、ゼラチン、グリセリン、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、カラメル色素、ビタミンE

貯法 直射日光：高温多湿を避けて、冷暗所にて保存してください。

用法・用量：1回3カプセルを朝食後と夕食後の1日に2回、計1日6カプセルを水または白湯で飲む。

ヒトにおける血漿 NF-L の測定に関して、種々の疾患で検証を積んだ。ダウン症候群の認知症はアルツハイマー病と類似した病理変化を示した年齢に伴い増加することが知られている。ダウン症候群患者の血漿 NF-L を定量した結果、年齢に伴い増加することを明らかにした<sup>2)</sup>（図5）。また、筋萎縮性側索硬化症

種目 (特定研究)

(ALS) 患者において、血漿 NF-L と脳脊髄液 NF-L が有意に増加し、血漿 NF-L 量により生命予後の判定も可能であることが示唆された<sup>3)</sup>(図6)。

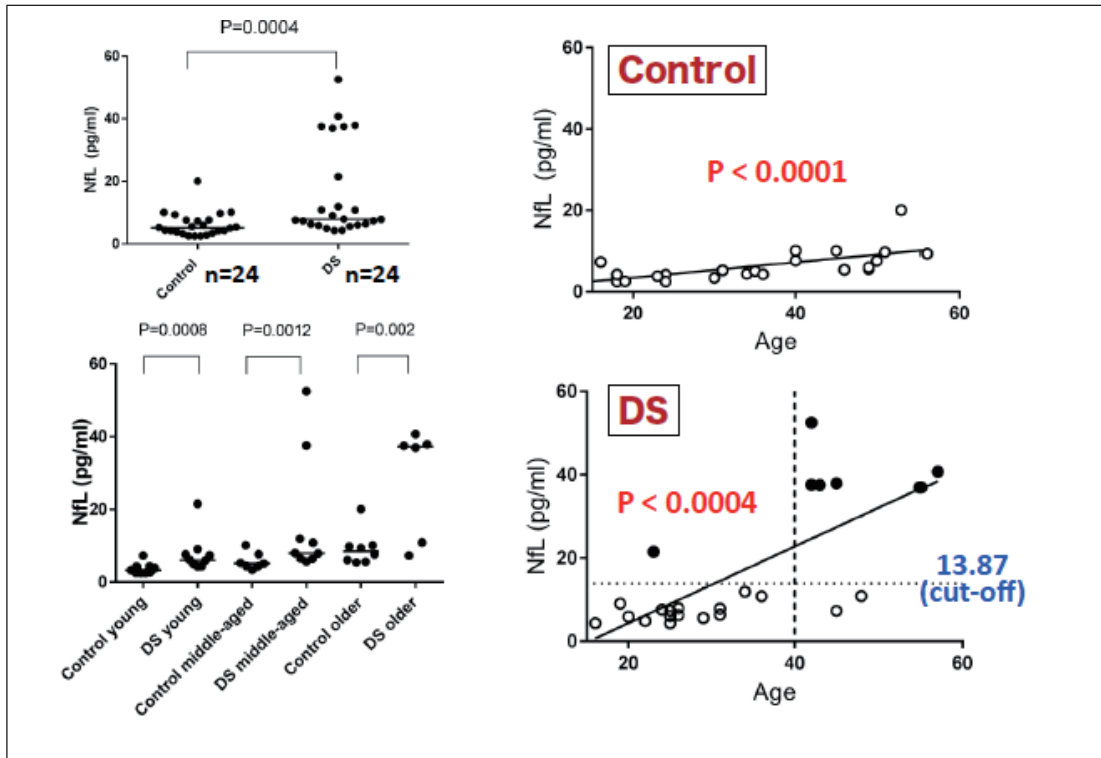


図5 ダウン症患者における血漿 NF-L (論文2 より改変)

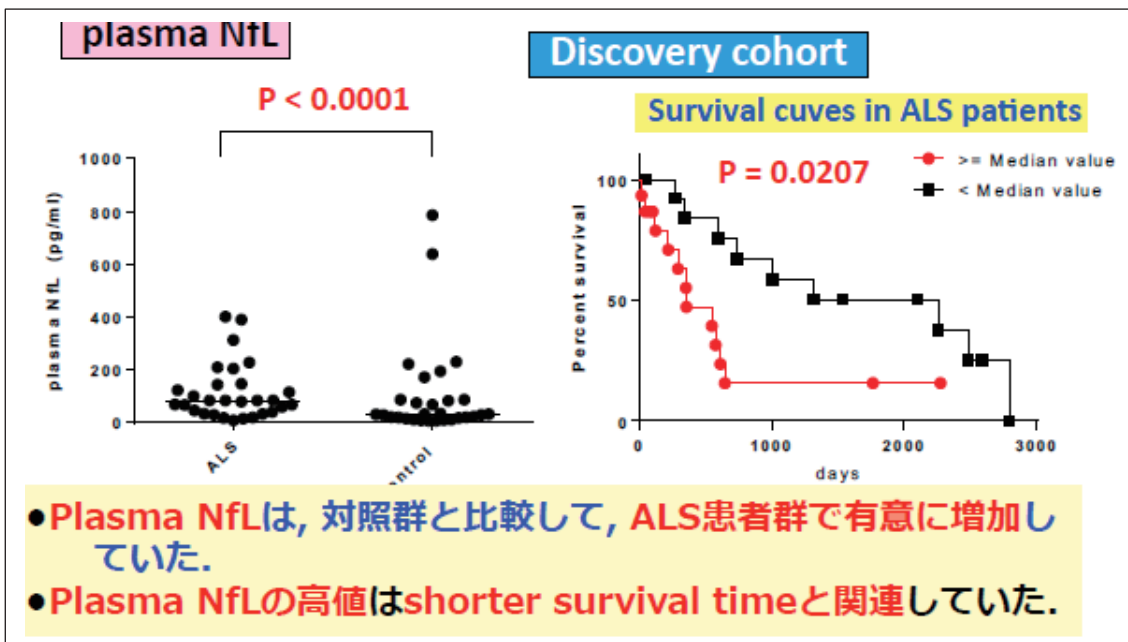


図6 ALS患者における血漿 NF-L (論文3 より改変)

## ■結論

神経変性疾患における軸索減少に伴い、脳内で減少し血漿中で増加することが示されている NF-L について検討した。血漿 NF-L が AD の進行に伴って増加する可能性が 5XFAD マウスでも示された。また、ヒト血漿を用いた NF-L 定量により、神経機能の低下と血漿 NF-L 増加が相関していることが示唆された。

高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスによる軽度認知障害および軽度アルツハイマー病患者に対する特定臨床研究の実施を進め症例登録数を増やした。全試験が終了するまで、認知機能や血漿 NF-L 濃度の評価結果は得られないため、現状では結果を考察できないものの、今後 1 年程度のうちに試験が終了する見込みである。

- 1) Farid M.M., Yang X., Kuboyama T., Tohda C. Trigonelline recovers memory function in Alzheimer's disease model mice: Evidence of brain penetration and target molecule. *Scientific Reports* (2020) 10, 16424.
- 2) Shinomoto M, Kasai T, Tatebe H, Kondo M, Ohmichi T, Morimoto M, Chiyonobu T, Terada N, Allsop D, Yokota I, Mizuno T, Tokuda T. Plasma neurofilament light chain: A potential prognostic biomarker of dementia in adult Down syndrome patients. *PLoS One*. (2019) 14(4):e0211575.
- 3) Kasai T, Kojima Y, Ohmichi T, Tatebe H, Tsuji Y, Noto YI, Kitani-Morii F, Shinomoto M, Allsop D, Mizuno T, Tokuda T. Combined use of CSF NfL and CSF TDP-43 improves diagnostic performance in ALS. *Ann Clin Transl Neurol*. (2019) 6(12):2489-2502.

## 軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能を評価する認知機能試験の研究

申請代表者	松井 三枝	金沢大学・国際基幹教育院	教授
所外共同研究者	稲田 祐奈	金沢大学・国際基幹教育院（～2020, 10）	研究員
研究統括者	東田 千尋	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	教授
所内共同研究者	楊 熙蒙	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	助教
所内共同研究者	稲田 祐奈	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域（2020, 11～）	助教

### ■背景・目的

【現状】現在開発中の、アルツハイマー病(AD)の原因物質である Aβ や tau を標的にした治験薬では、認知機能改善効果が明確には認められずいまだ承認に至ったものはない。病因物質をターゲットにした治療薬開発だけでは AD の克服は難しい。研究統括者・東田は、これまでの研究において、AD の機能を回復する本質的な戦略として神経回路網の破綻を修復により記憶障害を回復させることを目標年、軸索の修復・再伸展活性を有する非常に有望な化合物として Diosgenin を同定し、動物モデルにおける記憶改善効果も確認してきた。

【課題】しかしヒトでの証拠、すなわち Diosgenin が軸索伸展によって AD 患者の認知機能障害を改善させるかについては未検討であった。

【目的】そこで本研究は、軸索を修復する神経回路再構築型の薬物(Diosgenin)が、アルツハイマー病の記憶障害を回復させられることをヒトで実証し、新しい AD 根本的治療薬の開発につなげる。以上の取り組みによって、脳機能回復に本質的に必要な、変性軸索の修復と回路再構築の分子メカニズムを解明し、新しいコンセプトの根本的 AD 治療薬を提示する。また、東田・楊は、記憶障害を発症した AD モデルの 5XFAD マウスにおける Diosgenin 投与の効果の継続期間、また Diosgenin の効果的な脳移行性についてなどを動物実験で検討する。

	松井・稲田	東田・楊	
2019年度	認知機能試験に影響を与える要因を検討する	MCIおよびAD患者での臨床研究の準備	ADモデルマウスにおける Diosgeninの記憶改善作用の継続性を検討する
2020年度	認知機能を測定する	MCIおよびAD患者での臨床研究の実施	ADモデルマウスにおける Diosgeninの脳移行性について検討する

## ■結果・考察

### （1）臨床研究

高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスを試験薬とした、特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」の申請を行い、富山大学倫理委員会の承認を受けた（2020年7月3日）。jRCTに登録の上、被験者リクルートを開始し、2021年3月31日現在、症例登録者数は4人、この後の初回スクリーニング予定者は約30人となっている（目標登録者数40人）。また試験開始に先立ち、認知機能検査をRBANSからADAS-cogに変更した。ADAS-cogは、軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能の検出に国際的に最も広く使用されている評価法であり、患者が被験者である研究での実績が高い。これに前頭葉機能をより詳細に評価するために Verbal Fluency Test を追加することで、評価法全体の精度を高め、認知障害における試験薬の効果をより精度よく検出できる。稲田は、ADAS-cog 実施者の資格を取得した。

#### 主要評価項目：

1) Mini Mental State Examination (MMSE)の質問項目の得点の合計を算出し、投与前後の得点の変化量を算出して群間比較する。

2) Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)を用い、記憶、言語、行為の3領域12項目（単語再生、単語遅延再生、口頭言語能力、言語の聴覚的理解、自発話における喚語困難、口頭命令に従う、手指及び物品呼称、構成行為、観念運動、見当識、単語再認、テスト教示の再生能力）の機能評価を行なう。これに加えて、前頭葉機能をより詳細に評価するため、Verbal Fluency Test (VFT) による「言語流暢性」の評価を行う。それぞれについて、投与前後の得点の変化量を算出し、群間比較する。

#### 副次評価項目：

1) 血漿 NF-L の定量を行う。NF-Lは軸索を構成する中間系線維の一つであり、軸索変性に伴って血中に増えかつ安定的に検出され、しかもアルツハイマー病発症前から徐々に血漿中に増加し始めることが知られているバイオマーカーである。被験者脳内の神経軸索が器質的に修復されるかどうかを判断するものである。

