

201110018A

別添1

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

漢方薬の作用機序を解明するための研究

平成 23 年度

総括研究報告書

研究代表者 鈴木 洋史

研究分担者 高田 龍平

研究分担者 四ノ宮 成祥

研究分担者 松尾 洋孝

研究分担者 牧野 利明

平成 24 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

漢方薬の作用機序を解明するための研究

II. 添付資料

添付資料 1 : URAT1 阻害活性を持つ生薬のスクリーニングに関する資料

添付資料 2 : 生薬 B に含まれる URAT1 阻害活性物質の探索に関する資料

添付資料 3 : 生薬 F に含まれる URAT1 阻害活性物質の探索に関する資料

添付資料 4 : ABCG2 の転写活性化能を持つ生薬のスクリーニングに関する資料

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

研究課題：

漢方薬の作用機序を解明するための研究
(H22-創薬総合-一般-011)

研究代表者：

○鈴木 洋史（東京大学 医学部附属病院 薬剤部 教授・部長）

研究分担者：

○高田 龍平（東京大学 医学部附属病院 薬剤部 助教）

○四ノ宮 成祥（防衛医科大学校 分子生体制御学講座 教授）

○松尾 洋孝（防衛医科大学校 分子生体制御学講座 講師）

○牧野 利明（名古屋市立大学 大学院薬学研究科 准教授）

【研究要旨】

近年、漢方をはじめとする代替・補完医療が欧米でも注目されており、メタボリック症候群や高尿酸血症を含むさまざまな病態において効果があることが認知されているものの、漢方薬の作用機序についての分子レベルでのエビデンスの解明は十分ではない。そこで、本研究は、研究代表者らが同定した尿酸輸送体を含む輸送体の分子機能を指標に、輸送体を標的とする漢方薬・生薬とその成分を同定すること、ひいてはその作用機序を解明することにより、将来的に創薬に繋がる成果を得ることを目的として企画された。

研究開始二年度目にあたる平成 23 年度は、URAT1 阻害活性や ABCG2 転写活性化能を持つ生薬のスクリーニングを行い、これらの作用をもたらす化合物の単離・同定を目指した研究を進めた。

100 種以上の生薬から抽出したエキスを用い、URAT1 の尿酸輸送活性におよぼす影響について検討した。細胞毒性試験の結果により除外されたものを除き、数種の生薬エキスが URAT1 阻害活性を有することを見出したため、そのうちの 1 種について詳細な検討を行った結果、ヘキサソール画分に含まれ、濃度依存的な URAT1 阻害作用を有する単一化合物の同定に成功した。ABCG2 の発現調節活性についても同様の検討を行い、数種の生薬エキスが PPAR γ 依存的または非依存的に ABCG2 の転写活性化をもたらすことが示された。

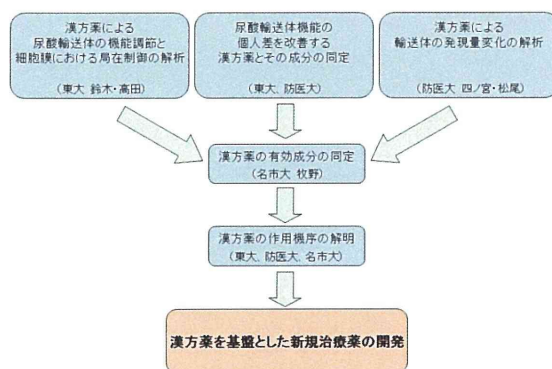
URAT1 による尿酸輸送に対する阻害活性を指標にスクリーニングを行った結果、URAT1 阻害作用を持つ可能性のある複数の生薬を見出し、そのうちの 1 種については分液操作および成分分析により単一の有効成分の同定に成功した。今後、URAT1 阻害作用を持つ生薬成分についてさらなる解析を行うとともに、ABCG2 の転写活性化をもたらす生薬成分の同定を行い、ABCG2 誘導の分子機序の解明を含めた詳細な解析を進めていく。

A. 研究目的

近年、漢方をはじめとする代替・補完医療が欧米でも注目されており、メタボリック症候群や高尿酸血症を含む種々の病態においても効果があることが認知されている。その一方で、治療の際には漢方医学的な専門知識が必要であり、すべての医師が自由に使いこなせるものではないのが現状である。さらには、漢方薬の作用機序についての分子レベルでのエビデンスの解明が十分でなかったことも、西洋医学を専門とする一般臨床医に活用される機会が少ない原因の一つと考えられる。しかしながら、漢方薬が有効性を持つことも事実であり、有効成分および作用機序が解明されれば、一般臨床医にも活用可能な効果的な治療薬となりうるとともに、新規治療薬の開発に繋がるのが期待される。一例として、茵陳蒿湯の有効成分ゲニピンが、ABCC2/MRP2の細胞膜への移行性を正に制御することで利胆作用を発揮するという、黄疸治療の作用機序を研究代表者らが過去に同定した (Hepatology, 2004; AJP, 2007)。このように、漢方薬は様々な生薬の組み合わせによる効果的な薬理作用もさることながら、多様な成分を含むケミカルライブラリーとしても、無限の可能性を秘めている貴重なリソースであると考えられる。

