

八味地黄丸効果の薬理遺伝学的研究

荻田 善一

富山医科薬科大学

Pharmacogenetical studies on the medicinal effects of Hachimi-jio-gan

Zen-ich OGITA

Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Accepted March 13, 1995.)

Abstract

One of the Characteristics of the Kampo medicines (the medicines used in the Kampo method which has a history of more than two thousand years) is that their pharmacological and medicinal effects have been evaluated only in human beings. In that sense, Kampo medicines could be regarded as medicines for human beings. However, if Kampo medicines, which are pharmacologically effective in human beings, are administered to experimental animals, the pharmacological effects may differ from those of human beings. Kampo medicines are selected and administered to patients based on their individual "Sho" (i.e. the body condition determined by diagnostic methods in Kampo), and the pharmacological and medicinal effects can be expected only when this is taken into consideration. This distinguishes Kampo medicines from western medicines. In carrying out pharmacological research in Kampo medicines, therefore, the "Sho" of experimental animals plays a key role. Hence, one of the main aims of this study was to determine whether "Sho" also exists in experimental animals or not.

We have established a mouse strain which has a high sensitivity to Hachimi-jio-gan in its multi-hormonal regulatory system of the submaxillary-gland. Using this established mouse strain, the study was carried out to demonstrate the pharmacological effects of Hachimi-jio-gan by employing pharmacogenetical methods.

Key words Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan), 八味地黄丸, animal model of "Sho", submaxillary gland protease, multi-hormonal regulatory system, kallikrein protease.

はじめに

2000年以上の歴史をもつ漢方薬の特徴は、薬理効果を試す動物としてヒトのみを用いて選択され続けてきたところにある。したがって漢方薬はヒトの薬であると言えるだろう。だから、ヒトに効果のあった漢方薬を実験動物に与えて得られる薬理効果がヒトでの効果と同様であるという保証はどこにもない。さらにまた漢方薬は患者の体質あるいは薬物応答性の差異に基づく症候群（証）に応じて方剤（処方）が投与されること（弁証施治）によってのみ治療効果が期待されるという点が西洋薬と大

きく異なっている。

したがって、漢方薬の薬理効果を科学的に解明するにあたっては、上記の二点を考慮した実験動物が選抜されなければならない。ここに西洋薬の薬理効果の解析に用いられる実験動物の選抜とは根本的に異なった考えに基づく重要な問題が提起されるのである。すなわち、ヒトと同様に機能的個人差（体質）に基づく病状の差異を表現する「証」を有する実験動物が用いられなければ実験は意味のないものになってしまう。だから「証」を有する実験動物が存在するかどうか、本研究における第一の命題である。病的な体質や症状を表現していない動物すなわち、体内の調節バランスが乱れていないで正常な

恒常性を維持しているような健康な動物を用いては、漢方薬の薬理効果を解明することは不可能であろう。

このように考えてくると漢方薬の薬理効果の解明にとって、ここに新しい観点からの「証」と「方剤」の対応に関する研究方法論を確立すべき、必要性和必然性がもたらされるのである。研究を展開するにあたって、個体の病態ならびに体質から考えられる「証」を「病証」とし、「方剤」に対する個体の応答性の差異からする「証」を「方証」として生体側からと薬物側からの「証」の二つに分けて考えることにした。

ところが、実験動物を四診といわれる診断法によって「弁証」し、「施治」（弁証施治）を行うことは非常に困難である。なぜならば、実験動物の「病証」をたとえ望診、問診あるいは切診によってもある程度診断することができたとしても、実験動物に問診し確認することは不可能であるからだ。そのうえ中医学において採用しようとする診断情報は、病気の原因を探り出せるような情報ではない。むしろ、過去の経験からどんな薬物を投与すれば治癒できる病気であるかを定めるための情報である。すなわち病態や体質の認識や識別を四診法で行い、「証」を決定した後、適用薬物を決定するための情報なのである。