#### 安全性の評価項目：

1) 一般血液検査を行う（検査項目：総タンパク、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、直接ビリルビン、間接ビリルビン、グルコース、総コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、ナトリウム、カリウム、クロール、アミラーゼ、CK、ロイシンアミノペプチダーゼ、 $\gamma$ -GTP、コリンエステラーゼ、AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ、白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、血小板数、アルブミン、タンパク分画（ALB、A1-G、A2-G、B-G、G-G、A/G）。採血量は14ml（5ml、2ml、7mlの3本）とする。

2) その他有害事象

#### 試験薬の概要

研究薬名（一般名）：ヤマモ抽出物含有加工食品

剤形：ソフトカプセル

成分・含量：1日摂取目安量（6粒）あたり、機能性関与成分：ジオスゲニン 16.7mg、添加物：オリーブ油、ゼラチン、グリセリン、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、カラメル色素、ビタミンE

貯法 直射日光：高温多湿を避けて、冷暗所にて保存してください。

用法・用量：1回3カプセルを朝食後と夕食後の1日に2回、計1日6カプセルを水または白湯で飲む。

種目（特定研究）

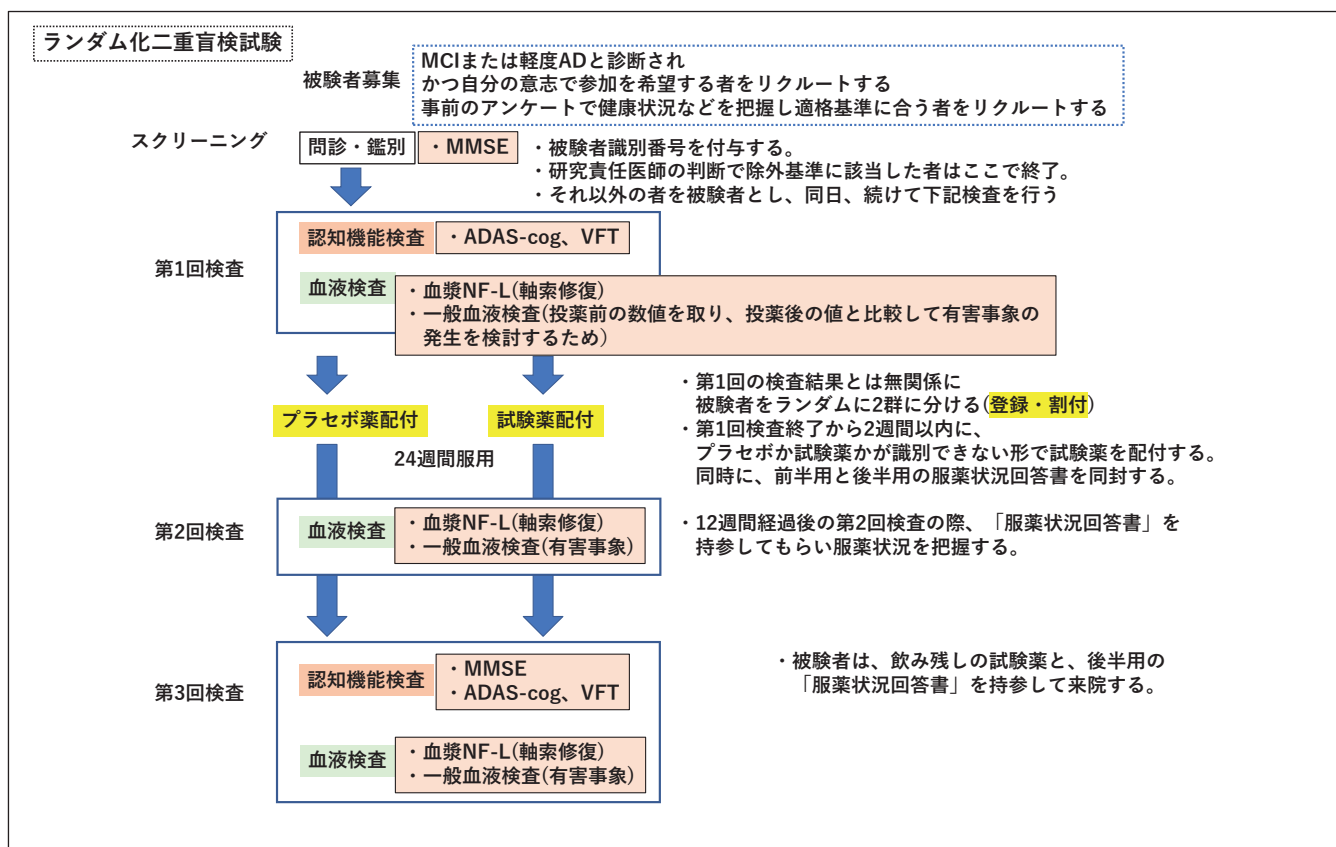


図1 本特定臨床研究のフロー

また、本共同研究チームが2019年度に実施した別の臨床研究「認知機能およびストレス抵抗性に対する骨碎補エキスとエゾウコギ葉エキス合剤の効果の研究」における検討の中で、松井・稲田は、認知機能の解析を行い、この共同臨床研究は論文として公開された<sup>1)</sup>。

(2) マウスでの研究

**Diosgenin による記憶障害改善作用の持続性**

生後5か月齢のアルツハイマー病モデルマウス5XFADにDiosgeninを0.1 μmol/kgの用量で2週間、経口投与した。投与終了後、1日後、8日後、15日後、29日後、57日後の各時点で、インターバル時間1時間の条件で物体認知記憶試験を行った。野生型マウスに比べて、5XFADマウスの溶媒投与群では、いずれの時点でも物体認知記憶が損なわれていた。これに対し、Diosgenin投与による記憶障害の有意な改善が投与終了後1日後から29日後まで認められた(図2)。この結果は、Diosgeninによる記憶障害改善作用が弾薬後少なくとも29日間は継続していることを示している。5XFADマウスでは、月齢とともに記憶障害の悪化が進行するが、Diosgeninの断薬後も持続する記憶改善作用は、Diosgeninによって脳内の器質的回復が起きていることを示唆するものである。

種目 (特定研究)

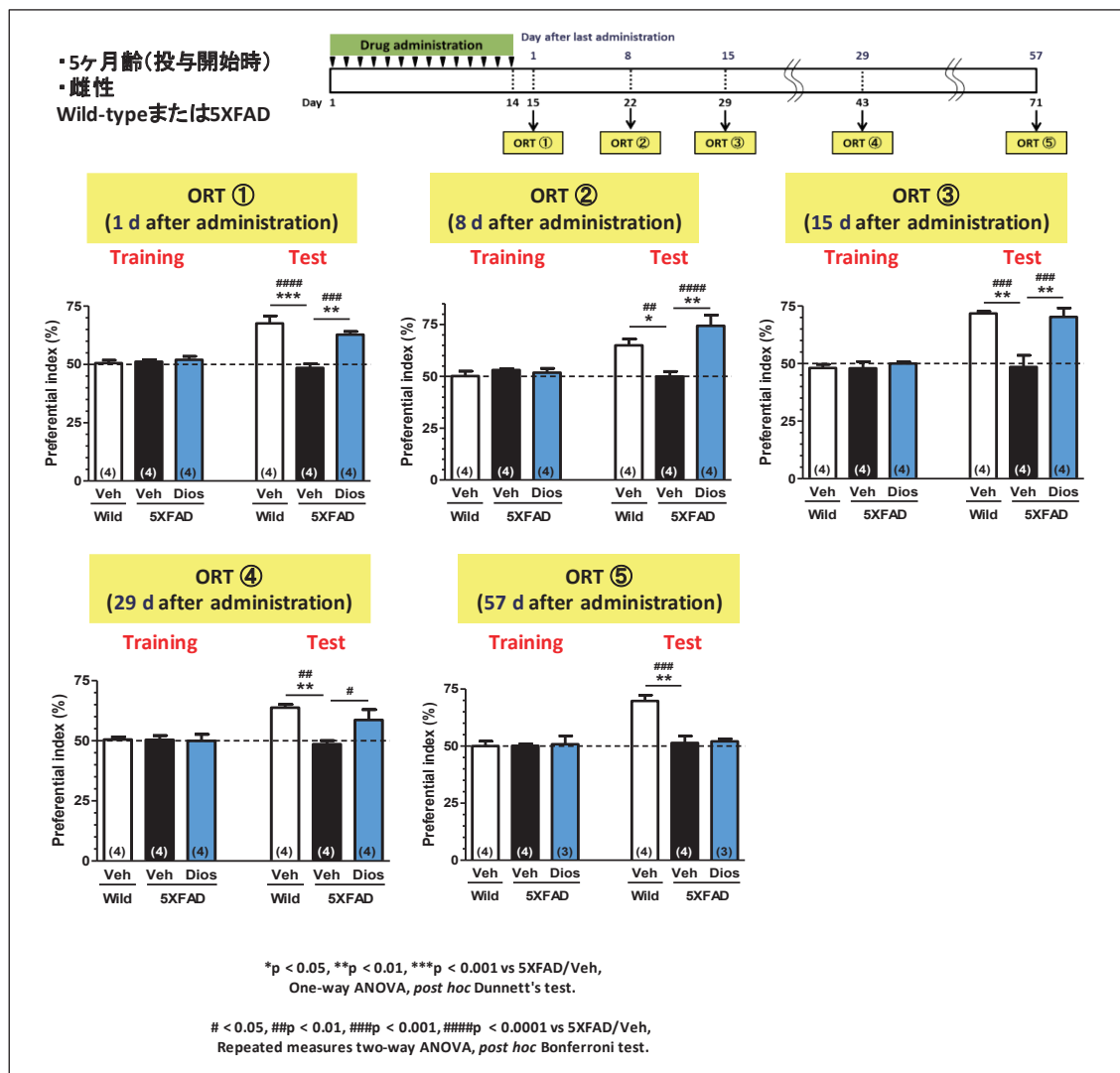


図2 Diosgenin 経口投与後の断薬期間と記憶改善作用の継続性

記憶障害を改善しうる山薬エキスの検討<sup>2)</sup>

日本薬局方で規定されている山薬 (*Dioscorea batatas* の根茎) を用いて、熱水抽出エキスを作製した。この山薬水エキス中の Diosgenin 含量を LC-MS 法で検討したところ、検出できるほどの Diosgenin は含まれていなかった。また以前の我々の研究では、山薬成分と言われている Diosgenin を正常マウスに経口投与すると、記憶能力が向上することが示されている。そこで、山薬水エキスの記憶能力向上効果を調べた。正常マウスに、水 (対照群)、山薬水エキス(100 mg/kg/day)、あるいは同じ山薬水エキス(100 mg/kg/day)に Diosgenin(16 mg/kg/day)を足して投与する群を比較した。7日間の経口投与後、物体認知記憶試験を行うと、山薬エキス+Diosgenin の群では、溶媒のみ投与の対照群と比べて認知機能が向上した。一方、山薬エキスのみ投与群では全く効果が見られなかった (図 3)。この時のマウス脳内への Diosgenin 移行を検出したところ、山薬エキス+Diosgenin 投与マウスの脳内には Diosgenin が検出されたが、山薬エキスのみ投与マウスでは、血中にも脳内にも Diosgenin は全く検出されなかった。また加工処理により Diosgenin を高濃度(16%) 含有する山薬エキスをオリーブ油を溶媒としてマウスに経口投与すると、Diosgenin が脳移行し、物体認知機能が向上することも示された。一連の結果は、Diosgenin の効果を山薬エキスなど植物エキスに期



種目 (特定研究)

待するには、もともと Diosgenin 含量の高い植物を選ぶか、Diosgenin 含量を高めるエキス作製を行う必要があることを示す。加えて、山薬中の Diosgenin 以外の成分には、認知機能向上の効果がないことも示唆された。

