

氏名（本籍）	むら かがみ かず ひと 村上 一 仁（広島県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第45号
学位授与の日付	2021年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	多彩な効果を持つ五苓散の薬理作用に関する研究

論文審査委員（主査）教授 早川 洋一
教授 秋本 和憲 教授 樋上 賀一
教授 磯濱洋一郎 教授 羽田 紀康

論文内容の要旨

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。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。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、そしてトロンボキサン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、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、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た。

この他にも、五苓散による様々な疾患に対する治療効果や、臨床での使用経験は多く報告されているが、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、さらには新たな治療概念の提唱ができると考えられる。

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。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。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。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、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。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。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。一方、水チャネルアクアポリン1(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。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、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、第一章では、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。

ところで、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。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、水の吸収において中心的な役割を担っている。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、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 2 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。

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、五苓散を新たな治療オプションとして提唱することができるほか、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。

論文審査の結果の要旨

現在の我が国の医療においては、多くの医師が漢方薬を治療手段の一つとして用いており、一定の役割を果たしている。その多くは、西洋医学的な治療が十分に奏功しない場合の補完的な使用や、西洋医学的な治療が長期に及び、副作用が懸念される場合などにこれを回避するための代替的使用がほとんどである。しかし、中には漢方薬の方が西洋薬よりも優れた効果を示すことも少なくなく、漢方薬の作用を科学的に解明することは、これらの薬物をより適切かつ効果的に利用するために有益な情報を与えることになる。特に、利尿薬すなわち水分代謝調節薬として知られ、尿量増加作用を期待して浮腫の治療に主に用いられている五苓散は、著明な薬理作用を持つ代表的方剤である。申請者は、五苓散が著効を示すとの臨床症例の多い慢性硬膜下血腫の再発防止および感染性胃腸炎に伴う下痢症状の改善に注目し、その薬理作用を科学的に解明する「リバーストランスレーショナル」の視点に立った研究を遂行している。

第一に、五苓散が慢性硬膜下血腫の術後患者で再発率が低下するという臨床報告をもとに、その理由を解明するために、血腫外膜で生じる血管新生に着目した検討を行っている。血管新生を再現する実験標本としてはヒト血管内皮細胞株の HUVEC 細胞を用いて、本細胞の遊走および増殖活性に対する五苓散の作用を調べ、本方剤がこれらを著明に抑制することを見出している。本方剤の作用は処理濃度依存的であり、特に注目すべきは血管栄養因子である VEGF で促進された細胞の遊走のみならず、VEGF 非存在下の基礎遊走活性を抑制することを見出したことである。本作用は、遊走時に葉状仮足の先端で水分子を吸収しその伸長を生じる機序となるアクアポリン1水チャネルの mRNA 発現を抑制することに基づくという、既存の西洋薬にはない新規作用に基づくことを示したことも見出している。五苓散による血管新生抑制作用は *in vitro* の実験系のみならず、*in vivo* でも示されており、さらに桂皮および緒苓といった構成生薬の重要性が示される

など、詳細な検討がなされている。

第二に、五苓散は感染性胃腸炎に随伴する下痢症状に著効を示すという小児科領域での臨床報告に着目し、本作用についても基礎薬理的に追求している。マウスの腹腔内にグラム陰性菌毒素の LPS を投与して誘発した炎症性下痢モデル動物を用いて、五苓散がステロイド薬のデキサメタゾンに匹敵する止瀉作用および腸管粘膜保護作用を持つことを示す一方で、LPS による炎症性サイトカインの TNF- α 発現はほとんど抑制せず、本方剤の止瀉作用が抗炎症に依存しないことを明らかにしている。五苓散の作用機序としては消化管内からの水分の吸収ルートとなる水チャネルのアクアポリン 3 に焦点を当てて検討しており、LPS によって下痢を生じた動物ではアクアポリン 3 の mRNA およびタンパク質の発現レベルが著明に減少し、五苓散はこのアクアポリン 3 発現の減少を阻害することを見出している。さらに本方剤による止瀉作用にアクアポリン 3 発現の調節が重要であることは欠損マウスを用いた検討からも証明している。

本研究で得られた成績は、臨床で治療手段の選択肢として考慮されている五苓散による血管新生抑制作用および止瀉作用の実効性を基礎薬理的に検証するものであるとともに、その作用機序の解明を通じて合理性を裏付けるものである。特に止瀉作用に関する研究では、感染性胃腸炎に伴う下痢症状が炎症のみならず、アクアポリン 3 発現の減少という 2 つの現象が組み合わされることで重篤化するという病態生理学的な新発見も伴っている。また、感染性胃腸炎が海外の発展途上国で多くの子供達の命を奪っている現状を鑑みると、安価な漢方薬が合理的かつ有効な治療手段となることを提唱するものとして今後、五苓散の世界的な使用の拡大に貢献できる発見として評価できる。

以上、本論文は博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。