研究代表者らは、最近、痛風の主要な病因遺伝子がABCG2という尿酸輸送体であることを発見し (Science Transl Med, 2009)、日本人の痛風症

例の8割に見られるこの遺伝子多型の個人差によりその病因の多くを説明できることを報告した。この輸送体タンパク質の発現誘導は痛風の根本的治療に結びつく可能性が示唆されており、既存の漢方薬の成分にこのような作用を有するものが存在することが期待される。本研究には、その痛風遺伝子を同定した研究代表者らに加え、漢方薬の有効成分の単離や構造決定を得意とする生薬研究者が研究分担者として参画している。これにより、これまでに研究代表者らが同定した他の尿酸輸送体、URAT1 (Nature, 2002) やGLUT9 (Am J Hum Genet, 2008) を含めた輸送体の分子機能を指標に、輸送体を標的とする漢方薬・生薬とその成分を同定し、ひいてはその作用機序を解明することにより、将来的には創薬に繋がる成果が十分に期待できる (下図)。研究開始二年度目にあたる平成23年度は、URAT1阻害活性やABCG2転写活性化能を持つ生薬のスクリーニングを行い、これらの作用をもたらす化合物の単離・同定を目指した研究を進めた。



B. 研究方法

1) 生薬サンプルの調製

スクリーニングの対象とした生薬は、わが国で主に漢方薬の原料として流通している生薬（日本薬局方に収載されているものについては局方適合品）を、それぞれツムラ（東京）、大晃生薬（名古屋）、栃本天海堂（大阪）またはウチダ和漢薬（東京）より購入した。以下に、生薬名、購入元、ロット番号を列記する。

アキョウ（大晃生薬、5C01）、イレイセン（ツムラ、21020771）、インチンコウ（ツムラ、22036091）、ウイキョウ（ツムラ、21023321）、ウヤク（大晃生薬、8C25）、エンゴサク（ツムラ、22042871）、オウギ（ツムラ、22043331）、オウゴン（ツムラ、22037381）、オウバク（ツムラ、22038081）、オウレン（ツムラ、22048301）、オンジ（ツムラ、22000701）、ガイヨウ（ツムラ、22031681）、カシュウ（ツムラ、22039451）、カッコン（ツムラ、22040931）、カロコン（ツムラ、22029491）、カロニン（ツムラ、22037861）、カンキョウ（ツムラ、23002281）、カンゾウ（ツムラ、22053201）、キキョウ（ツムラ、22040381）、キクカ（ツムラ、22008841）、キジツ（ツムラ、22043361）、キョウカツ（ツムラ、22041601）、キョウニン（ツムラ、22009451）、クジン（ツムラ、22011021）、ケイガイ（ツムラ、22042881）、ケイヒ（ツムラ、

22044881）、ゲンノショウコ（大晃生薬、ロット番号未記載）、コウカ（ツムラ、22040711）、コウブシ（ツムラ、22005381）、コウベイ（大晃生薬、5G29）、コウボク（ツムラ、22028611）、ゴシツ（ツムラ、22026591）、ゴシュユ（ツムラ、22038071）、ゴボウシ（ツムラ、21054451）、ゴミシ（ツムラ、22026581）、サイコ（ツムラ、22025091）、サイシン（ツムラ、22020521）、サンシシ（ツムラ、22031161）、サンシュユ（ツムラ、22038491）、サンショウ（ツムラ、22004261）、サンソウニン（ツムラ、23006931）、サンヤク（ツムラ、23000221）、ジオウ（乾）（ツムラ、22029541）、ジオウ（熟）（ツムラ、22054311）、ジコッピ（ツムラ、23000421）、シツリシ（ツムラ、22028771）、シャクヤク（皮つき）（ツムラ、22011231）、シャクヤク（皮なし）（ツムラ、22040921）、ジャショウシ（栃本天海堂、291087）、シャゼンシ（ツムラ、22049181）、ジュウヤク（大晃生薬、ロット番号未記載）、シュクシャ（ツムラ、22042491）、ショウキョウ（ツムラ、22046221）、ショウマ（ツムラ、21017241）、シンイ（ツムラ、23012431）、センキュウ（ツムラ、23001371）、センコツ（ツムラ、20009891）、センタイ（大晃生薬、5C30）、ソウジュツ（ツムラ、23001771）、ソウハクヒ（ツムラ、22034951）、ソヨウ（大晃生薬、8F16）、ダイオウ（ツムラ、22041591）、タイソウ（ツムラ、22047121）、タクシャ

(ツムラ、22043631)、チクジョ (ツムラ、22036071)、チクセツニンジン (ツムラ、21018391)、チモ (ツムラ、23005341)、チョウジ (ツムラ、22000321)、チョウトウコウ (ツムラ、22045681)、チョレイ (ツムラ、22045121)、チンピ (ツムラ、23002241)、テンナンショウ (ツムラ、22038971)、テンマ (ツムラ、23011631)、テンモンドウ (ツムラ、23011471)、トウガシ (ツムラ、21057771)、トウキ (ツムラ、22049651)、トウニン (ツムラ、22052901)、ドクカツ (ツムラ、22006261)、ニンジン (ツムラ、23018601)、ニンドウ (ツムラ、22040701)、バイモ (ツムラ、23012111)、バクガ(大晃生薬、7K27)、バクモンドウ (ツムラ、23003151)、ハッカ (ツムラ、22044091)、ハマボウフウ (ツムラ、22047301)、ハンゲ (ツムラ、22042141)、ビャクゴウ (ツムラ、22029511)、ビャクシ (ツムラ、22041851)、ビャクジュツ (ツムラ、23018581)、ビワヨウ (ツムラ、23010081)、ビンロウジ (ツムラ、22031171)、ブクリョウ (ツムラ、23007381)、ブシ (ウチダ和漢薬、8511606)、ボウイ (ツムラ、23008241)、ボウフウ (ツムラ、22049031)、ボクソク (ツムラ、23001531)、ボタンピ (ツムラ、23005351)、ボレイ (ツムラ、23014111)、マオウ (ツムラ、22050411)、マシニン (ツムラ、23018661)、モクツウ (ツムラ、23006161)、モッコウ (ツムラ、