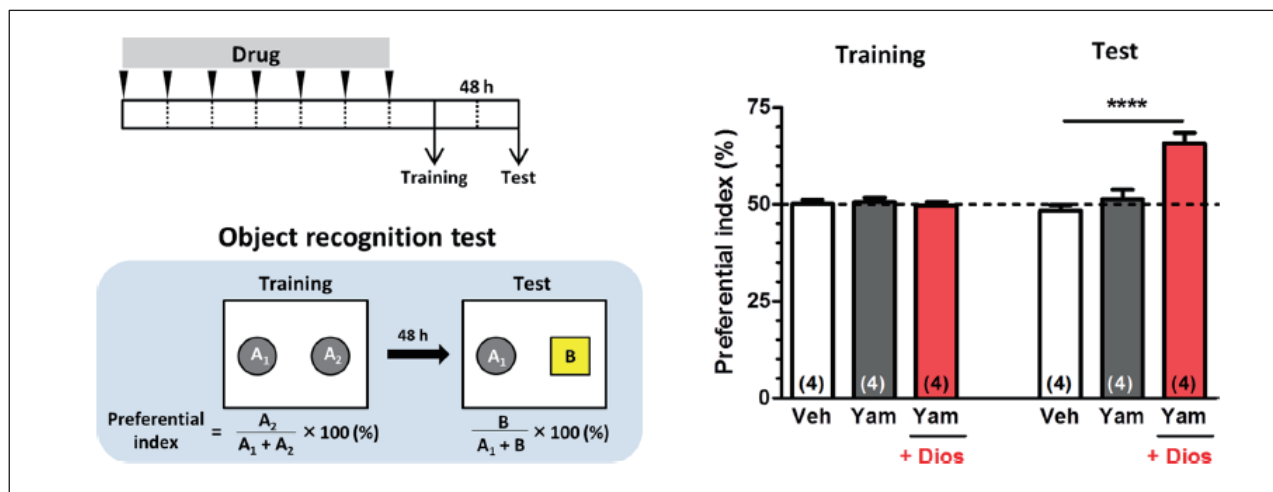


図 3 Diosgenin が検出されない山薬エキスの投与では正常マウスの記憶力向上作用が見られない (論文 2 より引用)

**Diosgenin を脳移行させる溶媒の検討<sup>3)</sup>**

Diosgenin の生物学的利用率は低いことがよく知られているが、我々の以前の研究では、Diosgenin をオリーブ油に溶解させて経口投与すると、脳に良く移行し記憶促進作用も認められた。そこで、油脂の違いによる脳移行性の差異を調べるため、オリーブ油、魚油、中鎖脂肪酸トリグリセリドのそれぞれに Diosgenin を溶解させたときの、経口投与後の血漿移行量と脳移行量を調べた。Diosgenin の血漿移行量(図 4)と脳移行量 (図 5) は、オリーブ油に溶解した場合が極めて高く、魚油はそれに比べると少なかった。中鎖脂肪酸トリグリセリドではさらに、Diosgenin の移行量が低かった。この結果は、溶媒として用いる油脂の違いにより、経口投与後に血中および脳へ移行する Diosgenin の量が異なることを示す。

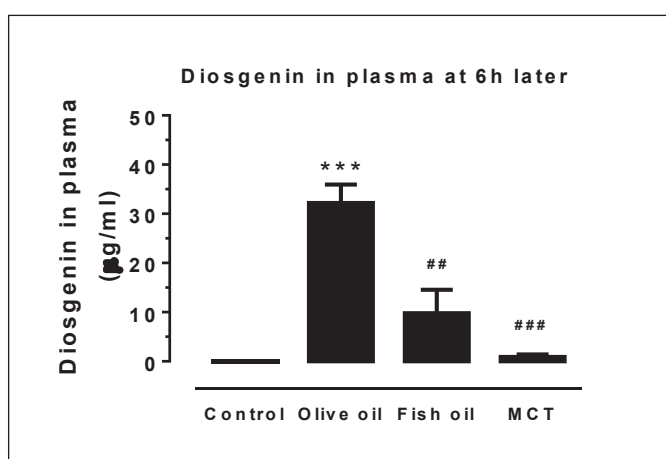


図 4 Diosgenin 経口投与 6 時間後の血漿中濃度 (いずれも論文 3 より引用)

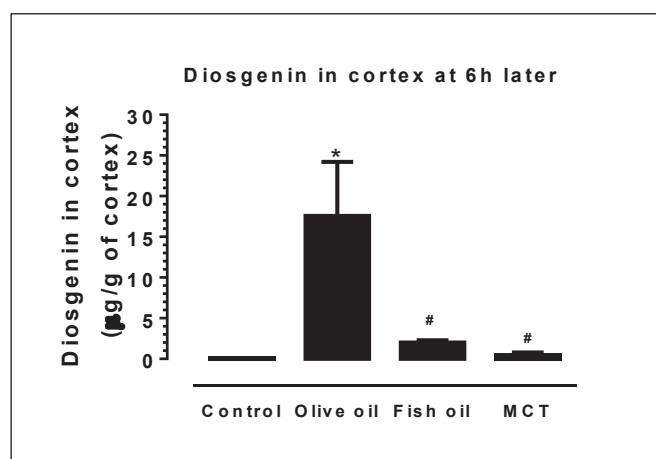


図 5 Diosgenin 経口投与 6 時間後の大脳皮質濃度

## ■結論

特定臨床研究の実施を進め症例登録数を増やした。全試験が終了するまで、認知機能や血漿 NF-L 濃度の評価結果は得られないため、現状では結果を考察できないものの、今後 1 年程度のうちに試験が終了する見込みである。

5XFAD マウスの検討では、Diosgenin による記憶障害改善作用が器質的修復によって表れている可能性が示された。また、Diosgenin を経口投与で脳に移行させる効果的な溶媒として、脂質の中でも特にオリーブ油が優れていることが示された。また、常法で抽出した山薬エキスには Diosgenin が含有されていないが、Diosgenin が高濃度含有されている山薬エキスをオリーブ油を溶媒として経口投与すれば、Diosgenin の脳移行が確認され記憶能力向上も認められた。実施中の臨床研究では、高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスをオリーブ油に溶かしてカプセル化しており、この製剤の妥当性を動物実験で証明したことになる。

- 1) Tohda C, Matsui M, Inada Y, Yang X, Kuboyama T, Kimbara Y, Watari H. Combined treatment with two water extracts of *Eleutherococcus senticosus* leaf and rhizome of *Drynaria fortunei* enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind study in healthy adults. *Nutrients* (2020) 12, 303.
- 2) Yang X, Nomoto K, Tohda C. Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of Yam extracts. *Journal of Natural Medicines* (2021) 75(1):207-216.
- 3) Tohda C, Yang X, Nomoto K. Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety* (2020) 27(2), 102-105.

## がん免疫療法における補剤の有用性に関する基礎研究

申請代表者	磯濱 洋一郎	東京理科大学 薬学部	教授
所外共同研究者	堀江 一郎	山口東京理科大学 薬学部	講師
研究統括者	早川 芳弘	研究開発部門病態制御分野野生体防御学領域	教授

### ■背景・目的

十全大補湯、補中益気湯および人参養栄湯などの補剤とよなれる漢方方剤は、病的状態での体力や栄養状態の改善を目的に処方されることが多い。一方、これらの方剤には免疫活性化作用があることも知られており、腫瘍免疫の活性化作用や補中益気湯によるインフルエンザワクチンに対するアジュバント効果などが示されている。我々は、これら補剤による免疫活性化作用の一部は、担がん状態などに分化誘導される骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）の抑制ではないかとの仮説のもと研究に着手し、昨年度までに人参養栄湯および十全大補湯が骨髄前駆細胞から MDSC の分化を抑制する効果を持つことを *in vitro* の実験系で明らかにしてきた。一方、MDSC は腫瘍組織や炎症部位などに遊走することで免疫抑制機能を発揮するが、遊走先の微小環境によってその活性が変化することも予想される。そこで今年度は、この MDSC 分化抑制作用の実効性を担がん動物を用いて検証するとともに、MDSC の免疫抑制活性の調節機構並びに MDSC 活性に対する補剤の直接的な作用を検討した。

### ■結果・考察

まず、人参養栄湯および十全大補湯による MDSC 分化抑制作用を、担がんマウスを用いた *in vivo* 実験で調べた。Balb/c 系の雄性マウス（6 週齢）の背部皮下に Matrigel®中に懸濁した 4T1-Luc2 乳がん細胞を  $1 \times 10^5$  個投与し、その後、3~6 日目に十全大補湯あるいは人参養栄湯（40 mg/mouse）を 1 日 1 回経口投与し、7 日目の骨髄および脾臓中の MDSC 数および腫瘍サイズを計測した。4T1-Luc2 細胞の移植によって、両臓器中の MDSC 数は健常動物の約 2 倍と著明に増加した（図 1A および B）。これに対し、人参養栄湯および十全大補湯（各々 40 mg）を投与したマウスでは、コントロール群に比べ低値を示す傾向にはあったものの、予想に反して統計学的な違いは得られなかった。しかし、7 日目に測定した腫瘍サイズは、十全大補湯および人参養栄湯を投与した動物では、コントロールの約 1/3 と著明に縮小され（図 1C）、明確な腫瘍成長抑制作用が観察された。

これまでに、補剤による腫瘍成長抑制の機序は免疫系の活性化に基づくことが示されており、特に人参養栄湯および十全大補湯ではマクロファージおよび T 細胞の関与が示唆されている。これらの免疫細胞種は、MDSC によって抑制されることがよく知られている。そこで次に、これらの補剤が MDSC の活性に影響するか否かを調べた。MDSC は免疫抑制因子として arginase-1 および一酸化窒素（NO）を産生する。単離したマウスの骨髄細胞を IL-6（40 ng/ml）および GM-CSF（40 ng/ml）存在下に 3 日間培養し、MDSC へと分化させた細胞標本を用いて、その後、これらの方剤エキスの存在下にさらに 3、6、12 あるいは 24 時間培養した。その結果、両方剤は arginase-1 の mRNA 発現を作用時間依存的に低下させ、12 時間以上の処理によってコントロールの約 1/5 となった（図 2A）。一方、iNOS の mRNA 量については今回の検討では著明な作用は認めなかった（図 2B）。すなわち、人参養栄湯および十全大補湯は、MDSC の分化を抑制するのみならず、arginase-1 の発現を抑制することにより、本細胞による免疫抑制作用を強力に阻害すると推定された。

