

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 22 年度 ～ 24 年度

総合研究報告書

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 25 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

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 : ジャショウシに含まれる URAT1 阻害活性物質の探索に関する資料

添付資料 4 : ABCG2 の転写活性に着目した *in vitro* 評価系の構築に関する資料

添付資料 5 : 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）
総合研究報告書

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 講師）

○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。

平成 22 年度は、漢方薬の有効成分同定に向けた尿酸輸送体に関する各種スクリーニング系および漢方薬・生薬ライブラリーの構築を中心として研究を進めた。つづいて、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。平成 24 年度には、生薬のスクリーニングをさらに進め、これらの作用をもたらす化合物の同定や作用機序の解明を目指した研究を行った。

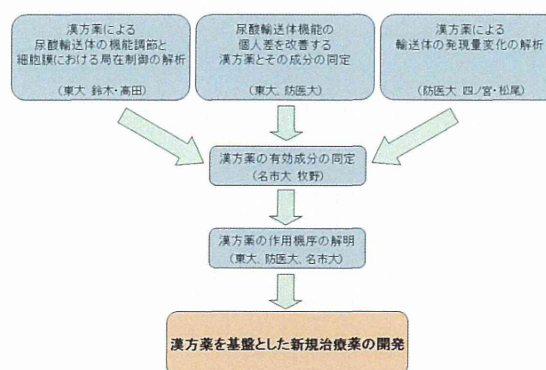
100 種以上の生薬から抽出したエキスを用い、URAT1 の尿酸輸送活性におよぼす影響について検討した。細胞毒性試験の結果により除外されたものを除き、数種の生薬エキスが URAT1 阻害活性を有することを見出したため、そのうちの 1 種であるジャショウシについて詳細な検討を行った。その結果、ヘキサシ画分に含まれ、濃度依存的な URAT1 阻害作用を有する単一化合物（osthol）の同定に成功し、輸送特性や構造活性相関に関する詳細な検討も加えた。ABCG2 の発現調節活性についても同様の検討を行い、数種の生薬エキスが ABCG2 の転写活性化をもたらすことが示された。そのうちの 1 種については、主にヘキサシ画分に含まれる活性成分として evodiamine を同定することができた。

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ことを期待される。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)。



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 分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) ジャショウシエキスの大量調製と分画

ジャショウシ (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、単一化合物を得た。この化合物に対して¹H、¹³C-NMR、MS スペクトルにより構造式を解析した。

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、マウス ABCG2 遺伝子の転写開始点を基準として、-1197bp から +162bp までを PCR 法によりクロー

ニングし、pGL3 Basic Vector に組み込んだ。

さらに、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レースアッセイ

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、ルシフェレー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% ビルビン酸、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% ビルビン酸、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。

・CMT93 細胞: 1.5×10^5 cells / well の濃度で播種後、1% PCSM、10% FBS (biosystems)を含む DMEM 培地 (Low glucose) (Sigma-Aldrich) 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：

・HepG2 細胞、Caco-2 細胞：ヒト ABCG2 プロモータープラスミド ($0.5 \mu\text{g} / \text{well}$)、PPAR γ 発現プラスミド ($0.5 \mu\text{g} / \text{well}$)、および、コントロール用プラスミドとして、pGL3 Basic vector ($0.5 \mu\text{g} / \text{well}$) ならびに pcDNA3.1(+)
vector ($0.5 \mu\text{g} / \text{well}$) 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 ($0.05 \mu\text{g} / \text{well}$) (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。

・CMT93 細胞：マウス ABCG2 プロモータープラスミド ($0.8 \mu\text{g} / \text{well}$) (コントロール用プラスミドは pGL3 Basic vector ($0.8 \mu\text{g} / \text{well}$)) と pRL-SV40 vector ($0.08 \mu\text{g} / \text{well}$) のプラスミド Mix に Lipofectamine 2000 Reagent ($2 \mu\text{L} / \text{well}$) (Invitrogen) を添加し、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、各種生薬エキスおよびその抽出物、evodiamine など) 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

エレーズアッセイを行った。ホタルルシフェラーゼ活性 (pGL3 Basic vector 由来) の測定値をウミシイタケルシフェラーゼ活性 (pRL-SV40 vector 由来) の測定値で補正し、ルシフェラーゼ活性値とした。

