

Fig. 1. Differential impacts of p53 on *Pparg1a* expression in myoblasts and preadipocytes. (A, B) C2C12 myoblasts (A) and 3T3-L1 preadipocytes (B) were treated with 0, 1, 5, or 25 μ M of Nutlin3a for 24 h. Protein levels of p53 were analyzed by Western blotting (left panels). Open triangles indicate the signals from p53. α -Tubulin (for C2C12 cells) or β -actin (3T3-L1 cells) was used as a loading control. *Pparg1a* and p21 expression levels were analyzed by RT-PCR (right panels). *Tbp* (for C2C12 cells) or *Actb* (for 3T3-L1 cells) was used as a loading control. (C, D) C2C12 myoblasts (C) and 3T3-L1 preadipocytes (D) were transfected with mouse p53 expression (exo-p53) or empty vector (mock). The cells were harvested after 20 h of transfection. Protein levels of p53 were analyzed by Western blotting (left panels). α -Tubulin (C; for C2C12 cells) or β -actin (D; for 3T3-L1 cells) was used as a loading control. (E, F) C2C12 myoblasts (E) and 3T3-L1 preadipocytes (F) were stably transfected with either p53 (shp53) or GFP (shGFP) shRNA expression vectors. p53 and *Pparg1a* expression levels were analyzed by quantitative real-time PCR. *Tbp* (E; for C2C12 cells) or *Rps18* (F; for 3T3-L1 cells) was used as a loading control. The quantitative data are represented as means \pm SD ($n=3$) (** $p < 0.01$).

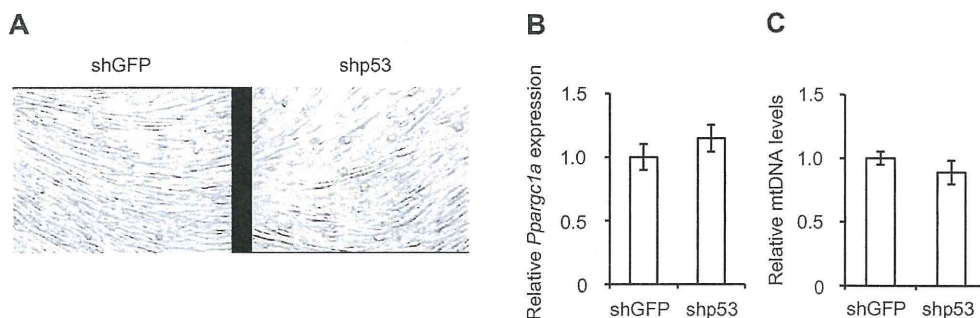


Fig. 2. Effects of p53 downregulation on *Pparg1a* expression and mtDNA content in myotubes differentiated from C2C12 myoblasts. p53-knockdown (shp53) and control (shGFP) C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes (Day 5) and the pictures were taken using a phase contrast microscope (magnification; $\times 200$) (A). *Pparg1a* expression (B) and mtDNA content (C) in myotubes (Day 5) were analyzed by quantitative real-time PCR. *Tbp* was used as a reference control. All data reported (means \pm SD) were not statistically significant ($n=3$).

markers appeared to be moderately higher in p53KO MEFs than in p53 WT MEFs. These results were consistent with previously reported findings [12,13]. Next, we examined the effects of p53 on *Pparg1a* expression and mtDNA content in adipocytes from MEFs using this adipogenesis system. Both the contents of mtDNA and *Pparg1a* expression in adipocytes at Day16 after differentiation

induction increased in p53 KO adipocytes compared with p53 WT adipocytes (Fig. 3F and G). Next, we investigated quantity of proteins that constitute mitochondrion. As shown in Fig. 3H, COX4, a subunit of mitochondrial cytochrome oxidase complex, and TOM20, a subunit of mitochondrial import receptor, increased in p53-knockdown adipocytes compared with control adipocytes.