たとえば、実験動物の「病証」の決定を問診に準じた方法、飲物の温度に対する好みがあれば、「熱証」あるいは「寒証」の区別ができるのであろうか。ヒトにおける「熱証」「寒証」と同じように冬でも冷たい飲物を好むネズミは「熱証」で、夏でも温かい飲物を好むネズミは「寒証」であると診断できるのであろうか。また疲労しやすいかどうか「実」「虚」を判断する重要な手がかりであり、ある一定の温度の水中で泳がせてみて、他のネズミに比べて疲れないのが「実証」のネズミであり、疲れやすいネズミは「虚証」だと判断できるのであろうか。尿の回数、尿量、便のかたさ、あるいは回数も「病証」の診断に役立つのであろうか。ヒトとの類似性から便秘のネズミは「熱証・実証・燥邪」だということになり、下痢のネズミは「寒証・虚証・湿邪」となるのであろうか。がしかし、たとえこのような実験動物における「病証」の診断がつけられたとしても、なにかこの四診法による「証」の決定には、やはり科学的にみて不安が残る。

そこで「証」の科学的理解のためのアプローチは、以上のような複雑な体質あるいは環境条件によってもたらされる「病証」を直接研究するよりも、「方剤」を投与してみた後の生体の薬物応答性の差異および病態の変化から推定される「方証」でもって「証」を分類し、それから逆に「病証」の存在を推定するほうがより科学的アプ

ローチに適しているのではなかろうかと考えた。ということはある遺伝的に確立された「病証」モデルとしての実験動物に対する適用薬物がわかれば「病証」を科学的に識別理解することも可能になるのではないかということである。すなわち、冷え症に効果のある「方剤」により健康状態が改善されるネズミは冷え症であると推定するのである。こうした薬物応答性の差異から始められる研究方法は、西洋医学的立場からいってみれば、これは個体間における薬物応答性の存在を認識することから始まる薬理遺伝学的な研究法と非常に類似してくる。いずれにしてもこのような研究方法論のアプローチから八味地黄丸の薬理作用を解明する立場をとることによって、自然科学における先端的な研究技術をすんなりと導入できるのである。

ここに八味地黄丸エキスに対する実験動物における応答性の差異から「方証」の存在を認識し、それを薬理遺伝学的立場から分子生物学的手法で研究を展開することによって得た結果から八味地黄丸の薬理効果について論じたい。

1. 「証」の遺伝的背景について

体質には先天性と後天性のものとがあると考えられている。そして先天性体質は生まれながらに親から受け継いだ身体の機能的な性質であり、後天性体質は生後に表現される身体の機能的な性質であると理解されている。しかし、現代遺伝学の常識から考えると、先天性体質にしろ後天性体質にしろ、いずれも遺伝子型に環境要因が加わることによって表現されたものである。だから、遺伝学を無視しては体質を科学的に理解することはできない。

東洋医学でいう「病証」とは、病気を得た患者の機能的個人差に基づいて構築された体質の差異によってもたらされたものだと考えた。体質は生涯にわたって不変な遺伝子型に自然環境、生活環境、職業環境や社会情勢などの広い意味での多くの外部環境因子などがからみあいながら発現された一種の表現型である。これにさらに病的因子がからみあってもたらされた症候群を「病証」と考えることができる。とすれば、「病証」は各人各様であり、多種多様であるべきはずだ。だから、各個人に適合した「方証」は厳密に言えば、一人一人異なっていて無数にあるべきであると考えられる。しかし、それではあまり煩雑である。そこで、こうした混乱を防ぐため体質に基づくこの多種多様な症候群を、経験によって整理整頓していくつかの「病証」の型に分類して「方証」を決めるという東洋医学における治療方式が確立されてきた

と考えられるのではなからうか。かくして、このような治療方式の展開に役立ったのが「証」という概念であったにちがいない。

ここに、「病証」は治療効果が認められるにつれて変化し、その時点における適用方剤も変わるわけである。いずれにしても東洋医学という体質とは、西洋医学でいうその意味とは全く同じではない。西洋医学でも、古くから病気にかかりやすい体質のあることが認められていて、その病名による易罹病性体質についての分類がされることがある。しかし、東洋医学でいう体質はもっと広い意味で使われているのである。

