

氏 名 ちょう けいほう  
趙 慶峰

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 富生命博甲第142号

学位授与年月日 令和3年9月30日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

教育部名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程  
生体情報システム科学専攻

学位論文題目

Development studies based on Kampo theories for new treatment strategies  
and drug discoveries

(漢方薬の理論に立脚した新しい治療戦略と薬開発に関する研究)

論文審査委員

(主査) 教授 中村 真人

(副査) 教授 黒澤 信幸

(副査) 准教授 東田 道久

(指導教員) 教授 黒澤 信幸

## 学位論文の要旨

学位論文題目 : Development studies based on Kampo theories for new  
treatment strategies and drug discoveries  
(漢方薬の理論に立脚した新しい治療戦略と薬開発に関する研究)

生体情報システム科学専攻  
氏名 趙 慶峰

Traditional Chinese medicines (TCMs) are gaining more and more attention all over the world, due to their specific theory and long historical clinical practice. However, modern exploration of TCM derived functional compounds is significantly hindered by the inefficient elucidation of pharmacological functions over past decades, because conventional research methods are incapable of efficiently elucidating therapeutic potential of TCM conferred by multiple functional compounds. Based on traditional Chinese medicine theory and modern pharmacology research, this study summarized and explored the current common research ideas of Traditional Chinese Medicine.

Collectively, such critical review is expected to provide novel perspective-strategy that could significantly improve modern exploration and exploitation of TCM derived functional compounds that further promote new drug discovery and development against the complex diseases. In a few word, the analysis of TCMs are moving towards an integrative and comprehensive direction, in order to better address the inherent holistic nature of TCMs.

Chapter 1: Acquisition of basic data on 120 types of crude drugs used in Kampo medicine, the construction of a library to examine neuronal/glia cell function and expressed genes, and an investigation of changes in the expression of depression-related factors.

The component profiles of 120 types of crude drug extracts, which were supplied by the Institute of Natural Medicine, University of Toyama, were obtained by 3D-HPLC. The neuronal cell line N18TG2 and glial cell line C6Bu-1 were treated with two concentrations and 480 morphological photographs were obtained. RNA was also extracted from each treated cell and converted to cDNA to create a library. The expression levels of BNIP-3 mRNA, which we previously identified as an antidepressant-related factor,

were investigated in the cDNA library using PCR. The results obtained revealed that BNIP-3 mRNA expression levels were increased by many of the herbal medicines in “Hochuekkito (補中益氣湯:HET)”, but were decreased by the herbal medicines in “Sanou-shashin-to (三黃瀉心湯:SST)” and “Orengedokuto (黃連解毒湯:OGT)”, which are used to treat anxiety.

Chapter 2: Reduced cytotoxicity of the combined extraction of *Coptidis rhizoma* and *Rhei rhizoma*: An example of the “herbal pair” theory.

Research on SST and OGT showed that both inhibited abnormal increases in Qi as described above, and *Coptidis rhizoma* (CR) and *Rhei rhizoma* (RR), which are included in OGT, suppressed the cytotoxicity of the other. Since the color of the solution when CR and RR were extracted together was lighter than when they were extracted individually, their components were analyzed by 3D-HPLC. The amount of CR-derived berberine was markedly lower in the co-extraction than in the CR alone extract. When the CR and CC extracts were combined *in vitro*, a new precipitate was formed. However, when cytotoxicity was assessed using the MTT assay, the inhibition of toxicity was only detected in the co-extraction, and not with *in vitro* mixing. The underlying mechanisms currently remain unclear; however, these results provide supportive evidence for the “herbal pair” theory in Chinese medicine.

Chapter 3: Stepwise detection of trace agonistic components in HET using electrophysiological techniques.

The majority of antidepressants are inhibitors of the serotonin 2C receptor (5-HT<sub>2C</sub>), whereas HET has been identified as a stimulator. In this chapter, active compounds were analyzed using electrophysiological methods without omitting any of the intermediate steps of separation. The results obtained showed that a molecule with 283.14 exhibited high physiological activity; however, its structure was not elucidated because it may be an ultra-trace component. These results indicate that a trace amount of a component with high activity contributes to the effects of Chinese herbal medicine. Since this molecule was present at a trace amount, HET may have many agonistic components that have yet to be identified.

Chapter 4: Clarifying the pharmacological mechanisms of action of Shenfu Decoction on cardiovascular diseases using a network pharmacology approach.