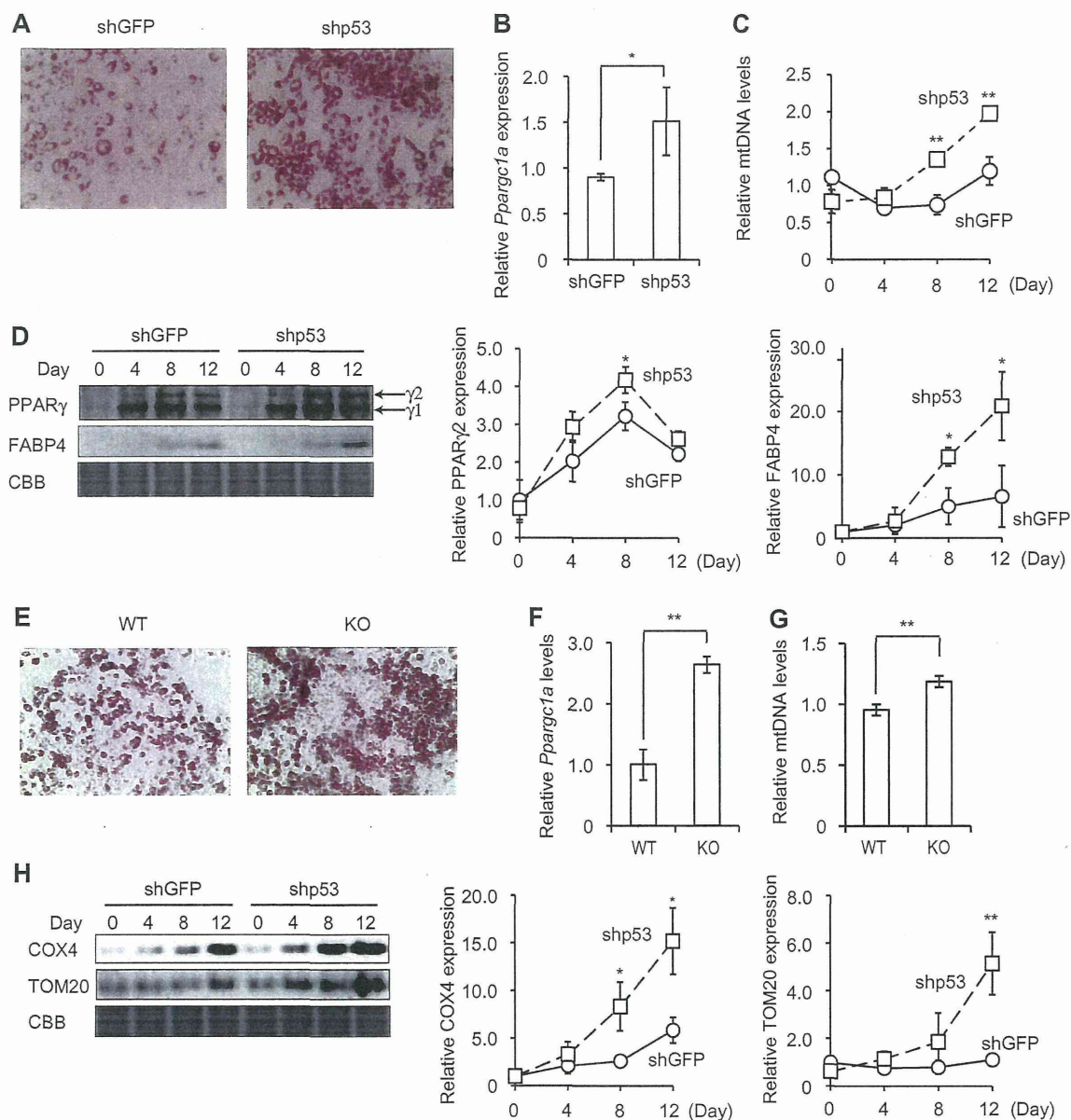


Fig. 3. Effects of p53 downregulation on *Pparg1a* expression and mtDNA content in adipocytes derived from 3T3-L1 preadipocytes and MEFs. (A) shRNA-mediated p53-knockdown (shp53) and control (shGFP) 3T3-L1 preadipocytes were differentiated into adipocytes (Day 12) and stained with Oil Red O to observe intracellular triglyceride accumulation. (B) *Pparg1a* expression in adipocytes (Day 12) was analyzed by quantitative real-time PCR. *Rps18* was used as a reference control. (C) Mitochondrial DNAs purified from differentiated adipocytes were analyzed by quantitative real-time PCR. (D) Extracted proteins from each day were subjected to Western blotting with the indicated antibodies. Representative images and the quantitative data ($n = 3$) were shown. CBB staining was used as a loading control. (E) p53 WT and p53 KO MEFs were differentiated to adipocytes (Day 16), and stained with Oil Red O to observe intracellular triglyceride accumulation ($n = 4$). (F, G) *Pparg1a* expression (F) and mtDNA content (G) in adipocytes (Day 16) were analyzed by quantitative real-time PCR ($n = 3$). *Gusb* was used as a reference control. (H) Extracted proteins from each day were subjected to Western blotting with the indicated antibodies. Representative images and the quantitative data ($n = 3$) were shown. The quantitative data are represented as means \pm SD ($n = 3$ –5) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

These results suggest that p53 affects on mitochondrial content during adipogenesis.

3.4. Effects of p53 downregulation on mitochondrial metabolic function during adipogenesis

Since Fig. 3 showed that p53 downregulation increases mitochondrial content during adipogenesis, we investigated whether the mitochondrial activity increases consistent with the observation. For this purpose, we selected two enzyme activities involved in metabolic pathway existed in mitochondria. As shown in Fig. 4,

both CS, a member of TCA cycle, and Complex IV, a member of electron transport chain, activity in p53-knockdown adipocytes significantly increased compared with those in mock cells.

4. Discussion

In the present study, on the ground of increases in mtDNA content and mitochondrial protein accompanying mitochondrial metabolic activity, we demonstrated that p53 is a negative regulator of mitochondrial biogenesis in adipocytes, which is one of peripheral tissues important in energy metabolism. On the other hand, we

have also considered mitochondrial elimination systems during adipogenesis. Autophagy is one of the most important systems for mitochondrial turn-over [29]. Recently our group has reported that autophagosomes accumulate in a p53-independent manner during adipogenesis [18] and anticipate that this phenomenon would result in impairment of autophagy during adipogenesis. Hence, our observation in this study, that p53 possesses an inhibitory effect on mitochondrial content in adipocyte lineage, is unlikely to be related to autophagy-mediated mitochondrial elimination.

