

学位論文

多彩な効果を持つ
五苓散の薬理作用に関する研究

2021 年 3 月

村上 一仁

目次

第1章 緒論	2
第2章 五苓散による血管内皮細胞の遊走抑制作用	6
第1節 実験材料および実験方法	6
第2節 本章の目的	16
第3節 実験成績	17
第1項 血管内皮細胞の遊走および増殖に対する五苓散の作用	17
第2項 AQP1 の発現に対する五苓散の作用	22
第3項 AQP1 発現減少による遊走および ERK リン酸化に対する作用	28
第4項 五苓散の血管新生阻害作用 (IN VIVO)	34
第4節 考察	36
第3章 五苓散による下痢改善作用	44
第1節 実験材料および実験方法	44
第2節 本章の目的	48
第3節 実験成績	49
第1項 下痢症状に対する五苓散の作用	49
第2項 炎症病態に対する五苓散の作用	52
第3項 組織傷害に対する五苓散の作用	54
第4項 AQP3 発現に対する五苓散の作用	56
第5項 AQP3 欠損マウスにおける五苓散の作用	59
第6項 腸管上皮細胞の AQP3 発現に対する五苓散の作用	61
第4節 考察	63
第4章 総括	72
第5章 参考文献	78
謝辞	85

第1章 緒論

創薬における戦略では、ある一つの受容体や分子に作用する薬物を見出すことが一般的であるが、反対に、一つの薬物が多面的な作用を持つことも珍しくない。世界初の医薬品であるアスピリンも、その作用は多岐に渡る¹。開発された当初は、解熱、鎮痛薬として普及したが、その後研究が進められ、新たに血小板凝集抑制薬として用いられるようになった^{2,3}。この歴史の変遷は、当初解明されたアスピリンによるシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害作用に加えて、さらにその先のプロスタグランジン⁴、そしてトロンボキサン⁵の合成阻害を見出したことによる。つまり、この成果は、一つのカスケードを掘り進めていったことによる産物である。一方で、脂質異常症に用いられるスタチンも、多面的な作用（プレイオトロピック効果）を持つことが知られている。肝臓におけるコレステロール合成に重要な HMG-CoA 還元酵素を阻害することがメインの作用であるが⁶、血管内皮機能改善、心筋保護、および抗炎症作用など複数の標的細胞において効果を発揮することが報告され⁷⁻¹³、治療薬に応用されている。これとよく似た特徴を持つのが漢方薬である。漢方薬は、5-6 世紀頃に中国から伝来し、その後日本で独自に発展した漢方医学の概念に基づいて処方される医薬品である。漢方薬の特徴の一つは、複数の生薬を組み合わせて調製されることに起因する多彩かつユニークな薬理作用であろう。生薬そのものが様々な活性成分を含有するため、それらを混合した漢方薬は超多成分系の薬剤と言っても過言ではなく、特定の薬理作用が増強もしくは減弱することや、複数の作用が同時に生じるために発生する新たな薬理作用がユニークな薬効の要因となる。

なかでも、私はこの漢方薬のユニークな作用に注目し、特に五苓散に関する研究を行ってきた。五苓散は、利尿作用を期待して、むくみや二日酔いに用いられる漢方薬である。尿量増加作用の強い方剤であるが、西洋医学的な利尿薬とは異なり、血漿中の電解質濃度への影響が少ないことが知られている。また、体内の水分過多の状態では尿量を増やし、脱水状態では尿量に影響しないこと、すなわち浮腫状態でのみ尿量増加作用を示すといった非常にユニークな薬理作用をもつ。一般に、利尿作用の機序には、腎血圧上昇による糸球体濾過量の増加、または電解質の再吸収阻害による原尿濃縮抑制、の 2 通りしか存在しないが、五苓散の作用はいずれにも当てはまらない。当研究室の先行研究では、この五苓散の利尿作用の機序解明に取り組み、浮腫形成に関わる水チャネルを作用点の一つとして同定した。正常状態での水の移動は、電解質のバランスが保たれているため、五苓散は作用しないが、病的状態では、電解質バランスが崩れ、非生理的な方向に水が移動するために、浮腫が形成される。五

苓散は、細胞膜での水輸送を担う水チャネルを阻害することでこの異常な水の動きを止め、浮腫を抑制することが考えられている。

この他にも、五苓散や他の漢方薬による様々な疾患に対する治療効果からも、疾患治療に対する漢方薬の実効性は疑う余地はないものの、根拠に基づいた処方すなわち EBM (Evidence-Based Medicine) の概念から見ると、もう一つのピースである合理性の部分が欠けている。そこで、作用機序の解明などの薬理学的エビデンスの付加によって、治療に対して漢方薬を用いる合理性の証明をすることが我々の至上命題であると考え。さらに我々は、臨床で得た知見を基礎研究に落とし込み、その結果を再び臨床にフィードバックする、リバーストランスレーショナルリサーチ (rTR) の戦略を置くことで、漢方薬を用いた新たな治療概念の提唱、さらには、新たな標的分子を狙った創薬の提案ができると考えている。

さらには、これを成し遂げることで、漢方薬を用いた治療が広がり、治療満足度の向上につながるだけでなく、薬価が安い漢方薬の併用などにより、現代で問題となっている莫大な医療費問題の解決に向かうことができる。

ところで、近年、五苓散が慢性硬膜下血腫の治療に広く用いられ、一定の効果を示すことが明らかにされてきている¹⁴。慢性硬膜下血腫は、頭部の外傷などにより硬膜の内側で血腫ができる疾患である。血腫が脳を圧迫することによる頭蓋内圧の亢進に伴い、頭痛、嘔吐などを生じるほか、記憶障害や認知症などの精神症状が現れたり、麻痺や痙攣などが起こる¹⁵。本疾患の治療は、抗浮腫作用を期待した利尿薬や抗炎症作用を期待したステロイドなどの薬物治療も選択肢としては存在するが、一般的に穿頭術による外科手術がメインとなる。しかしながら、その手術において完全に血腫を取り除くことができない場合が多く、術後の再発率は 8-20%と高確率に生じる。興味深いことに、この再発に対して、術後に五苓散を使用することで約 4%まで抑制するという臨床成績が報告されている¹⁶。このように慢性硬膜下血腫の再発に対する五苓散の有効性は示唆されているものの、本作用の合理性は前述した五苓散の利尿作用だけでは説明できず、血腫再発抑制に関わる五苓散の薬理機序は未だ不明である。

慢性硬膜下血腫が再発する要因として、血腫外膜で生じる未熟な血管の新生とその破壊が繰り返されることがあり^{17,18}、本疾患の再発予防または治療を考える上で、脆弱な血管新生を食い止めることが何より重要である^{19,20}。血管に血管新生の引き金となる血管内皮増殖因子 (VEGF) が作用すると、血管内皮細胞の増殖が始まり、既存血管から逸脱した内皮細胞が出現する (出芽)。出芽した内皮細胞は、VEGF の刺激を受けて、更に増殖・遊走し (伸長)、分岐を繰り返しながら血流需要組織へ向かう。最終的には、管腔構造を形成するとともに、壁細

胞などが裏打ち構造を形成し、成熟血管となる²¹。従って、VEGF による血管内皮細胞の遊走や増殖が血管新生において最も重要かつ律速となるプロセスであると考えられている^{22,23}。VEGF は、内皮細胞に発現する VEGF 受容体に作用し、その下流分子として ERK を活性化し、遺伝子発現の誘導、血管透過性亢進の制御、細胞遊走や増殖の促進などを引き起こす²⁴。現在上市されている血管新生阻害薬もその殆どが VEGF 受容体またはその下流シグナル分子を標的としていることを考えても²⁵、血管新生の制御には、VEGF による内皮細胞の遊走・増殖を阻害することが重要なのは言うまでもない。

Aquaporin (AQP) は、浸透圧勾配に準じた細胞膜の水輸送を促進する膜タンパク質、いわゆる水チャネルである。AQP は 1992 年に Agre らによって発見され²⁶、現在までに AQP0～AQP12 までの 13 種類のアイソフォームがほ乳類で同定されている。各 AQP アイソフォームは全身に広く分布しており、組織特異的な発現パターンを示す²⁷⁻³¹。中でも、AQP1 は、腎臓や赤血球、血管内皮細胞に発現し、興味深いことに、AQP1 の欠損マウスでは、腫瘍における血管新生が抑制されることも報告されている³²⁻³⁴。また、AQP1 を欠損した内皮細胞では、その遊走能が抑制されることも示されており³⁵、内皮細胞の増殖や遊走に重要な役割を果たしていると考えられる。

このような観点から、第 3 章では、五苓散が血管新生を阻害するのではないかとの仮説のもと、血管新生の重要な初期反応である血管内皮細胞の遊走・増殖に対する作用を検討した。まず、五苓散が血管内皮細胞の遊走に作用するか否かについて検討した。その結果、五苓散は、VEGF 誘導性の内皮細胞の遊走や増殖を抑制しただけでなく、無刺激時の基礎遊走能をも抑制し、五苓散が内皮細胞の遊走、すなわち血管新生の初期反応を抑制し得ることを明らかにした。続いて、VEGF 誘導性の遊走および基礎遊走に対する五苓散の抑制作用の機序を解明した。五苓散は、VEGF 受容体下流の ERK リン酸化を阻害することで遊走を抑制することを見出しただけでなく、基礎遊走に対する五苓散の抑制作用に AQP1 の発現低下が一部寄与することも明らかにした。これらの成績より、五苓散は、ERK 阻害と AQP1 発現低下という二つのプロセスを介して、血管内皮細胞の遊走を抑制することが明らかになった。

また、五苓散は、特に小児の感染性胃腸炎に伴う下痢を鎮めるのに著効を示すとの臨床報告も散見される。感染性胃腸炎は、食品や水を介して細菌やウイルスに感染し、腹痛、悪心・嘔吐および下痢などの症状を伴う疾患である。発症は通年で起こり、特に冬季に流行するロタウイルスもその一つであり、日本でも高い罹患率を示している。また、感染性胃腸炎の患

者の 75%前後は 10 歳未満の小児であるのも特徴の一つであり、世界では、年間、約 180 万人もの小児が感染性胃腸炎によって命を落としている³⁶⁻⁴⁰。本疾患の治療には、下痢や嘔吐に伴う脱水を防止することに主眼が置かれ、重症な場合には点滴による補水が行われるのが一般的である。五苓散には脱水に対する回復作用があるが、下痢改善作用に関してはこれまでのプロファイル上、当てはまらない。さらに、五苓散による消化器症状に対する実効性を基礎薬理学的に検証した実験はほとんどなされておらず、また、その作用機序も不明である。

一般に、腸管粘膜に感染を生じると炎症反応を惹起して、これが腸管粘膜のバリア機能の破綻^{41,42}と腸管内の水分の分泌・吸収のバランスを崩壊させることで⁴³下痢などの症状が生じる。その水分バランスに重要なのが AQP3 である。AQP3 は腸管の管腔側に発現しており^{44,45}、生理的条件下においては、大腸の管腔内の浸透圧は血管側のそれに比べて低いため、水は腸管側から血管側に輸送され、便の濃縮が行われる⁴⁶。従って、大腸での水の輸送は、腸管粘膜上皮細胞に発現している AQP3 を介して行われると考えられており、水の吸収において中心的な役割を担っている。また、実験的腸炎マウスや、ロタウイルス誘発性の感染性胃腸炎モデルマウスにおいて AQP3 の発現が低下することも報告されていることから⁴⁷、AQP3 の発現減少が下痢症状の増悪化に関係していることが示唆されている。

これらの観点から、第 4 章では、感染性胃腸炎病態を模倣した LPS 誘発性の急性胃腸炎モデルに対する五苓散の作用を検討した。LPS によって誘発された下痢症状を抑制する一方で、腸管粘膜のサイトカイン量を指標に評価した炎症応答には著明な影響を与えなかった。また興味深いことに、病理組織学的に調べた腸管粘膜の形態は、LPS 投与群では著しい粘膜上皮の絨毛の脱落が生じていたのに対し、五苓散の投与群ではこの上皮の傷害も生じなかった。さらに、AQP3 の発現量は、タンパク質、mRNA レベルどちらも LPS 投与によって著明に減少したが、五苓散の投与群では、この発現減少が抑制され、発現量は健常動物と同程度であった。また、AQP3 欠損マウスにおいて同様の実験をしたところ、五苓散の組織保護作用および下痢改善作用が消失することも確認した。これらの結果より、五苓散は、AQP3 の発現調節を介して下痢症状を改善することが明らかになった。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。

第2章 五苓散による血管内皮細胞の遊走抑制作用

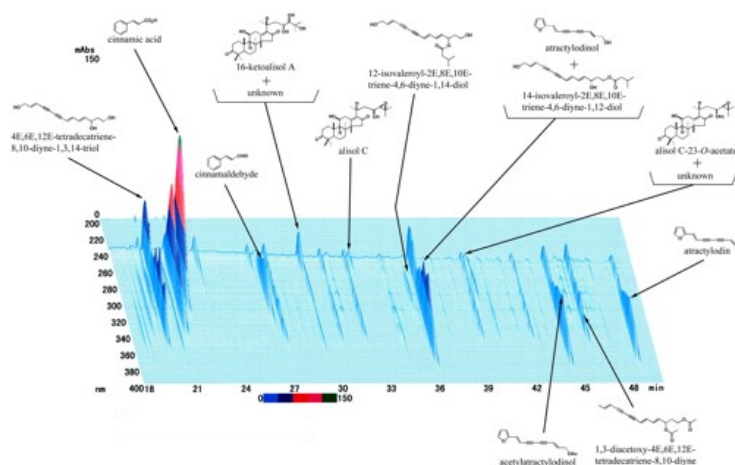
第1節 実験材料および実験方法

第1項 試薬

本研究に際し、使用した主な試薬を以下に示す。

Trypsin (Difco, NJ, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, CA, USA), fetal bovine serum (Hyclone, Little Chalfont, UK), Lipofectamine® 2000 transfection reagent (Invitrogen, CA, USA), Entellan® new (Merck, Darmstadt, Germany), Triton® X-100 (MP biomedical, CA, USA), Blocking One, NP-40 (以上, Nacalai tesque, Kyoto), eosin, hematoxylin 3G (以上, Sakura finetek, Tokyo), Tween-20 (Santa cruz, TX, USA), protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, MO, USA), Primescript™ RT master mix, RNAiso Plus, SYBR® Premix Ex Taq™ II (以上, Takara, Shiga), SuperSignal™ west femto maximum sensitivity substrate (Thermo scientific, MA, USA), bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide (以上, Wako, Osaka)

A spray-dried extract preparation of GRS (TJ-17, lot No. 2180017010) was kindly supplied by Tsumura & Co. (Tokyo, Japan). GRS doses for same-day use were prepared as follows: a mixture of *Alismatis rhizoma* (4 g, rhizomes of *Alisma orientale* Juzep), *Atractylodis lanceae Rhizoma* (3 g, rhizomes of *Atractylodes lancea* DC.), *Polyporus* (3 g, Sclerotium of *Polyporus umbellatus* Fries), *Poria* (3 g, Sclerotium of *Poria cocos* Wolf), and *Cinnamomi Cortex* (1.5 g, cortex of *Cinnamomum cassia* Blume) was added to water and extracted at 100 °C for 1 h. The extracted solution was filtered and spray-dried



to obtain dry extract powder (fig. 1).

Fig. 1. Chemical profile of Goreisan obtained by the three-dimensional HPLC analysis.

その他の試薬および無機塩類は市販の特級品を使用した。

第2項 抗体

本研究に際し、使用した抗体を以下に示す.

Mouse monoclonal anti- β -actin, rabbit polyclonal anti-AQP1 antibody (以上, Sigma), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Wako), rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2), rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (以上, Cell signaling technology, MA, USA)

第3項 Oligonucleotides

Oligonucleotide は, Sigma genosys 社に合成依頼した. 本研究に際し, 使用した primer および siRNA の配列を以下に示す.

(1) RT-PCR

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Target gene	Primer Sequence, 5'-3'	
	Forward	Reverse
human AQP1	GACAACGTGAAGGTGTCGCT	ATGTACATGAGGGCACGGAA
GAPDH	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG

(2) siRNA

AQP1 siRNA は Dharmacon 社から siGenome Smartpool (4 種類の siRNA 混合物) として購入した.

siGENOME Human AQP1 siRNA – SMARTpool

- 1) 5'-CCACGACCCUCUUUGUCUU-3'
- 2) 5'-GAACUCGCUUGGCCGCAAU-3'
- 3) 5'-CAACCCGGCUGUCACACUG-3'
- 4) 5'-GCUACAAAGCAGAGAUCA-3'

siGENOME non-Targeting siRNA #2

5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3'

(3) AQP1 promoter のクローニング

AQP1 Promoter (-1776)-Fw 5'-ACTTATGACCTTCGGCCACC-3'

AQP1 Promoter (+23)-Rv 5'-CGGGTGCTCAATTCCTCTG-3'

第4項 五苓散エキスの調製

五苓散は、五苓散料エキス原末 (ツムラ株式会社) を DMSO にて溶解し、20 分間の超音波処理後、遠心 (3,000×g, 25°C, 5 min) し、その上清を実験に用いた。

第5項 細胞株の培養

培養に用いた器具類は全て、オートクレーブによる滅菌処理を施し、溶液類の調製には超純水製造装置 (Direct-Q UV 5, Millipore) により精製した超純水を用いた。また、全ての操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行った。

1. 細胞株の培養

1) HUVEC 細胞

ヒト血管内皮細胞株 HUVEC 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。1.0×10⁶ cells/ml となるように、10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 5 µg/ml EGF, 1 mg/ml hydrocortisone, 1.5 µg/ml bFGF, 5 mg/ml heparin, 100 µg/ml BSA を含む Medium 200 に懸濁し、フラスコに播種 (2.0 ×10⁴ cells/cm²) 後、5% CO₂, 37°C 下で静置培養した。

2) A549 細胞

ヒト肺上皮細胞株 A549 細胞は、米国細胞バンク (ATCC) より入手した。1.5×10⁶ cells/ml となるように、5% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む DMEM に懸濁し、培養皿またはフラスコに播種 (2.0×10⁴ cells/cm²) 後、5% CO₂, 37°C 下で静置培養した。

2. 試薬処理

1) 五苓散

各細胞をサブコンフルエントまで培養後，細胞を無血清培地にて 2 回洗浄した．その後，各濃度の五苓散エキスを (溶媒: 0.1% DMSO) を含む無血清培地にて，5% CO₂，37°C 下で静置培養した．

2) VEGF, TNF- α および U0126

各細胞をサブコンフルエントまで培養後，細胞を無血清培地にて 2 回洗浄し，無血清培地に置換することで無血清状態にした．12 時間の無血清状態後，各濃度の VEGF および 40 μ M の U0126 (溶媒: 0.1% 滅菌超純水) を含む無血清培地にて，5% CO₂，37°C 下で静置培養した．

第 6 項 細胞への siRNA 導入

細胞への siRNA の導入は，Lipofectamine[®] 2000 (Invitrogen) を用い，そのプロトコールに従った．まず，AQP1 siRNA 40 pmol を Opti-MEM にて 250 μ l に希釈した (A 液)．ついで，10 μ l の Lipofectamine[®] 2000 を Opti-MEM にて 250 μ l に希釈し，室温で 5 分間反応させた (B 液)．A 液および B 液を混合し，室温にて 15 分間反応後，35 mm 培養皿上のサブコンフルエント状態にある細胞に添加した．目的時間，37°C にて培養後，実験に用いた．

第 7 項 Western blotting

培養細胞上の培地を除き，細胞を冷 PBS または冷 TBS で洗浄した．細胞に RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1% (v/v) proteinase inhibitor cocktail) または lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 50 mM sodium fluoride, 0.1% sodium orthovanadate, 1 mM PMSF) を加え，氷上にて 20 分間静置した．静置後，セルスクレイパーで回収した懸濁液を遠心 (10,000×g, 4°C, 10 min) し，その上清を細胞溶解液とした．抽出した細胞溶解液のタンパク質量は bicinchoninate (BCA) 法により測定し，BSA を用いて作製した検量線から，タンパク質量を算出した．各サンプルのタンパク質量を一定にした後，各サンプルを 10% polyacrylamide gel で SDS-PAGE を行い，PVDF 膜に転写 (250 mA, 1.5 h, 4°C) した．転写した PVDF 膜はブロッキング液中，室温で 1 時間振盪し，ブロッキングした．その後，1 次抗体反応 (4°C, overnight) を行い，0.1% Tween 20/PBS または 0.05% Tween 20/TBS で洗浄した後，2 次抗体を反応 (室温, 1 h) させた．2 次抗体反応後，PVDF 膜を 0.1% Tween 20/PBS または 0.05% Tween 20/TBS で洗浄した後，SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) により抗体反応を検出した．ECL 反応の検出には，ChemiDoc™ MP システム (Bio-rad) を用いた．なお，各抗体のブロッキング条件および希釈倍率を以下に示す．

Table. 2. The conditions of antibody reaction for western blotting

Name	Blocking sol.	Dilution of primary Ab	Dilution of 2ndary Ab	Ab dilution sol.
AQP1	5% skim milk*	1:1000	1:20000 (rabbit)	5% skim milk*
AQP3	5% skim milk*	1:1000	1:20000 (rabbit)	5% skim milk*
ERK	Blocking One	1:1000	1:20000 (rabbit)	Blocking-One*
phospho-ERK	Blocking One-P	1:1000	1:20000 (rabbit)	Blocking One-P**
β-actin	Blocking One	1:2000	1:20000 (mouse)	Blocking One*

*Diluted with 0.1% Tween 20/PBS

**Diluted with 0.05% Tween 20/TBS

第 8 項 Quantitative RT-PCR

培養細胞から RNAiso Plus (Takara) を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA の収量は UV (260 nm) の吸光度により算出した。なお、total RNA の抽出に用いた試薬・器具は全てオートクレーブもしくは DEPC 処理した。

得られた total RNA (0.5 µg) は Primescript™ RT master mix (Takara) を用い、逆転写反応 (1 cycle at 37°C for 15 min, 85°C for 15 sec) を行い、その産物の 2 µl を real-time PCR 反応の鋳型 DNA とした。Real-time PCR 反応には、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) を用い、CFX Connect™ リアルタイム PCR 解析システム (Bio-rad) で (1 cycle at 95°C for 30 sec, 40 cycles at 95°C for 5 sec, 60°C for 30 min.) の条件で反応させた。また、各 mRNA の定量化には、目的 PCR 産物が検出される最初の PCR cycle 数 (threshold cycle (Ct)) を選択し、内部標準遺伝子として GAPDH を用いた comparative Ct method (以下の式) にて定量解析した。

$$\text{Fold change} = 2^{-[(\text{CT,X-CT,R})_{\text{TEST}} - (\text{CT,X-CT,R})_{\text{CONTROL}}]}$$

CT,X: CT of the interest gene

CT,R: CT of the reference gene (GAPDH)

第 9 項 細胞遊走能の測定 (Scratch assay)