種目（特定研究）

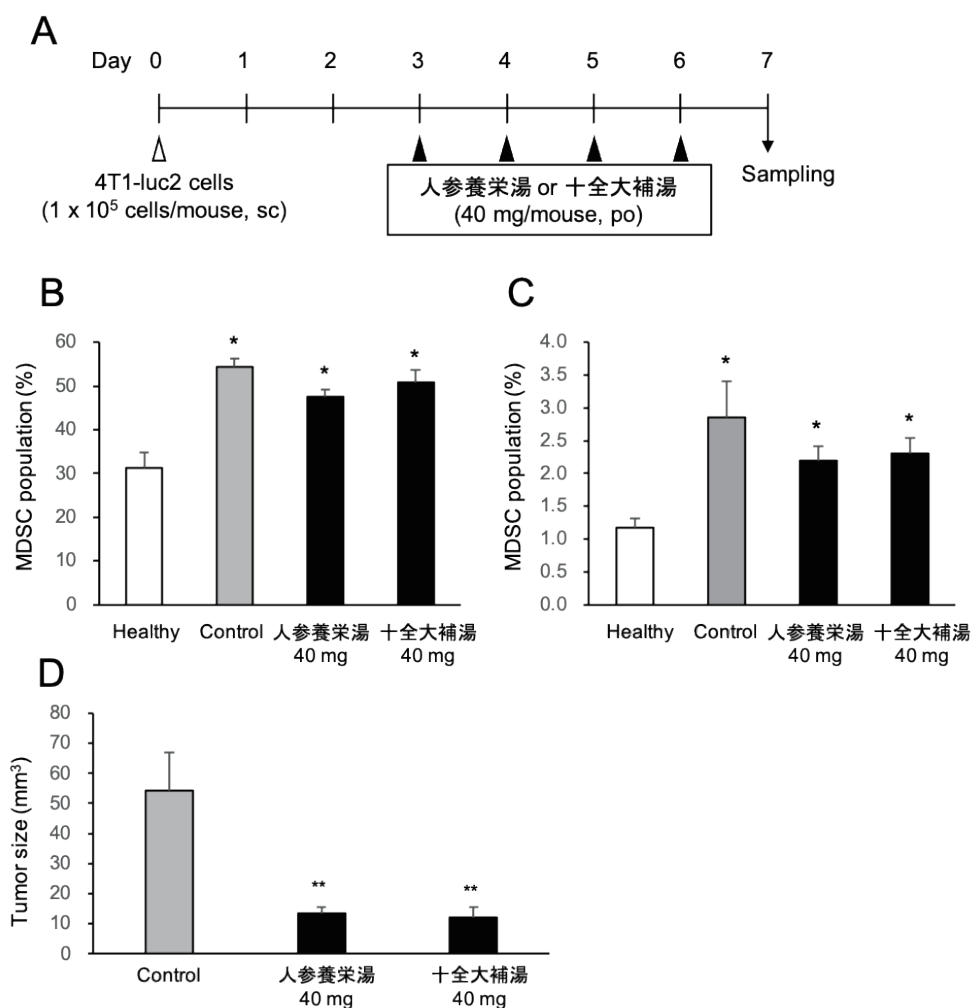


図1. 担がん動物の骨髄、脾臓中の MDSC 数および腫瘍成長に対する人參養榮湯および十全大補湯の作用

マウスの背部皮下に 4T1-luc2 細胞 (1 x 10<sup>5</sup> cells) を移植し、腫瘍増殖および骨髄中の MDSC 分化を誘発した。人參養榮湯および十全大補湯は腫瘍移植後、3-6 日目に投与した (A)。第 7 日目に骨髄 (B) および脾臓 (C) を摘出し、組織中の MDSC 数を計測するとともに腫瘍サイズ (D) を測定した。

Mean ± SE (n=6), \*: p<0.05 vs healthy (B, C), \*\*: p<0.01 vs control (D).

上記の実験結果により、MDSC による免疫抑制活性が薬理的に調節可能であることが示唆された。上述のように、MDSC は腫瘍など様々な病態を生じた組織に遊走し、その機能を発揮するが、遊走先の環境下でもその活性が変化する可能性が考えられる。そこで、MDSC の活性を調節し得る刺激を調べるために、骨髄細胞より分化誘導した MDSC を標本として、arginase-1 の mRNA 発現に対する種々の刺激に対する反応を調べた (データは示さず) が、その中で最も著明な作用を示したのは Th2 サイトカインの IL-4 であった。IL-4 は処理濃度 (1-20 ng/ml) 依存的に MDSC による arginase-1 発現を促進し、最大作用を示した 10 ng/ml ではコントロールの約 40 倍の高値を示した。

種目 (特定研究)

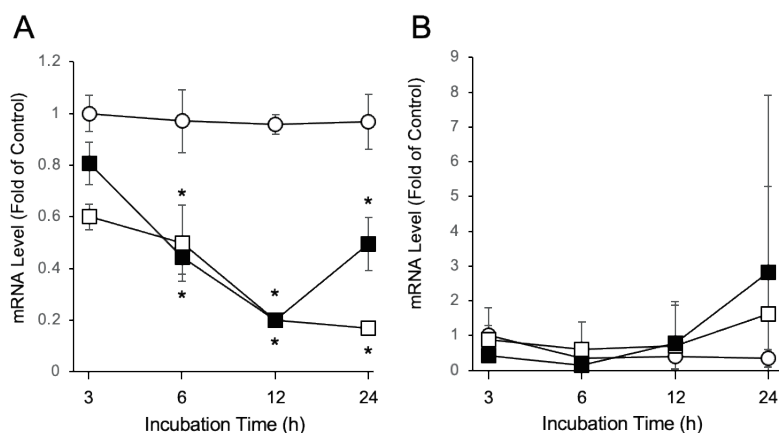


図2. MDSC の免疫抑制因子の mRNA 発現に対する人参養栄湯および十全大補湯の作用  
 マウスの骨髄細胞より分化させた MDSC を、vehicle (○)、人参養栄湯 (1 mg/ml, □) または十全大補湯 (1 mg/ml, ■) 存在下に表記の時間培養し、arginase-1 (A) および iNOS (B) の mRNA 量を測定した。  
 Mean± SE (n=3), \*: p<0.05 vs. control.

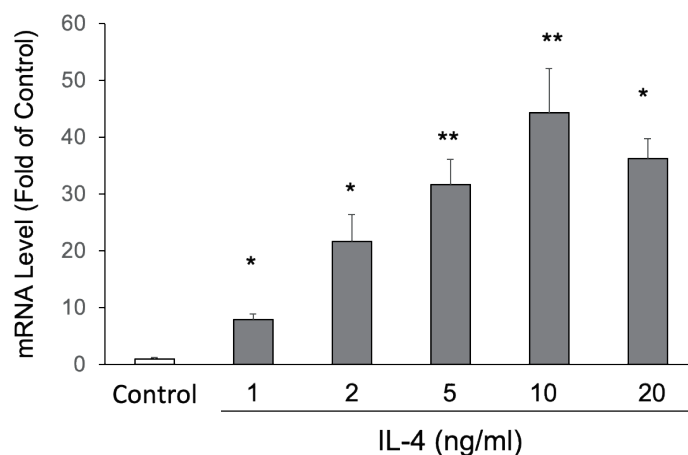


図3. MDSC の arginase-1 mRNA 発現に対する IL-4 の作用  
 マウスの骨髄細胞より分化させた MDSC を、表記濃度の IL-4 存在下に 24 時間培養し、arginase-1 の mRNA 量を測定した。Mean± SE (n=3), \*: p<0.05 vs. control.

■結論

従来、補剤による腫瘍免疫の活性化作用は、動物実験によって示されてきたが、その明確な作用点や作用機序の多くは不明であった。本研究では、人参養栄湯および十全大補湯の少なくとも 2 方剤が、MDSC の分化を抑制するだけでなく、免疫抑制因子である arginase-1 の mRNA 発現を抑制することで、その活性を著明に抑制することを示唆した。また、MDSC による arginase-1 の発現が IL-4 によって亢進したことも興味深く、Th2 サイトカインが病態形成に関わる間質性肺炎などの線維症を伴う病態でも本細胞が増悪因子として機能することが推定された。すなわち、人参養栄湯や十全大補湯による MDSC 機能の阻害は肺線維症などの疾患の悪化予防にも応用できる可能性が考えられ興味深い。

## ラマン顕微鏡を用いた未病検出技術の開発

申請代表者	渡邊 朋信	理化学研究所生命機能科学研究センター	先端バイオイメージング研究チーム・チームリーダー
所外共同研究者	春木 孝之	富山大学 学術研究部都市デザイン学系	准教授
所外共同研究者	吉田 泰彦	富山大学大学院 理工学教育部 知能情報工学専攻	修士1年
研究統括者	小泉 桂一	研究開発部門未病分野	教授

### ■背景・目的

これまでに統括研究者の小泉らは、複雑系数理学の DNB 理論を用いて<sup>1)</sup>、生体の遺伝子レベルでの揺らぎを捉える事により未病状態（健康から疾病の遷移状態）を検出することが可能であることを報告した<sup>2)</sup>。現在我々は、この報告を深化させることで、DNB 理論は未病状態のみならず細胞分化の遷移状態も検出可能であるとの仮説のもと基礎研究を行っている。従って、本研究は、和漢医薬学総合研究所の重点研究・未病・予防先制医療研究（未病バイオロジーの深化）に直結するものである。しかしながら、この基礎研究の成果を臨床の場実装するには、DNB 理論によって検出される生体の揺らぎ情報を非侵襲的に計測可能な技術の開発が必須である。

現在、ラマン顕微鏡は細胞イメージングへの応用が積極的に推し進められている<sup>2)</sup>。研究代表者の渡邊らは、細胞のラマンスペクトルを細胞の状態や種類を識別する「指紋」と見做し、スペクトル形状が細胞の種類や分化状態に依存して異なること、ならびに、分化・リプログラミングの非侵襲的な識別・同定に使用できることを報告している<sup>3)</sup>。

昨年度の研究においては、T 細胞の分化過程において、ラマン顕微鏡により経時的にラマンスペクトルを計測し DNB 解析を行った。その結果、ラマン顕微鏡のデータ解析手法に対しても、DNB 理論が適応可能であることが明らかとなった。

そこで本年度の研究では、昨年度の成果をヒト臨床検体へ適応するために、iPS 細胞の心筋細胞への分化過程における遷移状態の検出を試みた。同時に、この遷移状態の生物学的な特徴を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現情報を取得し、情報解析を行った。

### ■結果・考察

ラマンスペクトルを細胞の複雑系システムにおける離散的な構成要素と仮定して、iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導前（Day 0）の iPS 細胞を対照群として、Day 1、2、4、7、10、14 においてラマン顕微鏡を用いて細胞の全ラマンスペクトルを計測した（図 1）。なお、計測細胞数は全日数において 21～34 個であり、ラマンシフトは全日数で同一の 3001 個（500.00-2,000.00  $\text{cm}^{-1}$ 、刻み：0.5）であった。

種目 (特定研究)

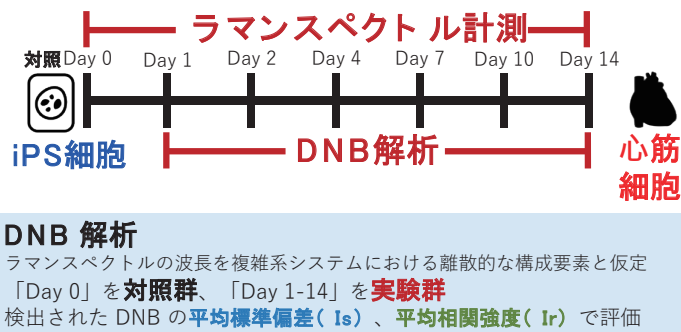


図 1. iPS 細胞の心筋細胞分化過程におけるラマンスペクトル計測および DNB 解析のプロトコル

なお、計測したラマンスペクトルのデータに対してバックグラウンド補正の処理を行い、その後その特性を精査した結果、負の値や欠損値はないことから、DNB 解析に供するための前処理は不要であることが確認できた (図 2)。

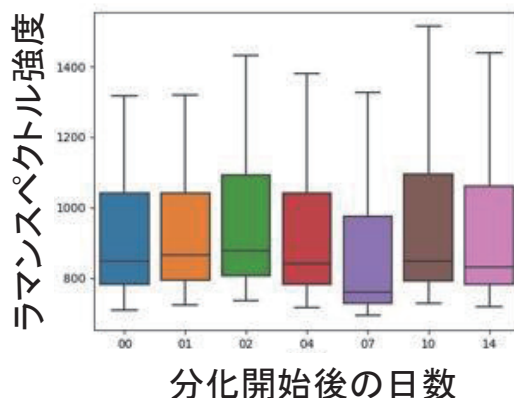


図 2. 各日 (Day 0-14) におけるラマンスペクトル強度の分布特性

次に、抽出された DNB のラマンシフトおよびそのシフトに由来する分子、分子結合 4) を示す (図 3)。Day 1 ではほぼすべてのラマンシフト (583.50-2,000.00 cm<sup>-1</sup>) がゆらいでいるが、Day 10 では 2 か所の局所的なラマンシフト (500.00-988.50 cm<sup>-1</sup> および 1,700.00-2,000.00 cm<sup>-1</sup>) のみがゆらいでいることが明らかとなった。