By using C2C12 myoblasts, which are derived from skeletal leg muscle of a C3H mouse [30], we also confirmed the contribution of p53 to mitochondrial biogenesis. However, our results showed that p53 did not dramatically affect *Ppargc1a* expression and mtDNA content in C2C12 myoblasts and myotubes (Figs. 1 and 2). In the past, the relationship between p53 and mitochondrial regulation in skeletal muscle has been examined and characterized. *Ppargc1a* expression and mtDNA content of the skeletal muscle of p53 null mice are reduced in comparison with those of WT mice [6,24]. Furthermore, the effects of p53 on mitochondrial biogenesis were greater for slow twitch fiber-rich muscles versus fast twitch fiber-rich muscles [24]. Taken together with the past findings, this finding may imply that C2C12 cells possess features of fast twitch fiber-rich muscle.

What is the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial regulation in adipocyte lineage? This important question may be able to explain by PGC1 α -orchestrated mitochondrial biogenesis. The past findings have indicated about two sides of p53-mediated PGC1 α regulation [6–9]. Our present study demonstrated that, at least in adipocyte lineage (preadipocyte and mature adipocyte), p53 functions as a negative regulator of *Ppargc1a*. Although it is important to confirm the changes of the protein levels of PGC1 α , we were not able to detect endogenous PGC1 α protein under any experimental conditions performed in this study. Generally the protein level of PGC1 α is very low in white adipose tissue and, even in brown adipose tissue, in which the protein level

of PGC1 α is relatively high, stimuli such as cold shock is required for the specific detection of PGC1 α protein by Western blotting [31,32]. Nevertheless, the study of adipose tissue-specific *Ppargc1a*-disrupted mice revealed evidence that, in the absence of such stimuli, *Ppargc1a* is involved in fatty acid oxidation and tricarboxylic acid cycle in white adipose tissue [32]. This fact implies that the basal expression of *Ppargc1a* can contribute to physiological functions in adipocytes.

In this study, we showed that in muscle cells p53 promotes differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes, but does not influence mitochondrial biogenesis, whereas in adipocytes p53 inhibits adipogenesis and plays a negative regulatory role in mitochondrial regulation. Recent *in vivo* studies demonstrated the negative effects of p53 on whole body metabolism via adipose tissue, and that adipose tissue-specific p53 depletion suppressed aging and inflammation, and improved insulin sensitivity [33]. Furthermore, mitochondrial content or quality is closely involved in insulin sensitivity [34]. Thus, our *in vitro* study in regard to adipocytes provides evidence of these *in vivo* results.

Acknowledgments

We thank Drs. Toshio Kitamura (The University of Tokyo, Japan) and Kazuhiro Shigemoto (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Japan) for provision of the research materials; Dr. Takao Sekiya (Sasaki Foundation, Japan) for his cooperation. The authors also thank all members of Laboratory of Molecular Pathology and Metabolic Disease for their encouragements. This work was partially supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (23790201 and 25860759, N.O.) and for Challenging Exploratory Research (23659207, Y.H.) from the Japan Society for the Promotion of Science.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.059>.

References

- [1] J.P. Kruse, W. Gu, Modes of p53 regulation, *Cell* 137 (2009) 609–622.
- [2] O.D. Maddocks, K.H. Vousden, Metabolic regulation by p53, *J. Mol. Med. (Berl.)* 89 (2011) 237–245.
- [3] A. Saleem, H.N. Carter, S. Iqbal, et al., Role of p53 within the regulatory network controlling muscle mitochondrial biogenesis, *Exerc. Sport Sci. Rev.* 39 (2011) 199–205.
- [4] P.Y. Wang, J. Zhuang, P.M. Hwang, P53: exercise capacity and metabolism, *Curr. Opin. Oncol.* 24 (2012) 76–82.
- [5] D.P. Kelly, R.C. Scarpulla, Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function, *Genes Dev.* 18 (2004) 357–368.
- [6] A. Saleem, P.J. Adhithetty, D.A. Hood, Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle, *Physiol. Genomics* 37 (2009) 58–66.
- [7] E. Sahin, S. Colla, M. Liesa, et al., Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise, *Nature* 470 (2011) 359–365.
- [8] C. Villeneuve, C. Guilbeau-Frugier, P. Sicard, et al., P53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 5–18.
- [9] K. Aquilano, S. Baldelli, B. Paglietti, et al., P53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 386–399.
- [10] M.A. Lebedeva, J. Eaton, G.S. Shadel, Loss of p53 causes mitochondrial DNA depletion and altered mitochondrial reactive oxygen species homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 328–334.
- [11] L. Yi, C. Lu, W. Hu, et al., Multiple roles of p53 related pathways in somatic cell reprogramming and stem cell differentiation, *Cancer Res.* 72 (2012) 5635–5645.
- [12] A. Molchadsky, I. Shats, N. Goldfinger, et al., P53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner, *PLoS One* 3 (2008) e3707.
- [13] A. Armesilla-Diaz, G. Elvira, A. Silva, P53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 3598–3610.