8) PPAR γ ノックダウン細胞の作製
 マウス PPAR γ を標的とした siRNA (GAUCUUGACAGGAAAGACAdTdT) を 7.5 μ L の Lipofectamine 2000 とともに FBS 不含の DMEM 培地 (High glucose) 500 μ L 中に添加し、15 分間室温でインキュベーションした。コントロール siRNA としては、siControl (Sigma Aldrich) を用いた。つづいて、Hepa1-6 細胞を 1% PCSM、10% FBS を含む DMEM 培地 (High glucose) で懸濁し、6 well 培養プレートに 2.5×10^5 cells / well で播種した後、上記 Premix を siRNA の終濃度が 125 pmol / well となるよう添加した。

48 時間後、RNA-solv Reagent (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) を用いて細胞を可溶化し、total RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪) を用いた逆転写反応により cDNA サンプルを得た。PPAR γ ノックダウン効率は、SyBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) を用いた定量的 PCR により解析した。使用したプライマー配列を以下に記す。

マウス PPAR γ sense:
 5'-GTCATTATTCTCAGTGGAGACC

G-3'、マウス PPAR γ antisense:
 5'-TGACGATCTGCCTGAGGTCTGT-3'、マウス ABCG2 sense:
 5'-TGCCAGGCGCTCATTTAAAA-3'、マウス ABCG2 antisense:
 5'-CCAGCGGCATCATATTTTCAGA-3'、 β -actin sense:
 5'-TTCAACACCCCAGCCATGTACG-3'、 β -actin antisense:
 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'。

PPAR γ および ABCG2 の mRNA 量は、 β -actin の mRNA 量で規格化することにより、相対発現量として算出した。

9) 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収率を、添付資料 1-1 に示した。エキス収率は生薬間で 0.64%~60.2%という大きな差を生じ、平均値は 9.7%であった。

得られた生薬エキスの 100 μg / 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 1-2 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%)、ジャシヨウシ (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、ジャシヨウシの 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 1-3~1-8 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、ジャシヨウシの 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~E、ジャシヨウシのうち、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 \rightarrow 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) ジャシヨウシに含まれる URAT1 阻害活性物質の探索

ジャシヨウシ 500 g を MeOH で抽出し、26.1 g (収率 5.2 %) のエキスを得た。このエキスの URAT1 阻害活性の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、53.2

$\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。このエキスを用いて、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)、水面分 (2.5 g) に分画した。それぞれの分画物について、もとのジャシヨウシ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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、単一化合物を得た。この化合物について、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ および MS スペクトルを取り、構造解析を行った。MS スペクトルから、分子量 244.11、分子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$ を得、NMR スペクトルから、本化合物はクマリン誘導体である osthol であることを同定した(添付資料 3-3)。

osthol 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 3-4)。osthol の細胞毒性を確認したところ、高濃度では細胞毒性がみられたが、100 μM で 93%の細胞が生存しており、osthol による尿酸取り込みの低下は細胞毒性によるものではないことが

示された。

また、HPLC を用いて、もとのジャシヨウシエキス中に含まれる osthol の量を測定した。その結果、保持時間 17.2 min に 322 nm に吸収極大をもつ osthol のピークが観測され、28.3 (w/w)% の値を得た (添付資料 3-5)。このことから、ジャシヨウシエキスの IC₅₀ (53.2 µg/mL) 中の osthol 濃度は 15.1 µg/mL と算出され、osthol の IC₅₀ が 78.8 µM (19.2 µg/ml) であることから、ジャシヨウシエキスによる URAT1 阻害活性のうち、大部分を osthol が担っていることが示唆された。

続いて、尿酸濃度 25-200 µM、取り込み時間 1 分で osthol の阻害作用の速度論的解析を行うことにした。osthol 100 µM の存在、非存在下で速度論的解析を行ったところ、osthol により尿酸取り込みの低下がみられ、Lineweaver-Burk プロットをとると、二本の近似直線が x 軸上で交わり、osthol による URAT1 阻害様式は非競合的阻害であることが示唆された (添付資料 3-6)。