New prescriptions may be developed based on the Kampo medicine theories. Numerous prescriptions have newly been developed and used in China to prevent the aggravation of COVID-19. Therefore, basic research was initiated with the aim of developing prescriptions to prevent heart failure caused by the side effects of anticancer drugs. In this chapter, experiments were performed on Shenfu Decoction (人參附子湯: SFD) and the genes contributing to its effects. The myoblast cell line H9C2, which differentiates to the cardiac type with a decrease in the percentage of serum in media and supplementation with retinoic acid, was treated with doxorubicin and SFD. A gene chip analysis followed by a network pharmacology and protein-protein network/module analysis were performed. The results obtained indicated that SFD significantly altered the expression of ubiquitination-related genes; therefore, it may play an important role in the treatment of heart failure. Information on hub genes will provide insights into the underlying molecular mechanisms and contribute to the development of effective novel Kampo prescriptions.

Collectively, the results of each chapter provide the following: 1) basic information on crude drugs in Chinese herbal medicine, 2) insights into the “herbal pair” theory, 3) a more detailed understanding of the effects of ultra-trace agonistic components that exert physiological effects, and 4) the outcomes of attempts to develop new Kampo prescriptions using novel combinations and their underlying molecular mechanisms of action. Although these results appear to be fragmented, research based on the basic concepts of classical Chinese medicine will contribute to the discovery of new theories and therapeutic drugs, and examples of this are described herein.

#### 発表論文

1) Tohda M and Zhao Q (2021) 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. 75-82 (2021)  
(<https://doi.org/10.1002/tkm2.1274>)

2) Suzuki R, Zhao Q, Hosokai H and Tohda M (2021) Examination of the molecular mechanism of the mutual inhibitory effect of each cytotoxicity caused by the combined extraction of *Coptidis Rhizoma* and *Rhei Rhizoma*:

An example of providing evidence to "herb pair" theory in Kampo medicine.  
Traditional & Kampo Medicine 8, 187-193.  
(<https://doi.org/10.1002/tkm2.1295>)

3) Tohda M, Zhao Q, Kobayashi N and Kazuma K (2021) Use of an electrophysiological technique for stepwise detection of trace agonist constituents of Hochuekkito in *Xenopus* oocytes injected with serotonin 2C receptor mRNA. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 15. 143-149.  
(DOI: 10.5582/ddt.2021.01037)

4) Zhao Q and Tohda M. (2021) Clarifying the pharmacological mechanisms of action of Shenfu Decoction on cardiovascular diseases using a network pharmacology approach. *Drug Discoveries & Therapeutics* 15 197-203.  
(DOI: 10.5582/ddt.2021.01071)

## 【論文審査の結果の要旨】

本審査委員会は、令和4年8月1日（月）に、趙慶峰氏の博士学位論文公聴会および最終審査を行い、以下に概要を示す通り、博士学位論文審査及び最終試験ともに合格と判断した。

本博士学位論文の概要は以下のとおりである。

近年、漢方薬の有効性に対する研究が増加しているが、その手法は、有効性を有効成分と作用分子に求める要素還元論的な方法が主となっている。しかし、一方で漢方薬には独自の古典的理論が存在し、その理論を基盤とした研究は著しく不足している。本論文は、趙慶峰氏が、本学和漢研に留学し、漢方理論に立脚して進めてきた漢方薬の有効性の解明に関する研究が主軸である。

趙氏は、基盤となる漢方薬理論を熟考し、1)漢方薬には微量で生体機能に働きかけて作用を及ぼすしくみがあること、2)漢方薬の有効性は複数の生薬の組み合わせによる機能調整のしくみがあること、の2点に重要な特徴があると推察し、それを実証することを目的に研究を進め、4章の学位論文にまとめた。

第1章では、微量で作用するしくみに焦点を当て、まず、漢方薬を構成する120種類の生薬エキスを和漢研から供給を受け、その全てに対して、微量成分分析に優れる3D-HPLCによるフィンガープリントの作成と、神経機能を持つ神経系培養細胞N18TG-2と増殖性の強いグリア系細胞のC6Bu-1への投与反応を調査し、形態写真データ480枚の撮影、加えてその480種のRNAを抽出してcDNAへの変換を行った。それらの成果は所属研究室の生薬研究ライブラリに追加され、これにより、微量成分分析の情報と、神経系細胞への作用情報とcDNAが加わった。そこで、このライブラリからの生薬情報とcDNAを利用して、BNIP-3 mRNAに着目し増幅することで、研究室で追究してきている「気」とBNIP-3 mRNAの相関性を検討した。「気」を上昇させる補中益気湯(HET)および抑制する三黄写心湯・黄連解毒湯(SST/OGT)を対象に、それぞれを構成する生薬の上記2種類の細胞反応によるBNIP-3 mRNAの発現に注目して解析を行った。その結果、HETの構成生薬ではBNIP-3 mRNAが亢進するものが優位で、SST/OGTの構成生薬ではBNIP-3 mRNA抑制性を示すものが優位であることが判明した。新調強化された生薬ライブラリの利用により、「気」とBNIP-3 mRNA発現の関係に新たな根拠を加えることができた。