細胞の遊走能の測定には、scratch assay を用い、wound-healing activity として評価した。HUVEC 細胞をコンフルエント状態まで培養後、無血清培地で 2 回洗浄し、無血清培地に置換した。この 24 時間培養後、細胞にピペットチップの先端を接触させ、一定の圧力を維持したまま一定方向に移動させることで細胞を直線状に剥離 (scratch) し、scratch 幅 (initial wound) を測定した。その後、各濃度の VEGF を含む培地を加え、さらに 24 時間培養し、再び scratch 幅を測定した。なお、1 つの scratch 当り 5 ヶ所で細胞の存在していない間隙幅を測定し、その平均値を scratch 幅とした。また、細胞遊走能は、initial wound と 24 時間後の scratch 幅の差 (relative wound healing activity) として算出した。

第 10 項 細胞増殖能の測定

細胞増殖は IncuCyte™ ZOOM (Essen bioscience 社) を用いて測定および解析を行った。細胞増殖試験は 96-well plate に細胞を 1.0×10^4 cells/ml で播種し、5% CO₂, 37°C 条件で培養した。1 時間毎に画像を取得し、画像中の細胞数を同機器内蔵のソフトウェアにて解析し、細胞増殖率を算出した。

第 11 項 レポーター遺伝子の調整

(1) ヒト genomic DNA の単離

ヒト AQP1 プロモーター領域をクローニングするために、Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) を用いて、A549 細胞から genomic DNA を単離した。まず、A549 細胞をコンフルエント状態まで培養し、その dish 上から培地を除き、冷 PBS にて細胞を洗浄した。これに Lysis Buffer 150μl を加えピペッティングにより混和し、細胞ライセートとした。細胞ライセート中の genomic DNA を吸着材が充填されたカラムに添加し、そのカラムを遠心することにより、genomic DNA を吸着材に吸着させた。その後、カラムから genomic DNA を溶出させ、その後の実験に用いた。

(2) AQP1 レポーター遺伝子の調製

HUVEC 細胞における AQP1 の転写活性を測定するためのレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた。ヒト AQP1 プロモーター領域のクローニングおよびルシフェラーゼ発現ベクター pGL4.17 (Promega) へのサブクローニングの方法を以下に示す。なお、すべての DNA の塩基配列は、Macrogen, Inc (Korea) に DNA 配列の解読を依頼し、確認した。

ヒト genomic DNA を鋳型とし、プライマーに AQP1Promoter(-1776)-Fw, AQP1Promoter(+23)-Rv, polymerase に TaKaRa LA Taq® (Takara) を用いて PCR (1 cycle at 94°C for 2 min, 40 cycle at 94°C for 30 sec, 63°C for 30 sec, 72°C for 2 min, 1 cycle at 72°C for 5 min) を行った。得られた PCR 産物を pCR®2.1 (Invitrogen) に挿入した後、HindIII および XhoI で制限酵素処理し、pGL4.17 の HindIII および XhoI 部位に挿入した。


ACTTATGACCTTCGGCCACCTGGGCTGTCTGAGCAGGCAGGGCCTGCTGGCCACCACCG
 -1776 PPAR
 TCCTGTACAGGCACCTTAGGGGAATGAATCTTCCCCACCTGCAGCCCCAGCAAACACACA
STAT
 CCAGGCTGGTCCCTGGCAATTCACCCCAAGAGCCAGGCCACAGCTGGGCAGAGGGGTG
PPAR
 GCCAGTAACAGCTGGTGTCTTCTCTGCAGGATAGCCCTGGACAAGAGGCATAAGACC
 CACTCATCCTTGCCCTGCCCCAGGCACACTTAGAAAAAGTCCTCTCACCGGGCCTCAGTTT
Sp1/Sp3
 CCCACCTATAAAATGGGAAGATGCCAACACGCCCCGAGTGGGACTGTGGTGGGGCAGGCA
NF-1
 GGAGGTGGGAGGAGAGCCAGATCATCCAGGCCTTCCCTAGGGGACGCAGGGGGACC
NF-kB
 CTCCCTTCTGGGCCTGGTTCTTCCAGCACGTTCCATGCAGCAGGCAAGAGGGCCAGGCC
NF-kB
 CAGGGGTTCTGACAGCTTGCTGGCCCTGGAGTCCAGATTCTTGTGTTGTTGGCTGGCGC
 TAGGCCTCTGGATTGGAGATGCCCCGGGGCACAGGCGGGCCACGGGGATCTGCAGCAGG
NF-kB
 GCCTCGGCCCCCTCCCTCTGCAGGGGCTCGTCTGGTCCCTCCCGCTCTCTGCCTCTCCTC
Smad
 ATTTATCTCTCCCTTTCTGCTTCTTGGCTCTGGGTCCAGTCCTATCTCCCCGTGTTTCAGTT
IRF
 TGTCTTTTCTAGCCCTTTGCGCTCTCTCTGTCTCTCTCAGCCCTGCTTGTCTCACTGTCT
 CTGGCTGGGGGATCTGTCTCTTTCACTTCCACTTTTGTCTATTTCCCTGCTACTGTCTTT
IRF
 CCTTCTCCTTGTCTGTCTCTTCTCCTCCCTCAGCCAGCATCTGTCTGTCTCTGCCTTTC
PPAR
 TCTCCTGCTCCCTCCCTCCCTCCTCTCCAGCACCTTCCAATGCCAGGTGGGGCTGCCATT
 CCTTCCACCTTCCCAGTGACCCGCCAGTGTGACTGCCTTGAGAGGAAAGTCCTAAACTG
NF-kB
 TCCCTATCTTCACCAGCCTGCCCTCAAATCATTGGTTCAAATCGCTGTCGAGAAGTTTGGG
NF-kB
 GAGCTCCAGGGCGGGGGCTTTCTAACAGCTCTGCCTAGCTCGGGCCTGCCCTCAACCG
HIF
 CAGCATGCAGGGCAGCCACAGACAACCTCTCTGCAACTTCTGATGCCTCCGTGCCCCCA
NF-kB
 TCCACAGAGCCCTGGCTCTGGGGGACTGGGGACTCTGGGACATCCCTAACATGGCATGC
NF-kB
 AGTGGCGGTGCGGGAGGACTTGACTGCCCTCTGGAGCCCTGGGCCCCGGGACTCCAG
 GCCAGTGCCTCTCTGGGTCGGGATGGGGATGTCAGGCCAGCAGGATCATGGTACCTGCC
 TCCAGGGAGGGCAACGTCCACCCACTGAGTCCAGCCCCGCCACCCACCCACTCCGGAG
Sp1/Sp3
 CACCTGGCTCTGCCCTCAGGAACTCCCTGAGCTTTGCACACAGGGCCGAGACACCTGGA
Smad
 TTTCTCTGGTTCCTGAGTGGGGCCAGCTTGGAAGAATTTCCCAAAGCCTATTAGAGCA
 ACGGCTGCCTCCTGCCTGCCTCCTTGGGCTGGGCAGGGCTGAGGGCGGAGGGAGAGAG
Sp1/Sp3
 AGAGAGAGGGAGGGGGAGAGGAGGAAGGAAAAAGTTGGCAGGCCGACAGCACAGCCG
 TGTCTGCATCCATCCAGAGGAGGTCTGTGTGGTGTGGGGCGGGCCAGGAGCGAAGAGA
Sp1/Sp3
 GGCTTTCCTCCCTTTGTGCTCCCCCGCCCCCGCCCTATAAATAGGCCAGCCAGG
Sp1/Sp3 TATA-like
 CTGTGGCTCAGCTCTCAGAGGGAATTGAGCACCCG
 +1  +23

Fig. 2. The sequence of the human AQP1 promoter region and the putative transcription factor binding elements.

The putative transcription factor binding elements identified by database search are underlined. The transcription start site (+1) is indicated by the bent arrow.

第 12 項 細胞へのレポーター遺伝子導入およびプロモーター活性の測定

(1) 遺伝子導入

細胞へのレポータープラスミドの導入はLipofectamine® 2000 を用い、そのプロトコールに準じて行った。プラスミドDNAとLipofectamine® 2000溶液を0.5 µg : 1.0 µl (DNA : Lipofectamine® 2000) の割合で混和し、全量をOpti-MEM にて25 µlとした。この混合液を室温にて15 分間反応後、培養皿のサブコンフルエント状態にある細胞に添加し、目的時間、37°Cにて培養した後、実験に用いた。

(2) プロモーター活性の測定

レポータープラスミドを導入した細胞におけるプロモーター活性はDual-Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定した。培養した細胞から培地を除き、冷PBS (250 µl/well) で2回洗浄し、100 µl の細胞溶解液を加え、室温で15 分間おだやかに振盪させた。この細胞溶解液20 µlと発光基質100 µl を室温で混和し、ルミノメーター (Lumat LB9507, EG&G) にてfirefly luciferase活性を測定した。また、細胞間の遺伝子導入効率の補正のために、全てのプラスミドと共に遺伝子導入したpGL4.17 (hRluc/TK, Promega) のrenilla luciferase活性も同時に測定した。なお、firefly luciferase活性をrenilla luciferase活性によって補整し、各試料のrelative luciferase activityを算出した。

第 13 項 組織染色

摘出した組織は、室温条件下で、10% 中性緩衝ホルマリン(Wako) に二晩浸して固定し、ethanol で段階的に脱水し、paraffin 包埋した。マトリゲルおよび腸管組織は5 µm 厚の paraffin 切片に薄切した。各組織の paraffin 切片を、xylene で脱 paraffin 化し、100% ethanol に浸漬した後、以下に示す染色を行い、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence)、またはシステム生物顕微鏡 BX51 (Olympus) で観察した。

(1) Hematoxylin and eosin (H&E) 染色

切片を hematoxylin 溶液に 10 分間浸して染色した。染色後、10 分間流水洗浄し、核の調色および色出しを行った。洗浄終了後、eosin 溶液に 1 分間浸し、線維および間質等の染色を行った。その後、水道水および蒸留水中で余分な eosin を洗浄し、ethanol で脱色と脱水を行った。

(2) 免疫染色

切片を 0.3% H_2O_2 /methanol 溶液に 10 時間浸すことで内因性ペルオキシダーゼを失活させた後, PBS で洗浄 (5 min, 2 回) し, 10 mM sodium citrate 溶液 (pH7.0) 中で抗原賦活処理 (80°C, 30 min) を行った. 放冷後, PBS で洗浄 (5 min, 2 回) し, 続いて, ブロッキング溶液 (2% BSA and 0.2% Triton X-100/PBS) で 15 分間ブロッキングを行った後, 一次抗体を添加し, 4°C 条件下で一晩静置した. 0.05% Triton X-100/PBS で洗浄 (5 min, 2 回) し, 二次抗体として biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) を添加し, 室温条件下で 1 時間静置した. 0.05% Triton X-100/PBS で数回洗浄し, avidin biotin-peroxidase complex を室温条件下で 1 時間静置した. 続いて, 0.05% Triton X-100/PBS で数回洗浄し, 0.1% DAB/0.05% H_2O_2 /PBS と反応させることで抗原を可視化した.

一次抗体には, rabbit polyclonal anti-AQP1 あるいは rabbit polyclonal anti-AQP3 を用いた.

第 14 項 統計処理

実験データは全て平均値 \pm 標準誤差で示した. 本研究における多群間の比較における有意差検定にはソフトウェア GrapPad Prism (MDF) を用い, One-way ANOVA を行い, Student-Newman-Keuls 試験により 5%未満の危険率をもって有意とみなした.

第2節 本章の目的

近年、五苓散が慢性硬膜下血腫の再発を有意に抑制することは既に述べた。しかしながら、五苓散は本来、利尿作用を期待して、むくみや二日酔いに用いられる漢方薬であり、体の水の位置を是正することで効果を発揮する。しかしその作用は、慢性硬膜下血腫の再発予防効果とは結びつかないため、機序は不明なままである。

慢性硬膜下血腫の病態では、術後に取り除けなかった血腫において、未熟な血管が新生されるが、その脆弱性故に破壊され、再び出血し、血腫が肥大することで再発や増悪化に繋がると考えられている^{16,17}。そのため、脆弱な血管の新生を食い止めることが何より重要であることは言うまでもない¹⁸⁻²⁰。

血管新生は、血管内皮細胞の出芽に始まり、本細胞の増殖・遊走が重要な初期反応となる。この内皮細胞の運動性には、血管内皮増殖因子 VEGF などの刺激依存性が知られる^{21,24}。VEGF は、血管内皮細胞に特異的に作用する増殖因子であり、血管内皮細胞に発現している VEGF のレセプター (VEGFR) に結合することで、種々の因子 (ERK, p38, Akt) のリン酸化を介し、増殖および遊走を引き起こす。

また、内皮細胞の遊走には、定常状態での細胞内アクチン骨格を含めた細胞構造など基本的な細胞性質も寄与する⁴⁸⁻⁵⁰。血管内皮細胞に発現する水チャネル AQP1 は、欠損マウスにおいて、腫瘍血管新生が抑制される報告からも³²⁻³⁴、その遊走に重要な役割を果たすことが知られており³⁵、メカニズムとしては、水の流入を介した細胞骨格の構築促進が想定されている。

そこで本章では、慢性硬膜下血腫の再発に対する五苓散の作用に血管新生阻害が関わるのではないかとの仮説のもと、VEGF 刺激による血管内皮細胞の運動性ととも、内皮細胞の基礎的性質すなわち AQP1 の発現に対する五苓散の作用を検討し、最後に *in vivo* における血管新生に対する作用を検証した。

第3節 実験成績

第1項 血管内皮細胞の遊走および増殖に対する五苓散の作用

(1) VEGF 誘導性の血管内皮細胞の遊走と増殖に対する五苓散の作用

まず, *in vitro* において, VEGF によって誘導される血管内皮細胞の遊走に対する五苓散の作用を調べた. ヒト血管内皮細胞株 HUVEC 細胞に対して VEGF (10 ng/ml) と共に 0.01, 0.03 または 0.1 mg/ml の五苓散エキスを 24 時間処理し, 遊走能を scratch assay に供した. その結果, VEGF によって本細胞の遊走は約 4 倍まで亢進したが, 五苓散はこの細胞遊走を濃度依存的に抑制し, 最大濃度である 0.1 mg/ml 処理での遊走能は VEGF 単独処理の約 50%まで低下した (Fig. 3A). さらに, VEGF の濃度を 2.5, 10, 25 または 100 ng/ml と変えて同様の実験を行ったところ, 五苓散はどの濃度においても VEGF による遊走を抑制したが, 最大作用の得られた 100 ng/ml でも抑制された (Fig. 3B).

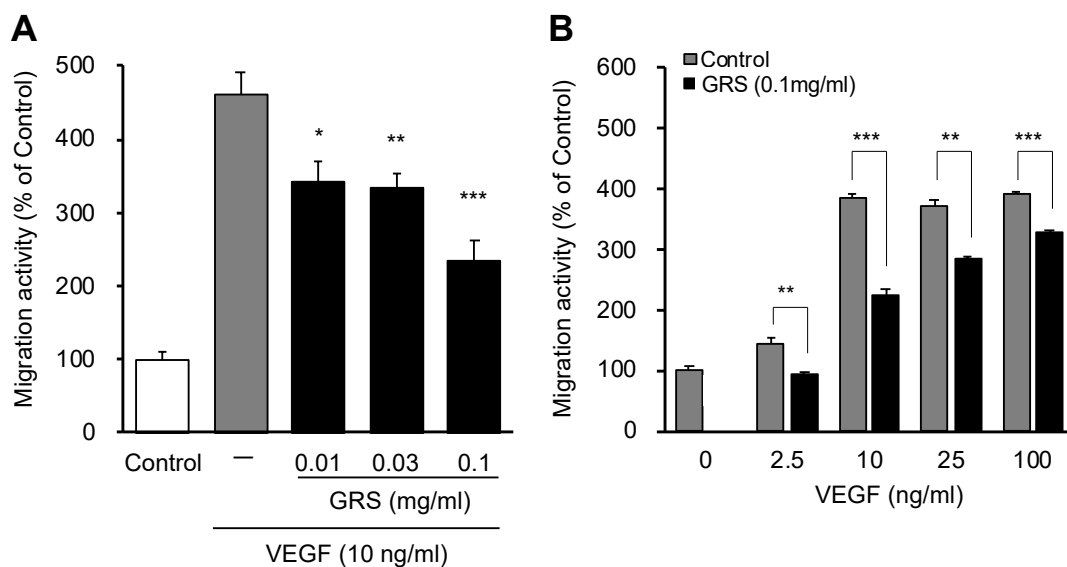


Fig. 3. GRS inhibited VEGF-induced migration of HUVEC cells.

A: HUVEC cells were serum-starved for 24 h with or without 0.01, 0.03, or 0.1 mg/ml GRS and subjected to *in vitro* wound-healing assay. Media containing 10 ng/ml VEGF with or without GRS were added to the wells and observed after 24h. B: After scratch, cells were treated with 0, 2.5, 10, 25, or 100 ng/ml VEGF

with or without GRS, and observed after 24h. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3). **, ***: $p < 0.01$, 0.001 vs. VEGF alone.

次に、血管内皮細胞の増殖に対する五苓散の作用を検討した。HUVEC 細胞に対して VEGF (10 ng/ml) と共に 0.01, 0.03 または 0.1 mg/ml の五苓散エキスを 24 時間処理し、増殖能をソフトウェアにて調べた。遊走の結果と一致して、五苓散は VEGF で亢進された血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に抑制した (Fig. 4).

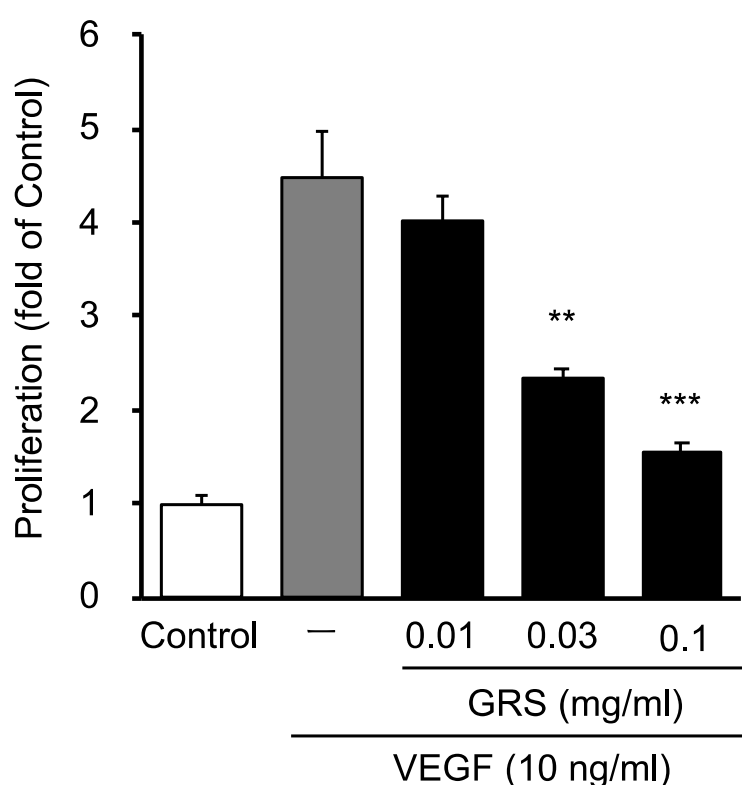


Fig. 4. GRS inhibited VEGF-induced proliferation of HUVEC cells.

HUVEC cells were serum-starved for 24 h with or without 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml *Goreisan* and subjected to proliferation assay. Media containing 10 ng/ml VEGF with or without *Goreisan* were added to the wells and incubated for an additional 24 h. The number of cells after 24 h in the image was measured using IncuCyte™ ZOOM (Essen bioscience) software and the proliferation rate was calculated. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3). **, ***: $p < 0.01$, 0.001 vs. VEGF alone.

(2) TGF- β 誘導性の血管内皮細胞の遊走に対する五苓散の作用

次に, VEGF 以外の刺激で誘導した内皮細胞の遊走に対する五苓散の作用を検討した. TGF- β は, 受容体に結合することで下流シグナル分子である Smad の活性化を経て様々な遺伝子発現を誘導し, 血管内皮細胞の増殖や遊走を促進する. HUVEC 細胞に TGF- β (10 ng/ml) と共に 0.01, 0.03 または 0.1 mg/ml の五苓散エキスを 24 時間処理し, 遊走能を scratch assay にて調べた. Fig.5 で示すように, 本細胞でも TGF- β によって著明な遊走が生じたが, 五苓散は, VEGF の結果と同様に, この細胞遊走も処理濃度依存的に抑制したものの, その作用は VEGF の場合に比べてやや弱かった. 従って, 五苓散の遊走抑制作用は遊走惹起刺激に依存しないと考えられた.

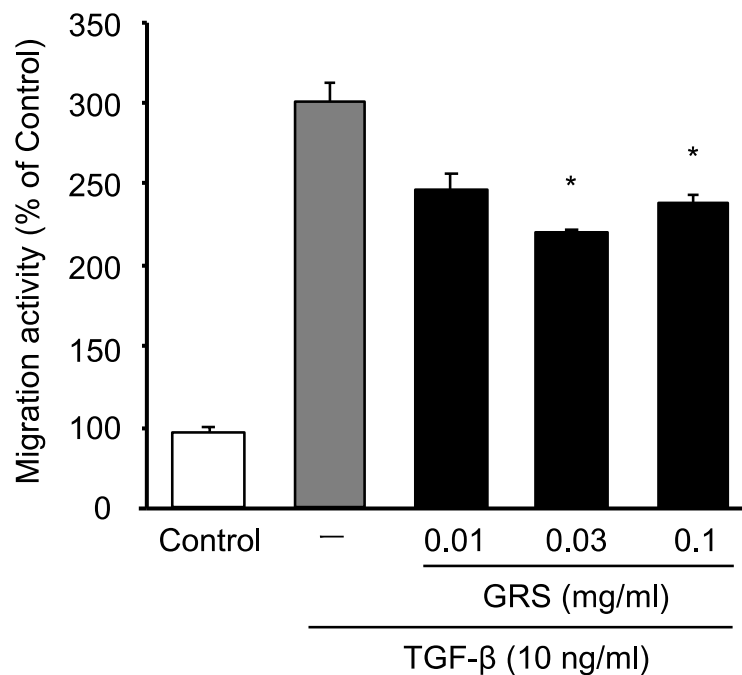


Fig. 5. GRS inhibited TGF- β -induced migration of HUVEC cells.

HUVEC cells were serum-starved for 24 h with or without 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml Goreisan and subjected to in vitro wound-healing assay. Media containing 10 ng/ml TGF- β with or without Goreisan were added to the wells and incubated for an additional 24 h. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3). *: $p < 0.05$ vs. TGF- β alone.