23004371)、ヨクイニン (ツムラ、23018091)、リョウガンニク (ツムラ、22036971)、リュウコツ (ツムラ、23006231)、リュウタン (ツムラ、22009991)、リョウキョウ (ツムラ、23011641)、レンギョウ (ツムラ、23012601)、レンニク (ツムラ、23006011)。

以上の生薬それぞれについて、以下の処理により MeOH 抽出エキスを調製した。生薬 1~30 g 分を 10 倍量の MeOH に浸し、ソニケーターで 30 分間処理した後、ひだろ過を行った。残留物に対して、再び同容量の MeOH を加え、ソニケーターで 30 分間処理した後に、再度のひだろ過を行った。さらにこの残留物に対してもう一度同様の操作を行い、3 回の抽出操作で得られたろ液を合わせた。ろ液を減圧下で濃縮後、真空下で乾燥させ、抽出物の重量を測定した。得られた抽出物は、100 mg/mL となるように DMSO に溶解し、使用時まで -20℃ で保存した。

2) URAT1 による尿酸取り込み実験

各種トランスポーターを含む膜タンパク質の裏打ちタンパク質として知られる PDZK1 を安定発現させたヒト腎由来株化細胞 HEK293/PDZK1 細胞、ならびにヒト URAT1 を含む pCMV-SPORT6 プラスミドは、金沢大学大学院薬学研究科分子薬物治療学研究室の加藤将夫教授、杉浦智子助教より分与されたものを使用した。HEK293/PDZK1 細胞は、1 mg/mL

G418 (ナカライテスク、京都)、10% ウシ胎児血清 (FBS、Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA) を培地として、75 cm² フラスコ (Becton Dickinson Labware、Franklin Lakes、NJ、USA) で培養し、80~90%コンフルエントになるごとに継代維持した。実験に使用する際には、20 µg/mL の poly-L-lysine (Sigma) を含む 0.02% 酢酸溶液で 1 時間以上のコーティング処理した 24 well 培養プレートに、HEK293/PDZK1 細胞を 2.5×10^5 cells / well となるように播種した。一晚培養して細胞の接着を確認した後、ヒト URAT1 を含む pCMV-SPORT6 プラスミド (1 µg / well) を Hilly Max (同仁化学、東京) を用いたリポフェクション法により細胞内へ導入した。Mock 細胞として、遺伝子を組み込んでいない pCI-neo プラスミド (Promega Corporation、Madison、WI、USA) を同様の方法で細胞内へ導入した。48 時間の培養の後、尿酸の取り込み実験を行った。

[¹⁴C]尿酸 (室町薬品、東京) を取り込み実験用緩衝液 (125 mM NaCl、4.8 mM KCl、1.2 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、1.2 mM MgSO₄、25 mM HEPES、5.6 mM glucose、pH 7.4) に $0.625 \mu\text{Ci} / \text{mL} = 11.6 \mu\text{M}$ の濃度で溶解した。URAT1 遺伝子を導入した HEK293 細胞の細胞培養用培地を吸引除去した後、37°C の取り込み実験用

緩衝液 200 µL / well を添加し、37°C で 8 時間のプレインキュベーションを行った。緩衝液を吸引除去後、[8-¹⁴C]尿酸および生薬エキスを含む取り込み実験用緩衝液を 200 µL 加え、30 分間、37°C でインキュベーションした。緩衝液を吸引除去し、1 mL / well の氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (0.15 M、pH 7.2) で細胞表面を 3 回洗浄した後、200 µL の 0.2N NaOH / 0.2% SDS を添加して一晚室温でインキュベートし、細胞を溶解させた。細胞溶解液に 2N HCl を 20 µL 加えて中和処理を行った後、液体シンチレーションカウンター測定用バイアルに移し、RI 活性を測定した。尿酸取り込み活性は、(生薬エキスで処理した URAT1 導入 HEK293/PDZK1 細胞の RI 活性 - Mock 細胞の RI 活性) / (無処置 URAT1 導入 HEK293/PDZK1 細胞の RI 活性 - Mock 細胞の RI 活性) をパーセンテージ (% of control) として表記した。

3) 生薬サンプルの細胞毒性試験

URAT1 阻害活性が認められた生薬については、その作用が細胞毒性による見かけのものではないことを確認するための試験を行った。Poly-L-lysine でコーティング処理した 96 well 培養プレートに HEK293/PDZK1 細胞を 6.25×10^4 個 / well となるように播種し、一晚培養した。培地を交換後、生薬エキスを含む取り込み実験用緩衝液で 30 分間、37°C インキュベーションを行い、緩衝

液を吸引除去後、通常の培地に交換して1時間培養した。培地を吸引除去後、0.5 mg/mL の MTT (Sigma) を含む培地を添加して4時間培養し、その後同容量の 10% SDS 水溶液を添加し、一晚 37°C インキュベーションを行った後、570 nm の吸光度を測定した。0.78 x 10³ ~ 1.25 x 10⁵ 個 / well で細胞を播種し無処置とした細胞での吸光度から、細胞数と吸光度間で相関する検量線を別に作成し、生細胞数を算出した。