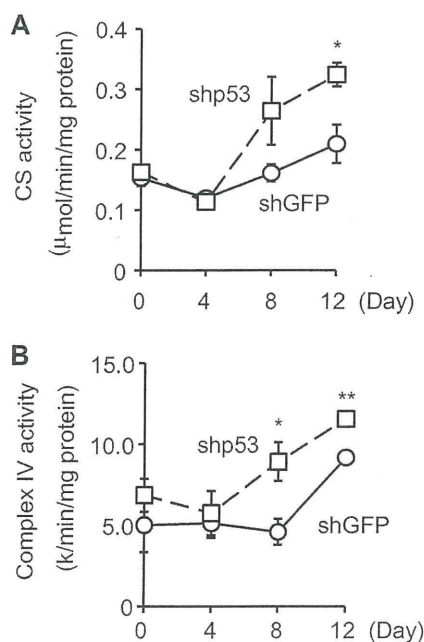


Fig. 4. Effects of p53 downregulation on mitochondrial metabolic function during adipogenesis. CS (A) and Complex IV (B) activities were analyzed as described in Section 2. The quantitative data are represented as means \pm SD ($n=3$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

- [14] A. Molchadsky, O. Ezra, P.G. Amendola, et al., P53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 774–783.
- [15] Y. Tamir, E. Bengal, P53 protein is activated during muscle differentiation and participates with MyoD in the transcription of muscle creatine kinase gene, *Oncogene* 17 (1998) 347–356.
- [16] A. Porrello, M.A. Cerone, S. Coen, et al., P53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb, *J. Cell Biol.* 151 (2000) 1295–1304.
- [17] S. Morita, T. Kojima, T. Kitamura, Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses, *Gene Ther.* 7 (2000) 1063–1066.
- [18] K. Mikami, N. Okita, Y. Tokunaga, et al., Autophagosomes accumulate in differentiated and hypertrophic adipocytes in a p53-independent manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427 (2012) 758–763.
- [19] S. Matsushima, N. Okita, M. Oku, et al., An Mdm2 antagonist, Nutlin-3a, induces p53-dependent and proteasome-mediated poly(ADP-ribose) polymerase1 degradation in mouse fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407 (2011) 557–561.
- [20] S. Mori, S. Kubo, T. Akiyoshi, et al., Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 798–810.
- [21] N. Okita, Y. Hayashida, Y. Kojima, et al., Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats, *Mech. Ageing Dev.* 133 (2012) 255–266.
- [22] L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves, et al., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2, *Science* 303 (2004) 844–848.
- [23] T. Thompson, C. Tovar, H. Yang, et al., Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 53015–53022.
- [24] J.Y. Park, P.Y. Wang, T. Matsumoto, et al., P53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content, *Circ. Res.* 105 (2009) 705–712.
- [25] H.M. Blau, C.P. Chiu, C. Webster, Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable Heterocaryons, *Cell* 32 (1983) 1171–1180.
- [26] L. Wilson-Fritch, A. Burkart, G. Bell, et al., Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 1085–1094.
- [27] S. Vankoningsloo, M. Piens, C. Lecocq, et al., Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 1133–1149.
- [28] P. Tontonoz, E. Hu, B.M. Spiegelman, Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor, *Cell* 79 (1994) 1147–1156.
- [29] I. Kim, S. Rodriguez-Enriquez, J.J. Lemasters, Selective degradation of mitochondria by Mitophagy, *Arch. Biochem. Biophys.* 462 (2007) 245–253.
- [30] D. Yaffe, O. Saxel, Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle, *Nature* 270 (1977) 725–727.
- [31] P. Puigserver, Z. Wu, C.W. Park, et al., A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis, *Cell* 92 (1998) 829–839.
- [32] S. Kleiner, R.J. Mepani, D. Laznik, et al., Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) 9635–9640.
- [33] T. Minamino, M. Orimo, I. Shimizu, et al., A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance, *Nat. Med.* 15 (2009) 1082–1087.
- [34] Z. Cheng, Y. Tseng, M.F. White, Insulin signaling meets mitochondria in metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 589–598.

腸管血流からみた大建中湯の役割

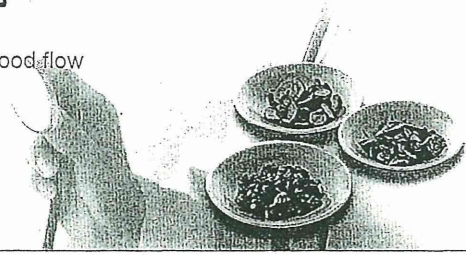
—アメリカ臨床試験薬 TU-100になった理由

Effect of Daikenchuto, an investigational new drug, on intestinal blood flow

河野 透 上園保仁 Toru KONO¹ and Yasuhito UEZONO²

旭川医科大学外科学講座消化器病態外科学分野¹,

(独)国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野²



◎日本の伝統的医学である漢方のなかでも大建中湯は山椒、乾姜、人參、膠飴という食材だけで構成されているにもかかわらず、臨床でもっとも高い使用実績と信頼性を得てきた漢方薬である。大建中湯の腸管血流改善作用を検討してきた結果、大建中湯の主要構成生薬である山椒の主成分 hydroxy- α -sanshool、乾姜の主成分 6-shogaol が直接または血中に吸収されて、腸管神経終末からカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene related peptide: CGRP)、腸管上皮細胞からアドレノメデュリン (adrenomedullin: ADM) という2つの強力な微小血管拡張作用を有するカルシトニンファミリーペプチドを動員することを明らかにし、その詳細な作用機序として標的細胞膜上にある transient receptor potential (TRP) チャネルを介していることも明らかにした。また、CGRP 減少が病因論的に関与している Crohn 病への大建中湯の治療的効果を動物レベルで証明し、アメリカ FDA によって臨床試験薬 TU-100 として認知され、現在全米多施設プラセボ二重盲検試験が開始されていることを紹介する。

Keywords

大建中湯、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、アドレノメデュリン、トランジェントレセプターポテンシャルチャネル、Crohn 病、腸管血流