(3) 血管内皮細胞の基礎遊走に対する五苓散の作用

これまでの結果から、五苓散が刺激に依らず内皮細胞の運動性に関わる可能性が考えられたため、無刺激時の遊走、すなわち血管内皮細胞の基礎遊走に対する五苓散の作用を検討した。HUVEC 細胞に五苓散を 0.01, 0.03 または 0.1 mg/ml の濃度で処理し、scratch assay にて 24 時間の遊走能を測定した。興味深いことに、五苓散はこの基礎遊走も濃度依存的に抑制し (Fig. 6), 最大 0.1 mg/ml の処理時には、コントロールの約 50%まで低下させた。従って、五苓散は刺激依存的な遊走だけでなく、内皮細胞の基礎遊走活性をも抑制する作用をもつことが示唆された。

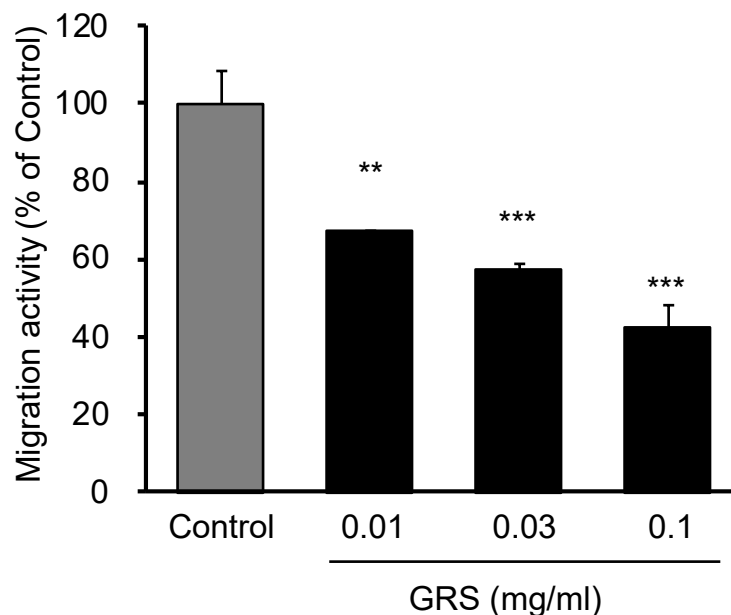


Fig. 6. GRS inhibited basal migration of HUVEC cells.

HUVEC cells were serum-starved for 24 h with or without 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml *Goreisan* and subjected to *in vitro* wound-healing assay. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3). **, ***: $p < 0.01$, 0.001 vs. Control.

(4) 血管内皮細胞の遊走抑制作用における ERK 阻害薬との作用比較

VEGF 刺激は、血管内皮細胞上にある VEGFR が受容し、下流シグナル分子である ERK を活性化することで、細胞の遊走や増殖を引き起こすとされている。そこで、ERK 阻害薬である U0126 と五苓散の遊走活性に対する比較検討を行った。HUVEC 細胞に対して VEGF (10 ng/ml) と共に 0.1 mg/ml の五苓散エキスおよび U0126 (40 μ M) を 24 時間処理し、遊走能を scratch assay にて調べた。U0126 は五苓散と同様に、VEGF 存在下での遊走を抑制したが、基礎遊走活性に対しては影響しなかった (Fig.7).

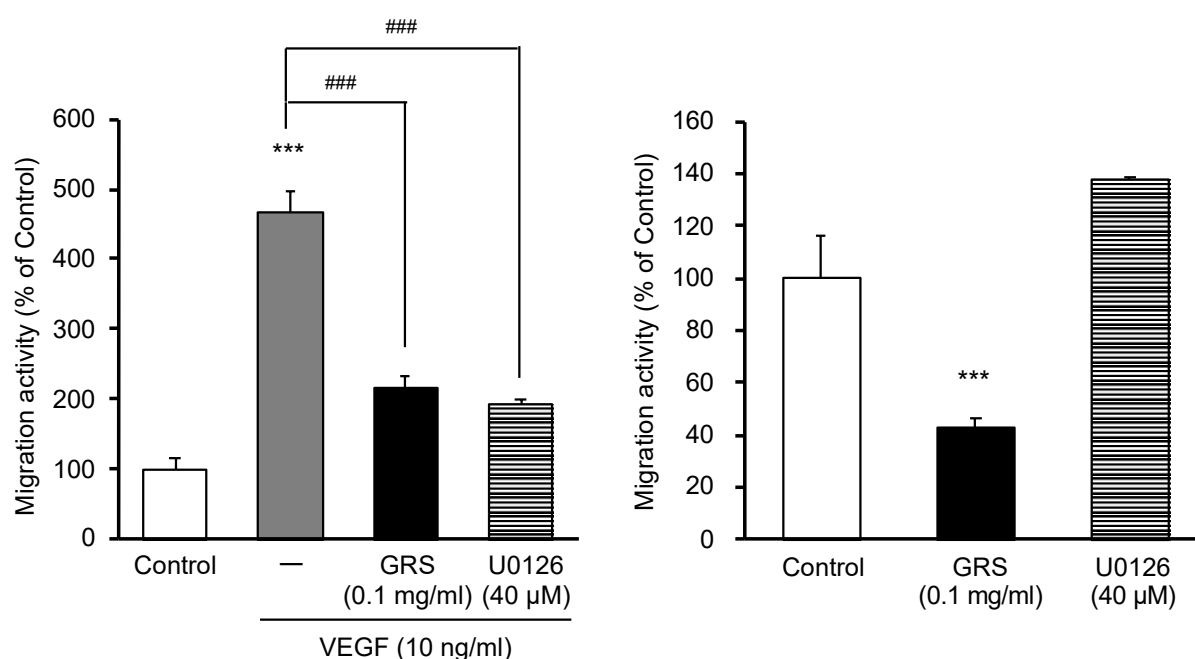


Fig. 7. GRS and ERK inhibitor inhibited VEGF-induced proliferation of HUVEC cells.

Media containing with or without GRS (0.1 mg/ml) or U0126 (40 μ M) were added to the wells and subjected to *in vitro* wound-healing assay. Media containing 10 ng/ml VEGF with or without GRS were added to the wells and incubated for an additional 24 h. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). *, **, and ***: $p < 0.05$, 0.01, and 0.001 vs. Control.

第2項 AQP1 の発現に対する五苓散の作用

(1) VEGF 刺激時および定常状態での AQP1 発現に対する五苓散の作用

続いて、血管内皮細胞の遊走に重要な役割を担う AQP1 の発現に対する五苓散の作用を検討した。HUVEC 細胞に VEGF および 0.1 mg/ml の五苓散エキスを 24 時間処理し、western blotting 法にて AQP1 タンパク質量を調べた。その結果、五苓散は、VEGF の有無に関わらず、AQP1 のタンパク質発現を著明に減少させた (Fig. 8 A,B)。また、AQP1 mRNA に対する作用も定量的 RT-PCR 法にて同様に検討したところ、五苓散はこれも有意に減少させ、さらにその作用は濃度依存的であった (Fig. 8 C,D)。

このことから、五苓散は血管内皮細胞の AQP1 発現を減少させることが示された。

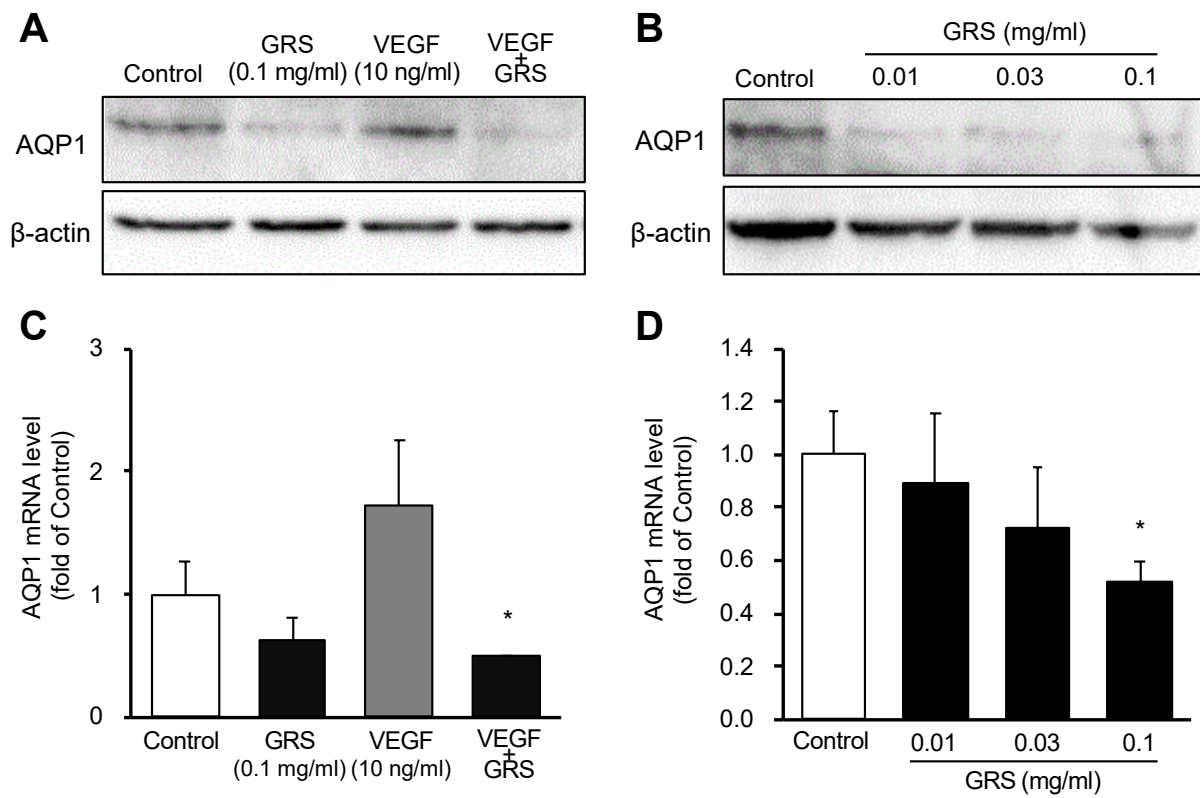


Fig. 8. GRS suppressed AQP1 expression in HUVECs.

HUVEC cells were serum-starved for 24 h, and cells were then treated with or without 0.1 mg/ml GRS for 24h. AQP1 protein expression was measured by western blotting analysis or quantitative RT-PCR. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). *: $p < 0.05$ vs. Control.

(2) AQP1 の転写および mRNA 安定性に対する五苓散の作用

ここまでの成績から、五苓散が AQP1 発現を抑制し、血管内皮細胞の基礎遊走活性を低下させることが明らかになった。AQP1 の発現低下には、mRNA 安定性の低下と転写抑制の 2 つの機序が関わりと想定される。そこでまず、AQP1 mRNA の安定性に対する五苓散の作用を検討した。HUVEC 細胞に新規 RNA 合成阻害薬の actinomycin D (5 μ g/ml) の存在下に五苓散を加え、12 および 24 時間後の AQP1 mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて測定し、AQP1 mRNA の減衰を評価した。actinomycin D を処理すると、AQP1 mRNA 量は処理時間依存的に減少した。一方、五苓散を共処理した細胞でも、mRNA 量は時間依存的に減少し、五苓散の有無による AQP1 mRNA 分解速度に著明な違いは認められなかった (Fig. 9A)。

次に、AQP1 遺伝子の転写に対する五苓散の作用を検討した。ヒト AQP1 プロモーター領域 (-1776/+23) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを HUVEC 細胞に導入し、五苓散 0.1 mg/ml を 24 時間処理した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、五苓散を処理すると AQP1 プロモーター活性は、コントロールに比べて約 50%まで抑制することが分かった (Fig. 9B)。

これらの結果から、五苓散は AQP1 遺伝子の転写を抑制することでその発現を低下させると考えられた。

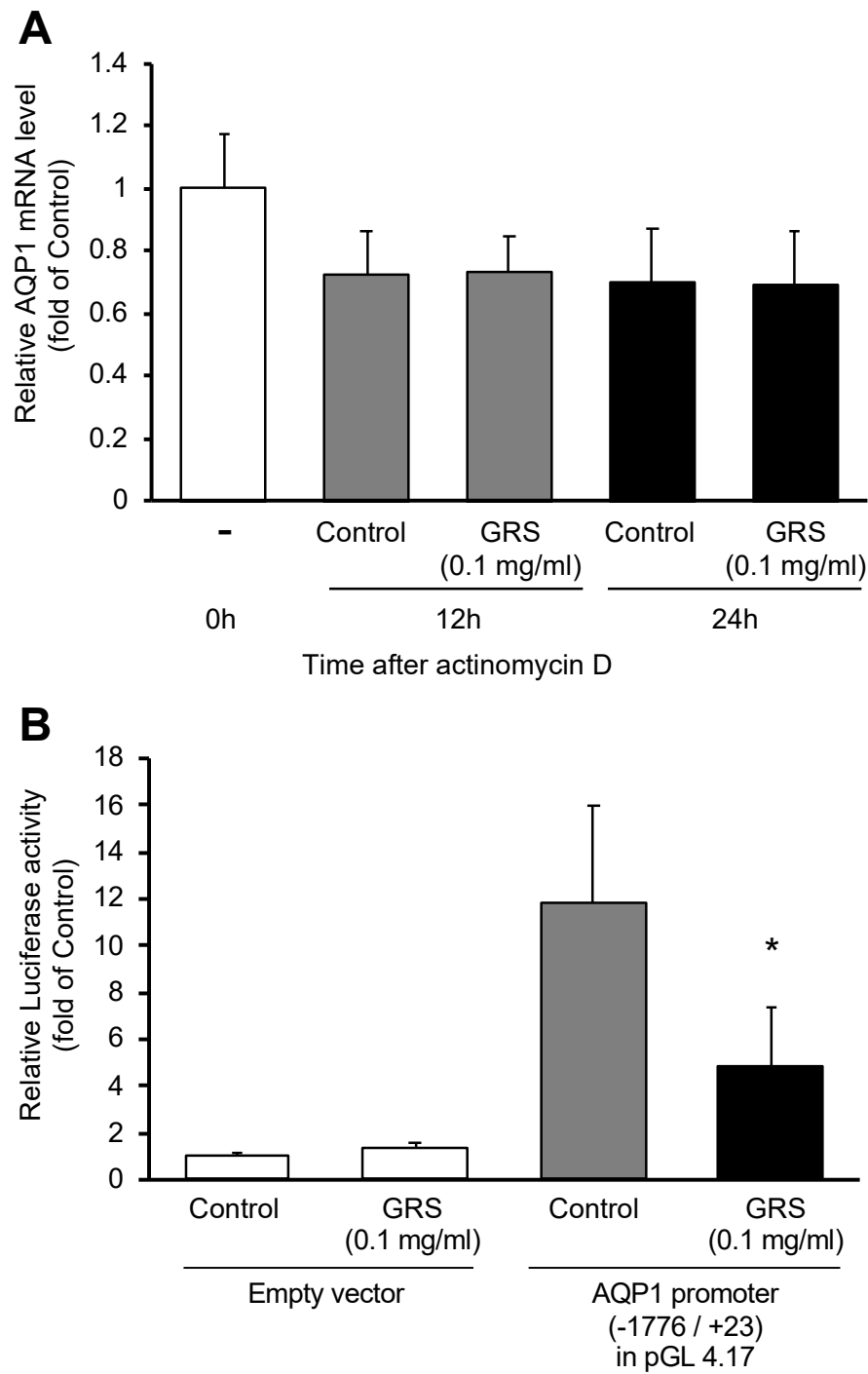


Fig. 9. GRS suppressed AQP1 gene transcription.

HUVEC cells were transfected with a luciferase reporter construct containing AQP1 promoter (-1776/+23). Cells were then treated with or without 0.1 mg/ml GRS for 24 hr. The transcriptional activity was measured by luciferase assay. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). *: $p < 0.05$ vs. Control.

(3) AQP1 発現減少と遊走に対する五苓散の構成生薬の作用

次に、五苓散を構成する生薬（沢瀉、蒼朮、猪苓、茯苓、桂皮）の AQP1 タンパク質発現に対する作用を調べるために、HUVEC 細胞に五苓散 0.1 mg/ml 相当量の生薬を処理し、western blotting 法にて AQP1 タンパク質を検出した。その結果、5 つの生薬のうち猪苓と桂皮が五苓散と同様に AQP1 の発現を著明に減少させた (Fig. 10A)。また、同条件下で遊走能を測定すると、AQP1 発現に関する結果とよく符合し、猪苓と桂皮のみが基礎遊走を抑制した (Fig. 10B)。

従って、猪苓と桂皮による AQP1 発現減少が五苓散の血管内皮細胞の遊走抑制作用に一部寄与することが示唆された。

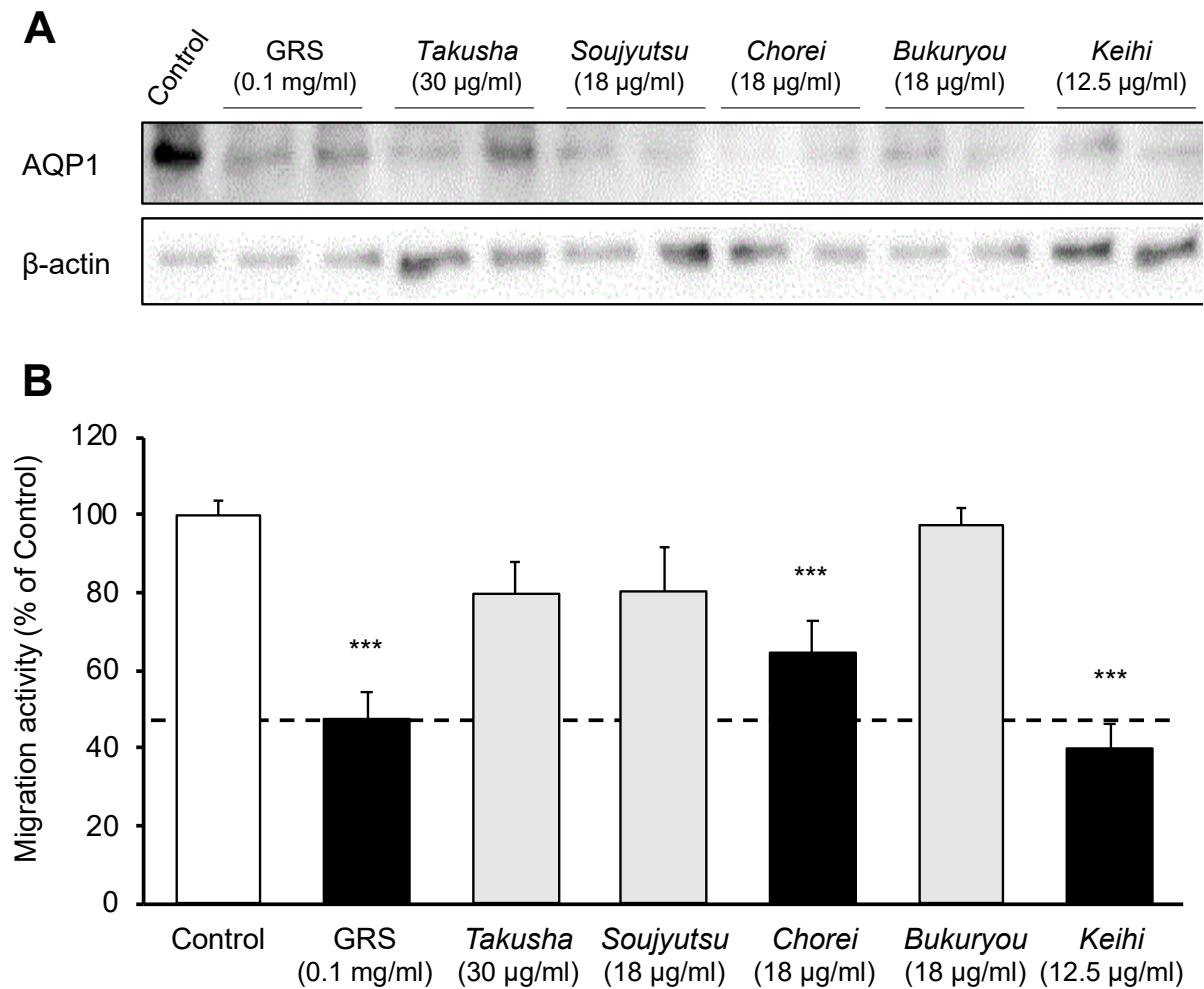


Fig. 10. *Chorei* and *Keihi* inhibited basal migration of HUVEC cells through decreased AQP1 expression.

A: HUVEC cells were serum-starved for 24 h, and then treated with or without 0.1 mg/ml *Goreisan* or Herbal extracts for 24h. The AQP1 protein expression was measured by western blotting analysis. B: HUVEC cells subjected to *in vitro* wound-healing assay. Media containing with or without *Goreisan* or Herbal extracts were added to the wells and incubated for an additional 24 h. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3) *** : $p < 0.001$ vs. control.

第3項 AQP1 発現減少による遊走および ERK リン酸化に対する作用

(1) AQP1 欠損細胞の遊走活性とそれに対する五苓散の作用

前項までに、五苓散が内皮細胞の AQP1 発現を低下させることを明らかにしてきたが、本作用が遊走抑制作用に直接的に寄与するの否かを検討した。まず、HUVEC 細胞に AQP1 siRNA を導入し、AQP1 の発現を抑制した。この細胞を用いて scratch assay により遊走能に対する五苓散の作用を検討した。コントロール細胞では、五苓散は有意に遊走能を低下させた。また、AQP1 を欠損させた細胞では、コントロールに比べ、ベースの遊走が約 50%まで低下したが、五苓散を処理してもそれ以上の遊走抑制は認められなかった (Fig. 11A)。さらに、VEGF 存在下においても AQP1 欠損によって遊走が抑制されることが明らかになった。この条件においても、五苓散によるそれ以上の遊走抑制作用は見られなかった (Fig. 11B)。

これらの結果より、五苓散は、AQP1 の発現減少を介して血管内皮細胞の遊走を抑制していることが示された。

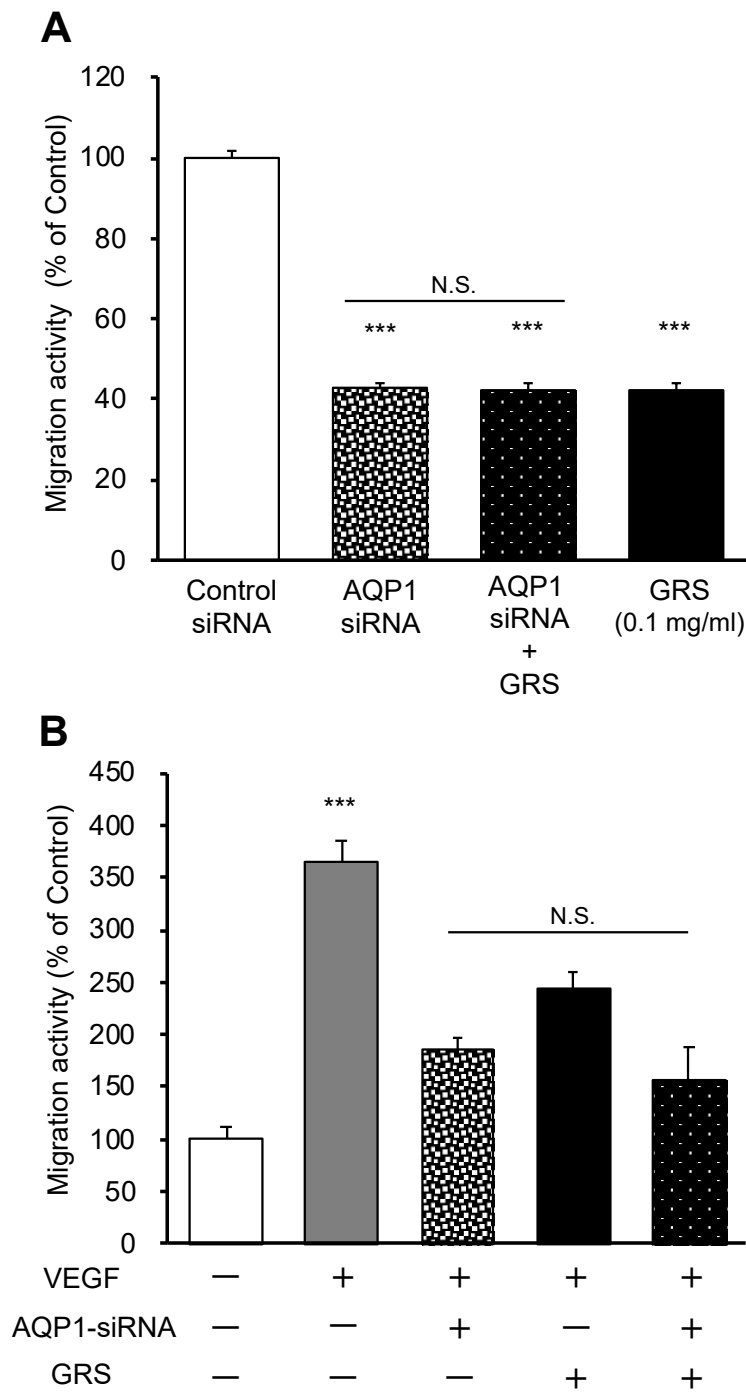


Fig. 11. AQP KD cell suppressed the migration of HUVECs.