さらに、osthol による URAT1 阻害活性の活性部位を調べるため、各種クマリン化合物を用いて、URAT1 阻害活性の構造活性相関を検討した。まず、添付資料 3-7 に示す 13 種類のクマリン化合物を用い実験を行った。各化合物 100 µM の存在下で尿酸取り込み実験を行ったところ、単純なクマリン化合物には URAT1 阻害活性がみられず、osthol と osthenol の 2 つの化合物の

みが URAT1 阻害活性を示した。このことから、プレニル基が URAT1 阻害活性に寄与していることが示唆されたため、続いてプレニル基が閉環したフラノクマリンの bergaptol、bergamottin と、プレニル基を有する geraniol を評価した。その結果、これら 3 つの化合物には URAT1 阻害活性はみられなかった (添付資料 3-7)。以上のことから、URAT1 阻害活性を示すためには、クマリン骨格の 8 位にプレニル基が結合していることが必須であることが示唆された。

4) ABCG2 の転写活性に着目した *in vitro* 評価系の構築

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。同様の検討を Caco-2 細胞を用いて行ったところ、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。

また、マウスを用いた *in vivo* における検討も考慮し、マウス ABCG2 プロモーター領域の転写活性を評価する *in vitro* 実験系の構築を試みた。ヒト ABCG2 と同様にルシフェラーゼアッセイによる検討を行ったところ、マウス消化管由来の CMT93 細胞においてマウス ABCG2 プロモーターによる有意なルシフェラーゼ活性の上昇が見出された(添付資料 4-6)。このことは、本実験系がマウス ABCG2 の転写活性評価に利用可能であることを示唆している。

さらに、PPAR γ 遺伝子の発現を抑制した際の ABCG2 遺伝子の発現量の変動についても検討を行った。添付資料 4-7 に示すように、PPAR γ を標的とした siRNA を肝臓由来の Hepa1-6 細胞に導入することで、PPAR γ の mRNA

発現量は 33%程度にまで低下した。このときに ABCG2 の mRNA 量が 55%以下にまで低下していたことは、Hepa1-6 細胞において、内因性 PPAR γ による ABCG2 転写調節が行われていることを示していると考えられた。

5) ABCG2 の転写活性化能を持つ生薬のスクリーニング

4) で得られた *in vitro* 評価系を用いて、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 μ g/mL または 100 μ g/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 5-1, 5-2)。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 5-3)。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 μ g/mL または 100 μ g/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 5-4)。

生薬 G と生薬 J については、ジャシヨウシエキスと同様の分画操作に

より得られた各画分を用いて、さらなる検討を行った。その結果、生薬 G のブタノール画分の添加により PPAR γ 依存的な転写活性の上昇が見い出されたことから、この画分には PPAR γ アゴニストが含まれることが示唆された (添付資料 5-5)。

生薬 J に関しては、ヘキササン画分に有効成分が含まれる可能性が示唆された (添付資料 5-6)。TLC による検討の結果、ヘキササン画分には evodiamine が濃縮されていることが明らかとなったため (添付資料 5-7)、ABCG2 の転写活性にもたらす影響について調べたところ、evodiamine は PPAR γ 非依存的に ABCG2 の転写活性を亢進する作用を有することが示された (添付資料 5-8)。さらに、各種シグナル伝達阻害剤の存在下における evodiamine の効果について検討を行った結果、chelerythrine、genistein、LY294002、tyrphostin AG 1478 のいずれも evodiamine 依存的な ABCG2 転写活性化作用を阻害することが明らかとなった (添付資料 5-9, 5-10)。

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 294 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。

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進めた。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 およびジャショウシについて、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、ジャショウシは、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 osthol を有効成分として単離した。osthol は非競合的に URAT1 を阻害し、その 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

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。

osthol 関連化合物の URAT1 阻害活性の構造活性相関解析の結果、クマリン骨格の 8 位にプレニル基が結合していることが必須であることが示唆された。また、オキソソル酸誘導高尿酸血症モデルマウスにおいて血中尿酸濃度低下作用が認められている esclatin、fraxetin (Li J.M., *et al.*, *Eur J Pharmacol.* 2011;666:196-204.) は、今回の実験では URAT1 阻害活性を示さなかったため、別の作用機序が推測された。

osthol は今回用いた *in vitro* の実験系において既存の尿酸排泄促進薬であるプロベネシドや URAT1 阻害作用の報告されているインドメタシンと同等の URAT1 阻害作用をもち、高尿酸血症治療薬開発のためのリード化合物となり得る可能性が示唆された。今後 osthol の URAT1 阻害作用、および *in vivo* における活性についてさらなる研究が行われることが期待される。