	Day 1	Day 10
DNB のラマンシフト	583.50-2,000.00	500.00-988.50 1,700.00-2,000.00
分子、分子結合	A, C.T.BK, C-C str, Phe, C-Nstr, C-C str, Phe Tyr, Phe Tyr, Amide III, CH def, A G, CH <sub>2</sub> def, G A, Amide I	A, C.T.BK, C-C str Amide I

図 3. Day 1 および Day 10 において抽出された DNB のラマンシフトと対応する分子、分子結合

種目（特定研究）

そこで、Day 1 および Day 10 で抽出された DNB のラマンシフトに関して、Day 0~Day 14 におけるラマンスペクトルの平均強度（いわゆる従来の静的バイオマーカー）および DNB の 2 条件（平均標準偏差 (Is) と平均相関強度 (Ir)）をそれぞれ算出した。Day 1 で DNB として抽出されたラマンシフト (583.50-2,000.00 cm<sup>-1</sup>) において、ラマンスペクトルの平均強度は、Day 2 で最高値に到達していることが明らかとなった。一方で、Day 1 において、平均標準偏差と平均相関係数の上昇が確認されることから DNB の 2 条件を満たしていることが明らかとなった。この結果から、iPS 細胞の心筋細胞への分化初期過程における遷移状態が Day 1 であることが示唆された。

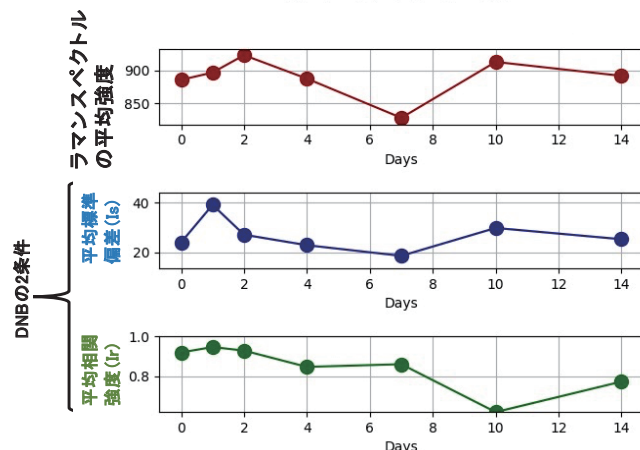


図 4. Day 1 で DNB として抽出されたラマンシフト (583.50-2,000.00 cm<sup>-1</sup>) の経日的な変化

おおむね 1,700.00-2,000.00 cm<sup>-1</sup> および 500.00-988.50 cm<sup>-1</sup> のラマンシフトの領域は、Day 1 および Day 10 において、DNB の 2 条件を満たしていることが明らかとなった。一方で、ラマンスペクトルの平均強度は、Day 2 および Day 10 で上昇していることが明らかとなった。この結果から、iPS 細胞の心筋細胞への分化後期過程における遷移状態が Day 10 であることが示唆された (図 5)。

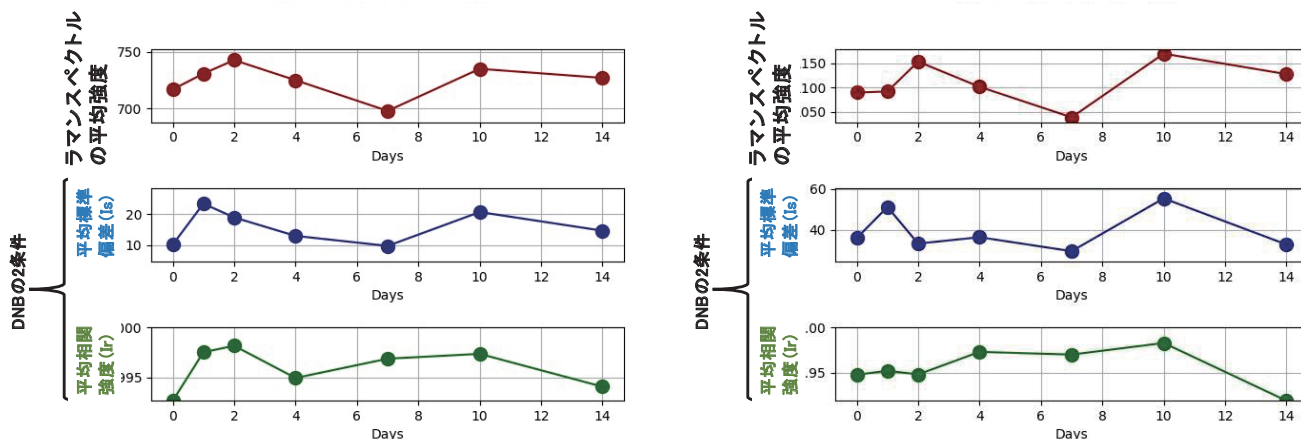


図 5. (左) Day 10 で DNB として抽出されたラマンシフト (1,700.00-2,000.00 cm<sup>-1</sup>) および (右) ラマンシフト (500.00-988.50 cm<sup>-1</sup>) の経日的な変化

細胞が発するラマン散乱スペクトルは構成する全ての分子の情報を含むため、分解分析が困難なほどに複雑となる。これまでの生命科学におけるラマン散乱スペクトル解析は、従来の多変量解析を用いても大きく変化する物質にのみ適用できるに過ぎなかった。ラマン顕微鏡技術に DNB 解析を応用することで「量」



## 種目（特定研究）

ではなく「揺らぎ」が評価軸となる。これにより、従来物質還元的な解析から脱して、分解分析できない信号を用いて物質に還元することなく解析できるようになる。

上記のように、本手法により分化状態を規定できる「揺らぎ」が同定できることが示された。「揺らぎ」を抑制/増幅するような薬剤を探索し投与することで、詳細な遺伝子相互作用が分からずとも、iPS 細胞分化をコントロールできる可能性がある。つまり、本研究は、「揺らぎ」の概念を取り入れることで、物質還元せずとも数値データに基づく科学的議論が可能になることを実証したことになる。

そもそも生命は複雑すぎて分解分析で理解することは出来ない可能性が、近年、認められつつある。本研究課題が「量」を指標とした研究から「揺らぎ」を指標とした新しい生命科学の創造につながるよう、引き続き研究開発を行っていく。

## ■結論

iPS 細胞の心筋への分化過程におけるラマン顕微鏡のデータ解析手法に対しても、DNB 理論が適応可能であることが明らかとなった。今後は、このラマン顕微鏡技術を疾患特異的、例えばミトコンドリア病やファブリ病由来の iPS 細胞に適応することで、DNB 理論によって検出される生体の揺らぎ情報を非侵襲的に計測し、分化異常の前兆（未病）を検出する予定である。さらに、DNA 理論を空間的揺らぎ（不均一性）に拡張することで、静的情報である画像データから動的情報を推定することにも挑戦したい。

## 参考文献

1. Koizumi, K. (2019) Sci Rep. 9, 8767. doi: 10.1038/s41598-019-45119-w.
2. Ichimura, T. et al. (2014) PloS One 9, e84478. DOI: 10.1371/journal.pone.0084478.
3. Ichimura, T. et al. (2015) Sci Rep. 5, 11358, doi:10.1038/srep11358.
4. 渡邊朋信「ラマン散乱光スペクトルによる遺伝子発現予測/推定技術の開発」  
<https://www.secomzaidan.jp/tokutei/advanced-medical/interview/watanabe/index2.html>

## 植物二次代謝酵素の潜在的触媒活性を基盤とするカンナビノイド関連化合物の生合成工学

申請代表者	田浦 太志	富山大学学術研究部薬学・和漢系	准教授
所外共同研究者	棚谷 綾介	富山大学大学院医学薬学教育部	博士後期課程 1年
所外共同研究者	林 望	富山大学大学院医学薬学教育部	博士前期課程 2年
研究統括者	森田 洋行	研究開発部門資源開発分野天然物創薬学領域	教授

### ■背景・目的

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で構成される特異な二次代謝産物であり、中でも $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) や cannabidiol (CBD) は鎮痛、鎮吐、抗炎症及び抗痙攣など種々の興味深い薬理作用を示すことから、多発性硬化症や小児てんかんなど各種難治性疾患の治療薬として欧米を中心とした約 30 カ国で医薬品応用されている。申請者はカンナビノイドの生合成研究に取り組み、主成分である THCA や CBDA の生合成酵素を同定するなど、本研究領域をリードしてきた (Taura et al., 2019)。

カンナビノイドは 100 種類以上が知られており、またその生物活性は微細な構造の違いにより大きく変化する。例えば THC は大麻の幻覚活性成分であるが、側鎖がプロピル基の THCV は幻覚活性を示さない一方、II 型糖尿病患者に顕著な治療効果を示すことから英国 GW pharmaceuticals により phase 2 の臨床試験が実施されている (Welling et al., 2018)。このような非幻覚性カンナビノイドの生物活性に関する報告は数多く、今後医薬資源として非常に期待できる研究分野と考えられる。またカンナビノイド関連化合物はオオケビラゴケなどの苔類からも得られており、これら化合物の生物活性にも近年注目が集まっている (Chicca et al., 2018)。

カンナビノイドの生合成経路は、1) ポリケチド骨格の形成、2) プレニル基の転移、及び 3) 立体選択的酸化閉環の 3 ステップで構成される (図 1)。酵素と基質の関係は一般に「鍵と鍵穴」と言われるほど厳密であるが、近年我々は、各ステップの酵素がフレキシブルに基質アナログを受容する「潜在的触媒活性」を有することを確認している。即ち、これら生合成酵素は、新規なカンナビノイド類縁体の酵素合成や微生物生産に応用できる可能性が考えられる。ここでは本共同研究を通じて我々が明らかにした生合成酵素の性質ならびに新規化合物生産への取り組みについてについて概説する。

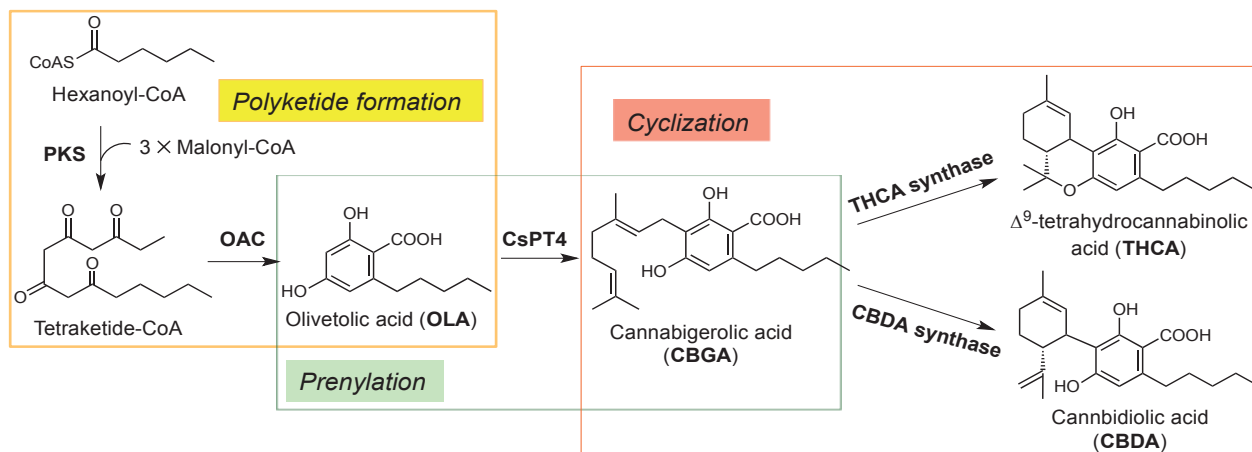


図 1. カンナビノイドの生合成経路

## ■結果・考察

### 1. 大麻プレニル転移酵素 CsPT4 の構造機能研究

プレニル基転移酵素 (PT) は芳香族基質にプレニル二リン酸由来のプレニル基を転移する酵素であり、一般に基質選択性が厳密と考えられているが、我々は先の共同研究において複数のプレニル基質と反応する新規な PT を同定報告しており、天然物の構造多様性を創出する PT の触媒ポテンシャルには非常に興味をもたれる (Saeki et al., 2018)。そこで我々は、大麻由来 CsPT4 組換え酵素の基質特異性を詳細に検討した。