HUVEC cells were transfected with 20 nM small interfering RNAs against AQP1 and incubated for 24 h. Subsequently, cells were treated with or without 0.1 mg/ml GRS and subjected to *in vitro* wound-healing assay. Media containing 10 ng/ml VEGF was added to the wells and incubated for an additional 24 h.

(2) AQP1 発現減少と ERK リン酸化の関係

VEGF 存在下においても, AQP1 を欠損した細胞では遊走能が抑制されたことから, AQP1 の発現減少が VEGF シグナル, すなわち ERK のリン酸化に影響するかを検討した. HUVEC 細胞に AQP1 siRNA を導入し, AQP1 の発現を抑制した後, VEGF で刺激し, 30 分後の ERK のリン酸化レベルを western blotting 法にて調べた. その結果, ERK のリン酸化は AQP1 欠損によって阻害された (Fig. 12). このことより, AQP1 発現減少が ERK のリン酸化に影響する可能性が示唆された.

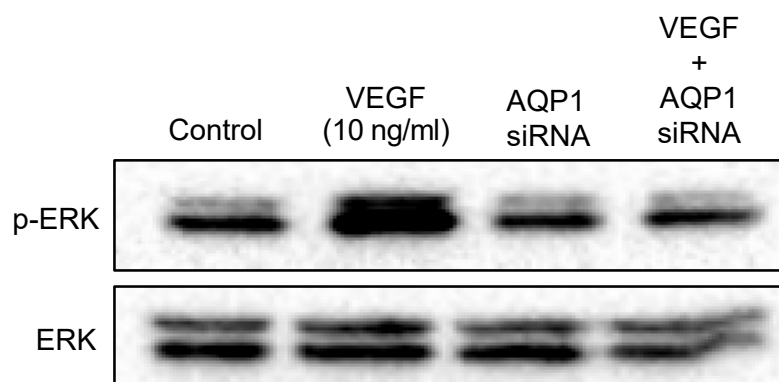


Fig. 12. AQP KD cell suppressed ERK phosphorylation.

HUVEC cells were transfected with 20 nM small interfering RNAs against AQP1 and incubated for 24 h. Subsequently, cells were treated 10 ng/ml VEGF for 30 min.

(3) ERK のリン酸化に対する五苓散の作用

次に、五苓散そのものに ERK の阻害作用があるのか否かを検討した。HUVEC 細胞に VEGF と各濃度の五苓散エキスを 30 分間処理し、western blotting 法にて ERK のリン酸化レベルを調べた。その結果、MEK-ERK 阻害薬である U0126 (40 μ M) と同様に、五苓散は VEGF によって生じた ERK のリン酸化を著明に抑制した (Fig. 13)。

ここまでの結果を考え合わせると、五苓散は、AQP1 の発現減少および ERK のリン酸化阻害を介して血管内皮細胞の遊走を抑制したことが明らかになった。

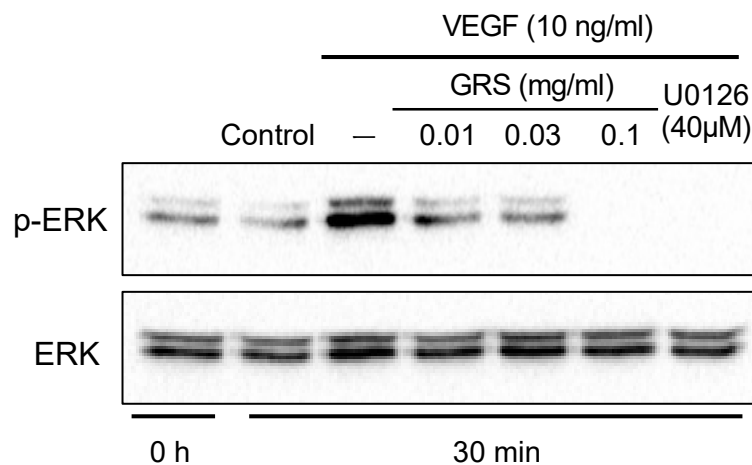


Fig. 13. GRS suppressed ERK phosphorylation of HUVECs.

HUVEC cells were treated 10 ng/ml VEGF with or without 0.1 mg/ml *Goreisan* and U0126 for 30 min. The ERK phosphorylation was measured by western blotting analysis.

(4) ERK のリン酸化と遊走に対する五苓散の構成生薬の作用

五苓散を構成する生薬（沢瀉，蒼朮，猪苓，茯苓および桂皮）の ERK リン酸化に対する作用を調べるために，HUVEC 細胞に五苓散 0.1 mg/ml 相当量の生薬エキスを処理し，western blotting 法にてリン酸化 ERK を検出した．その結果，五苓散と同様に桂皮エキスによって ERK のリン酸化が著明に抑制された (Fig. 14A)．また，同条件下で遊走能 (Fig. 14B) と増殖能 (Fig. 14C) を測定したが，遊走能に対しては，すべての生薬が抑制作用を示したが，増殖能に対しては，猪苓と桂皮のみが抑制作用を示した．これらの実験から，ERK のリン酸化レベル，遊走能，そして増殖能に対して桂皮だけが五苓散と同様の作用を示したことから，少なくとも桂皮による ERK のリン酸化抑制が五苓散の血管内皮細胞の遊走抑制作用に一部寄与することが示唆された．

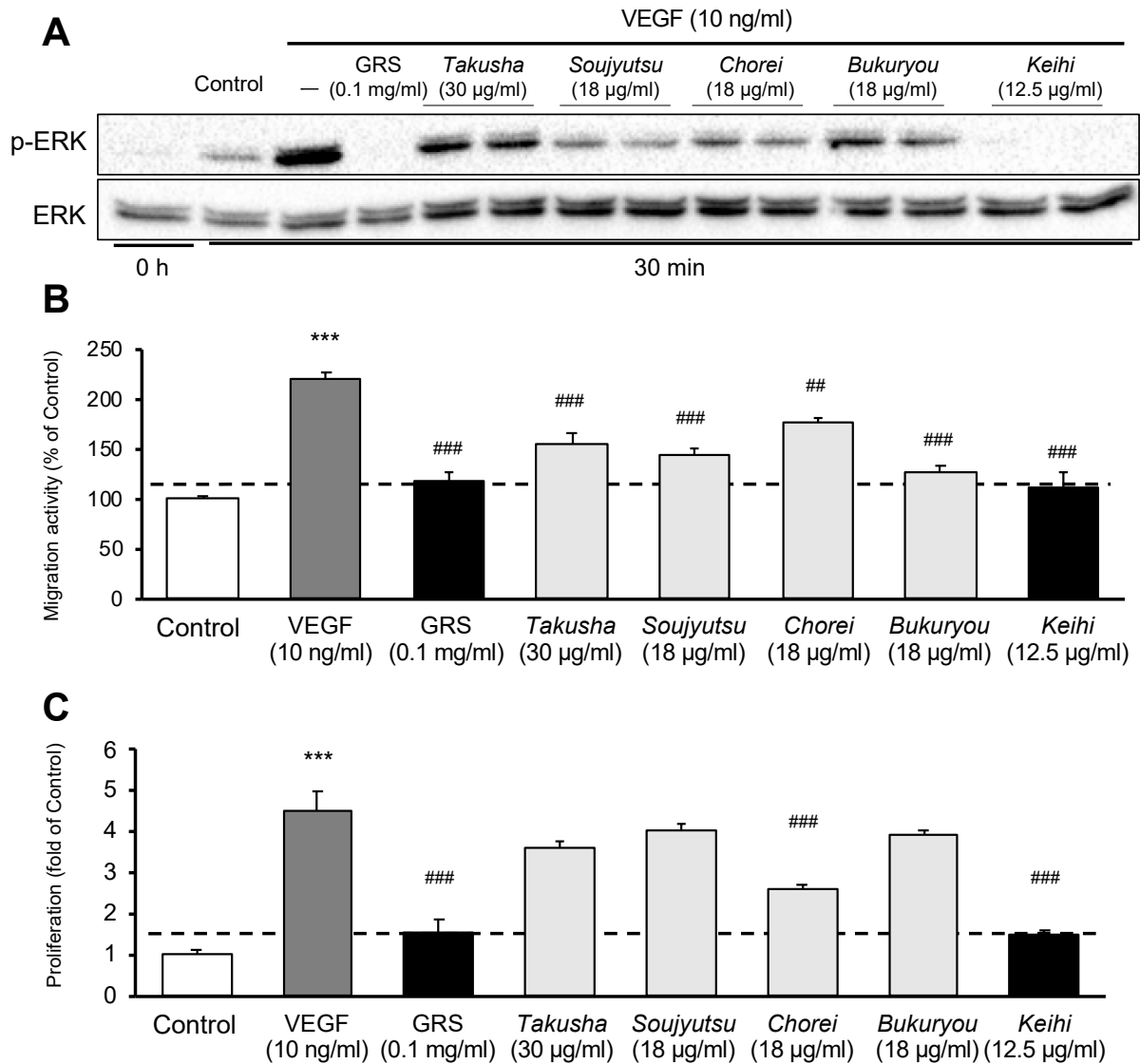


Fig. 14. Keihi inhibited VEGF-induced ERK phosphorylation, migration and proliferation.

A: HUVEC cells were serum-starved for 24 h, and then treated 10 ng/ml VEGF with or without 0.1 mg/ml Goreisan or herbal extracts for 24h. The ERK phosphorylation was measured by western blotting analysis. B: After scratch, media containing 10 ng/ml VEGF with or without Goreisan or Herbal extracts were added to the wells and incubated for an additional 24 h. C: HUVEC cells were serum-starved for 24 h with or without Goreisan or herbal extracts and subjected to proliferation assay. Media containing 10 ng/ml VEGF with or without Goreisan or herbal extracts were added to the wells and incubated for an additional 24 h. Each data represent the mean \pm S.E. (n=3) ***,###, ### : $p < 0.01, 0.001$ vs. control.

第4項 五苓散の血管新生阻害作用 (*in vivo*)

In vivo において血管新生に対する五苓散の作用を検討すべく、VEGFを含んだマトリゲルをマウスの背部に皮下注射し、7日後のゲル内に新生された血管を観察した。VEGFを含んだゲルでは、血管内皮細胞の浸潤および血管管腔の形成が見られ、それらの細胞は全て AQP1 陽性であることが明らかになった (Fig. 15)。一方、五苓散を経口投与した群では、それらの構造は確認できず、五苓散は血管新生を阻害することが示された。

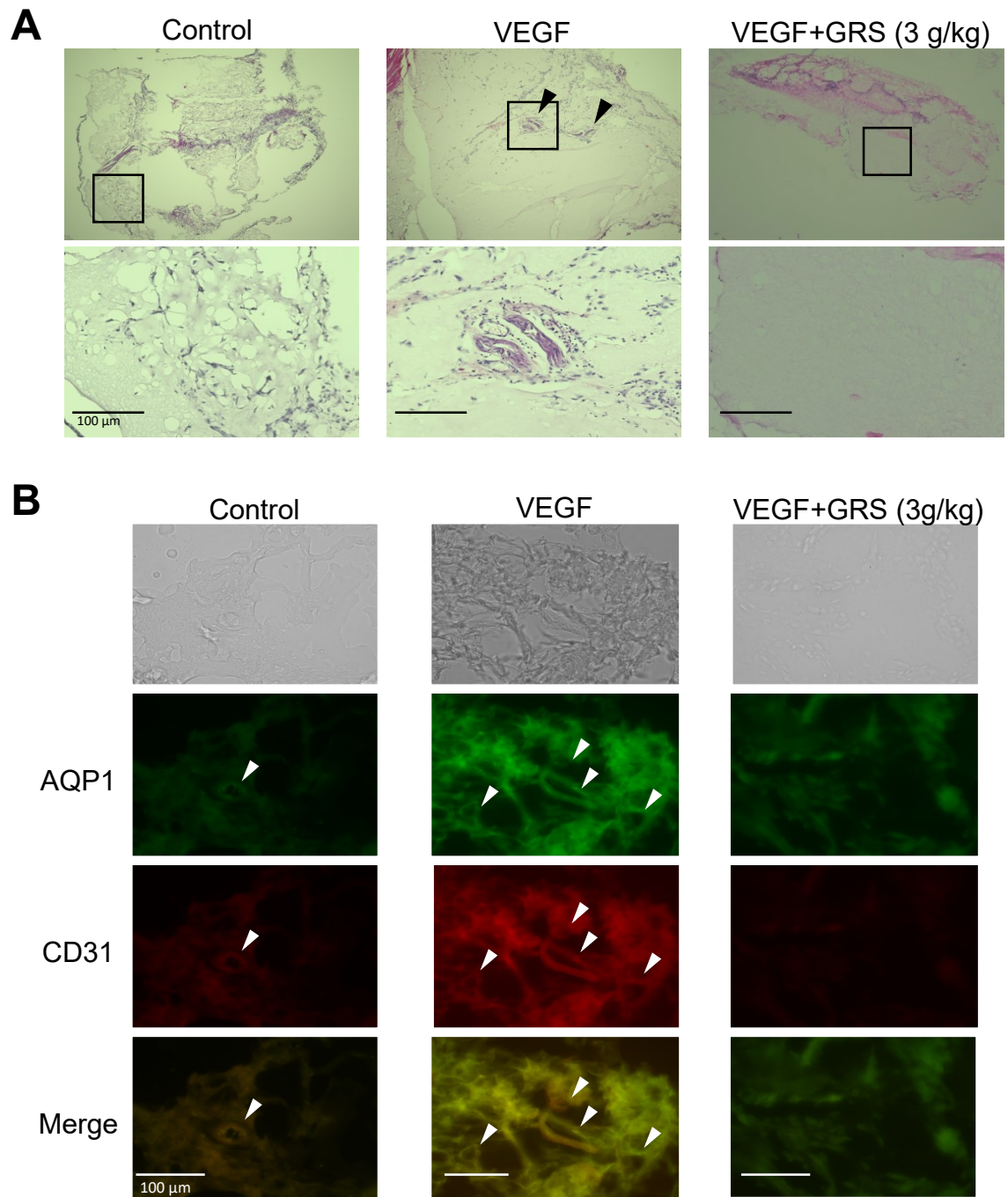


Fig. 15. GRS inhibited angiogenesis *in vivo*.

Matrigel containing VEGF (10 ng/ml) was injected subcutaneously into the abdomen of C57BL mice. After oral administration of GRS for 7 days, tissues were collected and frozen sections were prepared. Histological evaluation was performed by H&E staining or immunofluorescence staining (AQP1, CD31).

第4節 考察

第1項 血管内皮細胞の遊走および増殖に対する五苓散の作用

第1項では、五苓散による慢性硬膜下血腫の再発予防効果の一部に、血管新生阻害作用が関わっているのではないかと仮説のもと、血管新生の重要な初期反応である血管内皮細胞の遊走および増殖に対する五苓散の作用を調べた。第一に、五苓散は、最も代表的な血管新生促進因子である VEGF 処理で認められた細胞遊走を濃度依存的に抑制した (Fig. 3)。第二に、五苓散は VEGF 依存的な増殖も著明に抑制した (Fig. 4)。

血管新生は、主に、①血管内皮細胞から産生されたプロテアーゼによる基底膜の分解、②血管内皮細胞の遊走、③血管内皮細胞の増殖、④内皮細胞の管腔形成、⑤基底膜の形成と周辺細胞による取り囲みが連続して起こることによって成立する。この中でも中心的なステップである、血管内皮細胞の遊走と増殖の両方を抑制することは非常に重要である。

また、VEGF によって活性化される分子である ERK の阻害薬 (U0126) との比較実験では、ERK 阻害薬と同様に五苓散は VEGF による細胞遊走を抑制した (Fig. 7A)。これより、五苓散の遊走抑制作用には、下流シグナル分子である ERK 阻害が関与することが示唆された。

一方、五苓散の遊走抑制作用は VEGF の濃度を変えて行った実験において、その濃度ごとの抑制率には乖離があった (Fig. 3B)。このことから、五苓散は、VEGF による刺激に対し、非競合的に阻害作用を示すことがわかり、VEGF シグナル以外の作用点が存在することが示唆された。これに加えて、五苓散は、TGF- β で誘導した遊走、および無刺激下での基礎遊走のどちらも抑制した (Fig. 5)。

TGF- β は、細胞膜上に存在する受容体に結合し、細胞内情報伝達分子である Smad をリン酸化する。この Smad は、複合体を形成することで、細胞質から核に移行する。そして核内で Smad 複合体は、標的遺伝子の転写調節領域に存在する SBE (Smad binding element) に結合し、標的遺伝子の発現を制御することで血管内皮細胞の遊走や増殖を促進する⁵⁷⁻⁵⁹。そのため、VEGF のような成長因子由来の刺激による受容体下流での MAPK や p38 を介したシグナル伝達機構とは一致する部分は全くないと考えられた。また、基礎遊走能に対して ERK の阻害薬

は影響を与えないことから、五苓散には、VEGF シグナルとは別の遊走抑制メカニズムが存在することが垣間見えた。

すなわち、第 1 項から五苓散は、血管内皮細胞に直接作用し、刺激応答性と細胞の基礎的性質の両方に影響することで、内皮細胞の遊走・増殖を著しく抑制することが考えられた。

第2項 AQP1 の発現に対する五苓散の作用

第2項では、五苓散の遊走抑制メカニズムの解明に迫った。一般的に、細胞は遊走する際に、一連のタンパク質群 (Rac1GEF, Rac1, Arp2/3) の活性化を介したアクチン骨格の再構成を行い、移動方向に対して葉状仮足を形成するための形態変化を行う^{48,49}。近年では、この機構に血管内皮細胞に発現する水チャネル AQP1 の関与が報告されている。AQP1 は、遊走先端部に局在することで、水の流入を介して細胞容積を膨張させ、葉状仮足の効率的な形成に寄与している。また、AQP1 を過剰発現した細胞の遊走が一定の方向性をもって遊走することが知られている³⁵。これらの報告より、五苓散が AQP1 発現を調節するの可否かを調べた。

まずは、AQP1 の発現に対する五苓散の作用を調べると、五苓散は、AQP1 タンパク質の発現を VEGF の有無にかかわらず減少させた (Fig. 8A,B)。さらに無刺激時の AQP1 mRNA にも五苓散は濃度依存的な抑制作用を示した (Fig. 8C,D)。次に、五苓散を構成するどの生薬（沢瀉、蒼朮、猪苓、茯苓、桂皮）が基礎遊走抑制作用を担っているのかを調べた。まず、AQP1 発現に対する作用を調べたところ、ほぼすべての生薬が AQP1 の発現を減少させた (Fig. 10A)。また、基礎遊走の作用について調べると、猪苓と桂皮のみが遊走抑制作用を示した (Fig. 10B)。これらの実験から、AQP1 の発現減少と遊走能に対して猪苓と桂皮だけが五苓散と同様の作用を示すことが明らかになり、この二つの生薬による AQP1 発現減少が五苓散の血管内皮細胞の基礎遊走抑制作用に一部寄与することが示唆された。

また、AQP1 の発現減少機構について追及すると、五苓散は mRNA の安定性には全く影響せず (Fig. 9A)、AQP1 のプロモーター活性を著明に抑制した (Fig. 9B)。これらの結果から、五苓散は AQP1 遺伝子の転写を抑制することでその発現を低下させることが明らかとなった。

複数の研究報告より、血管内皮細胞での AQP1 発現に寄与する転写因子の存在も明らかになってきている。発生期における血管の形成に関与するとされていた転写因子である MEF-2c (myocyte enhancer factor 2c) は、それらの欠損によって AQP1 のプロモーター活性が有意に低下することが証明されているほか、血管内皮細胞の遊走が劇的に抑制されることが示されている^{52,53}。このことから、五苓散は MEF-2c などの特定の転写因子に作用する可能性も考えられた。それを解明するためには、AQP1 プロモーターの欠損変異体を作成し、五苓散の作用に重要な領域を同定する必要があると考えている。

我々の研究結果において、AQP1 の発現減少の程度が、タンパク質と mRNA レベルにおいて少しの乖離があることが取り沙汰された。これは、単なる実験間の誤差の可能性もあるが、mRNA と比較して、タンパク質発現の方が顕著に減少していることから、何らかのタンパク質分解機構を介していることも考えられる。

また、近年では AQP1 とがんが密接な関係にあるという報告が数多く存在している^{55,56}。それは、AQP1 が腫瘍血管新生を促進する因子であることを示唆しているが、未だ世の中には AQP1 を標的とした抗がん剤もなければ血管新生阻害薬も存在しない。この研究を通して、AQP1 を阻害することが血管新生阻害につながることを植え付けると同時に、新たな研究シーズとして取り上げられることを願っている。

第3項 AQP1 発現減少による遊走および ERK リン酸化に対する作用

第3項では、前項までで明らかにしてきた、五苓散による AQP1 発現減少作用が、遊走抑制作用に寄与するの否かを検討した。AQP1 をノックダウンした細胞で五苓散の作用を調べると、AQP1 欠損細胞では、ベースの遊走が低下したが、五苓散によるそれ以上の遊走抑制作用は見られなかった (Fig. 11A)。さらに、VEGF 存在下においても AQP1 欠損によって遊走が抑制されることが明らかになった (Fig. 11B)。また、この条件においても、五苓散によるそれ以上の遊走抑制作用は見られなかった。これらの結果より、五苓散による血管内皮細胞の遊走抑制作用は AQP1 発現減少を介していることが明らかになった。