また東洋医学の基本概念に「外因は内因を通じて初めて発現される」という認識がある。この認識は疾病が発症する根本原因が身体の内因環境を構成する調節機構、すなわち内因としての自然治癒力の強弱にあり、気候、食物成分、ウィルスや細菌などを含めた外因は単なる発症条件にすぎないと考えたことを意味している。ここでいう内因の基本的な条件は個人の遺伝的背景によって決定されることはいまでもない。東洋医学においては、このような内因としての自然治癒力の存在を西洋医学におけるよりもさらに重要視して考えており、薬物の効果とその個人の持っている自然治癒力が呼応することによって病気が治るというのがこの治癒原理であり、診断の方法論的根拠にもなっている。ここでいう自然治癒力とは、デカルトの身体と精神を画然と分離して健康を考える物心二元説に対する一元説的思考に基づく全体論で考えられる「治癒系」すなわち、循環系や消化系などがヒトの身体を構成していて、それが正しく機能するように調節しようとする＜全体に戻ろうとする傾向＞ヒーリング（癒し）系の存在と類似した考えである。「癒し」の系については、最近における精神神経免疫学の進歩によって、ホメオスターシスの主役とされていた自律神経系やホルモン系に免疫系を加えた三角関係がホメオスターシスの三角形と呼ばれるようになって、自然治癒力に関する科学的な研究が進展しつつある。これに東洋医学における治療方式が加わることによって、さらに新しい治療体系が確立されるにちがいない。

以上のように、従来からの和漢薬の有効成分の科学的裏づけへの努力に加うるに、東洋医学でいう「病証」や「方証」を個人差、体質の差異に基づく機能的個人差としてとらえ、漢方薬の治療効果をホメオスターシスの三角形に及ぼす影響として解明し、裏付けることができるならば、過去の伝統医学をよみがえらせることはもちろんのこと、一歩進んで近代医学の展開に新しい局面をもたらす、新しいパラダイムで考える高次元の科学としての治療医学体系を確立することさえも不可能ではないと

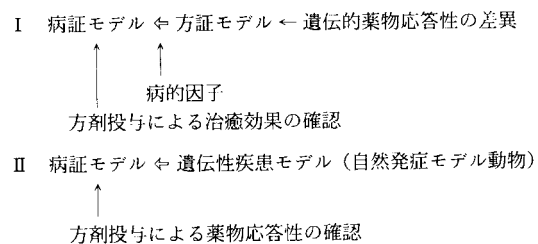
考えられるのである。

II. 「証」のモデル動物をどのようにして得ることができるのか？

ここでいう「病証」モデル動物とは、従来の薬物の過剰投与や毒物による、いわゆる病態モデル動物ではないし、また「方証」モデルも実験動物における単なる薬物代謝系の高低による薬物反応性の差異だけでもない。遺伝的に異なる薬物応答性の差異を有する系統動物を育成し、これに病因を与えて得た病態動物を、ある種の病証モデル動物としてみなすという考えかたに基づいている。もう1つの「病証」モデル動物作製法は、遺伝性疾患や自然発症動物の選抜方式によるものである。このようにして得られた実験動物における「病証」モデルは、いずれも遺伝的背景が健康な動物と異なっているのである。したがって、その「病証」モデル動物の育成にあたっては遺伝学的手法による選抜育成方法を導入しなければならない。

かくして常法による交配実験を繰り返し標識形質を決め選抜することによって、「病証」あるいは「方証」モデル動物を遺伝的に固定することができる。そのためには交配実験の容易なマウスが本研究の実験動物として適していることになる。すなわち、「病証」モデル動物と「方証」モデル動物を育成するためには次の図1に示されたような2つの方式にまとめることができる。

図1 「証」モデル動物についての考え方



1. 「方証」モデル動物の選抜

一般に薬理効果の解明にあたっては、健康な実験動物と、それに病態を発症させた個体にそれぞれ薬物を投与し、比較するという方式が用いられてきた。だから、このような実験動物から得られた方剤の薬理機序にしても、ヒトにおいて「証」に適した方剤が投与される、いわゆる「弁証施治」にみられる薬理効果の発現機序と全くおなじであるとは思えない。「証」の科学的解明に当たって、方剤名を「病証」とするような場合には、特にその方剤の薬理効果に対して遺伝的に感受性の高い実験動