肩唾物扱いからアメリカの臨床試験薬へ

アメリカでもっとも優れた医療施設のひとつとされるメイヨー・クリニックの消化器外科のシニアコンサルタントで併設医科大学の外科教授でもあるサール先生は、2009年春の第109回日本外科学会(会頭:田中雅夫教授/九州大学)に招待され、来日された。以前よりアメリカの主流であるハーバルメディシン中医は肩唾物と信じ込んでいて(「サイドメモ1」参照)、日本に来られたついでに日本のハーバルメディシン漢方が本物か肩唾かどうかを検証しようと乗り込んでこられ、著者らが迎え撃つことになった。著者らは大建中湯の作用機序、とくに腸管血流に関する基礎的エビデンスを分子レベルで紹介、1時間の予定が数時間にも及ぶディスカッションとなり、漢方が肩唾物ではなくて日本の真の伝統医療であり、その臨床での

可能性を理解しはじめた様子であった。別れる際に、自分が編集している『Surgery』誌の巻頭総説に漢方の総説を推薦したいので論文を書くよう

サイドメモ1

漢方薬と中医薬

漢方薬は500年前に中国から伝来した中医を基礎としてはじまり、日本独自の生薬調合が繰り返され、完成された日本の伝統医療である。個々の薬剤名称は変更されることがなかったため、中国で発展してきた中医薬と同名であっても含まれる生薬が異なることに注意を要する。よくマスコミで両者を区別せずに使用しているが、両者はまったく別ものである。大建中湯の山椒は同名の中医では含まれていないし、六君子湯は漢方では8種類の生薬が含まれているが、中医では6種類である。中医薬の一部はアメリカにてサプリメントとして広く販売されているが、多くの副作用が発生し、その品質が問題となっている。

に、と勧めていただき、力強い握手とともにお約束し数カ月でその約束を果たし、論文は“漢方の代替医療からの脱出”というかなり刺激的な題名で出版された¹⁾。その後、サール教授はアメリカにおける強力な漢方薬サポーターに大変身された。

当時、伝統医療の主役であるハーバル・メディシン(漢方は含まれていない)は、欧米諸国では代替補完医療の枠組みのなかにあり、エビデンス重視の現代医療のなかに組み込まれることを阻んできた。しかし、高騰する医療費と合成薬剤の限界から、安全性と品質で日本の伝統医療である漢方に対する期待感が巻き起こり、アメリカの食品医薬品局(FDA)が合剤としてはじめて臨床治験薬剤、TU-100(ツムラ大建中湯)を認可するに至った²⁾。最近まで日本でも、漢方に対する偏見から多くの医師が漢方に関心を示すことはなかった。しかし、大建中湯のエビデンスレベルの高い基礎研究を契機に現在、全国大学病院の80%が参加する二重盲検プラセボ比較試験が展開されており、大建中湯の有効性が示唆される高いエビデンスレベルをもった臨床データが出はじめている。それは日本よりアメリカで先行している²⁾。

大建中湯は医食同源タイプの シンプルな漢方薬

大建中湯に使用されている材料はすべて食材である。抽出生薬は3種類で山椒(サンショウ 2.2%)、乾燥させた生姜である乾姜(カンキョウ 5.6%)、朝鮮人参(ニンジン 3.3%)で、残りはマルトース(膠飴コウイ)やラクトースでできている¹⁾。つまり特殊な材料は含まれていない、きわめてシンプルな漢方薬といえる。大建中湯は1回 2.5~5 g、1日3回食前に服用することを基本としている。服用しやすくしているのはマルトースのおかげであり、甘く飲みやすい工夫がなされているが、二糖類なので低カロリーで甘みも1/3程度に抑えられている。ちなみに大建中湯の大(ダイ)はきわめてという意味で、建(ケン)は建て直す、中(チュウ)は消化管を意味し、湯(トウ)は水溶性

を意味し、合わせて消化管を大きく建て直すという意味で大建中湯と名づけられているそうである。

保険適応症は腹部膨満感、腹部の冷えの改善であるが、実臨床では術後の腸管運動麻痺改善目的で使用されることが多く、漢方薬のなかでもっとも多く使用されているが、保険収載されたのは比較的最近で1986年である。副作用に関してFDAから要請のあった副作用調査でも1%以下で、重篤なものはまったくない、安全性がきわめて高い薬剤である。構成材料が食材であることを考えれば自明である。

腸管粘膜血流の特色と疾患への関与

消化管粘膜のエネルギー消費量は高く、大腸では細菌によってつくられる短鎖脂肪酸を栄養素として、血流からのブドウ糖だけでは不足する栄養素を補っている。そのような絶妙なバランスで保たれている腸管粘膜にいったん虚血状態が発生すれば、腸管バリア機能障害、バクテリアトランスロケーションを経て全身炎症反応に至る。高齢者では動脈硬化による虚血性腸疾患を発症しやすく、若年者に多い炎症性腸疾患では血液凝固系が亢進している状態であり、腸間粘膜血流の血栓などによる血流不全が病因論的に関与していることが指摘され、抗凝固剤の併用が高いエビデンスレベルで推奨されている。また、腸間膜側に縦走潰瘍を形成するCrohn病の発症原因としても、腸間膜側の血流維持の解剖学的脆弱性から説明できるという報告もある。このように腸管粘膜血流は、多くの腸疾患に病因論的に関与している。