はじめに芳香族基質として OLA を用い、各種プレニル基質との反応を検討した結果、本酵素は炭素数 10 の GPP を受容して CBGA を生成するばかりでなく、DMAPP (C5) から GGPP (C20) に至る 4 種のプレニル基質を受容し、側鎖長の異なる CBGA 類縁体を合成するという驚異的な触媒ポテンシャルを有することを確認した (図 2)。また興味深いことに、酵素反応で得られるセスキテルペン型及びジテルペン型 CBGA は新規化合物であり、それぞれ sesqui-CBGA および diterpeno-CBGA と命名した。各プレニル基質に対する反応速度論解析を行った結果、本酵素は GPP に対して最も高い  $V_{max}/K_m$  値を示したことから、GPP を最適なプレニル基質として受容することが判明した。

次いで図 2 に構造を示した各種の芳香族基質を用いて、さらなる基質特異性の検討を行った。この結果、本酵素はアルキル側鎖の異なる OLA 類縁体のみならず、フロログルシノール (phlorocaprophenone) やビベンジル (dihydropinosylvin acid) といった、異なる骨格の化合物にもプレニル基を転移可能であることを確認した。即ち CsPT4 は芳香族基質に対しても柔軟な基質特異性を示し、合計 14 種もの生成物を与える能力を有していた。

特に、生成物の一つである 3-geranyl dihydropinosylvin acid は苔類オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) に由来し、近年その生物活性が注目されるビベンジルカンナビノイドの前駆体であり、CsPT4 はビベンジルカンナビノイドのバイオテクノロジーにも応用可能と言える。

CsPT4 は植物二次代謝 PT としては例外的な幅広い基質特異性を示したことから、酵素合成や合成生物学への展開が期待されるが、一方で CBGA 合成反応以外の反応速度には改善の必要があると考えられた。このため、本酵素活性中心への部位特異的変異により、触媒活性の向上について現在検討を行っている。

また得られた生成物の生物活性に関しては、Suresh 准教授のご協力のもと膵癌 PANC-1 細胞を用いた抗緊縮アッセイを検討し、CBGA よりも新規化合物の sesqui-CBGA および diterpeno-CBGA の方が高い活性を示すという興味深い結果を得ている。

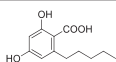


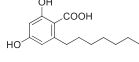
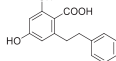
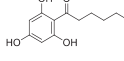
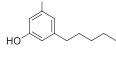


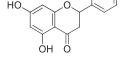
Name	Substrate Structures	DMAPP	GPP	FPP	GGPP
Olivetolic acid (OLA)		+	+	+	+
Orsellinic acid		-	-	-	-
Divarinic acid		-	+	+	+
6-Heptylresorcylic acid		-	+	+	-
Dihydropinosylvin acid		-	+	+	+
Phlorocaprophenone		-	+	+	-
Olivetol		-	-	-	-
Umbelliferone		N.D.	-	N.D.	N.D.
Homogentisic acid		N.D.	-	N.D.	N.D.
Naringenin		N.D.	-	N.D.	N.D.

図 2. CsPT4 の基質特異性

+ : Activity was detected. - : Activity was not detected.

### 2. カンナビノイド合成酵素の基質特異性

本研究ではカンナビノイド合成酵素による酸化閉環反応を活用したカンナビノイド関連化合物の構造多様性拡大を最終目標としている。本項では THCA synthase をモデルとして、その触媒ポテンシャルについて検討した。はじめに、CsPT4 が生成した sesqui-CBGA とタバコ BY-2 細胞で発現した組換え THCA synthase をインビトロで反応させ、生成物を HPLC で分析したところ、コントロールには見られない生成物のピークを確認した。本生成物を

## 種目 (特定研究)

LC-ESI-MS で分析した結果、酸化生成物と予想される  $m/z = 425$  の分子イオンピークを示すことを確認した(図 3A)。したがって、THCA synthase は少なくとも sesqui-CBGA を酸化する能力を有していることを明確にした。生成物が微量であったことから、その NMR 解析はできていないものの、本生成物の UV 吸収は既知カンナビノイドの cannabichromenic acid とほぼ一致するものであり、THCA 型の閉環反応ではなくクロメン環の形成が進行した可能性が考えられた(図 3B)。

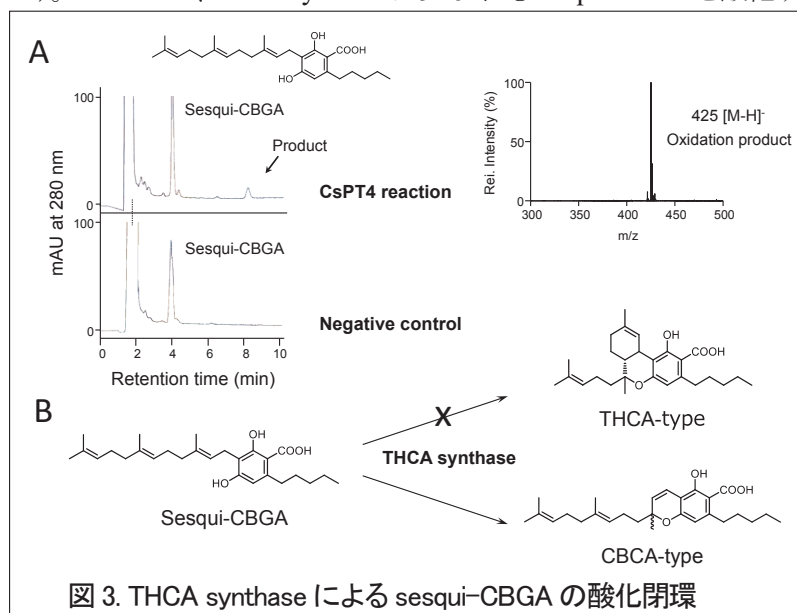


図 3. THCA synthase による sesqui-CBGA の酸化閉環

以上のように THCA synthase は CBGA のみならず、長鎖プレニル基を有する sesqui-CBGA を受容し、酸化する能力を有することを確認した。プレニル鎖長の違いが生物活性に与える影響は極めて興味深いところであり、ラージスケール反応による sesqui-CBGA 閉環産物の調製及び生物活性について今後検討する計画としている。

以上のように THCA synthase は CBGA のみならず、長鎖プレニル基を有する sesqui-CBGA を受容し、酸化する能力を有することを確認した。プレニル鎖長の違いが生物活性に与える影響は極めて興味深いところであり、ラージスケール反応による sesqui-CBGA 閉環産物の調製及び生物活性について今後検討する計画としている。

### 3. オオケビラゴケが生産するビベンジルカンナビノイド生合成マシナリーの解明

希少苔類オオケビラゴケ (*Radula perrottetii*) が生産するビベンジルカンナビノイドの perrottetinic acid (PETA) は THCA に類似した興味深い構造を有する(図 4) (Asakawa et al., 2013)。しかしながら、PETA は微量成分であることから、その生物活性および生合成メカニズムはほとんど検討されていない。本研究ではビベンジルカンナビノイド生合成酵素の遺伝子クローニングおよび構造機能解析を目的とした。

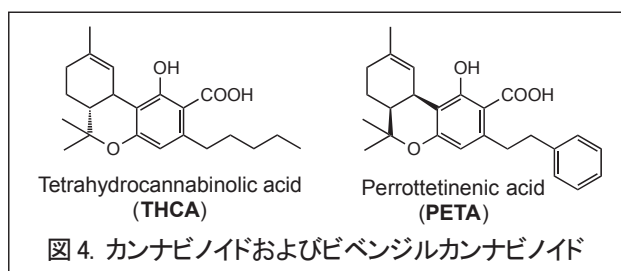


図 4. カンナビノイドおよびビベンジルカンナビノイド

即ち、オオケビラゴケのトランスクリプトームデータを構築し、生合成酵素の候補遺伝子としてカンナビノイド合成酵素をはじめとする FAD オキシダーゼと高いホモロジーを示す RpOx1~3 をコードする配列を同定した。次いで *Pichia pastoris* を宿主として各組換え酵素を発現し、酵素活性の測定により生合成酵素遺伝子の同定、機能解析を検討した。PETA の前駆体と推定される 3-geranyl dihydropinosylvin acid を基質とする酵素アッセイを行い、生成物を LC-MS により分析した結果、いずれの組換え酵素を用いた場合も PETA の生成は確認されなかった一方、RpOx3 の反応液に PETA 以外の酸化生成物の明確なピークが確認された。ラージスケールの酵素反応により本生成物を調製し、分取 HPLC で精製した後 NMR により構造解析した結果、本化合物はクロメン環を有する PETA の異性体であることを確認し、新規化合物であったことから、オオケビラゴケの学名にちなんで radulachromenic acid と命名した(図 5)。なお本化合物は文献未記載であるが、オオケビラゴケエキスの LC-ESI-MS 分析から、本植物の微量成分として存在することも確認している。

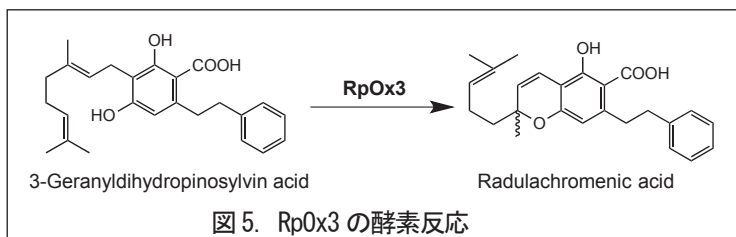


図 5. RpOx3 の酵素反応

以上のように、RpOx3 は期待された PETA ではなく、新規なクロメン化合物 radulachromenic acid を合成するという予想外の結果を得た。また、生成物のキラル HPLC 分析から、radulachromenic acid は酵素反応でありながらラセミ体として生成するという、これもまた意外な結果が得られている。このことから、RpOx3 は基質を酸化した後

## 種目 (特定研究)

に、閉環しないままリリースしている可能性が考えられる。即ち、オオケビラゴケ植物内には RpOx3 のパートナー酵素が存在して、未閉環の中間体を PETA に閉環する可能性を想定している。パートナー酵素の候補として各種二次代謝産物の骨格形成に関わる dirigent protein (Uchida et al., 2017) の類縁タンパクを想定した遺伝子スクリーニングを開始したところである。

## ■結論

本研究ではカンナビノイド生合成酵素の触媒ポテンシャルを詳細解明し、これを新規カンナビノイド関連化合物の酵素合成に応用する目的で各種検討を行った。この結果、CsPT4 が示す驚異的なまでの潜在的触媒活性に加えて、THCA synthase もまたプレニル鎖長の異なる基質アナログを受容可能なことを確認した。いずれも基質アナログに対する反応性には改善の必要があるものの、これらを組み合わせた反応を行うことで、従来想像されることのなかった非天然カンナビノイドの生産が可能になると考えられる。さらに本研究では近年注目されるビベンジルカンナビノイド生合成酵素の候補として、オオケビラゴケより RpOx3 の発見に成功した。これを足がかりとして、ビベンジルカンナビノイドの生合成機構に関しても究明したいと考えている。