物と感受性の低い実験動物に同一の病態を与え、方剤を投与して、その治療効果を比較するという方法ですめてみたらどんな結果が得られるだろうかということに興味をもたれた。これは西洋医学的にいえば「方証」の薬理遺伝学的研究法とも言えるであろう。この種のアプローチから「証」と「方剤」の関係、いわゆる「弁証施治」に関する、ある種の科学的理解が得られるのではないだろうかという期待から、まず方剤に対する薬物応答性の高いマウス集団と応答性の低いマウス集団を選択育成することから研究を始めた。

2. 「病証」モデルマウスの作製

「病証」モデルマウスは、その作製方式によって2つに分類できる。

①方証モデルマウスを西洋医学的方法により種々の病態を与え、「病証」モデルを作る。これにそれぞれ該当する方剤を投与し、その治療効果を臨床化学、免疫学、内分泌学、神経生理学的立場から解析するというで、「弁証施治」の科学的解明にアプローチする。

②遺伝性疾患モデルや自然発症モデルのマウスをある種の「病証」モデルとみなして、その「病証」の該当する方剤を投与し、健康なマウスにおける効果とを比較して、「病証」モデルマウスであることを確認する。

現在までに育成ならびに系統保存している「証」モデルマウスを表1に示してある。

表1 育成ならびに系統保存している「証」モデルマウス

1. 八味地黄丸証モデルマウス(腎虚証)
方証モデルマウス: HR-A(B10A由来)
: HR-B(B10由来)
病証モデルマウス: 老化促進マウス(SAM-P8)
(京大竹田)
2. 黄連解毒証マウス(ベルベリン感受性マウス)
3. アルコール感受性マウス(アルコール代謝能のhigh型とlow型)
4. 霊芝成分感受性マウス(NK細胞増殖能応答性のrapid型とslow型)
5. 癲癇型マウス(DHA感受性)
C57BL由来
DBA系由来

III. 八味地黄丸の薬理効果に関する遺伝学的考察

1985年以降、われわれはマルチホルモン調節器官であるマウス顎下腺におけるプロテアーゼ活性値の変動を指標として、八味地黄丸効果の薬理遺伝学的研究を始めた。その結果、H-2遺伝子付近のみが異なった相互にコンジェニック系統であるB10AとB10系統のマウスの間で、八味地黄丸に対する応答性の差異が見出された。

表2 八味地黄丸および六味地黄丸投与による顎下腺プロテアーゼ活性値の変動

Oriental Medicines	sex	♂	♂	♀
	strain			
Hachimi-jio-gan	HR-A (B10A)	↑	↑	↑
	HR-B (B10)	↑	→	→
Rokumi-jio-gan	HR-A (B10A)	↑	→	→
	HR-B (B10)	↑	→	→

八味地黄丸を投与した場合、B10Aから由来したHR-A系統では雌雄マウスおよび去勢したマウスともに顎下腺のプロテアーゼ活性値の上昇が認められた。ところが、B10から由来したHR-B系統のマウスではプロテアーゼ活性値の上昇は精巣を有する正常雄においてのみ認められた。

さらに、八味地黄丸構成生薬より附子と桂枝とを除いた方剤である六味地黄丸を投与したところ、顎下腺のプロテアーゼ活性値の上昇はHR-A、HR-B系マウスの正常雄にのみ認められ、雌や去勢した雄では認められなかった(表2参照)。