4) 生薬 B エキスの大量調製と分画

URAT1 阻害活性が認められた生薬のうち、まずは生薬 B について、活性成分の単離を試みた。生薬 B (500 g) に 2.5 L の MeOH を加え、30 分間超音波処理して抽出後、ひだろ過を行った。残渣に 2.5 L の MeOH の添加・30 分間の超音波処理・ひだろ過という一連の操作を計 4 回行った後、全てのろ液を合わせて減圧濃縮した。得られたエキスを 500 mL のイオン交換水に懸濁し、150 mL のヘキサンで 3 回、150 mL の酢酸エチルで 4 回、150 mL の水飽和ブタノールで 4 回分液し、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分、水画分に分画した。ヘキサン画分については、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (薄層板、Merck シリカゲル 60F254、0.2 mm ; 移動層、ヘキサンまたはヘキサン/アセトン 8:2 ; 発色、アニスアルデヒド硫酸)、ブタノール画分については高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; カラ

ム ; Cosmosil C₁₈-ARS、4.6 x 150 mm ; 移動層、水/MeOH 70:30 → 0:100 (0 → 60 min、直線勾配)、1.0 mL/min、50°C ; 検出、UV 254 nm および 340 nm) により、含有する化合物の分析を行った。

5) 生薬 F エキスの大量調製と分画

生薬 F (500 g) に対して、4) と同様の方法により、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、ブタノール画分、水画分に分画した。活性が認められたヘキサン画分に対して、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (5 cm x 22.5 cm、移動層 : ヘキサン/アセトン 8:2) により分画し、画分 A~N に分画した。その後、活性が認められた分画から、同溶媒を用いたシリカゲル分取薄層クロマトグラフィーにより、化合物 S を得た。化合物 S に対して ¹H、¹³C-NMR、MS スペクトルにより解析し、構造式を同定した。

6) ABCG2 プロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドの構築

ヒト ABCG2 遺伝子の転写開始点を基準 (0bp) として、上流 4058 番目の塩基 (-4058bp) から下流 712 番目の塩基 (+712bp) までを PCR 法によりクローニングし、pGL3 Basic vector (Promega) に組み込んだ。

また、ヒト PPAR γ cDNA (Accession No. NM_138712) を PCR 法により増幅し、pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen) に組み込むことにより、

PPAR γ 発現プラスミドを構築した。

7) ABCG2 プロモーター領域を用いたルシフェーラスアッセイ

6)で構築したレポータープラスミドの活性を評価するため、ルシフェーラスアッセイを行った。

まず、各細胞を以下の条件で 24 well 培養プレートに播き、培養した。

・ HepG2 細胞: 1.5×10^5 cells / well の濃度で播種後、1% L-glu、1% ピルビン酸、1% PCSM、10% チャコール処理 FBS を含む DMEM 培地 (Phenol red 不含、High glucose) (Sigma-Aldrich) で培養した。

・ Caco-2 細胞: 1.0×10^5 cells / well の濃度で播種後、1% L-glu、1% ピルビン酸、1% PCSM、1% NEAA、10% チャコール処理 FBS を含む MEM 培地 (Phenol red 不含、High glucose) で培養した。

24 時間後、各プラスミドを細胞に遺伝子導入した。プラスミドの導入方法を以下に記す:

ヒト ABCG2 プロモータープラスミド (0.5 μ g / well)、PPAR γ 発現プラスミド (0.5 μ g / well)、および、コントロール用プラスミドとして、pGL3 Basic vector (0.5 μ g / well) ならびに pcDNA3.1(+) vector (0.5 μ g / well) を用いてプラスミド Mix を作製した。全てのプラスミド Mix には、pRL-SV40 vector (0.05 μ g / well) (遺伝子導入効率の補正用)を添加した。

上記プラスミド Mix と FuGENE 6 Transfection Reagent (導入プラスミ

ド量の 3 倍量) を FBS 不含の培地中で混和し、Premix とした。各 Premix を細胞に添加し、37°Cにて 6 時間のインキュベーションを行い、遺伝子導入を行った。

遺伝子導入から 24 時間後、試験化合物 (Pioglitazone、Troglitazone、各種生薬エキス) を添加した後、遺伝子導入から 36 時間後に、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェーラスアッセイを行った。ホタルルシフェーラス活性 (pGL3 Basic vector 由来) の測定値をウミシイタケルシフェーラス活性 (pRL-SV40 vector 由来) の測定値で補正し、ルシフェーラス活性値とした。

8) 倫理面への配慮

本研究で取り扱った標的遺伝子の遺伝子組み換え実験については、研究実施機関における組み替え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) URAT1 阻害活性を持つ生薬のスクリーニング

生薬から MeOH で抽出したエキスの 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下において尿酸取り込み実験を行い、非存在下における取り込み活性と比較して算出した URAT1 阻害活性を、添付資料 1-1 に示した。50%以上の阻害率を示した生薬は、生薬 A(23%)、カンキョウ(23%)、ケイガイ(46%)、生薬 B(46%)、コウブシ(17%)、ゴボウシ(22%)、生薬 C(0%)、生薬 D(0%)、ソウジュツ(0%)、ドクカツ(17%)、生薬 E(0%)、生薬 F(0%) の 12 種であった。

それら 12 種の生薬エキスに関して、細胞毒性試験を行った。その結果、カンキョウ、ケイガイ、コウブシ、ゴボウシ、ソウジュツ、ドクカツ処理により、有意な細胞数の減少が認められ、これらの生薬エキス存在下における見た目の尿酸取り込み活性の低下は細胞毒性を反映したものであると考えられた。