第1項において、五苓散による VEGF シグナル阻害作用が示唆されていたため、AQP1 の発現減少が VEGF シグナルに影響するの否かを調べた。AQP1 欠損細胞では、VEGF によって誘導された ERK のリン酸化が阻害されることがわかった (Fig. 12)。さらに、五苓散の ERK に対する作用も併せて検討したところ、五苓散は、ERK 阻害薬の U0126 と同様にこのリン酸化を著明に抑制した (Fig. 13)。したがって、五苓散による AQP1 発現減少作用が ERK 阻害にも関与し、遊走能を低下させることが示された。

本研究において、五苓散は、ヒト肺胞上皮細胞株である A549 細胞での ERK リン酸化および本細胞の遊走には全く影響しなかった (データ示さず)。また、ヒトケラチノサイト細胞株である DJM-1 細胞においても同様に五苓散が作用しないという結果を得ている (データ示さず)。これらの結果は、五苓散の ERK 抑制作用が VEGF シグナル選択的もしくは血管内皮細胞選択的であることを支持している。VEGF 受容体は、EGF 受容体や IGF 受容体と同様に受容体型チロシンキナーゼ (RTKs) に分類され、自己リン酸化を経て細胞内にシグナルを伝達する⁵⁶⁻⁵⁸。一般的な RTKs は、その下流で Ras→Raf→MEK→ERK というように下流へシグナルを伝達するが、VEGF 受容体は、この経路を介さず、ホスホリパーゼ γ (PLC γ)-PKC の活性化による ERK のリン酸化という特殊なシグナル系を利用している⁵⁹。五苓散の作用が血管内皮細胞以外では認められなかったことを合わせて考えると、五苓散の作用点として VEGF 受容体-PLC γ -PKC シグナルの中に標的分子が存在すると考えられる。これ以外にも、血管内皮細胞に特異的に発現するアダプター分子の存在なども報告されており^{60,61}、五苓散の作用点を完全に解明するためには、こうした分子の機能に対する作用を評価する必要がある。

ERK と AQP の関係性については、明らかになってはいないが、当研究室では、AQP5 の過剰発現させた細胞での ERK のリン酸化が亢進することを確認している。今回の結果も合わせると、ERK の上流に AQPs が位置していることが考えられるが、それらを結ぶシグナル機構は、議論の余地がある。

次に、五苓散を構成するどの生薬（沢瀉、蒼朮、猪苓、茯苓および桂皮）が VEGF 誘導性の遊走抑制作用を担っているのかを調べた。まず、ERK のリン酸化に対する作用を調べたところ、桂皮が五苓散と同様に ERK のリン酸化を著明に抑制した。また、遊走能に対しては、すべての生薬が抑制作用を示したが、増殖能に対しては、五苓散と同様の作用を示したのは猪苓と桂皮だけであった。すなわち、ERK のリン酸化レベル、遊走能、そして増殖能に対して五苓散とすべて同様な作用を示したのは桂皮のみであり、桂皮による ERK のリン酸化阻害が、五苓散の血管内皮細胞の遊走抑制作用に一部寄与することが示唆された。桂皮の主成分である桂アルデヒドが腫瘍血管新生に一定の効果を示すことは既に報告されている⁶²。その中で、血管内皮細胞の遊走を抑制することはもちろん、がんモデルマウスに桂アルデヒドを投与することで、VEGF 自体の発現が減少し、その結果血管新生が抑制されることが示唆されている。その一方で、桂アルデヒドが血管内皮細胞の遊走を促進させる報告や、その他の構成成分である桂皮酸が内皮細胞の遊走を抑制するという研究報告が存在している。

これらの知見と今回見出した結果と考え合わせると、五苓散、少なくとも桂皮が内皮細胞内において ERK リン酸化に至る VEGF 受容体以降のシグナル分子の機能を制御することで血管新生に対して作用する可能性は大いに考えられる。しかしながら、その成分に関しては、今後の詳細な検討が必要であろう。

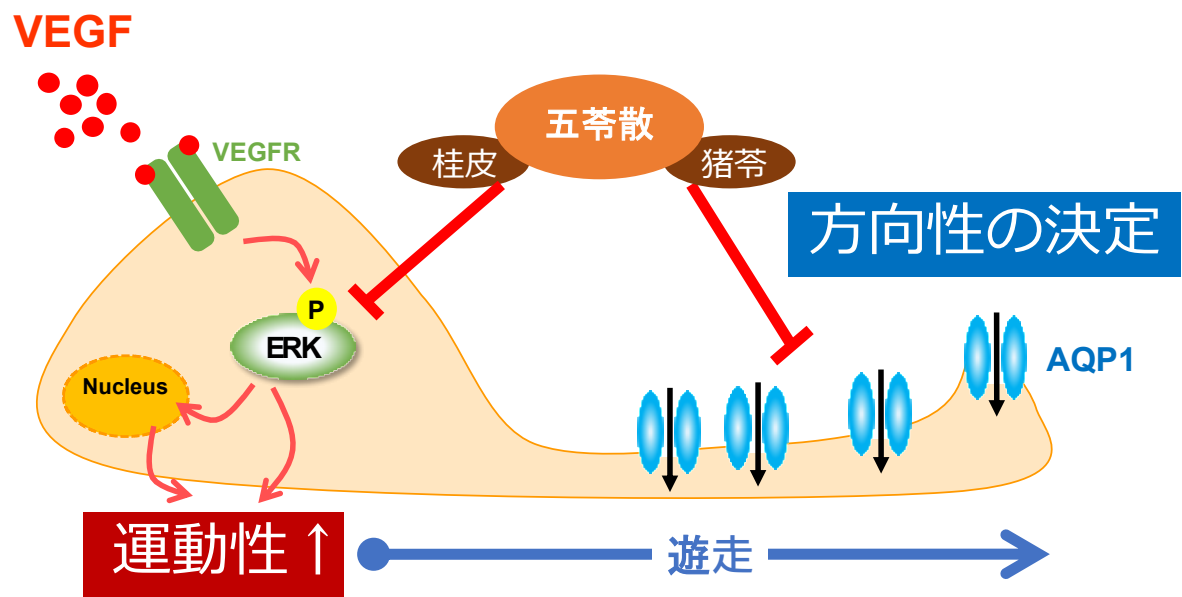


Fig. 16 The scheme showing the mechanism of migration inhibition in vascular endothelial cells by GRS

第4項 五苓散の血管新生阻害作用 (*in vivo*)

第4項では、実際の生体内での血管新生に対して五苓散が作用を示すのかを明らかにした。VEGF を含んだマトリゲルをマウスの背部に皮下注射し、そこで起きる血管新生反応に対する評価をした。VEGF を含んだゲルでは、AQP1 陽性の内皮細胞の浸潤と、血管管腔の形成が観察されたが、五苓散を経口投与した群では、それらの現象は観察されなかった。このことから、五苓散は、実際に生体に投与することでも血管新生阻害作用を示すことが証明された。

実際の慢性硬膜下血腫患者の病変部位において、VEGF の発現が過剰になっていることから⁶⁴、VEGF が増悪化の最大の要因であると言っても過言ではない。そしてこの VEGF による作用を阻害する点で、五苓散の臨床での効果は理にかなっていると言えるであろう。

さらに、VEGF による血管新生の亢進が増悪化の要因となっている疾患は数多く存在し、例としては、がん、関節リウマチ⁶⁵、加齢黄斑変性症などがある。そんな中、抗 VEGF 抗体や、VEGF や TGF- β の下流シグナル分子を標的とした分子標的薬が、それらの疾患に治療に用いられ、一定の効果を示すことも分かってきている。もし、この五苓散が VEGF シグナルに対して発揮しているのであれば、慢性硬膜下血腫だけでなく、ほかの疾患に対して、五苓散を治療戦略として加えることができるかもしれない。

現在上市されている血管新生阻害薬は、成長因子の下流シグナルを標的とするため重篤な副作用を併せ持つことは言うまでもない。一方、五苓散は、ERK 阻害に加えて、AQP1 という全く別の分子をターゲットにすることで、それぞれの作用は弱くとも、強力な血管新生阻害作用を示す可能性は高い。それは、既存薬で認められる重篤な副作用が五苓散には生じ得ないことを支持するものであり、実際に五苓散の投与で成長因子阻害に基づくと考えられる有害事象が報告されていないこともよく符合する。さらには、既存の血管新生阻害薬と五苓散の作用機序が異なることは、両薬物を併用できる可能性を示唆しており、有害作用の強い血管新生阻害薬の減量を可能にしつつ、効果を維持することも期待できる。

第3章 五苓散による下痢改善作用

第1節 実験材料および実験方法

第1項 試薬

主に使用した試薬は、第2章に準ずる.

A spray-dried extract preparation of GRS (TJ-17, lot No. 2180017010) was kindly supplied by Tsumura & Co. (Tokyo, Japan). GRS doses for same-day use were prepared as follows: a mixture of *Alismatis rhizoma* (4 g, rhizomes of *Alisma orientale* Juzep), *Atractylodis lanceae Rhizoma* (3 g, rhizomes of *Atractylodes lancea* DC.), *Polyporus* (3 g, Sclerotium of *Polyporus umbellatus* Fries), *Poria* (3 g, Sclerotium of *Poria cocos* Wolf), and *Cinnamomi Cortex* (1.5 g, cortex of *Cinnamomum cassia* Blume) was added to water and extracted at 100 °C for 1 h. The extracted solution was filtered and spray-dried to obtain dry extract powder (fig. 1).

第2項 抗体

本研究に際し、使用した抗体を以下に示す.

Mouse monoclonal anti- β -actin, rabbit polyclonal anti-AQP3 antibody (以上, Sigma), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Wako), rabbit polyclonal anti-phospho-p44/p42 MAPK (ERK1/2), rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (ERK1/2) (以上, Cell signaling technology, MA, USA)

第3項 Oligonucleotides

Oligonucleotide は、Sigma genosys 社に合成依頼した。本研究に際し、使用したprimer配列を以下に示す。

Table 3 Primer sequences for RT-PCR

Target gene	Primer Sequence, 5'-3'	
	Forward	Reverse
human AQP3	TGCCTGGGGACCCTCATC	GATCATATCCAAGTGTCC
mouse AQP3	AACCCTGCCCCGTGACTTTGGA	CGAAGACACCAGCGATGGAACC
mouse TNF- α	TTCCAGAACTCCAGGCGGTGC	TGAGTGTGAGGGTCTGGGCCAT
mouse IL-1 β	GTGGCTGTGGAGAAGCTGTGGC	TGGGTCCGACAGCACGAGGC
mouse IL-6-	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
mouse IL-8	CATGACTTCCAAGCTGGCCG	TTTATGAATTCTCAGCCCTC
mouse IL-10	GGGTGCCAAGCCTTATCG	TCTCACCCAGGGAATTCAAATG
mouse COX-2	CAGGGCCCTTCCTCCCGTAG	GCCTTGGGGGTCAGGGATGA
mouse HO-1	GGGTGACAGAAGAGGCTAAG	GTGTCTGGGATGACCTAGTG
GAPDH	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTG

第4項 五苓散エキスの調製

第2章に準ずる.

第5項 細胞株の培養

培養に用いた器具類は全て、オートクレーブによる滅菌処理を施し、溶液類の調製には超純水製造装置 (Direct-Q UV 5, Millipore) により精製した超純水を用いた. また、全ての操作は、クリーンベンチ内で無菌的に行った.

1. 細胞株の培養

Caco-2細胞

ヒト結腸直腸腺癌細胞 Caco-2 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクより入手した. 1.0×10^6 cells/ml となるように、10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin を含む DMEM に懸濁し、培養皿またはフラスコに播種 (2.0×10^4 cells/cm²) 後、5% CO₂, 37°C 下で静置培養した.

2. 試薬処理

1) 五苓散

各細胞をサブコンフルエントまで培養後、細胞を無血清培地にて2回洗浄した. その後、各濃度の五苓散エキス (溶媒: 0.1% DMSO) を含む無血清培地にて、5% CO₂, 37°C 下で静置培養した.

2) TNF- α および U0126

各細胞をサブコンフルエントまで培養後、細胞を無血清培地にて2回洗浄し、無血清培地に置換することで無血清状態にした. 12時間の無血清状態後、各濃度の TNF- α および U0126 (溶媒: 0.1% 滅菌超純水) を含む無血清培地にて、5% CO₂, 37°C 下で静置培養した.

第 6 項 動物

雄性 ICR マウス (6 週齢) は, SLC (Shizuoka, Japan)より購入した. AQP3^{-/-}マウスは, 標的遺伝子の欠損によって作製し, 7-10 週齢まで育成してから実験に使用した. また, これらの実験は, これらの実験は, 東京理科大学の動物実験委員会および慶應義塾大学の動物実験委員会 (承認番号: 16075) の検討を経て, 各大学学長により承認された.

第 7 項 下痢スコアの評価

LPS (10 mg/kg) を腹腔内に投与した後, 90 分をエンドポイントとして 15 分ごとに評価した. 下痢スコアは, Williams らの文献を参考にし⁶⁶, 固形便を 1, 軟便を 2, 水様便を 3 とした.

第 8 項 Western blotting

第 2 章に準ずる.

第9項 Quantitative RT-PCR

第 2 章に準ずる.

第 10 項 組織染色

腸管組織は 5 μ m 厚の paraffin 切片に薄切し, Hematoxylin and eosin (H&E) 染色および免疫染色の方法は第 2 章に準じて行った.

第 11 項 統計処理

第 2 章に準ずる.

第2節 本章の目的

慢性硬膜下血腫に効果を一定の効果を示す五苓散は、特に小児の感染性胃腸炎に伴う下痢を鎮めるのに著効を示すとの臨床報告も散見される。しかしながら、五苓散の消化器症状に対する作用を解明しようとした基礎研究は行われておらず、その作用機序も不明なままである。

感染性胃腸炎は、食品や水を介して細菌やウイルスに感染し、腹痛、悪心・嘔吐および下痢などの症状を伴う疾患である。日本でも高い罹患率を示しており、世界に目を向けると、年間、約 180 万人もの小児が感染性胃腸炎によって命を落としている³⁶⁻⁴⁰。本疾患の治療には、下痢や嘔吐に伴う脱水を防止することに主眼が置かれ、重症な場合には点滴による補水が行われるのが一般的であり、明確な治療薬は存在しない。

一般に、腸管粘膜に感染を生じると炎症反応を惹起して、これが腸管粘膜のバリア機能の破綻^{41,42}と腸管内の水分の分泌・吸収のバランスを崩壊させることで下痢などの症状が生じる。中でも、我々が注目した分子が水チャネル AQP3 である。AQP3 は、腸管上皮細胞すなわち腸管の管腔側に発現しており、腸管での水分の吸収に重要な役割を担っていると言われて⁴³⁻⁴⁵。また、実験的腸炎マウスや、ロタウイルス誘発性の感染性胃腸炎モデルマウスにおいて AQP3 の発現が低下することも報告されていることから⁴⁷、AQP3 の発現減少が下痢症状の増悪化に関係していることが示唆されている。

そこで、本章では、感染性胃腸炎病態を模倣した LPS 誘発性の急性胃腸炎モデルを用いて、下痢症状、炎症病態、組織傷害および AQP3 の発現調節に対する五苓散の作用のプロファイリングを行った。加えて、*in vitro* 実験系において五苓散による AQP3 発現減少抑制作用のメカニズムについても追求した。

第3節 実験成績

第1項 下痢症状に対する五苓散の作用

まず、LPS (10 mg/kg) を ICR マウスの腹腔内に投与し、90 分をエンドポイントとする急性胃腸炎モデルを作製した。LPS 投与後から糞便を観察し、15 分ごとに下痢スコアを算出した。なお、下痢スコアの内訳は 1; 固形便, 2; 軟便, 3; 水様便とし⁶⁶、五苓散および各種対象薬は LPS 投与の 30 分前に経口または腹腔内にて投与した。

LPS 単独投与群では、投与 60 分までに急激に下痢スコアが上昇し、その後も 90 分まで高値を保ち続けた。一方、五苓散投与群では、どのタイムポイントにおいても下痢スコアを抑制し、その作用は投与量依存的であった (Fig. 17A, B)。

本モデルは、前述したように LPS による炎症を惹起しているものであるため、炎症に対する薬物であるステロイドのデキサメタゾン (DEX, 1 mg/kg, i.p.) および非ステロイドのインドメタシン (Ind., 10 mg/kg, i.p.) も対照薬として設定した。すると、両薬物は、本モデルにおいて五苓散には劣るものの、下痢改善作用を示し、一定の下痢改善効果があることが示唆された。

さらに、一般的な下痢症状を考えた場合、アセチルコリンによる腸管の蠕動運動の過剰亢進があげられる。そのため、対照薬として抗コリン薬のスコポラミン (Sco., 3 mg/kg, i.p.) を採用した。しかしながら、このスコポラミンは、本モデルにおける下痢症状を改善しなかった (Fig. 17C)。

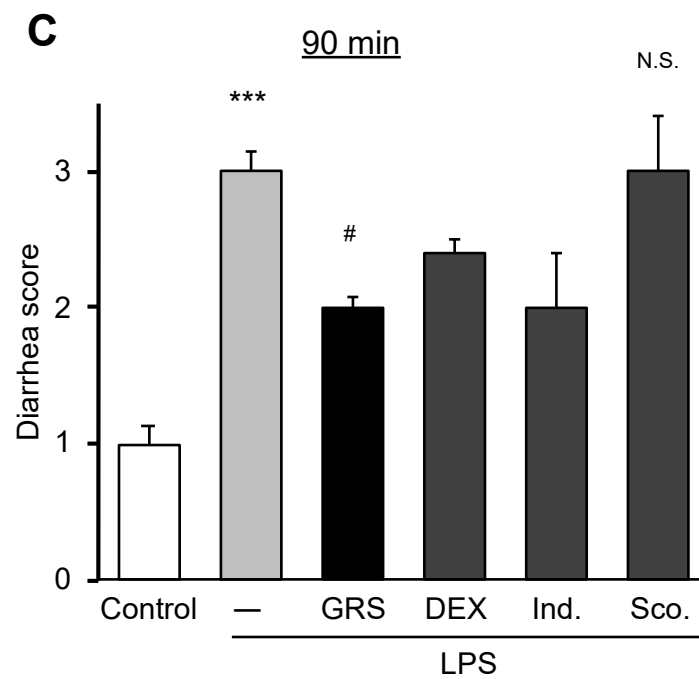
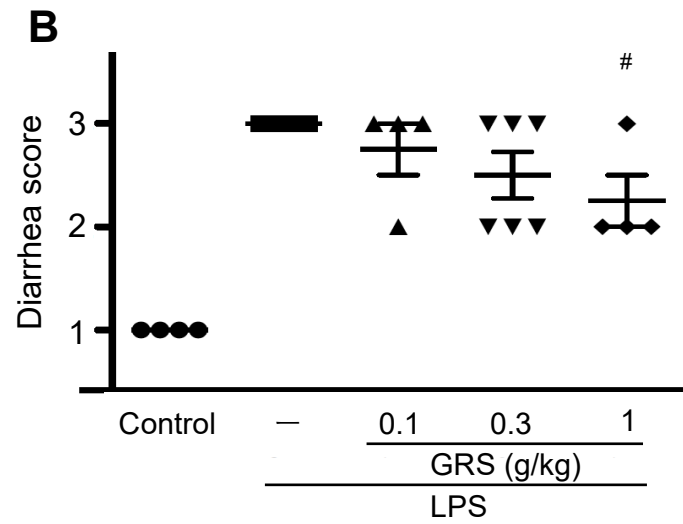
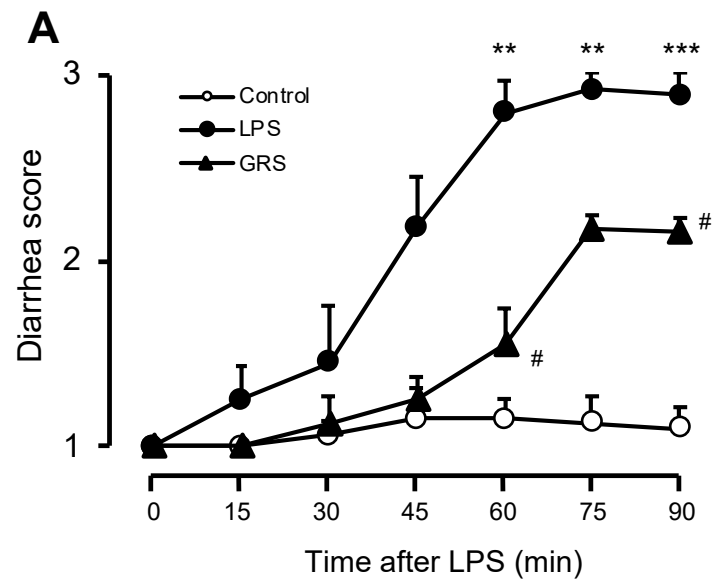


Fig. 17. GRS suppressed LPS-induced diarrhea.