## ■参考文献

- 1) **Taura F, Tanaya R, Sirikantaramas S** (2019) Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology *Science Asia* **45**: 399–407
- 2) **Welling MT, Liu L, Raymond CA, Ansari O and King GJ** (2018) Developmental plasticity of the major alkyl cannabinoid chemotypes in a diverse Cannabis genetic resource collection. *Front Plant Sci* **9**: 1510
- 3) **Chicca A, Schafroth MA, Reynoso-Moreno I, Erni R, Petrucci V, Carreira EM, Gertsch J** (2018) Uncovering the psychoactivity of a cannabinoid from liverworts associated with a legal high. *Sci Adv* **4**: eaat2166
- 4) **Saeki H, Hara R, Takahashi H, Iijima M, Munakata R, Kenmoku H, Fuku K, Sekihara A, Yasuno Y, Shinada T, Ueda T, Nishi T, Sato T, Asakawa Y, Kurosaki F, Yazaki K, Taura F** (2018) An aromatic farnesyltransferase functions in biosynthesis of the anti-HIV meroterpenoid daurichromenic acid. *Plant Physiol* **178**: 535–551
- 5) **Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F** (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry* **91**: 52–80
- 6) **Uchida K, Akashi T, Aoki T** (2018) The missing link in leguminous pterocarpan biosynthesis is a dirigent domain-containing protein with isoflavanol dehydratase activity. *Plant Cell Physiol* **58**: 398–408

## 高齢者疾患または予防先制医療に有効な和漢薬の網羅的精密分析

申請代表者	丸山 卓郎	国立医薬品食品衛生研究所 生薬部	第一室長
所外共同研究者	後藤 佑斗	国立医薬品食品衛生研究所 生薬部	派遣研究員
所外共同研究者	内山 奈穂子	国立医薬品食品衛生研究所 生薬部	第二室長
所外共同研究者	南 基泰	中部大学 応用生物学部	教授
研究統括者	小松 かつ子	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	教授
所内共同研究者	當銘 一文	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	准教授
所内共同研究者	朱 姝	研究開発部門資源開発分野資源科学領域	助教

### ■背景・目的

超高齢化社会を迎えた我が国にとって、国民医療費の増大への対応は喫緊の課題となっており、健康寿命の延伸が求められている。健康寿命の延伸のためには、糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の予防・治療に加え、認知症やサルコペニア、運動器症候群（ロコモティブシンドローム）などに対する改善策が求められる。これまでの研究により、認知症に対する抑肝散や釣藤散、サルコペニアに対するニクジュヨウなど、生薬、漢方薬に、これらの疾患に対する治療効果が見出されている。これらの天然薬物は、化学合成医薬品よりも薬価が低い場合が多いため、国民医療費の抑制効果も高く、今後、更なる利用促進が望まれる。その一方で、天然薬物は、基原植物や品種、栽培／野生の別、産地の違いなどにより、含有成分の量や組成が異なる場合が多い。このため、各疾患の治療に適した品質（成分組成）のものを選択することが天然薬物を用いた治療の最適化につながる。

このような背景から、本研究では、高齢者疾患の治療に用いられる生薬の遺伝子型、成分組成を網羅的に解析し、各疾患に適した品質の生薬を継続的に供給するための基礎的知見を収集、蓄積することを目的とした。

対象生薬としては、ボウフウ、ニクジュヨウ及びカノコソウを取り上げた。このうち、ボウフウについては、昨年度までに、モンゴル産の試料について、HPLC-DAD 法による指標成分の定量分析を行い、各産地由来の試料との比較分析を行った結果、モンゴル産の *S. divaricata* はボウフウの資源として有用であることを明らかにし、検討を終了した。ニクジュヨウについては、昨年度に引き続き、塩基配列解析による基原種鑑別の検討を、カノコソウについては、昨年度に明らかになった各産地の精油型について、主成分を単離し、同定した。また、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列に基づく基原種鑑別を行うとともに、精油型と遺伝子型の相関性を調査した。

### ■結果・考察

#### 1. ニクジュヨウ

ニクジュヨウは、JP17において、ハマウツボ科に属する寄生植物、*Cistanche salsa* G. Beck, *C. deserticola* Y. C. Ma, *C. tubulosa* Wight の肉質茎と規定されており、各基原植物により成分プロファイルが異なることが

## 種目 (特定研究)

知られている。ニクジュヨウの基原植物の遺伝子鑑別については、葉緑体 DNA の *rps2* 遺伝子及び *rpl16-rpl14* 遺伝子間領域の塩基配列解析による鑑別が報告されている<sup>1)</sup>が、*C. salsa* と *C. deserticola* については、共通の遺伝子型が見出されるなど、分子系統解析について未解決な部分がある。その要因として、1) 葉緑体 DNA が母系遺伝であるため、雑種を検出できていないこと、2) *Cistanche* 属は寄生植物であるため、光合成を行っておらず、葉緑体 DNA 上の遺伝子が機能していないことによる変異速度の著しい変化及び遺伝子の消失、3) 宿主植物由来遺伝子の水平伝播による取り込みが考えられる (2), 3) は、既に *C. deserticola* の葉緑体ゲノムの解析により示唆されている<sup>2)</sup>。このため、本研究では、核 DNA の ITS2 領域の塩基配列による分子系統解析を行っている。今年度は、昨年度に引き続き、ITS2 領域の配列解析を継続した。

ニクジュヨウ試料は、Tomari ら<sup>1)</sup>の先行研究に用いられた 25 検体を譲り受け使用した。その内訳は、*C. salsa*, 8 検体；*C. deserticola*, 10 検体；*C. tubulosa*, 4 検体；*C. sinensis*, 3 検体で、採集地は、中国, 19 検体；カザフスタン, 4 検体；トルコ及びパキスタン, 各 1 検体である。これまでに得られている 14 検体の塩基配列から分子系統樹を作成したところ、Tomari らの報告と同様に、*C. tubulosa* 及び *C. sinensis* は、*C. salsa* 及び *C. deserticola* の配列と明確に区別された。また、*C. salsa* と *C. deserticola* は、複数のクレードに跨って分類され、種別ではなく産地別にクレードを形成する点も、Tomari らの報告と一致した。内モンゴル自治区産の *C. deserticola* 1 検体 (CH-1)、カザフスタン産の *C. deserticola* 3 検体 (CH-8, 9, 10) 及び寧夏回族自治区産の *C. salsa* 1 検体 (CH-15) では 2 種の配列の混合物と推定されたことから、サブクローニングによりそれぞれの配列に分離した上で解析を行った。その結果、CH-15 の 2 つの配列は、別々のクレードに分類され、一方は、同じ寧夏回族自治区産の *C. salsa* である CH-16, 17 の配列と一致した。他方は、トルコ由来の *C. salsa* である CH-24 と同じクレードに分類され、さらに Blast search による相同性検索では、*C. ridgewayana* の配列 10 種と最も高い相同性 (98.2-99.6%) を示し、*C. salsa* の配列とは、最も高いものでも 95.0% の相同性とどまった。*C. ridgewayana* は、主に中東地域に分布する種であり、トルコ由来の *C. salsa* に近い配列を示したことは、産地別にクレードを形成する傾向を支持するが、一方で、同種は、中国に分布しないこと、また、*C. salsa* と混同されることがある種であることから、本結果の解釈は、成分情報や他の試料の結果と併せて、慎重に検討が必要である。

CH-8, 9, 10 は、互いによく似た 2 つの遺伝子型からなり、マイナーな配列は、CH-7 の配列と一致した。Tomari らの葉緑体 DNA 領域での検討においても、CH-7 と CH-8, 9, 10 は、2 つの遺伝子型が認められており、その結果と一致する結果と解釈された。

以上のことから、ニクジュヨウの基原種は寄生植物であるものの、葉緑体 DNA の遺伝子領域による遺伝子鑑別結果は、核ゲノム上の塩基配列である ITS2 を対象としたものと、特に変わらない結果であることが明らかになった。

系統樹上、種としての近縁関係よりも産地の類似性の方が優位に作用する要因については、なお、不明である。近年、次世代シーケンサーを使用した分子系統解析手法として、MIG-Seq 法が考案され、多くの報告がなされている<sup>3)</sup>。特定の遺伝子領域を用いた系統解析は、終了したことから、今後、MIG-Seq 法を用いたゲノム全体を対象とした解析を行い、これまでの知見と比較することが、上記の要因の解明の一助となりうる。また、成分分析結果と統合することで、各基原植物で認められる成分多様性の理解に繋がることが期待される。

既報<sup>4)</sup>の成分分析法では、ニクジュヨウの粉末を 50%メタノールで振とう抽出し、減圧乾固した後、溶媒に再溶解し HPLC 解析を行っている。より簡便な分析法の確立を目指し、50%メタノールで超音波抽出したものを直接分析することを試みた。その結果、抽出後の遠心分離が 1 回の場合、カラムの目詰まりが確認されたが、遠心分離を 2 回行ったところ、目詰まりすることなく分析が可能であった。この手法を用いて各種 1 検体及び *C. tubulosa* 由来の市場品について LC/MS 解析を行ったところ、6 種の主要なフェニルエタノイド類が検出され、基原により成分パターンが異なることが確認された。また、骨格筋機能改善作用が報告されている echinacoside と verbascoside (=acteoside)<sup>5)</sup>は、*C. tubulosa* 及び *C. salsa* において含量が高いことが示唆された。今後、検体数を増やし、主要化合物の定量分析を行い、遺伝子鑑別による基原植物の違い及び産地の違いと、成分パターンの多様性との関連について解析を進める予定である。

## 種目 (特定研究)

### 2. カノコソウ

カノコソウは、JP17において、カノコソウ *Valeriana fauriei* Briquet の根及び根茎と規定されている。本生薬は、元々、JP1～JP3 に記載されていた欧州産カノコソウ (ワレリアナ根; *V. officinalis* L.) の代用または併用できる本邦産生薬の収載方針に基づき、JP2 より記載されており、JP2～JP8 までは、*V. officinalis* L. var. *latifolia* Miquel を基原植物学名として記載しているが、植物分類学上の扱いの変化に伴い、JP9 以降、現在の *V. fauriei* が学名として採用されている<sup>6)</sup>。カノコソウには、これまで、いくつかの品種が栽培されており、以前、盛んに栽培されたカメバキソウや、現在の市場品の主流であるホッカイキソウがある。ホッカイキソウは、さらにボタン、タコの2品種がある<sup>7)</sup>。これらは、精油量及びセスキテルペンの組成が異なることが知られており<sup>8)</sup>、また、近年では、需要の高まりに伴い、中国産も使用されている。本研究では、これらの試料について、遺伝子型と成分型の相関を探り、より薬用価値の高いものを、再現性よく供給するための基盤整備を行った。

各生薬メーカーより分与されたカノコソウ市場品、38 検体; セイヨウカノコソウ市場品、2 検体; 蜘蛛香 (*V. jatamansii*), 3 検体; *Valeriana* 属の不明種、1 検体、カメバキソウ由来カノコソウ 1 検体の計 45 検体を用いた。このものについて、ジクロロメタンエキスを調製し、GC/MS 分析を行い、多変量解析を行った結果、5 つの精油型が見出された。1) **J<sub>1</sub> 型**及び2) **J<sub>2</sub> 型**: どちらも保持時間、約 7.9 分に、bornyl acetate (BA), 12.7 分に kessyl glycol diacetate (KGD) のピークを認めたが、9.7 分、10.5 分の未同定ピークが、J<sub>1</sub> 型では、顕著に大きかった。日本産のカノコソウ市場品は、いずれもどちらかの精油型を示した。3) **K 型**: BA のピークを認める点は、J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> 型と共通するが、KGD のピークをほとんど認めず、代わりに、kessyl acetate (KA) のピークを主ピークとして認めた。カメバキソウ由来のカノコソウがこのタイプに分類された。4) **C 型**: BA のピークを認める点は、日本産のものと共通するが、KGD, KA のピークを認めず、主ピークは、1-O-acetyl-2, 10-bisaboladiene-1, 6-diol であった。中国及び韓国産のカノコソウ市場品が、この精油型を示した。5) **O 型**: テルペノイド類を分析する今回の分析条件では、ほとんどピークを認めなかった。セイヨウカノコソウ及び蜘蛛香が、このタイプに分類された。