大建中湯の成分レベルからみた 腸管粘膜血流改善機序

大建中湯は臨床で高い実績と信用を得た漢方薬であり、とくに術後の麻痺性イレウス改善などを期待して使用されてきた。エビデンスはかならずしも十分とはいえないが、機序として腸管運動神経の関与が示唆され、腸管運動改善が期待できる

というものである³⁻⁷⁾。

ところが、大建中湯の健康保険上の適応は“腹が冷えて痛み、腹部膨満感のあるもの”とある。つまり腸管運動改善効果は腹部膨満感の改善につながると考えられるが、適応の最初にある“腹が冷えて痛む”という点についての機序にはつながらない。実際、患者に大建中湯服用後の様子を尋ねると、しばしばお腹が温かくなるという経験談を聞くことができる。そこで、腹の冷えを改善することは消化管の血流改善と置き換えることができると著者らは考え、最初に腸管血流増加機序解明を目的に実験を行い、大建中湯の腸管血流改善機序を薬理的・分子生物学的に明らかにしてきた。

カルシトニンファミリーペプチド

大建中湯の腸管血流改善機序に関して最初に注目したのは、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) である。すでに大建中湯の腸管運動亢進作用に CGRP が関与することは報告されていた⁸⁾。この CGRP は微小血管拡張作用が最強の神経ペプチドであり、神経終末から放出され、血管平滑筋に作用し血管拡張を起こすことが知られていた^{9,10)}。小動物を用いた実験で腸管血流増加を大建中湯が起こし、その血流増加が CGRP 拮抗薬によってほぼ完全に抑制され、その他の血流に関連する神経ペプチド(サブスタンス P, VIP など)の拮抗薬では抑制されないことから、CGRP が重要な機序因子であることが示唆された¹¹⁾。

つぎに受容体レベルでの検討の結果、CGRP の受容体だけでなく、同じカルシトニンファミリーペプチドであるアドレノメデュリン (adrenomedullin: ADM) が大建中湯の血流改善機序に関与していることが示唆された。ADM は CGRP ほど強い微小血管拡張作用はないが、相応の微小血管拡張作用がある¹²⁾。産生部位は、CGRP とは大きく異なり非神経組織、上皮細胞や平滑筋などである。さらに CGRP と ADM はともに抗炎症性作

用、抗炎症性サイトカイン作用があり、大建中湯の多彩な作用を理解するうえできわめて重要な鍵となると考えられた¹⁾。

有効成分の同定と薬物動態

有効成分同定のため *in vitro* 研究を進めた結果、大建中湯の山椒と乾姜が ADM と CGRP を動員することが観察された。山椒、乾姜の主成分をランダム試験で解析を進めると、山椒の hydroxy- α -sanshool と乾姜の 6-shogaol がその有効主成分であることが判明した¹³⁾。

しかし、ここで大きな疑問点が生じた。大建中湯の成分は吸収されるのか、それともされないのかという西洋薬では開発時点で明らかとなっているべき点が、大建中湯では不明であった。そこで、臨床試験と動物試験で薬物動態を検討することにした。その結果、驚くべきことに山椒の主成分である hydroxy- α -sanshool は 5 分以内に血中に大量に存在することが判明、乾姜の 6-shogaol は吸収されるが緩徐であり、低レベルであることが判明した¹⁴⁾。つまり、大建中湯の血流改善効果は直接的だけでなく、血中を介しても起こることが示唆されたのである。薬物動態を詳細に検討された

サイドメモ 2

TRPチャネル

1989年にショウジョウバエの眼の光刺激に対して受容体電位が一過性に変化することから transient receptor potential (TRP) チャネルと名づけられたもので、6回膜貫通型イオンチャネルとして Ca^{2+} イオンの高い透過性を有しており、6つのサブファミリーが同定されている。その大きな生理的役割は外界刺激に対応して種々の生理活性物質を活性化することであり、生体“センサー”蛋白質として働くことが知られている。その内容は多岐にわたり、温度刺激・化学刺激・機械刺激・pH・酸化還元・浸透圧などがある。自然物から抽出された物質に TRP チャネル刺激物が多いとされている。

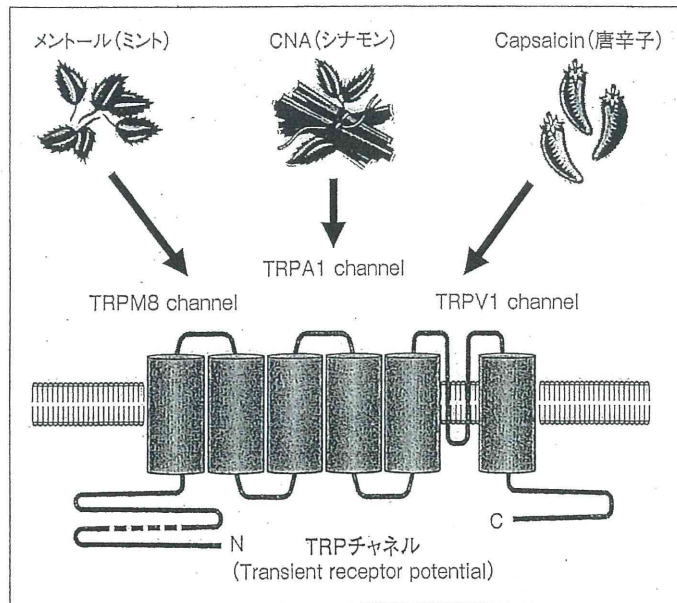


図1 TRPチャンネルとその刺激物
多くの自然物はTRPチャンネルの刺激物を含む。

ハーバルメディシンは、大建中湯が世界初である。現在、人工肛門からの便を採集して、どの程度の各成分が大腸に到達するのか検討しており、その結果が待たれる。

トランジェントレセプターチャンネル (TRPチャンネル)