細胞毒性が認められたものを除いた 6 種の生薬のうち、生薬 A、生薬 B、生薬 C、生薬 D、生薬 E、生薬 F の MeOH エキスの URAT1 阻害活性の用量依存性実験の結果を、添付資料 1-2~1-7 に示した。6 種の生薬エキスにおいて、用量依存的な URAT1 阻害活性が見出された。そこで、本研究で探索対象とする生薬として、生薬 A、生薬 B、生薬 C、生薬 D、生薬 E、生薬 F の 6 種の生薬を選択することにし

た。

2) 生薬 B に含まれる URAT1 阻害活性物質の探索

1)のスクリーニングで得られた生薬 A~F のうち、細胞毒性が最も弱かった生薬 B を第一のターゲットとし、有効成分を単離するためのさらなる検討を行った。生薬 B に含まれている既知化合物として、生薬 B の指標成分ともなっている化合物 G が知られており、試薬として市販されている化合物 H も各種文献により生薬 B に含有されていることが明らかになっていることから、化合物 G と化合物 H の URAT1 阻害活性について評価した。両化合物を和光純薬(大阪)より購入し、10 または 100 μM における URAT1 阻害活性を測定した(添付資料 2-1)。その結果、両化合物による URAT 阻害活性が認められなかったことから、生薬 B に含まれる他の化合物が URAT1 阻害活性を有すると考え、生薬 B の MeOH エキスを分画し、活性成分を探索することとした。

生薬 B 500 g を MeOH で抽出し、30 g (収率 6.0 %) のエキスを得た。このエキスのうち 28 g を用いて、分液操作によりヘキサン画分(7.0 g)、酢酸エチル画分(3.8 g)、ブタノール画分(8.7 g)、水画分(7.3 g)に分画した。それぞれの分画物について、もとの生薬 B MeOH エキス 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当する濃度における URAT1 阻害活性を評価した。その結果、ヘキサン画分とブタノール画分が阻害作用を

有する可能性が示唆された（添付資料 2-2）。このことから、生薬 B に含まれる URAT1 阻害活性成分は単一ではなく、複数の化合物の有する阻害活性により大きな阻害が見られていることが考えられた。

各画分に含まれる有効成分の単離を目指し、さらなる検討を行った。ヘキサン画分をシリカゲル薄層クロマトグラフィー（ヘキサンまたはヘキサン/アセトン 8:2）で展開したところ、少なくとも 16 種類の化合物の存在が確認された（添付資料 2-3、A および B）。また、ブタノール画分について、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（水/MeOH 70:30 → 0:100）による分析を行った結果、UV 吸収をもつ化合物として、少なくとも 15 種類の化合物の存在を確認することができた（添付資料 2-3、C）。しかしながら、計 31 種類の化合物についてそれぞれ単独における活性を評価したところ、いずれの化合物においても URAT1 阻害活性は確認されなかった。

3) 生薬 F に含まれる URAT1 阻害活性物質の探索

生薬 F 500 g を MeOH で抽出し、26.1 g（収率 5.2 %）のエキスを得た。このエキスをを用いて、分液操作によりヘキサン画分（6.1 g）、酢酸エチル画分（7.4 g）、ブタノール画分（2.3 g）、水画分（2.5 g）に分画した。それぞれの分画物について、もとの生薬 F MeOH エキス 100 $\mu\text{g/mL}$ に相当する

濃度における URAT1 阻害活性を評価した。その結果、ヘキサン画分と酢酸エチル画分による阻害効果が見出された（添付資料 3-1）。

そこで、このヘキサン画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、画分 A~N を得た。各画分について、33 $\mu\text{g/mL}$ における URAT1 阻害活性を評価したところ、画分 D~H、画分 J~K に活性を認めた（添付資料 3-2）。比較的単一化合物を多く含む画分 F を分取薄層クロマトグラフィーにより精製し、化合物 S を得た。化合物 S の MS スペクトル、 ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルを解析し、構造式を同定した。

化合物 S は、URAT1 を用量依存的に阻害する作用をもち、その 50% 阻害濃度は 79 μM であった（添付資料 3-3）。現在、URAT1 阻害活性を得るための必須官能基を同定し、より強い活性を持つ化合物を得て創薬へ応用することを目指し、化合物 S の構造活性相関解析を進めている。

4) ABCG2 の転写活性化能を持つ生薬のスクリーニング

はじめに、ABCG2 のプロモーター領域が有する転写活性について、ルシフェレースアッセイにより評価する *in vitro* 実験系の構築を行った。ヒト肝臓由来の HepG2 細胞、ヒト消化管由来の Caco-2 細胞において、ヒト ABCG2 プロモーター領域を組み込んだプラスミドはコントロールプラスミドと比較し、有意なルシフェレース

活性の上昇をもたらしたことから（添付資料 4-1）、両細胞において、ヒト ABCG2 プロモーター領域が転写活性を有することが確認された。

ABCG2 が核内受容体 PPAR γ により正の転写制御を受けることが報告されていたため、構築した実験系における PPAR γ の影響を解析した。HepG2 細胞に PPAR γ 発現プラスミドとレポータープラスミドとを共導入した結果、ヒト ABCG2 プロモーター存在下においてのみ、PPAR γ によるルシフェラーゼ活性の有意な上昇が見出された（添付資料 4-2）。さらに、添付資料 4-3 および 4-4 に示すように、PPAR γ のアゴニストとして知られる Troglitazone、Pioglitazone を添加することで、ABCG2 のプロモーター活性のさらなる亢進が見られた。Caco-2 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、HepG2 細胞と同様、PPAR γ の共発現ならびに Pioglitazone 存在下において転写活性の有意な上昇が認められた（添付資料 4-5）。これらの結果から、本研究により構築された実験系はヒト ABCG2 の転写活性を評価する上で有用な評価系となりえると考えられた。