第2章では、2つの生薬の組み合わせ効果“対薬”に関する検討として、三黄写心湯と黄連解毒湯に着目し、黄連と大黄の組み合わせの意義を検討した。大黄と黄連それぞれの抽出液と、両抽出液の混合液、両者混合後抽出した抽出液の4つを用いて、成分分析、および、培養細胞への投与後の細胞形態の観察とMTTアッセイ法での細胞への影響を検討した。その結果、大黄と黄連は共に個々では強い細胞毒性を生ずるが、両者混合後抽出した場合、その両者の細胞毒性が相互に完全に抑制されることが示された。また、両者の個々の抽出液を試験管内で混合すると沈殿を生ずるが、細胞

毒性はその上清にも残存することが認められた。これらの結果は、この相互の毒性消失効果には両生薬を一緒に抽出することが必須であることを示唆しており、漢方の対薬の効果を裏付ける実例と言える。抽出時の化学的反応の調査など、次の展開が期待される。

第3章では、超微量成分の生理学的作用の検出について検討した。抗うつ薬の多くはセロトニン 2C 受容体 (5-HT<sub>2CR</sub>) の抑制薬だが、5-HT<sub>2CR</sub> 発現遺伝子を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学検査で、高感度でセロトニン 2C 受容体 (5-HT<sub>2CR</sub>) を介する細胞反応が検知できる。抗うつ作用が期待される補中益気湯 (HET) を用いて、合成 5-HT<sub>2CR</sub> mRNA 投与に対する卵母細胞の活動電位の反応を検討した。実験の結果、HET では逆に活動電位変化の増強効果を示した。そこで活性増強の要因となる生薬成分の探索を進めたところ、特に升麻に強い作用が見られた。さらに升麻を HPLC で分画分取して調べたところ、ひとつのピークでのみ活性化効果を認めた。MS スペクトル解析で分子量が 283.14 であることが判明した。微量ゆえに構造同定にまでは至らなかったが、この高感度電気生理学検査の手法を用いたことで、生薬中に微量な有効成分の存在とその微量成分が薬効メカニズムの鍵になっていることが示唆された。

第4章では、心不全治療効果が期待される人参附子湯の作用機序の解明に **Network pharmacology** 的アプローチの導入を行った。まず、心不全誘発作用を持つ抗がん薬ドキシソルビシン処置を行なった心筋系細胞 C2H9 を用いて、人参附子湯を投与した場合の遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法により検出した。次にその遺伝子発現データについて、**Network pharmacology** による解析手順に従って、まず **String** 解析を行い、蛋白間相互作用の解析を行った。次に **Cytoscape** 解析によって 9 つの相互連関性ネットワークを形成しているコロニーを抽出し、その中心となる **hub gene** を同定した。さらに **Gene Ontology analysis** と **Pathway analysis** によって、それら **hub gene** に関しての関係する遺伝子群や活性化されている経路に関する知見を得た。そこから先のさらに踏み込んだ詳細な解析にはまだ至っていないものの、**Network pharmacology** 手法の導入により、**Big data** に基づく全体的な視点からの人参附子湯の薬効解析が進められた。漢方薬の作用解析においてバイオインフォマティクスを活用する新たな解析アプローチとその可能性を示した点で有益な成果と言えよう。

このように、趙慶峰氏による本博士研究は、漢方理論に立脚して、微量成分による薬効と複数成分の組み合わせ効果に焦点を当て、地道であるが戦略的に実験データを収集し、研究室の生薬ライブラリに新たな有用な成果物に追加し、付加価値の高いデータベースの構築に貢献した。さらに複数生薬の組み合わせ効果を説明する実験結果、また遺伝子導入卵母細胞を用いた高感度電気生理学実験で、微量での生理活性作動のしくみの存在を実証した。これらは漢方理論を裏付ける成果であると評価できる。さらに、生薬のライブラリを充実させ強化すると同時に、それを利用して構成生薬から薬効解析を行った実施例、さらに細胞への薬効調査実験にマイクロアレイ検査の利用、そしてその解析にネットワーク薬理学を導入して関係する遺伝子群、活性化経路を導き出した実施例を提示したが、これらはいずれも網羅的なビッグデータとバイオイン

フォーマティクスのアプローチを積極的に活用した取り組みであり、生体情報システム科学専攻が目指す方向にも適う有望な研究成果と評価できる。

これらの成果は既に4報の論文として報告されており、うち1報は著者2名中の筆頭著者であり、それ以外の3報も全て著者4名以内の第2著者であり、それぞれの論文に対する寄与率も高い。コロナ蔓延の時期と重なり、厳しい活動制限により予備審査、公聴会と最終審査ともオンラインで行わざるを得なかったが、研究者としての能力の高さと今後の発展性は十分に期待できるレベルにあると判断できる。

以上の点から、趙慶峰氏は博士号を与えるレベルに到達しているものと判断した。