The diarrhea score was measured every 15 minutes after LPS (10mg/kg, i.p.) administration. GRS (0.1-1 g/kg, p.o.) (A,B), DEX (1 mg/kg, i.p.), Ind (10 mg/kg, i.p.) or Sco (3 mg/kg, i.p.) (C) were administered 30 minutes before LPS administration. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). *, **, and ***: $p < 0.05$, 0.01, 0.001 vs. Control. #: $p < 0.05$ vs. LPS

第2項 炎症病態に対する五苓散の作用

次に、LPS で誘発した炎症病態に対して、五苓散は影響するのかを炎症性サイトカインの発現量をもとに評価した。腹腔内に投与された LPS は、腹腔マクロファージに発現する Toll-like receptor 4 (TLR4) が受容し⁶⁷⁻⁶⁹、nuclear factor kappa B (NFκB) などのシグナル分子が活性化した後、TNF- α のような炎症性サイトカインを放出し⁷⁰、上皮細胞を傷害することが知られている。そこでまずは、TNF- α の発現に対する作用を検討した。LPS 投与から 90 分後に回腸を摘出し qPCR 法にてサイトカインレベルを測定した。LPS 投与によって著明に上昇した TNF- α は、予想通り、ステロイド薬である DEX によって有意に抑制された。しかしながら、五苓散はこの発現を抑制することはなかった。また、継続して用いた比較対象である Ind.および Sco.に関しても炎症病態に影響しなかった (Fig.18A)。

さらに、炎症病態に対する作用を見極めるため、五苓散および DEX だけを用いて炎症性サイトカインの小規模スクリーニングを実施した。指標としたものは、IL-1 β , IL-6, IL-8, COX2 および IL-10 であったが、いずれのサイトカインに対しても五苓散が作用するものがなかった (Fig. 18B)。これらの結果より、五苓散は炎症病態には影響しないことが明らかになった。

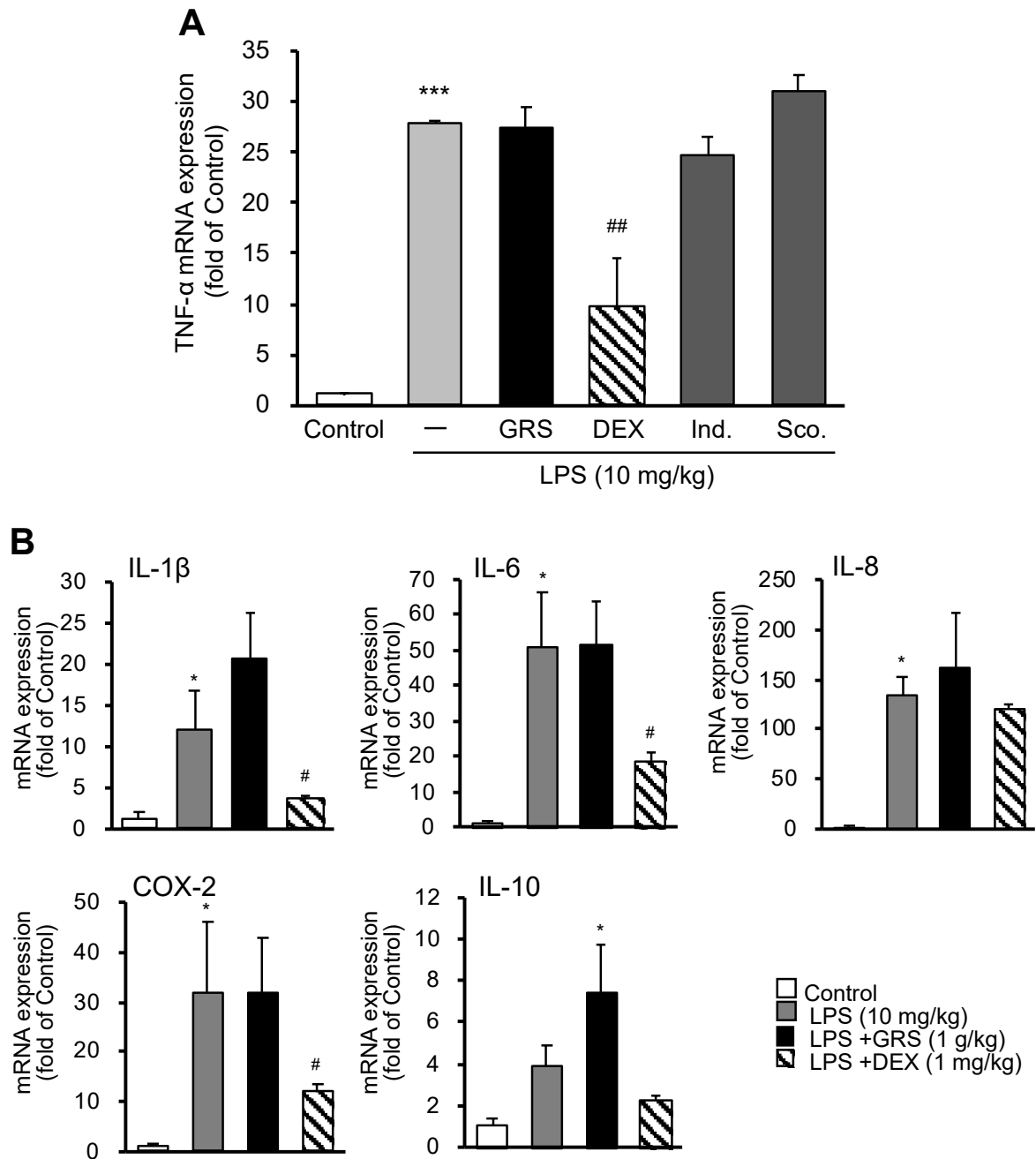


Fig. 18. GRS did not affect cytokine expression.

90 minutes after LPS administration, the expression level of inflammatory cytokines was measured by qPCR. GRS (0.1-1 g/kg, p.o.), DEX (1 mg/kg, i.p.), Ind (10 mg/kg, i.p.) or Sco (3 mg/kg, i.p.) were administered 30 minutes before LPS administration. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). *, **, and ***: $p < 0.05$, 0.01, 0.001 vs. Control. #: $p < 0.05$ vs. LPS

第3項 組織傷害に対する五苓散の作用

炎症病態に伴い腸管上皮細胞が傷害されることは前述した。そこで、腸管傷害に対する五苓散の作用について検討した。LPS 投与から 90 分後に回腸を摘出し、組織切片を作製した後、HE 染色を行った。なお、病理組織は BZ-9000 (KEYENCE) にて観察した。Control 群では一定の長さの、形の整った絨毛が観察されたが、LPS 投与群では、絨毛の長さにばらつきがある上に、絨毛の形が著しく崩れており、腸管が傷害されている様子が観察された。一方で、五苓散および DEX 投与群では、組織傷害が改善されている様子が観察された。また、Ind. に関しては完全なる組織修復作用は見られなかった (Fig. 19)。したがって、五苓散は炎症病態に影響することなく組織傷害を改善したことがわかった。

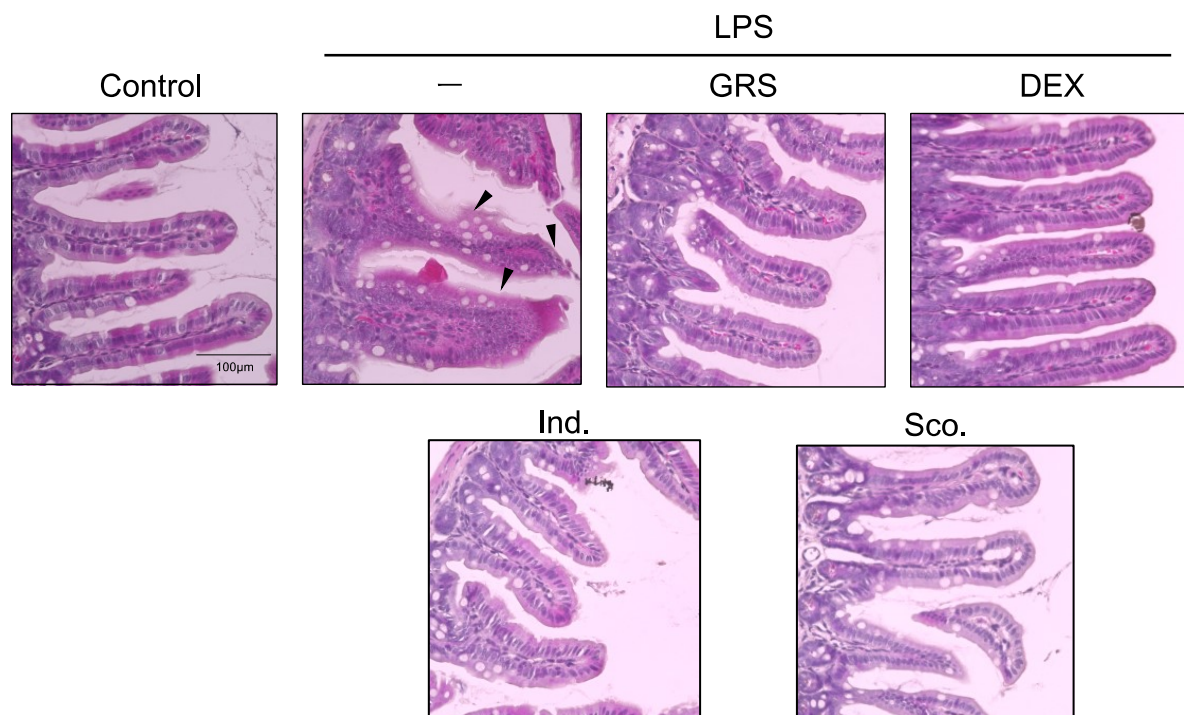


Fig. 19. GRS improved tissue damage.

90 minutes after LPS administration, mucosal tissues were observed by H&E staining. GRS (0.1-1 g/kg, p.o.), DEX (1 mg/kg, i.p.), Ind (10 mg/kg, i.p.) or Sco (3 mg/kg, i.p.) were administered 30 minutes before LPS administration. Arrow heads indicate epithelial cell destruction.

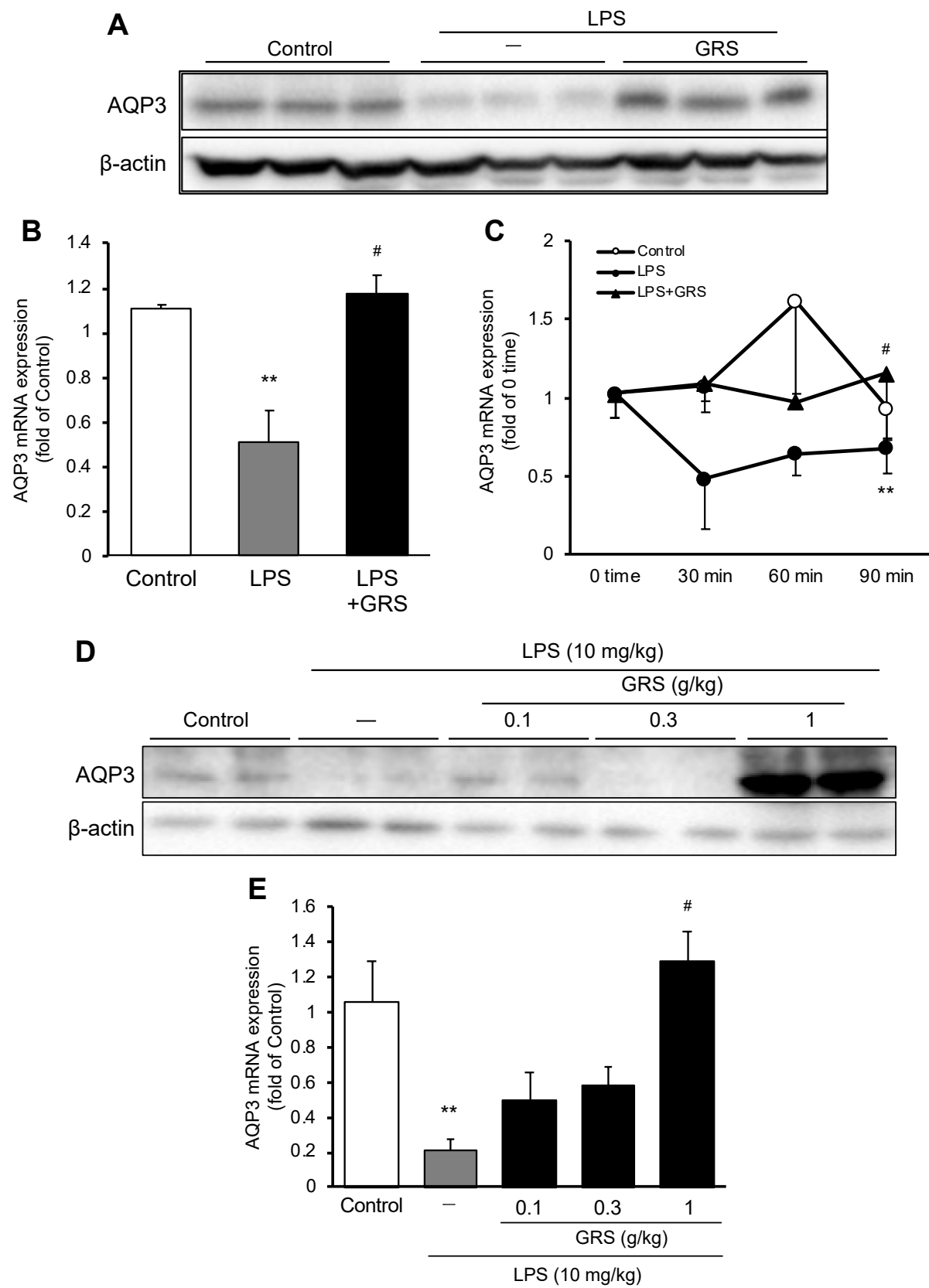
第4項 AQP3 発現に対する五苓散の作用

続いて、腸管内での水の吸収に重要な役割を果たすとされている水チャネル AQP3 の発現に対する五苓散の作用を検討した。LPS 投与から 30, 60, 90 分後に回腸を摘出し、western blotting 法、免疫染色または qPCR 法にてタンパク質および mRNA の発現量を測定した。AQP3 の発現は、LPS 単独投与によって著明に減少したが、五苓散投与群では、その AQP3 発現の減少が抑制され、その作用は投与量依存的であった。また、経時間的な推移を追った試験では、五苓散はどのタイムポイントにおいても発現減少を抑制しており、遺伝子発現を増加させるのではなく、発現を維持する作用があることが示唆された (Fig. 20A-E)。

さらに、AQP3 の発現に対する各種対照薬の作用を同様の方法で検討した。すると、AQP 3 の発現減少は、どの薬物によっても抑制されることはなかった (Fig. 20F, G)。

また、組織票本を用いた免疫染色では、Control 群において、AQP3 の発現が絨毛の周りを覆うように発現していたのに対し、LPS 投与群では上皮細胞の欠落に伴う AQP3 発現の消失が観察された。一方、五苓散投与群においては、絨毛の欠落などは見られず、AQP の発現が上皮細胞上に維持されている染色像が確認できた。そして、DEX 投与群では、上皮細胞の欠落などは見られなかったものの、AQP3 の発現は減少したままであった (Fig. 20H)。

従って、五苓散は、LPS による腸管上皮における AQP3 発現減少を抑制することが明らかになった。また、その作用は抗炎症薬では抑制できず、五苓散に特有のものであった。



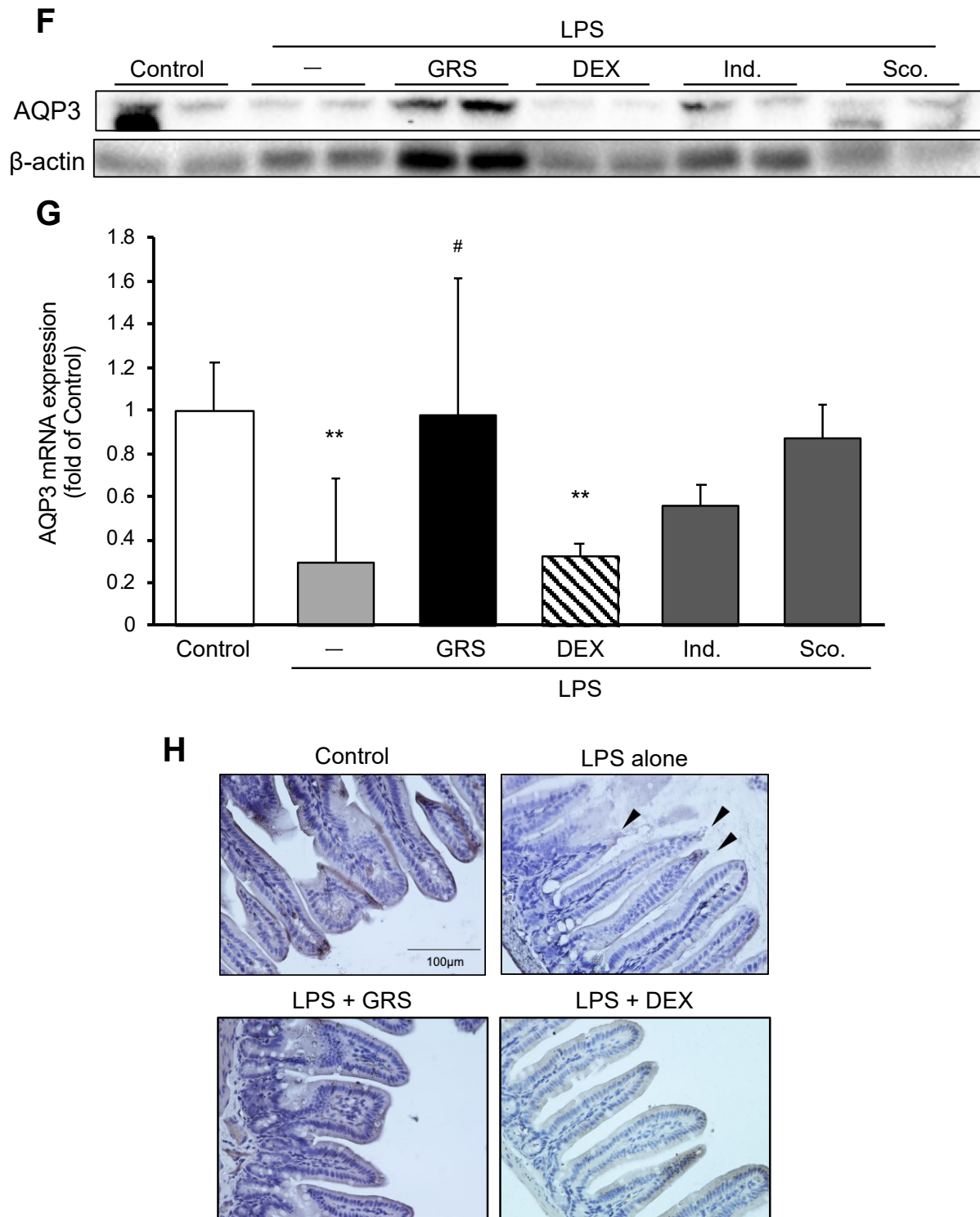


Fig. 20. GRS abrogates LPS-induced decreases in AQP3 expression.

90 minutes after LPS administration, AQP3 protein expression was measured by western blotting (A, D, F), or immunostaining (H). (B, C, E, G) AQP3 mRNA expression was measured by qPCR. Arrow heads indicate epithelial cell destruction. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). **: $p < 0.01$ vs. Control. #: $p < 0.05$ vs. LPS

第 5 項 AQP3 欠損マウスにおける五苓散の作用

五苓散による下痢改善作用と AQP3 発現減少抑制作用の直接的な関係を明らかにするため、AQP3 欠損マウスにて、先ほどまでと同様に LPS 投与実験を行った。慶應義塾大学安井研究室の竹馬真理子先生のご協力のもと AQP3 欠損マウスを準備し、LPS 投与から 15 分ごとに下痢スコアを測定した。その結果、WT において見られた五苓散の止瀉作用が、AQP3 欠損マウスにおいて消失した (fig. 21A,B)。

また、LPS 投与の 90 分後には回腸を摘出し、組織切片を作製した後、HE 染色を行った。なお、病理組織は BZ-9000 (KEYENCE) にて観察した。すると、下痢スコアの結果と同様に、WT で確認された五苓散による組織保護作用が、AQP3 欠損マウスでは消失した (Fig. 21C)。

従って、五苓散による下痢改善作用および組織改善作用は、AQP3 の発現調節を介したものであることが明らかになった。

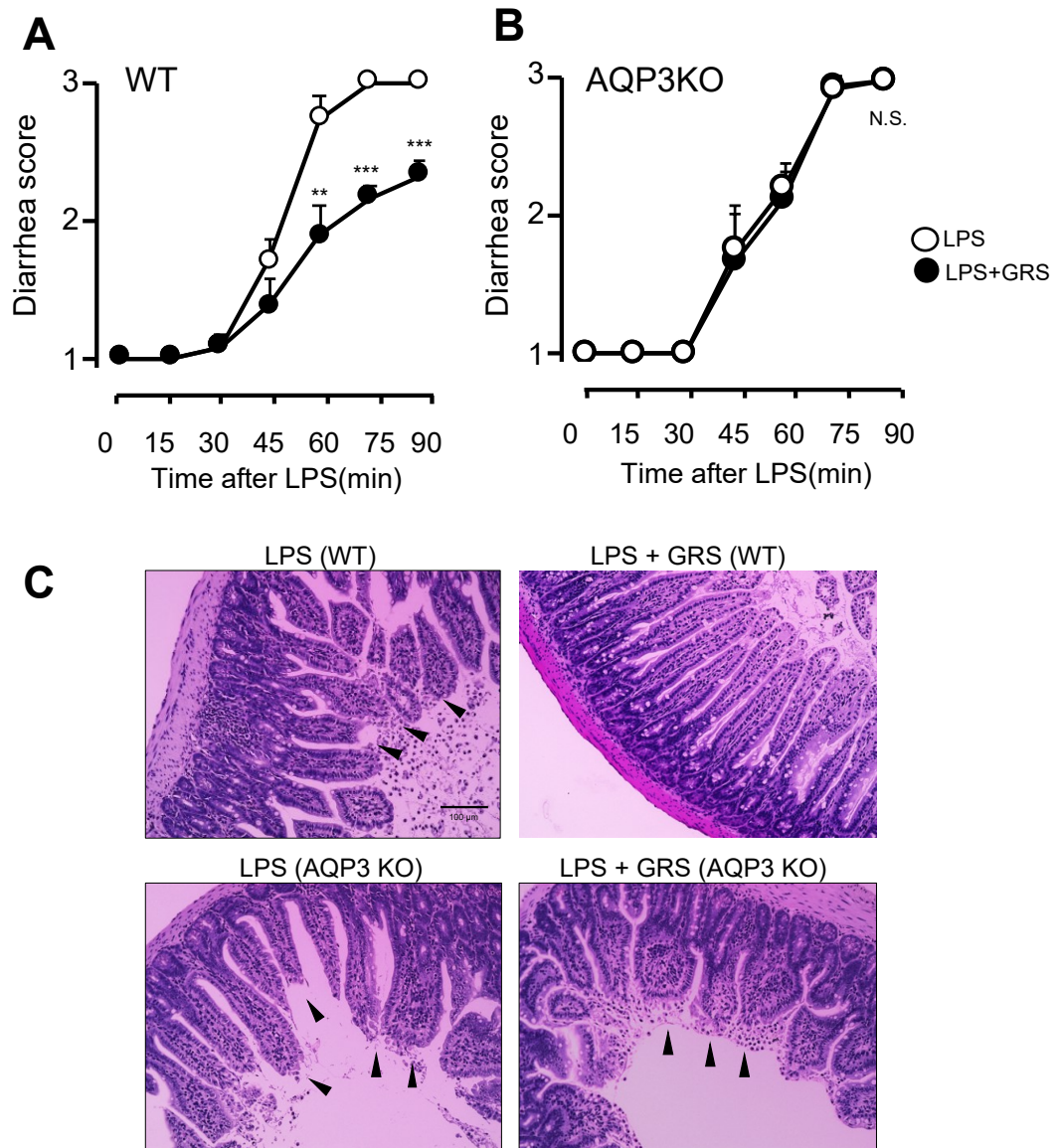


Fig. 21. GRS did not show an antidiarrhea effect in AQP3^{-/-} mice.

LPS was administered to WT (A) or AQP3 KO (B) mice, and diarrhea score and intestinal mucosal pathological evaluation (C) were performed. Arrow heads indicate epithelial cell destruction. Each data represent the mean \pm S.E. (n=9). **, ***: $p < 0.01, 0.001$ vs. Control.