これらの結果を踏まえて、生薬エキスによる ABCG2 転写活性化作用に関するスクリーニングを行った。はじめに、比較的高いルシフェラーゼ活性をもたらす HepG2 細胞を用い、PPAR γ 導入時、各種生薬エキスの 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下におけるルシフェラーゼ活性を評価した（添付資

料 4-6~4-7）。HepG2 における検討により ABCG2 転写活性化作用が示唆された 19 種の生薬について、ABCG2 による尿酸排泄に関与するとされるヒト腸管由来の Caco-2 細胞を用いて同様の検討を行った結果、12 種の生薬エキスについて ABCG2 誘導活性が見出された（添付資料 4-8）。これら 12 種の生薬について、PPAR γ 存在下・非存在下、各種生薬エキス 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 存在下における詳細な検討を行った結果、多くの生薬エキスが PPAR γ 依存的に ABCG2 転写活性化作用をもたらす一方で、一部には PPAR γ 非依存的な ABCG2 転写活性化を生じるものも見出された（添付資料 4-9）。

D. 考察

わが国で漢方薬の原料として流通している生薬は約 400 種類であるが、そのうち使用量が多く汎用性の高いと考えられる 111 種の生薬を入手し、本研究におけるスクリーニング対象とした。この生薬数は、一般用漢方製剤 263 種の 9 割以上、医療用漢方エキス製剤 148 種すべてを調剤、製造できる数に相当し、日本で利用されている漢方薬の有効性を探索するためには十分な量と考えられる。今回は、この 111 種類の生薬それぞれについて MeOH 抽出したエキスを調製し、さまざまな薬理活性を探索できるようなライブラリーを作成した。生薬は 1 種類であってもその中には無数の化合物を含むことになるため、このライブラリーは本研究だけでなく、さまざまな薬理活性を対象とした創薬研究に応用可能なものである。なお、今後も生薬入手の試みは継続して行い、ライブラリーを拡充していく予定である。

昨年度に引き続き、今年度もこのライブラリーを用いて URAT1 阻害活性を持つ化合物の探索研究を行った。その結果、111 種類の生薬から 12 種類の陽性サンプルを得ることが出来、細胞毒性試験により細胞毒性が認められなかった 6 種の生薬を選択することが出来た。新薬の開発に成功する確率は、一般的に 1~2 万化合物のうちの 1 つとされていることを考えると、現段階では生薬エキスという無数の化合物を含んだ混合物ではあるものの、比較的高い確率で有用な化合物を含

んでいるグループを見出すことができたことになる。

見出された 6 種の生薬のうち、生薬 B および F について、さらなる活性成分の絞り込みを試みた。生薬 B の作用はその他の 4 生薬と比較して高くはなかったものの、5 生薬のうちでは細胞毒性が最も弱かったこと、漢方薬に配合される生薬として最も汎用性が高く多くの漢方薬の有効成分が得られる可能性があることから選択した。常法により分画を行い、有効成分の候補として計 31 種類の化合物の存在を確認することに成功した。しかし、その 31 種の化合物は、単独では URAT1 阻害活性を生じないことが明らかとなった。生薬 B は、僅かに URAT1 阻害活性を持つ多数の化合物を含み、それらが相加相乗作用することにより有効性を示すことが推測された。このことから、生薬 B については特定の化合物を有効成分として同定することが困難であることが明らかになった。

一方、生薬 F は、高濃度において細胞毒性が認められるものの、それ以上の強い URAT1 阻害活性を持つことから、その有効成分の探索を試みた。各種カラムクロマトグラフィーに供して分画を進めた結果、単一化合物として化合物 S を有効成分として単離した。化合物 S の URAT1 に対する 50%阻害濃度は 79 μM であり、既知の URAT1 阻害薬であるベンズブロマロンの IC₅₀ (約 50 nM) と比較すると活性は弱いものの、インドメタシン (約 41 μM) と匹敵する活性を持つこ

とになる。漢方薬はさまざまな化合物を含み、それらが相加相乗作用をすることにより、最終的に強い薬理作用を示すことから、漢方薬から単一化合物として西洋医薬と同等の活性を持つ化合物が得られたことは興味深い。今後、類似化合物との構造活性相関や、生薬 F に含まれる他の化合物との相互作用を比較検討することにより、単一化合物としての新薬の開発を目指すと同時に、漢方薬としての作用機序の解明を試みる。

ABCG2 の発現調節に関しては、消化管および肝臓においてヒト ABCG2 が PPAR γ による転写制御を受けていることが示唆された。また、ヒト ABCG2 のプロモーター活性を指標としたスクリーニングの結果、12 種の生薬が消化管における ABCG2 発現誘導をもたらす可能性が示唆された。漢方薬 TongXinLuo の報告も含め、PPAR γ 活性化作用をもたらす可能性のある天然化合物は多数知られており、今後のスクリーニングにより ABCG2 の発現誘導活性を有する生薬成分が同定されることを期待している。一方、今回のスクリーニングで見出された生薬エキスの中には PPAR γ 非依存的に ABCG2 の転写活性の上昇をもたらすものも見出されていることから、PPAR γ とは異なる機序により ABCG2 の転写誘導をもたらす生薬成分が存在することが考えられ、新規機序による ABCG2 誘導剤の開発につながる可能性に期待している。