大建中湯の有効成分が、どのようにして細胞を刺激してADMやCGRPを動員するのであるか、というやっかいな問題を解決するため、著者らはTRPチャンネルに着目した(「サイドメモ2」参照)。TRPチャンネルは生体における温度などを感じる生体センサーで、Ca²⁺イオンを通すチャンネルであり、おもに神経組織に発現しているが、最近では腸管上皮細胞にも存在することが報告されている。ミントを含むガムをかむと口のなかが冷たく感じるのは、ミントが冷たいということを感じるTRPチャンネル(TRPM8チャンネル)を特異的に刺激する分子だからである。そのほかにも多くの自然物が、TRPチャンネルの刺激分子となっている(図1)。漢方は自然物、植物からできており、

多くのTRPチャンネルの刺激分子を含んでいることが容易に想像される。そこで、大建中湯の有効成分である山椒のhydroxy- α -sanshoolと乾姜の6-shogaolがTRPチャンネルの刺激分子となっていないか調べたところ、多くの論文ですでに検討されており、TRPA1とTRPV1の刺激分子であることがわかっていた。そこで、大建中湯のターゲット細胞のひとつである腸管粘膜上皮細胞に両TRPチャンネルが発現しているか調べたところTRPA1のみが発現しており、山椒のhydroxy- α -sanshoolと乾姜の6-shogaolによるADMの分泌がTRPA1拮抗薬剤でブロックされ、TRPA1遺伝子を抑制するとADMの分泌が抑制されることが観察された。さらに、TRPV1アゴニストで刺激してもADMの分泌は観察されなかった。これらのことから、大建中湯は山椒のhydroxy- α -sanshoolと乾姜の6-shogaolによって、ターゲット細胞のTRPA1カルシウムチャンネルを介してADMを分泌させていることが明らかとなった(図2)。

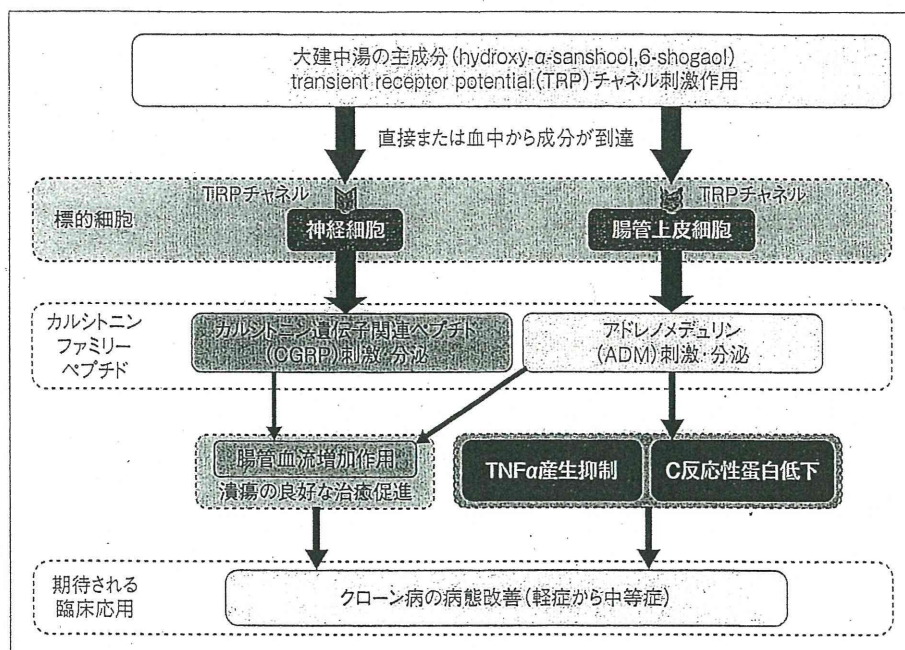


図 2 大建中湯の作用機序と期待される臨床応用

カルシトニンファミリーペプチドと Crohn 病

大建中湯が神経終末から CGRP、粘膜上皮細胞から ADM という 2 つのカルシトニンファミリーペプチドを放出させる機序を述べてきたが、以前より CGRP および ADM に関して、消化器分野では Crohn 病と強く関連づける報告が臨床的にも実験的にもなされている。とくに、繰り返す炎症による神経組織へのダメージも大きく、神経組織で産生される CGRP の特異的な減少が起ることが示唆され、動物モデルで外来性 CGRP に治療的効果があると報告されている。また、ADM に関しても動物モデルで外来性に投与することで治療的効果があることが報告されており、CGRP と ADM の Crohn 病治療薬としての可能性が示唆される結果となっている。ところが、外来性にこれらのペプチドを投与することは、全身の循環動態への影響、デリバリーの問題などから不