次に、塩基配列解析により、これらの試料の基原種鑑別を行った。*Valeriana* 属植物の遺伝子鑑別については、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域を利用した Minami らの先行研究<sup>9)</sup>があり、それによれば、*V. fauriei* は、同領域において AH-1～AH-5 の 5 つの遺伝子型を持ち、国産 (AH-1～AH-4) と中国産 (AH-5) も区別される。J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, C, K 型の成分型を示した試料の同領域の塩基配列解析を行ったところ、AH-1, 2, 5 の配列を示し、いずれも *V. fauriei* と同定された (解析不能 4 検体)。さらに、精油成分型と遺伝子型には、相関性が認められた。すなわち、J<sub>1</sub> 型の成分組成を持つ 11 検体は、解析不能だった 2 検体を除き、全て AH-1 の遺伝子型であった。また、J<sub>2</sub> 型の成分組成を持つ 20 検体は、解析不能だった 2 検体を除き、全て AH-2 の遺伝子型であった。さらに、C 型の成分組成を持つ 5 検体では、韓国産の 1 検体が AH-3 の遺伝子型であったことを除き、全て AH-5 の遺伝子型であった。一方、K 型の成分組成を持つカメバキソウは、AH-1 の遺伝子型を示し、上記の相関性とは逸脱していた。以上の結果から、現在のカノコソウ市場品の主流であるホッカイキソウにおける J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> 型の違いは、産地等の環境要因ではなく、遺伝的背景の違いに起因していると推定された。

カノコソウは、前述の通り、漢方処方用薬ではなく、主に鎮静作用を目的に、種々の生薬製剤に配合される生薬である。先行研究では、バルビツレート誘導睡眠に対する延長作用やロコモーターアッセイによる自発運動量の変化を指標にしたカノコソウ類の鎮静作用の評価が行われている。Takamura ら<sup>10)</sup>は、北海道産、中国産、欧州産の吉草根 (基原植物は、いずれも未記載) に対して、上記の睡眠延長作用を調べた結果、北海道産 > 中国産 > 欧州産の順で強い活性を示し、北海道産の活性成分として KGD を同定している。また、Yoshitomi ら<sup>11)</sup>は、カメバキソウとホッカイキソウについて、上記 2 種の試験を行い、睡眠延長作用は、ホッカイキソウがやや強く、自発運動抑制作用は、ほぼ同等であったと報告している。



## 種目（特定研究）

本研究で、成分型が明らかになった各種のカノコソウについて、同様の比較を行うことにより、各成分型、特にC型の成分組成を持つカノコソウの薬用価値を明らかにすることで、適切な薬用資源管理に繋がると期待される。

## ■結論

ニクジュヨウについては、昨年度に引き続き、核 rDNA の ITS2 配列の解析を行うとともに、複数の配列の混合物と推定された試料について、サブクローニングにより、個別の配列を解析し、葉緑体 DNA の遺伝子領域による系統解析と齟齬がないことを確認した。今後、成分情報と合わせることで、ニクジュヨウの品質多様性の要因が明らかになると期待される。

カノコソウについては、昨年度に実施した GC/MS 分析で明らかになった各精油成分型について、主ピークを単離し、NMR 及び LC/MS の情報に基づき、同定した。また、葉緑体 DNA の *psbA-trnH* 遺伝子間領域の塩基配列解析を行い、中国産の市場品も国内のものとは異なる遺伝子型を持つ *V. fauriei* であることを確認した。また、同配列と精油成分型には相関性が見出されたことから、精油成分の多様性は、環境要因より遺伝的背景の違いの寄与が大きいと推測された。

以上、遺伝子解析と成分情報を組み合わせた解析を行うことにより、品質に影響を与える因子を理解するための基礎的知見を得た。

## 参考文献

- 1) N. Tomari *et al.*, *Nat. Med.*, **57**, 233-237 (2003).
- 2) X. Li *et al.*, *PLOS One*, **8**, e58747 (2013).
- 3) Y. Suyama *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 16963 (2015).
- 4) 花岡信義ら, *生薬学雑誌*, **69**, 1-9 (2015).
- 5) A. Kodani *et al.*, *J. Neurotrauma*, **36**, 1935-1948 (2019).
- 6) K. Yanagisawa, *薬史学雑誌*, **48**, 63-74 (2013).
- 7) The committee of Japanese Pharmacopoeia Guide Book, ed., “The Guide Book of Japanese Pharmacopoeia 14<sup>th</sup> Ed.”, p. D208-210.
- 8) M. Takeuchi *et al.*, *Nat. Med.*, **55**, 225-230 (2001).
- 9) T. Fujii *et al.*, *J. Nat. Med.*, *in press* (2021).
- 10) K. Takamura *et al.*, *Yakugaku Zasshi*, **93**, 599-606 (1973).
- 11) S. Yoshitomi *et al.*, *Nat. Med.*, **54**, 55-60 (2000).

## 生薬エキス/漢方方剤由来新規抗トキソプラズマ薬の探索

申請代表者	彦坂 健児	千葉大学 大学院医学研究院 感染生体防御学	講師
所外共同研究者	野呂瀬 一美	千葉大学 大学院医学研究院 感染生体防御学	特任准教授
所外共同研究者	新庄 記子	千葉大学 大学院医学研究院 感染生体防御学	特任助教

### ■背景・目的

トキソプラズマ症はトキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)感染による日和見感染症である。トキソプラズマ症治療薬としてピリメタミンやスルファジアジンなどが使用されているが、副作用や薬剤耐性株出現が報告されており、新規抗トキソプラズマ薬の候補物質が探索されている。植物成分由来物質に基づいた治療薬は、一般的に安全性が高いことが知られており、抗トキソプラズマ薬候補として注目されている。本研究では、漢方方剤において抗トキソプラズマ増殖効果を探索する目的で、安価で多量サンプルのスクリーニングが可能なスルホローダミン B (SRB) 細胞傷害性アッセイ系を用いてトキソプラズマ感染による宿主細胞傷害性に対する各漢方方剤の効果を評価した。

### ■結果・考察

評価には、トキソプラズマ深谷株、および、宿主細胞として Vero 細胞を供した。SRB 細胞傷害性アッセイの結果を下の図に示す。図は、トキソプラズマを添加せず宿主細胞を培養した場合の生存率を 100%とし、それぞれの漢方方剤を添加した場合の宿主細胞生存率を示す。陰性対照として蒸留水[水(トキソプラズマあり)]を、陽性対照としてピリメタミン (1 μM) を用いた。陽性対照のピリメタミン添加群では 91.7%の宿主細胞生存率が認められ、漢方方剤添加群では、香蘇散、大黃甘草湯および麻黄湯を添加したもので細胞生存率が 70%以上であった。甘草はこれらの漢方方剤で共通して配合されているが、他の多くの漢方方剤でも配合されているため、トキソプラズマ感染に対する有効成分の特定はできなかった。今後は、漢方方剤の添加濃度や配合されている生薬について詳細に検討する必要があると考えられた。

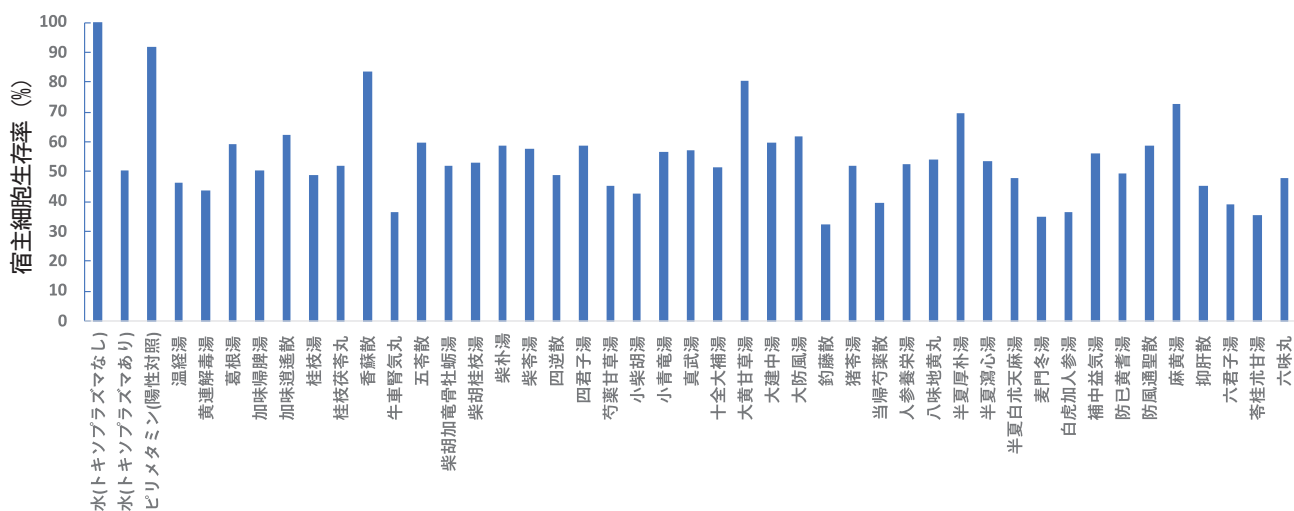


図. 各漢方方剤を添加した場合の宿主細胞生存率

種目（特定研究）

## ■結論

漢方方剤のうち、香蘇散、大黄甘草湯および麻黄湯はトキソプラズマ感染による宿主細胞傷害性抑制効果が高い傾向にあった。

## ゼブラフィッシュを用いた癌細胞転移抑制効果を有する漢方薬の探索

申請代表者	中山 淨二	庄内地域産業振興センター	研究員
所外共同研究者	牧野嶋 秀樹	国立がん研究センター先端医療開発センター	ユニットリーダー
所外共同研究者	今野 裕貴	慶應義塾大学先端生命科学研究所	実験補助員

### ■背景・目的

癌による死亡のほとんどは転移を原因としています。癌細胞転移は多段階の複雑な過程（隣接する組織への浸潤、血管やリンパ管内への侵入、血液やリンパ液中での遊走、別の臓器や器官への侵襲、新たな腫瘍の形成）を経て進行します。各過程を制御する分子機構はほとんど未解明で、それ故に癌細胞転移を抑制する薬の開発は遅れています。

癌細胞転移は胚の初期発生で見られる原腸陥入を制御している分子機構の一部を利用して起こることが知られています。我々はこの共通した機構に着目した小型魚類ゼブラフィッシュ胚を用いた癌細胞転移抑制効果を有する化合物の探索法を開発しました。同探索法は簡便且つ短時間で同効果を有する化合物の探索が可能です。漢方薬は天然由来のため副作用などの心配も少なく、補完代替療法と用いられることが多いのですが、それらの一部は科学的に薬効が証明されていません。そこで、本研究は同探索法を用い癌細胞転移抑制効果を有する漢方薬を探索し、その薬効を実験科学的に証明することを目的としました。

### ■結果・考察

シナモンより抽出した漢方薬（桂皮、以下シナモン抽出物）が原腸陥入を干渉し、またヒト乳癌細胞の浸潤及び細胞移動（癌転移に関与する分子機構）も抑制した。さらに、ヒト乳癌細胞を移植したゼブラフィッシュを用いた評価からシナモン抽出物は癌細胞の血管を経由した移動も抑制することを明らかにした。メタボローム解析の結果、シナモン抽出物は解糖系代謝に関与している酵素である Hexokinase2 の発現を低下させることで、解糖系代謝を低下させた。

### ■結論

上述の結果を統合すると、シナモン抽出物は Hexokinase2 の発現抑制を起因とする解糖系の代謝低下を誘導することで、癌細胞の移動及び浸潤を抑制していることを明らかにした。

本研究成果をまとめた論文は投稿中です。

Cinnamon bark extract suppresses metastatic dissemination of cancer cells through inhibition of glycolytic metabolism.

Yuki Konno, Ami Maruyama, Masaru Tomita, Hideki Makinoshima, and Joji Nakayama.

doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.25.437098>

和漢医薬学総合研究所年報

第47巻

令和3年4月

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)





リサイクル適性 

この印刷物は、印刷用の紙へ  
リサイクルできます。