第 6 項 腸管上皮細胞の AQP3 発現に対する五苓散の作用

AQP3 は、腸管上皮細胞に発現しており、実験的腸炎モデルにおいてその発現が減少することが報告されている。また、AQP3 は皮膚組織においても発現しており、皮膚炎モデル動物や、皮膚ケラチノサイト細胞株を TNF- α で刺激した際に、同じくその発現が減少することが報告されている。そこで、腸管上皮細胞においても炎症性サイトカイン刺激によって AQP3 発現が減少するのか、さらにはそれに対する五苓散の作用を検討した。実験標本には、ヒト結腸癌細胞株 Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞の培養液中に 10 ng/ml の TNF- α および 0.01, 0.03, 0.1 mg/ml の五苓散を処理し、24 時間培養して、AQP3 mRNA 量を qPCR 法にて測定した。その結果、TNF- α 刺激によって AQP3 の発現は著明に減少したが、その発現は五苓散の処理濃度依存的に抑制された (Fig. 22A)。

また、TNF- α などの炎症性サイトカインによる遺伝子転写の活性化は、グルココルチコイドによって抑制される⁷¹。そこで、五苓散による AQP3 の発現減少抑制がこの作用に由来するのか、DEX と比較検討を行った。Caco-2 細胞の培養液中に TNF- α および DEX (100 nM) を添加して 24 時間培養し、AQP3 mRNA 量を qPCR 法にて測定した。すると、DEX は、TNF- α 刺激による AQP3 の発現減少を抑制できなかった (Fig. 22B)。

さらに、TNF- α は、TNFR の下流で p38, ERK などの MAP kinase シグナルを介して遺伝子発現を調節する^{72,73}。そこで、五苓散による AQP3 発現減少抑制作用がこれらのシグナル因子を阻害することによるものかを、阻害薬との比較検討および、シグナル因子の活性化に対する作用を調べた。そこでまずは、Caco-2 細胞の培養液中に TNF- α および p38 阻害薬である SB203580 (20 μ M), U0126 (40 μ M) を処理し、24 時間培養して、AQP3 mRNA 量を qPCR 法にて測定した。その結果、SB203580 および U0126 は、TNF- α 刺激による AQP3 の発現減少を抑制した (Fig. 22B)。その後、ERK のリン酸化に対する作用を western blotting 法にて調べたところ、五苓散は、ERK のリン酸化を阻害した (Fig. 22C)。

これらの結果から、五苓散は ERK のリン酸化を阻害することで、AQP3 の発現減少を抑制することが明らかになった。

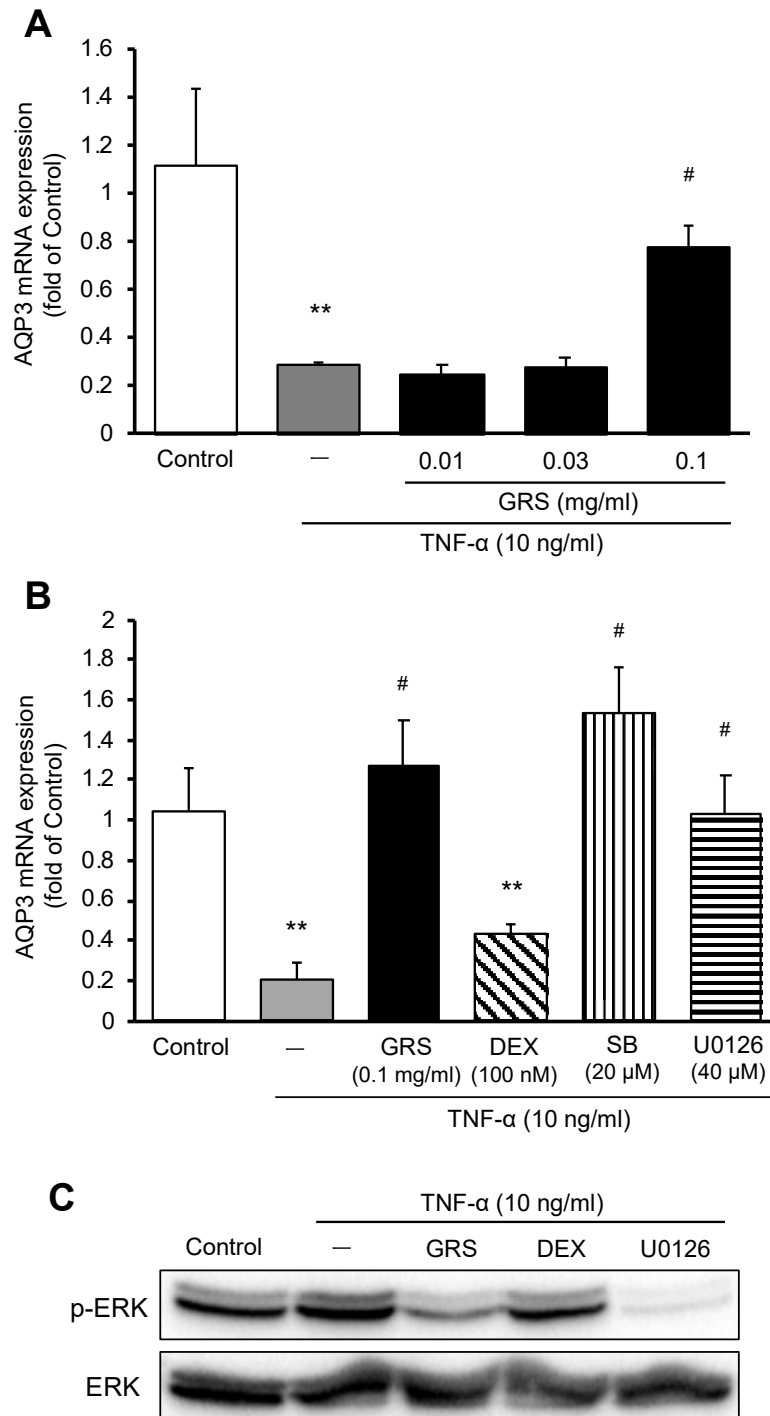


Fig. 22. GRS suppressed the LPS-induced decrease in AQP3 expression via the inhibition of MAPK.

Caco-2 cells were treated TNF- α (10 ng/ml) with 0.01-0.1 mg/ml GRS or DEX (100 nM) or U0126 (40 μ M) for 24h. AQP3 mRNA expression was measured by quantitative RT-PCR (A-C), and ERK phosphorylation was measured by western blotting analysis (D). Each data represent the mean \pm S.E. (n=3).

**: $p < 0.01$ vs. Control. #: $p < 0.05$ vs. LPS

第4節 考察

第1項 下痢症状に対する五苓散の作用

第1項では、実際の臨床現場における感染性胃腸炎の治療に五苓散が奏功するとの臨床報告を基礎研究に落とし込むため、五苓散による下痢改善作用を LPS モデルにて検討した。腹腔内投与された LPS は、同じく腹腔内に存在するマクロファージの TLR4 が受容し⁶⁷⁻⁶⁹、NF- κ B 経路などを介して TNF- α などの炎症性サイトカインの放出を促す⁷⁰。そしてその放出された TNF- α が腸管上皮細胞を傷害し、水分吸収バランスが崩れることで下痢が発生すると考えられている。

このモデルにおいて、LPS 投与後 60 分から水を含む軟便を多く排泄したことから、下痢スコアが急激に上昇し、その後エンドポイントである 90 分まで高い値を保ち続けた。一方、五苓散投与群では、どのタイムポイントにおいても下痢症状を改善し、その作用は投与量依存的事実であることがわかった。五苓散は、従来、脱水に対して効果を示す漢方薬として考えられていたが、下痢症状そのものを抑制する興味深い作用が垣間見え、本モデルにおいて病態に対する新たな五苓散の作用が存在することが示唆された。そこで、五苓散の薬理学的なプロファイリングのため、異なる作用を持つ対照薬を設定し、比較検討を行った。

まず、強力な抗炎症作用を持つステロイドであるデキサメタゾン (DEX) を採用した。ステロイドは、潰瘍性大腸炎などの腸疾患において、炎症によって引き起こされる血便や下痢症状を抑制するとされており、臨床現場においても用いられている。また、基礎研究においても、DSS などの実験的大腸炎モデルにおいて陽性対照として用いられることも多い^{74,75}。本モデルにおいては、LPS によって誘発された下痢症状に対して、五苓散には及ばないが、一定の効果があることがわかった。よって、DEX は LPS によって引き起こされた急性炎症を収束させ、下痢症状を改善することが考えられた。

次に、非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) の一つであるインドメタシン (Ind.) を用いた。こちらも抗炎症の目的で採用した。今回のモデルは、急性期の炎症であるため、反応が速いエイコサノイド系の影響を受けるのではないかと想定していた。一方で、インドメタシンは、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 阻害作用を持ち、そしてその PGE₂ は消化管における粘膜保

護作用を担っている⁷⁶。そんな中、本モデルでは、下痢症状を改善しているように見えた。投与量の問題はつきまとうが、インドメタシンにおいても急性期の炎症を抑制したために、止瀉作用を発揮したと考えている。

最後に、下痢症状は、アセチルコリンなどの神経伝達物質による腸管の蠕動運動の過剰興奮によっても引き起こされる⁷⁷。そのため代表的な抗コリン薬であるスコポラミン (Sco.) を採用した。しかしながら、本モデルにおいてスコポラミンは下痢症状を抑制しなかった。つまり、五苓散には、抗コリン用の作用を持たないことが推察された。これを裏付けるために、ラット腸管の摘出標本を、マグヌス法を用いて、血管平滑筋に対する五苓散の作用を検討した。すると、五苓散は、アセチルコリンによって誘発された腸管平滑筋の収縮を抑制しなかった (データ示さず)。

従って、第 1 項からは、五苓散および抗炎症作用を持つ薬物が、下痢症状を抑制したことが明らかになった。

第2項 炎症病態に対する五苓散の作用

腸管傷害は、炎症性サイトカインの発現上昇が最初のトリガーとなることが知られており、本モデルにおいても LPS 刺激によって急性炎症を誘発している。また、第1項において、下痢症状に対して、五苓散とともに抗炎症作用の持つ薬物が効果を示したことから、炎症に対する五苓散の作用を検討した。まずは、潰瘍性大腸炎などの種々の炎症性腸疾患において病態時に発現が上昇すると知られており、本モデルにおいても、腸管上皮細胞に直接的に傷害与えるとして位置付けられている TNF- α の発現レベルを各種対照薬とともに測定した。すると、TNF- α の値は、DEX にのみ抑制された。DEX は、NF κ B 阻害作用を有しており、この作用は、LPS を受容したマクロファージがその経路を介して TNF- α を産生することにフォーカスした作用であると言えよう。

この DEX によるサイトカイン抑制は、いわば予想通りであったが、これに加えて、五苓散の炎症病態に対する作用を見極めるため、炎症性サイトカインに対する作用の小規模スクリーニングを行った。

先ほどから述べているように、腹腔に注入された LPS は、マクロファージが受容し、そこから炎症病態が始まる。そこでまずは、主にマクロファージから産生されるサイトカインである IL-1 β および IL-6 について検討した。その結果、五苓散はどちらのサイトカインに対しても影響しなかった。これより、五苓散は、マクロファージを標的として作用していないことが示唆された。

次に、炎症が生じると、好中球の浸潤・集積が起こることが知られているため、好中球の走化因子である IL-8 の発現レベルを測定した。しかしながら、このサイトカインに対しても五苓散は作用せず、好中球の浸潤に対しても影響しないことが考えられた。

本モデルは、急性期の炎症であるため、比較的速い炎症応答が起こることが予想される。そのため、病態において産生速度が速いとされるエイコサノイド類の COX-2 に対する作用を調べた。だが、早期の炎症反応に対しても五苓散は影響しないことが明らかになった。COX-2 は、先ほどまで用いていた対照薬であるインドメタシンによって抑制されることが知られている。このことより、五苓散による止瀉作用はインドメタシンが持つプロファイルと異なることが示唆された。

最後に、抗炎症サイトカインである IL-10 の発現に対する作用を調べた。すると、意外なことに、五苓散だけが発現を上昇させた。しかしながら、サイトカインの変化が微量であり、本モデルの病態にどれだけ寄与しているのかは疑問が残る。一方、データには示していないが、抗酸化因子として知られる Heme oxygenase-1 (HO-1) の発現も同様に五苓散投与で上昇することを確認している。HO-1 は、主に酸化ストレスによって刺激された際に誘導される因子であり、抗酸化作用・抗炎症作用などを有し、生体の恒常性維持の一翼を担っている⁷⁸。こういった因子に五苓散が作用している可能性があり、大変興味深い。

五苓散は、沢瀉、蒼朮、茯苓、猪苓そして桂皮の 5 つの生薬から構成されており、これらの生薬の中に明確な抗炎症作用を示すものは存在しない。このことより、五苓散が炎症病態に影響を与えないことはいわば必然と言えるであろう。それゆえ、五苓散には抗炎症によらないユニークな下痢改善作用があることが浮き彫りになった。

第3項 組織傷害に対する五苓散の作用

第2項までで述べてきた炎症に伴い組織傷害が起こることが知られている。そこで、組織傷害に対する五苓散の作用を検討した。すると、LPS 投与群では、絨毛の形が著しく崩れており、腸管が傷害されている様子が観察された。一方で、五苓散およびDEX 投与群では、その組織傷害が改善された。DEX 投与群は、先ほど述べたような抗炎症作用を発揮した結果によるものだと推察される。しかしながら、五苓散は、炎症病態に影響することなく組織改善作用したことから、また別のメカニズムの存在が示唆された。

腸管の恒常性の維持を評価する上で指標にされるものには、上皮細胞の裏打ちタンパクであるタイトジャンクションが挙げられる⁷⁹。通常の腸管では、タイトジャンクションによって上皮細胞が密接しており、腸管管腔からの水分や異物の通過を阻止している。腸管が傷害されることにより、この機構が破綻し、水分吸収バランスが崩れることも分かっているほか^{80,81}、これらを組織修復の指標として取り上げる文献も多く存在する。従って、これらの分子においても今後評価を行う必要があるのかもしれない。

第4項 AQP3 発現に対する五苓散の作用

五苓散によるユニークな作用を解明するため、腸管の水分吸収に重要な役割を担う水チャネル AQP3 に焦点を当てた。AQP3 の発現は、LPS 単独投与によって著明に減少したが、五苓散投与群では、その AQP3 発現の減少が抑制された。また、各種対照薬を投与した群では、AQP3 発現減少抑制作用は見られず、この作用は五苓散特有のものであった。さらに、五苓散単独投与では AQP3 発現量の増加がみられなかったことと（データ示さず）、経時間的推移のデータから分かるように、五苓散は、あくまで炎症などによる引き金によって減少する AQP3 に対して作用することが明らかになった。

腸管の AQP3 は、管腔に面している腸管上皮細胞に発現することが知られており、外因的な刺激による影響を一番に受ける。組織染色や免疫染色の結果でも見受けられるように、LPS 投与群では、上皮細胞の欠落に伴って AQP3 の発現の消失が起こっていた。その流れの中で、五苓散は、先述した HO-1 などの発現を介して上皮細胞を保護し、あくまで AQP3 の発現を増加ではなく、維持する方向に作用していることが考えられた。

AQP3 は、腸管のほかに皮膚などにも発現しており、炎症病態に伴ってその発現が減少することが、臨床および実験的モデルマウスの両方から報告されている^{83,84}。また、感染性胃腸炎の一番の原因となるウイルスとして、ロタウイルスが知られているが、ロタウイルス誘発性腸炎モデルマウスにおいて AQP3 の発現が有意に減少することも示されている⁴⁷。これらの報告と考え合わせると、五苓散が、AQP3 の発現を調節することで下痢症状を改善することは合点がいく。

また、腸管や皮膚における代表的な炎症性疾患である、潰瘍性大腸炎および乾癬は、その病態形成に TNF- α の関与が強く示唆されている^{82,85}。そしてその治療には、抗 TNF- α 中和抗体がしばしば用いられる。今回の我々のデータにおいて、TNF- α に作用するステロイドである DEX が AQP3 発現を調節できなかったことから、これらの疾患をケアする上では、抗炎症のみならず AQP3 の発現も治療標的として目を向けられる必要があると感じた。

今回対照薬として用いた一つであるインドメタシンは、AQP3 の発現減少を抑制する薬物としての報告も存在する。星薬科大学の五十嵐先生らの研究によると、刺激性下剤を用いた際に、その有効成分であるセンノシド類がレインアンスロンに代謝され、マクロファージか

らの PGE₂ 分泌を促進することが AQP3 の発現を減少させるとの報告がある⁸⁶。周知の通り、インドメタシンは PGE₂ を抑制する薬物であるが、我々のモデルではこのようなシチュエーションには当てはまらなかった。

AQP3 の発現を減少させる物質に関しては、想定されるものが他にもまだまだあるが、本研究では、腸管に侵入してきた LPS の下流で産生される TNF- α による発現減少機構に対しては、五苓散は一定の効果を示すことが明らかになった。

第 5 項 AQP3 欠損マウスにおける五苓散の作用

五苓散が AQP3 の発現を調節することで下痢症状を改善することを明確にするために、AQP3 欠損マウスを用いて同様の検討をした。その結果、WT で見られていた五苓散の下痢改善作用および組織傷害改善作用が AQP3 欠損マウスでは完全に消失した。

AQP3 欠損マウスの表現型として、尿量増加作用および創傷治癒の遅延が報告されているが、下痢症状に関しては言及がない。本実験においても、AQP3 欠損マウスは何も刺激を加えない状態においてはマウスが排泄する便に変わりにはなかった。また、データは示していないが、TNF- α の発現量も WT と AQP3 欠損マウスの間に差がなかったことから、炎症病態には AQP3 の有無が影響しないことが示唆された。

一方、組織保護作用には AQP3 が大きく関与していることが考えられている。AQP3 はアクアグリセロポリンともカテゴライズされており、水だけでなくグリセロールも通過させる。慶應義塾大学の竹馬先生らの報告によると、皮膚や腸管において AQP3 の発現を欠損させた際に、グリセロールの透過能が低下し、炎症によって引き起こされる組織傷害が増悪化する実験結果が示されている^{87,88}。グリセロールは言わずと知れた組織保護成分であるため、これらの結果と考え合わせると、AQP3 は水分吸収だけでなく、組織保護にも関わる分子だということが言え、さらには五苓散の作用点とも合致する。

従って、五苓散による下痢改善作用および組織保護作用は、AQP3 発現減少抑制作用を介していることが明らかになった。

第6項 腸管上皮細胞の AQP3 発現に対する五苓散の作用

炎症性疾患において AQP3 の発現が減少することは、前項まで述べてきた。そこで、そのメカニズムに迫るべく Caco-2 細胞を用い、当研究室の先行研究において皮膚ケラチノサイト細胞株において AQP3 が減少することが示されている TNF- α で刺激することで⁸⁹、その発現を調べた。すると、TNF- α によって AQP3 の発現は著明に減少したが、五苓散はその発現減少を有意に抑制した。また、TNF- α の下流で遺伝子発現に関与するシグナル分子である p38 および ERK の阻害薬を用いた検討では、五苓散と同様に AQP3 の発現減少が抑制された。さらに、ERK の活性化に対する五苓散の作用を検討したところ、第3章において見られた結果と一致して ERK のリン酸化を阻害した。すなわち、これらのシグナル分子の活性化が、AQP3 の発現減少に重要であり、五苓散はそれらのシグナル分子を阻害することで AQP3 の発現を維持することが明らかになった。

先行研究では、皮膚ケラチノサイト細胞において、AQP3 の発現に関わる転写因子の同定まで行っており、詳細なメカニズムが解明されている⁸⁹。今後、プロモーターアッセイや転写因子の選定に関して行う必要があるだろう。さらには、これらの活性を示す生薬および活性成分を同定し、再び *in vivo* 試験において有効性を証明することができれば、冒頭で述べた感染性胃腸炎に苦しむ発展途上国の子供達に、現地の植物等で補うことが可能になるかもしれない。

第4章 総括

漢方薬は、西洋薬には無いユニークな作用を持ち、臨床での使用経験からも実効性には申し分がない。しかしながら、根拠に基づいた処方すなわち EBM (Evidence-Based Medicine) の概念から見ると、もう一つのピースである合理性の部分が欠けている。そこで、我々は、漢方薬が用いられる合理性を薬理学的に証明しようと試みた。

五苓散による血管内皮細胞の遊走抑制作用

五苓散は、利尿作用を期待して、むくみや二日酔いに用いられる漢方薬であるが、近年では、慢性硬膜下血腫の治療に広く用いられ、特に本疾患の再発を著しく抑制できることが明らかにされてきた。慢性硬膜下血腫は、頭部の外傷などにより硬膜の内側で血腫ができる疾患である。本疾患の治療は一般的に穿頭術による外科手術がメインとなる。しかしながら、その手術において完全に血腫を取り除くことができない場合が多く、術後の再発率は 8-20% と比較的高確率に生じる。興味深いことに、術後に五苓散を使用することで、本疾患の再発頻度を約 4% まで抑制するという臨床成績が報告された。このように慢性硬膜下血腫の再発に対する五苓散の有効性は示唆されているものの、本作用の合理性は前述した五苓散の利尿作用だけでは説明できず、血腫再発抑制に関わる五苓散の薬理機序は未だ不明である。本疾患の病態では、未熟な血管の新生とその破壊が繰り返され、血腫の肥大を来とし、再発・増悪する。従って、本疾患の再発予防を考える上で、血管新生を抑制することが何より重要となる。そこで本研究では、本疾患の再発に対する五苓散の抑制効果が血管新生阻害によるものではないかとの仮説を立て、血管新生の初期ステップである血管内皮細胞の増殖や遊走に対する五苓散の作用を調べた。

まず、血管新生の重要な初期反応である血管内皮細胞の遊走に対する五苓散の作用特性を調べた。血管内皮細胞株である HUVEC 細胞に VEGF と五苓散 (0.01-0.1 mg/ml) を共処理し、scratch assay にて遊走能を測定すると、五苓散はこの VEGF によって生じた細胞遊走を著明に抑制した。その作用は濃度依存的であり、最大濃度である 0.1 mg/ml の処理では、遊走能は VEGF 単独の約 50% まで低下した。この結果とよく一致して、五苓散は VEGF による細胞増殖も抑制した。一方、興味深いことに、VEGF で誘発した作用だけでなく、無刺激時すなわち内皮細胞本来の基礎遊走能に対しても濃度依存的な抑制作用を示した。

次に、遊走に対して促進的に働く分子である AQP1 に注目した。AQP1 は血管内皮細胞に発現し、運動性および遊走方向性を決定づける役割をもつ。この AQP1 の発現に対する五苓散の作用を調べると、五苓散は、AQP1 タンパク質の発現を VEGF の有無に関わらず減少させた。さらに、この結果と一致して、無刺激時において、五苓散は AQP1 mRNA 発現を減少させるとともに、AQP1 プロモーターの活性も著明に抑制し、五苓散が AQP1 遺伝子の転写を抑制することで、その発現を減少させると推測された。この五苓散による AQP1 発現減少作用が、遊走抑制作用に寄与するの否かを調べるために、siRNA を用いて AQP1 をノックダウンした細胞で基礎遊走能を測定した。その結果、AQP1 欠損細胞では、ベースの遊走は約 50% まで低下したが、五苓散共処理による、それ以上の遊走抑制作用は見られなかった。このことから、五苓散は AQP1 の発現を減少させることで、血管内皮細胞の遊走を抑制することが示唆された。