可能であるとも考えられている。しかし、CGRP や ADM が腸管粘膜血流維持に重要であることは疑いのないことである。

そこで著者らは大建中湯が、CGRP がうまく働かない状態の Crohn 病腸管において腸管粘膜上皮から ADM を放出させ、CGRP 減少を補う形で腸管血流を正常化させる可能性があるという仮説を得た。さらに、ADM は炎症性サイトカイン TNF- α の産生を抑制する作用が報告されており、現在の Crohn 病治療におけるもっとも有効な治療薬である抗 TNF- α 抗体 (インフリキシマブやアダリムマブ) とまったく同じ治療ターゲットであることから、Crohn 病に対して治療効果があるのではないかと考え、Crohn 病動物モデルでこれらのことを検証した結果、大建中湯の治療効果は明らかで、Crohn 病腸管血流改善効果、抗炎症性サイトカイン、とくに TNF- α の抑制効果、さらに C 反応性蛋白 CRP を抑制することが観察された (図 2)^{13,15)}。

レミケードは TNF- α に対する抗体で、重症の Crohn 病に開発された薬剤である。一方、Crohn

病患者の75%は軽症から中等症に分類されるが、これらに対する新規薬剤開発は行われてこなかった。そこで、軽症から中等症のCrohn病患者に対する大建中湯(TU-100)の効果を確かめるプラセボ使用の二重盲検臨床試験を、シカゴ大学の炎症性腸疾患センターを中心とした全米多施設(レミケード臨床試験と同じチーム)で2011年秋よりスタートした。詳細はFDAのWebで公開されている。同じく大建中湯を使った二重盲検臨床試験はメイヨー・クリニック、ミネソタ大学などアメリカの超一流の施設で開始されているが、これらの事実はまだ多くの日本の医師たちには知られていない。また、すでにメイヨー・クリニックでの臨床試験で大建中湯の有効性が報告されていることを強調したい²⁾。

おわりに

これまでアメリカではハーバルメディスンを単なる代替医療としてとらえ、国立補完代替医療センターなどが多額な予算を使い、エビデンスを得るべく研究活動を行ってきたが、成果はまったく得られず議会から追及されるに至った。そこで、彼らが目をつけたのが日本のハーバルメディスン、漢方であった。高度に医療の発達した日本において漢方が保険収載され、西洋医学中心の医師らによって使われていることに彼らは驚き、同時に安心感ももった。漢方は西洋医学的にとらえれば500年という長期にわたる第I相試験を繰り返してきた日本伝統医学であり、漢方は毒性、安全性が担保されたハーバルメディスンであるともいえる。世界的にハーバルメディスンを保険収載薬として西洋薬と同時に処方できる国は日本だけである。つまり西洋医学と漢方を同時に使用できるわれわれ日本人医師が、基礎医学にも臨床医学レベルでエビデンスを構築し世界に向けて発信することはとても意義のあることである。新薬開発に莫大な経費がかかる現代で、漢方薬は新規薬剤開発の手がかりとなる宝庫であり、また漢方薬そのものがこれまでにない適応を発見したりすること

で、大きな展開を生む可能性までである。その先頭に立つのが大建中湯であるといえよう。

文献

- 1) Kono, T. et al.: Exodus of Kampo, traditional Japanese medicine, from the complementary and alternative medicines: is it time yet? *Surgery*, **146**: 837-840, 2009.
- 2) Manabe, N. et al.: Effect of daikenchuto (TU-100) on gastrointestinal and colonic transit in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **298**: G970-G975, 2010.
- 3) Iwai, N. et al.: Effects of herbal medicine Dai-Kenchu-to on anorectal function in children with severe constipation. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, **17**: 115-118, 2007.
- 4) Endo, S. et al.: Dai-kenchu-to, a Chinese herbal medicine, improves stasis of patients with total gastrectomy and jejunal pouch interposition. *Am. J. Surg.*, **192**: 9-13, 2006.
- 5) Suehiro, T. et al.: The effect of the herbal medicines dai-kenchu-to and keishi-bukuryo-gan on bowel movement after colorectal surgery. *Hepatogastroenterology*, **52**: 97-100, 2005.
- 6) Itoh, T. et al.: The effect of the herbal medicine dai-kenchu-to on post-operative ileus. *J. Int. Med. Res.*, **30**: 428-432, 2002.
- 7) Shibata, C. et al.: The herbal medicine Dai-Kenchu-Tou stimulates upper gut motility through cholinergic and 5-hydroxytryptamine 3 receptors in conscious dogs. *Surgery*, **126**: 918-924, 1999.
- 8) Sato, Y. et al.: Dai-kenchu-to raises levels of calcitonin gene-related peptide and substance P in human plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**: 1875-1877, 2004.
- 9) Martinez, V. and Tache, Y.: Calcitonin gene-related peptide and gastrointestinal function. In: *Handbook of biologically active peptides* (ed. by Kastin, A. J.). Elsevier, London, 2006, pp.1005-1011.
- 10) Brain, S. D. et al.: Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol. Rev.*, **84**: 903-934, 2004.
- 11) Kono, T. et al.: Colonic vascular conductance increased by Daikenchuto via calcitonin gene-related peptide and receptor-activity modifying protein 1. *J. Surg. Res.*, **150**: 78-84, 2008.
- 12) Schubert, M. L.: Adrenomedullin in gastrointestinal function. In: *Handbook of biologically active peptides* (ed. by Kastin, A. J.). Elsevier, London, 2006, pp.999-1004.
- 13) Kono, T. et al.: Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J. Gastroenterol.*, **46**: 1187-1196, 2011.
- 14) Munekage, M. et al.: Pharmacokinetics of daikenchuto, a traditional Japanese medicine (kampo) after single oral administration to healthy Japanese