E. 結論

URAT1 による尿酸輸送に対する阻害活性を指標にスクリーニングを行った結果、URAT1 阻害作用を持つ可能性のある生薬として 12 種類が選択された。そのうち、細胞毒性の認められない 6 種の生薬については現在検討を進めており、優先的に研究を進めた一つの生薬の中からは、単独で URAT1 阻害活性を有する化合物を単離することができた。来年度には、得られた化合物と類似化合物との構造活性相関など、URAT1 阻害作用を持つ生薬成分に関してさらなる解析を行う。また、ABCG2 の転写活性に関するスクリーニングの結果、ABCG2 誘導作用を持つ可能性のある 12 種の生薬を見出しており、今後のさらなる検討により成分同定・機序解明を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当ありません。

G. **研究発表**

以下には 2011 年度に出版された論文のリスト、および 2011 年度に行った学会発表のリストを示す。

【原著論文】

1. Yamanashi Y., Takada T., Shoda J., Suzuki H. Novel function of Niemann-Pick C1-like 1 as a negative regulator of Niemann-Pick C2 protein. *Hepatology*. 2012;55:953-964.
2. Yamamoto T., Yasuno N., Katada S., Hisaka A., Hanafusa N., Noiri E., Yahagi N., Fujita T., Suzuki H. Proposal of a pharmacokinetically optimized dosage regimen of antibiotics in patients receiving continuous hemodiafiltration. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55:5804-5812.
3. Yamamoto N., Honma M., Suzuki H. Off-target serine/threonine kinase 10 inhibition by erlotinib enhances lymphocytic activity leading to severe skin disorders. *Mol Pharmacol*. 2011;80:466-475.
4. Soga T., Sugimoto M., Honma M., Mori M., Igarashi K., Kashikura K., Ikeda S., Hirayama A., Yamamoto T., Yoshida H., Otsuka M., Tsuji S., Yatomi Y., Sakuragawa T., Watanabe H., Nihei K., Saito T., Kawata S., Suzuki H., Tomita M., Suematsu M. Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *J Hepatol*. 2011;55:896-905.
5. Nakayama A., Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Ikebuchi Y., Ito K., Hosoya T., Kanai Y., Suzuki H., Shinomiya N. ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011;30:1091-1097.
6. Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Nakayama A., Takada Y., Okada C., Sakurai Y., Hosoya T., Kanai Y., Suzuki H., Shinomiya N. Identification of ABCG2 dysfunction as a major factor contributing to gout. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011;30:1098-1104.
7. Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Nakayama A., Suzuki H., Hosoya T., Shinomiya N. ABCG2/BCRP dysfunction as a major cause of gout. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2011;30:1117-1128.
8. Koshimichi H., Ito K., Hisaka A.,

- Honma M., Suzuki H. Analysis and prediction of drug transfer into human milk taking into consideration secretion and reuptake clearances across the mammary epithelia. **Drug Metab Dispos.** 2011;39:2370-2380.
9. 松原和夫, 外山聡, 佐藤博, 鈴木洋史, 栗屋敏雄, 田崎嘉一, 安岡俊明, 堀内龍也. 薬剤師の病棟勤務時間が長いほど薬剤が関連するインシデント発生数は少ない 国立大学病院における調査. **薬学雑誌.** 2011;131:635-641.
 10. Kawamura Y., Matsuo H., Chiba T., Nagamori S., Nakayama A., Inoue H., Utsumi Y., Oda T., Nishiyama J., Kanai Y., Shinomiya N. Pathogenic GLUT9 Mutations Causing Renal Hypouricemia Type 2 (RHUC2). **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.** 2011;30:1105-1111.
 11. Tanaka M., Kinoshita M., Yoshihara Y., Shinomiya N., Seki S., Nemoto K., Hirayama T., Dai T., Huang L., Hamblin M.R., Morimoto Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. **Photochem Photobiol.** 2012;88:227-232.
 12. Shono S., Habu Y., Nakashima M., Sato A., Nakashima H., Miyazaki H., Kinoshita M., Tsumatori G., Shinomiya N., Seki S. The immunologic outcome of enhanced function of mouse liver lymphocytes and Kupffer cells by high-fat and high-cholesterol diet. **Shock.** 2011;36:484-493.
 13. Fujita M., Sato H., Kaku K., Tokuno S., Kanatani Y., Suzuki S., Shinomiya N. Airport quarantine inspection, follow-up observation, and the prevention of pandemic influenza. **Aviat Space Environ Med.** 2011;82:782-789.
 14. Kinoshita M., Miyazaki H., Ono S., Inatsu A., Nakashima H., Tsujimoto H., Shinomiya N., Saitoh D., Seki S. Enhancement of neutrophil function by IL-18 therapy protects burn-injured mice from MRSA infection. **Infect Immun.** 2011;79:2670-2680.
 15. Hamajima N., Okada R., Kawai S., Hishida A., Morita E., Yin G., Wakai K., Matsuo H., Inoue H., Takada Y., Asai Y., Mori A., Naito M. Significant association of serum uric acid levels with SLC2A9 rs11722228 among a Japanese population. **Mol Genet Metab.** 2011;103:378-382.

16. Sumi, A., Hanada, N.Y., Bai, F., Makino, T., Mizukami, H., Ono, T. Roles of coagulation pathway and factor Xa in the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. **Biol Pharm Bull.** 2011;34:824-830.
17. 松岡尚則, 栗林秀樹, 別府正志, 山口秀敏, 中田英之, 阿南多美恵, 頼建守, 岡田研吉, 岩井祐泉, 牧角和宏, 三浦於菟, 秋葉哲生, 牧野利明, 笛木司. 海人湯と鷓鴣菜湯. 漢方の臨床. 2011;58:2263-2272.