さらに、この AQP1 の発現減少が VEGF の下流シグナル分子である ERK のリン酸化に影響するのかを確かめた。HUVEC 細胞に AQP1 siRNA を導入し、AQP1 の発現を抑制した後、VEGF で刺激し、30 分後の ERK のリン酸化レベルを western blotting 法にて調べた。その結果、ERK のリン酸化は AQP1 欠損によって阻害された。また、五苓散による ERK のリン酸化阻害作用が処理濃度依存的であることも確認している。このことより、AQP1 発現減少が ERK のリン酸化に影響する可能性が示唆された。

最後に、*in vivo* モデルマウスにおける五苓散の血管新生阻害作用を調べた。VEGF を含んだマトリゲルをマウスの背部に皮下注射し、7 日後のゲル内に新生された血管を観察した。VEGF を含んだゲルでは、血管内皮細胞の浸潤および血管管腔の形成が見られ、それらの細胞は全て AQP1 陽性であることが明らかになった。一方、五苓散を経口投与した群では、それらの構造は確認できず、五苓散は血管新生を阻害することが示された。

第 2 章の成績から、五苓散が強力に血管内皮細胞の遊走および増殖を抑制することが明らかとなった。その機序としては、AQP1 の発現減少による遊走の方向性の消失および VEGF の下流シグナルである ERK の阻害すなわち遊走の駆動力の低下が関係している。本研究で得られた知見は、臨床での五苓散による慢性硬膜下血腫の再発予防効果の一部に血管内皮細胞の遊走抑制作用が関与すること示した興味深いデータである。

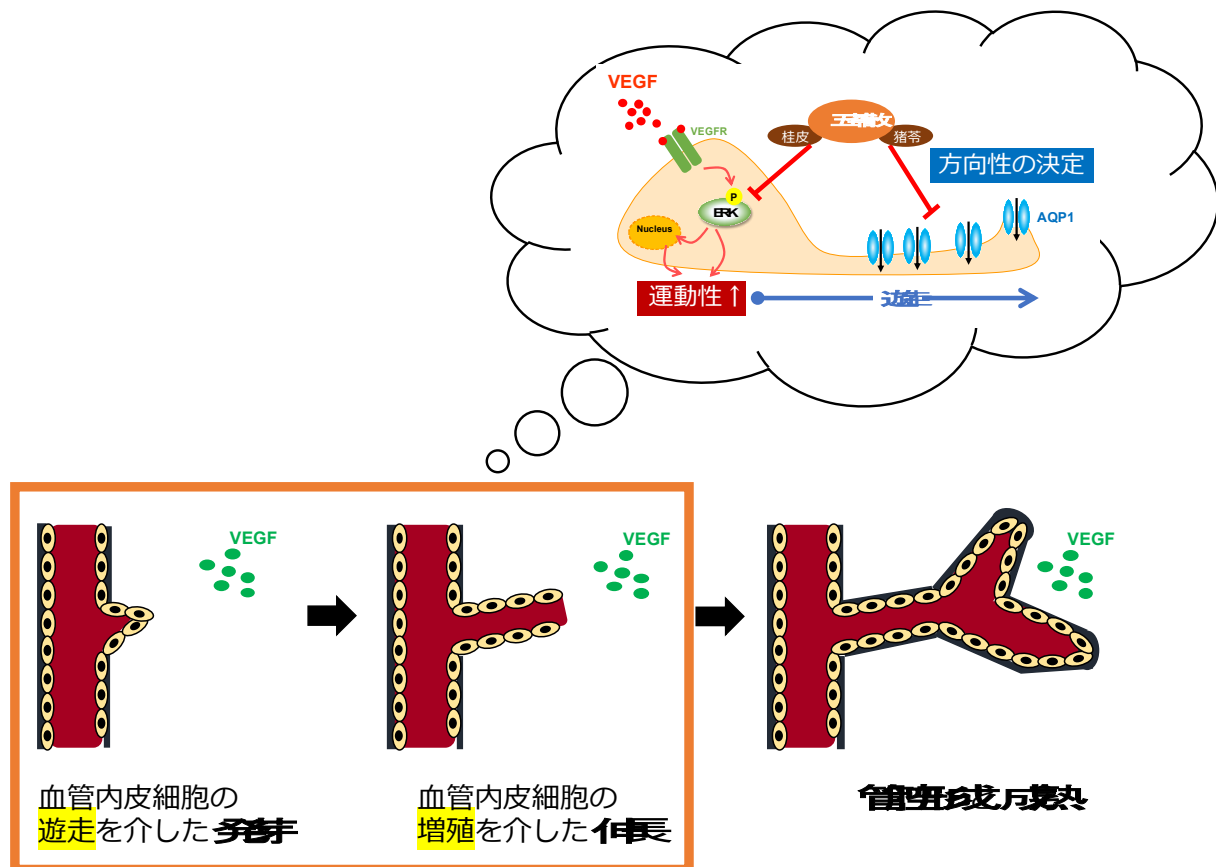


Fig. 23 The scheme showing the mechanism of angiogenesis inhibition by GRS.

五苓散による下痢改善作用

また、五苓散は、特に小児の感染性胃腸炎に伴う下痢を鎮めるのに著効を示すとの臨床報告も散見される。感染性胃腸炎は、食品や水を介して細菌やウイルスに感染し、腹痛、悪心・嘔吐および下痢などの症状を伴う疾患であり、日本でも高い罹患率を示している。本疾患の治療には、下痢や嘔吐に伴う脱水を防止することに主眼が置かれ、重症な場合には点滴による補水が行われるのが一般的である。五苓散には脱水に対する回復作用があるが、下痢改善作用に関してはこれまでのプロファイル上、当てはまらない。さらに、五苓散による消化器症状に対する実効性を基礎薬理学的に検証した実験はほとんどなされておらず、また、その作用機序も不明である。

一般に、腸管粘膜に感染を生じると炎症反応を惹起して、これが腸管粘膜のバリア機能の破綻と腸管内の水分の分泌・吸収のバランスを崩壊させることで下痢などの症状が生じる。そこで、感染性胃腸炎病態を模倣した LPS 誘発性の急性胃腸炎モデルを用いて、その病態に対する五苓散の作用のプロファイリングを行った。

LPS によって誘発された下痢症状を抑制する一方で、腸管粘膜のサイトカイン量を指標に評価した炎症応答には著明な影響を与えなかった。また興味深いことに、病理組織学的に調べた腸管粘膜の形態は、LPS 投与群では著しい粘膜上皮の絨毛の脱落が生じていたのに対し、五苓散の投与群ではこの上皮の傷害も生じなかった。つまり、五苓散は、炎症病態には関与せずに、組織傷害を改善し、下痢症状を抑制することがここまで明らかになった。

五苓散のユニークな作用に迫るべく、水チャネル AQP3 に焦点を当てた。AQP3 は、腸管の管腔側に発現しており、便中の水の吸収に重要な役割を担っていることが知られている。AQP3 の発現量は、タンパク質、mRNA レベルどちらも LPS 投与によって著明に減少したが、五苓散の投与群では、この発現減少が抑制され、発現量は健常動物と同程度であった。また、AQP3 欠損マウスにおいて同様の実験をしたところ、五苓散の組織保護作用および下痢改善作用が消失することも確認した。これらの結果より、五苓散は、AQP3 の発現調節を介して下痢症状を改善することが明らかになった。

最後に、*in vitro* 実験系において AQP3 発現減少抑制メカニズムを追求した。炎症性サイトカインである TNF- α によって Caco-2 細胞の AQP3 の発現が著明に減少したが、五苓散処理によってその発現減少が抑制された。この作用は、ステロイドである DEX では見られなかった。

が、TNFR の下流シグナル分子である p38 や ERK の阻害薬によっては確認された。また、第 2 章の結果の一部と符合して、五苓散は Caco-2 細胞においても ERK 阻害作用を示した。従って、五苓散は、ERK 阻害を介して AQP3 の発現減少を抑制していることが明らかになった。

第 3 章の成績から、LPS によって誘発される下痢症状に対して五苓散が改善作用を示すことが明らかになった。その機序としては、炎症性刺激によって腸管上皮に発現する AQP3 の減少を抑制することによるものであった。ロタウイルスによる感染性胃腸炎病態時にこの AQP3 が減少することを考え合わせると、臨床での効果も納得できる。

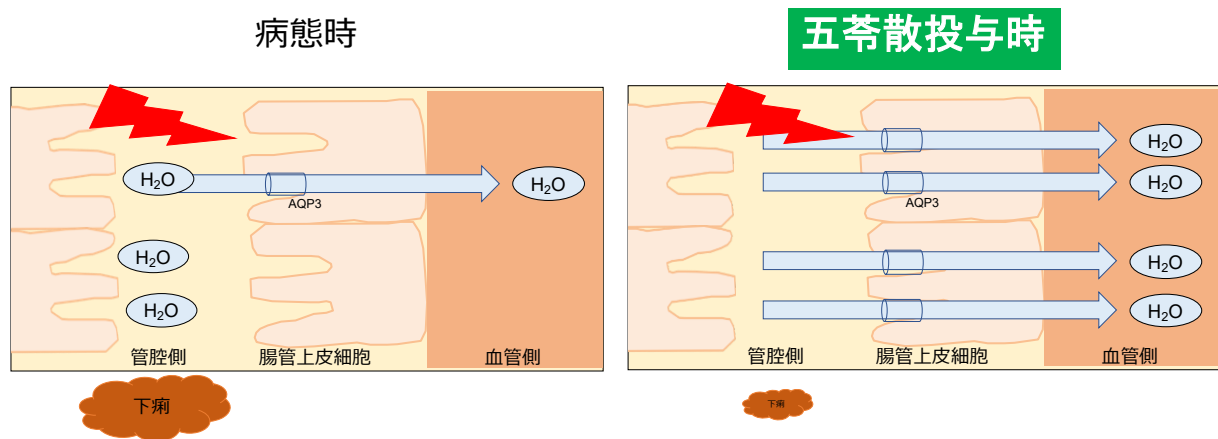


Fig. 24 The scheme showing the mechanism of diarrhea improving effect by GRS.

本研究では、臨床報告で得られた知見を基礎研究に落とし込み、実験科学的に検証することで、五苓散が実際の臨床現場において治療に用いられる合理性を証明している。これにより、エビデンスに基づいた医師による処方が増えることで治療効果や満足度が必然的に高まると確信している。

治療満足度の観点からは、感染性胃腸炎に苦しむ発展途上国の子供達に目を向けたい。彼らのほとんどは、経済的、立地的な面で、治療を受けることができない故に苦しんでいる。そこで、五苓散を構成する生薬を成分レベルまで分析し、その同等の成分を含む現地の植物で補うことはできないかと画策している。それができれば、手軽に入手することが可能となり、どのシーンにも対応することができるため、より多くの人々を救うことができると確信している。

また、基礎研究の成果が実を結び、医療経済学的な観点からも評価された実績もある。五苓散が慢性硬膜下血腫の術後の再発率を低下させることで、医療費の大幅な削減に成功したとの報告が存在する。手術には莫大な医療費と共に医師の時間を奪うが、薬価の安い五苓散を予防的に投与することで手術の実質的な回数を減らし、医療費の削減に貢献した。基礎研究の立場から臨床での出来事に関与することができ、嬉しく思うと同時に、今後は、様々な疾患に対してユニークな作用を持つ漢方薬の「併用」などを提案していくことで、医療費の削減、さらには治療満足度の向上などに尽力できればと考えている。

この、リバーストランスレーショナルリサーチのアウトプットとして臨床現場にフィードバックできることが、新たな治療オプションの提供である。未だかつて、AQP1を標的とした血管新生阻害療法およびAQP3を標的とした下痢に対する療法は存在しない上に、両分子を標的とした薬物も存在しない。これらをターゲットとした創薬を期待すると共に、構成する生薬ひいては活性成分をさらに掘り進めていくことで、創薬のシーズにもなり得ると確信している。また、五苓散の血管新生阻害作用という新たな一面を見出したことで、血管新生が病態形成に関わる疾患に対して、五苓散を用いた新たなアプローチも可能になるかもしれない。こういったサイクルを回すことで、より良い医療が、必要な人に提供されることを切に願う。

第5章 参考文献

1. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med*. 1979;300(20):1142-7.
2. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231(25):232-5.
3. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994;330(18):1287-94.
4. Kurtova AV, Xiao J, Mo Q, Pazhanisamy S, Krasnow R, Lerner SP, et al. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance. *Nature*. 2015;517(7533):209-13.
5. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep*. 2010;62(2):233-44.
6. Sehayek E, Butbul E, Avner R, Levkovitz H, Eisenberg S. Enhanced cellular metabolism of very low density lipoprotein by simvastatin. A novel mechanism of action of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Invest*. 1994;24(3):173-8.
7. Corsini A, Bellosta S, Baetta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther*. 1999;84(3):413-28.
8. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97(12):1129-35.
9. Simionescu M, Stancu C, Costache G, Sima A. Endothelial cell response to hyperlipemia. Activation-dysfunction-injury, the protective role of simvastatin. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(5):275-82.
10. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92(3):657-71.
11. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(11):1671-8.
12. Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med*. 2000;32(3):164-76.
13. Goto S, Kato K, Yamamoto T, Shimato S, Ohshima T, Nishizawa T. Effectiveness of Goreisan in Preventing Recurrence of Chronic Subdural Hematoma. *Asian J Neurosurg*. 2018;13(2):370-4.

14. Yasunaga H. Effect of Japanese Herbal Kampo Medicine Goreisan on Reoperation Rates after Burr-Hole Surgery for Chronic Subdural Hematoma: Analysis of a National Inpatient Database. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;6.
15. Yadav YR, Parihar V, Namdev H, Bajaj J. Chronic subdural hematoma. *Asian J Neurosurg*. 2016;11(4):330-42.
16. Edlmann E, Giorgi-Coll S, Whitfield PC, Carpenter KLH, Hutchinson PJ. Pathophysiology of chronic subdural haematoma: inflammation, angiogenesis and implications for pharmacotherapy. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):108.
17. Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol*. 1990;111(2):757-63.
18. Shono T, Inamura T, Morioka T, Matsumoto K, Suzuki SO, Ikezaki K, et al. Vascular endothelial growth factor in chronic subdural haematomas. *J Clin Neurosci*. 2001;8(5):411-5.
19. Li F, Hua C, Feng Y, Yuan H, Bie L. Correlation of vascular endothelial growth factor with magnetic resonance imaging in chronic subdural hematomas. *J Neurol Sci*. 2017;377:149-54.
20. Isaji T, Osuka K, Ohmichi Y, Ohmichi M, Naito M, Nakano T, et al. Expression of Angiopoietins and Angiogenic Signaling Pathway Molecules in Chronic Subdural Hematomas. *J Neurotrauma*. 2020;37(23):2493-8.
21. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004;56(4):549-80.
22. Li S, Huang NF, Hsu S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem*. 2005;96(6):1110-26.
23. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 2007;100(6):782-94.
24. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005;23(5):1011-27.
25. Bevacizumab in combination with irinotecan plus fluorouracil plus leucovorin chemotherapy prolongs survival but increases adverse events in people with metastatic colorectal cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(8):715-7.
26. Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, et al. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*. 2002;542(Pt 1):3-16.
27. Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(1):F13-28.

28. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 15):3225-32.
29. Kuriyama H, Kawamoto S, Ishida N, Ohno I, Mita S, Matsuzawa Y, et al. Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(1):53-8.
30. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6269-73.
31. Ma T, Yang B, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem.* 1998;273(8):4296-9.
32. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature.* 2005;434(7034):786-92.
33. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Bell BA, Krishna S. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br J Cancer.* 2002;87(6):621-3.
34. Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest.* 2003;112(1):67-75.
35. Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. *Pflügers Arch.* 2008;456(4):693-700.
36. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17083.
37. Gurwith M, Wenman W, Hinde D, Feltham S, Greenberg H. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis.* 1981;144(3):218-24.
38. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, et al. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1022-8.
39. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(5):565-72.
40. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD, Network WHOCGRS. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis.* 2016;62 Suppl 2:S96-S105.

41. Lundgren O, Svensson L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* 2001;3(13):1145-56.
42. Morris AP, Estes MK. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VIII. Pathological consequences of rotavirus infection and its enterotoxin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(2):G303-10.
43. Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog Histochem Cytochem.* 2004;39(1):1-83.
44. Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(10):1275-86.
45. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. *Biol Cell.* 2005;97(7):479-86.
46. Phillips SF. Diarrhea: a current view of the pathophysiology. *Gastroenterology.* 1972;63(6):495-518.
47. Cao M, Yang M, Ou Z, Li D, Geng L, Chen P, et al. Involvement of aquaporins in a mouse model of rotavirus diarrhea. *Virol Sin.* 2014;29(4):211-7.
48. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9.
49. Enomoto A. [Coordination of actin cytoskeleton and membrane transport in cell migration]. *Seikagaku.* 2008;80(3):233-40.
50. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):857-69.
51. Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009;19(1):116-27.
52. Jiang Y, Liu H, Liu WJ, Tong HB, Chen CJ, Lin FG, et al. Endothelial Aquaporin-1 (AQP1) Expression Is Regulated by Transcription Factor Mef2c. *Mol Cells.* 2016;39(4):292-8.
53. Maiti D, Xu Z, Duh EJ. Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(8):3640-8.
54. Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848(10 Pt B):2576-83.
55. Wei X, Dong J. Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro. *Oncol Rep.* 2015;34(3):1440-8.
56. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling

- in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-105.
57. Lee SH, Jeong D, Han YS, Baek MJ. Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Ann Surg Treat Res*. 2015;89(1):1-8.
 58. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011;437(2):169-83.
 59. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-7.
 60. Foubert P, Varner JA. Integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Methods Mol Biol*. 2012;757:471-86.
 61. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005;9(2):267-85.
 62. Bae WY, Choi JS, Kim JE, Jeong JW. Cinnamic aldehyde suppresses hypoxia-induced angiogenesis via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α expression during tumor progression. *Biochem Pharmacol*. 2015;98(1):41-50.
 63. Sakamoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Horie I, Isohama Y. Aquaporin 5 increases keratinocyte-derived chemokine expression and NF- κ B activity through ERK activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(4):355-60.
 64. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Atsuzawa K, Aoyama M, Niwa A, et al. Activation of Ras/MEK/ERK signaling in chronic subdural hematoma outer membranes. *Brain Res*. 2012;1489:98-103.
 65. Colville-Nash PR, Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis*. 1992;51(7):919-25.
 66. Williams JM, Duckworth CA, Watson AJ, Frey MR, Miguel JC, Burkitt MD, et al. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. *Dis Model Mech*. 2013;6(6):1388-99.
 67. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
 68. Medzhitov R. Innate immunity: quo vadis? *Nat Immunol*. 2010;11(7):551-3.
 69. Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol*. 2005;6(6):587-92.
 70. Wi SM, Moon G, Kim J, Kim ST, Shim JH, Chun E, et al. TAK1-ECSIT-TRAF6 complex

- plays a key role in the TLR4 signal to activate NF- κ B. *J Biol Chem*. 2014;289(51):35205-14.
71. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T, et al. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem*. 1994;269(18):13289-95.
 72. Rahman I, Gilmour PS, Jimenez LA, Biswas SK, Antonicelli F, Aruoma OI. Ergothioneine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced NF-kappa B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;302(4):860-4.
 73. Yoon SW, Chun JS, Sung MH, Kim JY, Poo H. alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression by modulating p38 kinase and nuclear factor kappaB signaling in human chondrosarcoma HTB-94 cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(1):115-24.
 74. Meers GK, Bohnenberger H, Reichardt HM, Lühder F, Reichardt SD. Impaired resolution of DSS-induced colitis in mice lacking the glucocorticoid receptor in myeloid cells. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190846.
 75. Hamady ZZ, Scott N, Farrar MD, Lodge JP, Holland KT, Whitehead T, et al. Xylan-regulated delivery of human keratinocyte growth factor-2 to the inflamed colon by the human anaerobic commensal bacterium *Bacteroides ovatus*. *Gut*. 2010;59(4):461-9.
 76. Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hwang HJ, Tsuchiya T, Mizushima T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12752-8.
 77. Takeuchi T, Tanaka K, Nakajima H, Matsui M, Azuma YT. M2 and M3 muscarinic receptors are involved in enteric nerve-mediated contraction of the mouse ileum: Findings obtained with muscarinic-receptor knockout mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(1):G154-64.
 78. Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 2010;16(25):3112-9.
 79. Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res*. 2018;2018:2645465.
 80. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53.
 81. Ricanek P, Lunde LK, Frye SA, Støen M, Nygård S, Morth JP, et al. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early stage inflammatory bowel disease. *Clin Exp*

- Gastroenterol. 2015;8:49-67.
82. Zhao G, Li J, Wang J, Shen X, Sun J. Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(1):161-6.
 83. Tsang KW, Leung JC, Tipoe GL, Leung R, Yan C, Ooi GC, et al. Down-regulation of aquaporin 3 in bronchiectatic airways in vivo. *Respir Med*. 2003;97(1):59-64.
 84. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol*. 2004;13(4):193-222.
 85. Ikarashi N, Baba K, Ushiki T, Kon R, Mimura A, Toda T, et al. The laxative effect of bisacodyl is attributable to decreased aquaporin-3 expression in the colon induced by increased PGE2 secretion from macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(5):G887-95.
 86. Hara-Chikuma M, Verkman AS. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2008;128(9):2145-51.
 87. Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut*. 2007;56(11):1529-35.
 88. Horie I, Maeda M, Yokoyama S, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, et al. Tumor necrosis factor-alpha decreases aquaporin-3 expression in DJM-1 keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(3):564-8.
 89. Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):103.

謝辞

稿を終えるにあたり，終始懇篤なる御指導，御鞭撻を賜り，また本研究および本稿作製にあたり多大なる御教示，御援助および御校閲を戴きました東京理科大学薬学部 磯濱 洋一郎教授に深甚なる感謝の意を表します．

本論文の審査にあたり，有益なる御助言と御校閲を賜りました東京理科大学薬学部 秋本和憲 教授，羽田 紀康 教授，早川 洋一 教授ならびに樋上賀一 教授に厚く御礼申し上げます．

本研究に際し，有益なる御指導と御助力を賜りました山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部 堀江 一郎 講師に心から厚く感謝致します．

本研究に際し，研究室配属時より有益なる御指導と御助言を戴きました 藤川 みか 修士に深く感謝致します．

本研究に際し，遺伝子改変マウスのご提供および有益なる御指導を賜りました慶應義塾大学 医学部 竹馬 真理子 准教授に厚く御礼申し上げます．

本研究ならびに研究室生活に際し，御協力，御助言をいただきました応用薬理学研究室の諸氏に感謝の意を表します．特に，同級生として共に苦楽を味わい，私を励まし，支えてくれた 石橋 純平 修士，室井 慎一 学士，小森 駿 修士，斎藤 賢治 修士，町田 渉 修士ならびに堀田 瑞希 氏に心から感謝の意を表します．

最後に，ここまで私を支えてくれた友人，そしてここまで育て見守ってくれた両親に心から感謝します．