ABCG2 の発現調節に関しては、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、生薬 G のブタノール画分等を詳細に解析することにより、ABCG2 の発現誘導活性を有する生薬成分が同定されることが期待される。

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 誘導薬の開発につながる可能性に期待している。生薬 J のヘキサン画分に存在する evodiamine は PPAR γ 非依存的に ABCG2 の転写活性を亢進する作用を持つことが示され、その亢進作用は PKC 阻害剤である chelerythrine、PTK 阻害剤である genistein、PI3K 阻害剤である LY294002、EGF 受容体阻害剤である tyrphostin AG 1478 により有意な阻害を受けた。このことは、evodiamine は PPAR γ リガンドとは異なる機序で ABCG2 の発現誘導をもたらす可能性を示唆するものであり、今後の研究の進展が期待される。

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検討が進められ、特に優先的に研究を進めたジャショウシから URAT1 阻害活性を有する osthol を単離することができた。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 種の生薬を見出した。そのうちの 1 種については、PPAR γ 非依存的な ABCG2 発現誘導をもたらす活性成分として evodiamine を同定することができた。今後、血清尿酸値や尿中尿酸排泄などに関する *in vivo* 実験や各化合物の作用機序の解明を含めたさらなる検討を進めることにより、生薬成分を起点とした創薬に繋がることが期待される。

F. 研究発表

以下には 2010~2012 年度に出版された論文のリスト、および 2010~2012 年度に行った学会発表のリストを示す。

【原著論文】

1. Ikebuchi Y., Ito K., Takada T., Anzai N., Kanai Y., Suzuki H. Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cell surface expression and function of ATP binding cassette G2. **Drug Metab Dispos.** 2010;38:2320-2328.
2. Aoki S., Honma M., Kariya Y., Nakamichi Y., Ninomiya T., Takahashi N., Udagawa N., Suzuki H. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **J Bone Miner Res.** 2010;25:1907-1921.
3. Honma M., Kozawa M., Suzuki H. Methods for the quantitative evaluation and prediction of CYP enzyme induction using human in vitro systems. **Expert Opinion on Drug Discovery.** 2010;5:491-511.
4. Masuo Y., Ito K., Yamamoto T., Hisaka A., Honma M., Suzuki H. Characterization of inhibitory effect of carbapenem antibiotics on the deconjugation of valproic acid glucuronide. **Drug Metab Dispos.** 2010;38:1828-1835.
5. Iwayanagi Y., Takada T., Tomura F., Yamanashi Y., Terada T., Inui K., Suzuki H. Human NPC1L1 expression is positively regulated by PPAR α . **Pharm Res.** 2011;28:405-412.
6. Kariya Y., Honma M., Hanamura A., Aoki S., Ninomiya T., Nakamichi Y., Udagawa N., Suzuki H. Rab27a and Rab27b are involved in stimulation-dependent RANKL release from secretory lysosomes in osteoblastic cells. **J Bone Miner Res.** 2011;26:689-703.
7. Yoshikado T., Takada T., Yamamoto T., Yamaji H., Ito K., Santa T., Yokota H., Yatomi Y., Yoshida H., Goto J., Tsuji S., Suzuki H. Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. **Mol Pharmacol.** 2011;79:241-250.
8. Yamanashi Y., Takada T., Yoshikado T., Shoda J.I., Suzuki H. NPC2 Regulates Biliary Cholesterol Secretion via Stimulation of ABCG5/G8-Mediated Cholesterol Transport. **Gastroenterology.** 2011;140:1664-1674.

9. Hayashi K., Shimura K., Makino T., Mizukami H. Comparison of the contents in kampo decoction containing ephedra herb when prepared simply or by re-boiling method according to the traditional theory. *J Nat Med.* 2010;64:70-74.
10. 牧野利明. 「臨床生薬学」の歴史～創始者、山口広次の果たした功績. *薬史学雑誌*. 2010;45:126-129.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Matsuo H., Takada T., Ichida K., Nakamura T., Nakayama A.,