【総説・著書】

1. 鈴木理恵, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, イミダフェナシン. スズケンメディカル. 2011;14:11-12.
2. 鈴木洋史, 伊藤晃成: 薬物動態とトランスポーター. トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—(分担執筆). 2011;256-266.
3. 苦米地敬, 本多秀俊, 大野能之, 鈴木洋史: Let's! 服薬コミュニケーション, テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合カプセル剤・顆粒剤(ティーエスワン配合カプセル・配合顆粒). スズケンファーマ. 2011;14:2-5.
4. 大野能之, 鈴木洋史: 症例チャートからみる薬物治療マネジメント. 薬局別冊. 2011;62:209-219.
5. 大野能之, 鈴木洋史: チーム医療における医療情報の活かし方. 医薬ジャーナル. 2011;47:77-84.
6. 大野能之, 鈴木洋史: 病気と薬パーフェクトブック 2011. 薬局4月増刊号. 2011;62:1280-1281.
7. 大野能之, 樋坂章博, 鈴木洋史: CKDにおける薬剤の使用法とその留意点. **Medical Practice**. 2011;28:1103-1108.
8. 大野能之, 樋坂章博, 鈴木洋史: 消化管内のpH上昇とキレート形成による薬物間相互作用. **PharmaTribune**. 2011;3:18-21.
9. 大久保聡, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, イトラコナゾール. スズケンメディカル. 2011;14:11-12.
10. 杉山雄一, 鈴木洋史, 樋坂章博, 大野能之, 前田和哉: 付録ポスター: 薬物動態の変化を伴う薬物間相互作用2011. **PharmaTribune**. 2011;3.
11. 杉山雄一, 樋坂章博, 大野能之, 鈴木洋史, 前田和哉, 草間真紀子: 薬物動態の変化を伴う薬物間相互作用 薬物間相互作用はここまで予測できる(座談会). **PharmaTribune**. 2011;3:7-17.
12. 山本武人, 鈴木洋史: 緊急報告すべき検査結果のすべて・すぐに使えるパニック値事典: 薬物検査強心薬. 検査と技術. 2011;39:959-961.
13. 山道寛子, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム. スズケンメディカル. 2011;14:11-12.
14. 山田麻衣子, 本多秀俊, 大野能之, 鈴木洋史: Let's! 服薬コミュニケーション, イミダフェナシン. スズケンファーマ. 2011;14:2-5.
15. 山田千穂, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, 炭酸ランタン水和物. スズケンメディカル. 2011;14:11-12.
16. 山口諒, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, エゼチミブ. スズケンメデ

- イカル. 2011;14:11-12.
17. 永井倫典, 本多秀俊, 大野能之, 鈴木洋史: Let's! 服薬コミュニケーション, 爪白癬. スズケンファーマ. 2011;14:2-5.
 18. 伊藤晃成, 鈴木洋史: 【小児医療における診断・治療の進歩】 治療技術 小児に対するファーマコゲノミクス (分担執筆). 小児科. 2011;52:1667-1674.
 19. 藤野知子, 本多秀俊, 大野能之, 鈴木洋史: Let's! 服薬コミュニケーション, エストラジオール. スズケンファーマ. 2012;15:2-5.
 20. 大野能之, 鈴木洋史: 病気と薬パーフェクトブック 2012. 薬局 4月増刊号. 2012;63:1030-1031.
 21. 大野能之, 山本武人, 樋坂章博, 鈴木洋史: 薬物動態理論に基づいた血液浄化療法時の薬物投与設計-第56回日本透析医学会ワークショップより. 透析会誌. 2012;45:117-119.
 22. 折山豊仁, 本多秀俊, 大野能之, 鈴木洋史: Let's! 服薬コミュニケーション, ドネペジル. スズケンファーマ. 2012;15:2-5.
 23. 高田龍平, 山梨義英, 鈴木洋史: コレステロールの胆汁排泄におけるトランスポートソーム. くずりとからだ (日本薬理学雑誌). 2012;139:56-60.
 24. 阿部敏秀, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, エストラジオール. スズケンメディカル. 2012;15:11-12.
 25. 阿部敏秀, 山本武人, 大野能之, 鈴木洋史: ドラッグコンサルテーション, ドネペジル. スズケンメディカル. 2012;15:11-12.
 26. 高田龍平, 松尾洋孝: 尿酸排出トランスporter ABCG2/BCRPと痛風発症リスク. 生化学. 2011;83:1131-1134.
 27. 高田龍平: コレステロール輸送体. **G.I. Research**. 2011;19:25-32.
 28. 高田龍平: 脂溶性ビタミンのトランスporter. 栄養・食品機能のトランスporter. 2011;167-182.
 29. 松尾洋孝: 【尿酸】高尿酸血症と腎輸送体. 腎臓. 2011;34:16-22.
 30. 高田雄三, 松尾洋孝: 痛風・高尿酸血症の原因遺伝子 (ABCG2). **Medical Technology**. 2011;39:884-886.
 31. 松尾洋孝, 四ノ宮成祥: 腎性低尿酸血症の遺伝学. **Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌**. 2012;145-154.
 32. 松尾洋孝: 【臨床医のための高尿酸血症・痛風のABC】その他 痛風の遺伝素因を教えてください. **高尿酸血症と痛風**. 2012;20:84-86.
 33. 牧野利明, 大嶽信弘: 漢方薬の副作用～偽アルドステロン症のメカニズムとその発症予防策について. **ファルマシア**. 2011;47:403-407.
 34. 牧野利明, 堀美智子: 生活習慣病等の方へのかぜ薬の選択. **Pharma Medica**. 2011;29:125-129.