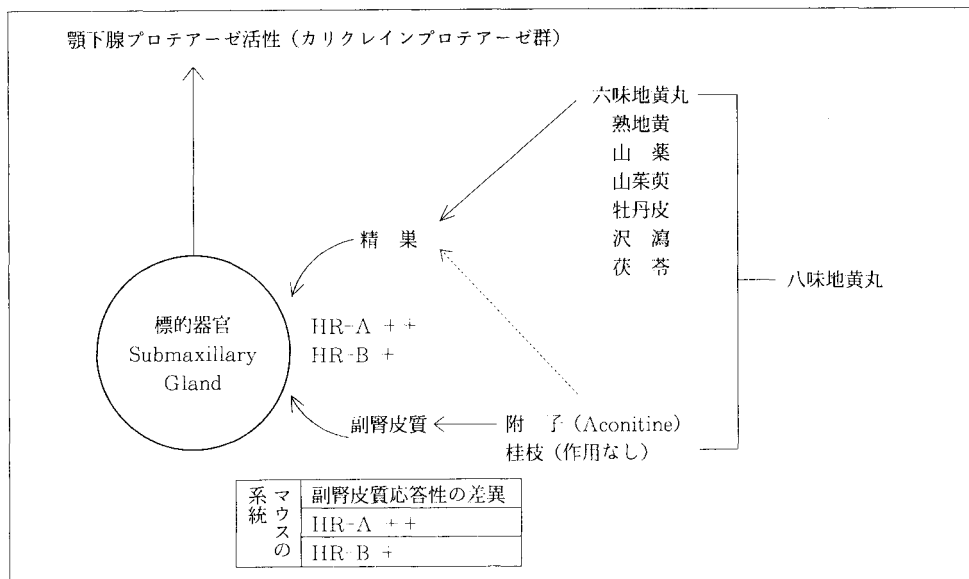
そこで、八味地黄丸を構成する生薬である附子と桂枝とをそれぞれ単独にHR-Aマウスに投与したところ、桂枝にはプロテアーゼ活性上昇作用はなく、附子の主要アルカロイド成分であるアコニチンにプロテアーゼ活性を誘導上昇させる作用のあることが示された。ところが副腎を摘出したHR-A系マウスにアコニチンを投与しても、顎下腺のプロテアーゼ活性の上昇は認められなかった。

すなわち、八味地黄丸エキス成分による顎下腺のプロテアーゼ活性の誘導上昇には少なくとも二つの作用点のあることが明らかとなった。一つは精巣の存在を必要とする機構。もう一つは、附子に含まれるアコニチンによる副腎を介する機構である(図2参照)。

B10AとB10系統マウスの八味地黄丸ならびに六味地黄丸に対する応答性の差異を顎下腺プロテアーゼ活性値の変動で比較すると図2に示したようであった。この結果から、HR-A系はHR-B系統のマウスに比較して、アコニチンの効果を受けやすいマウス系統であることが暗示された。

副腎虚型患者の尿中の副腎皮質ホルモンの代謝産物の含有量が正常者より低いことから、副腎皮質機能が低下

図2 マウス顎下腺に及ぼす八味地黄丸の薬理効果



していることが知られている。このような副腎皮質ホルモンの合成と分解の過程に対する観察から、腎陽虚の主な発病機序の1つは下垂体-副腎皮質系の機能低下であり腎陽虚治療漢方製剤に対して高い応答性を示すことが確認された。

ここに八味地黄丸は腎陽虚型患者の「証」の適用薬剤であることから、八味地黄丸に対する応答性の高いHR-A系マウスは正常マウスに比較してより副腎皮質機能が低下している腎陽虚証モデルであると考えられた。次いで、われわれは八味地黄丸の効果のうち精果を介して顎下腺プロテアーゼ活性を上昇させる機構すなわち、六味地黄丸を構成する六つの生薬のうちで、どの生薬が効果を有するかについて検討した。

その結果、六味地黄丸構成生薬のうち、熟地黄をはじめ、山茱萸、牡丹皮のような補腎生薬にはプロテアーゼ活性の誘導上昇作用が認められた。その作用機構について研究したところ、熟地黄は男性ホルモン作用を強める効果を有することが明らかとなった。その効果は血清中のテストステロン量の増加によるものではなく、デヒドロテストステロン量を増加させるためであることを明らかにした(篠原, 荻田ら, 1994, 未発表)。

IV. マウス顎下腺におけるマルチホルモン調節系の分子生物学的解析

薬物のホルモン作用を検定する方法は多数報告されている。簡便な方法としては、ホルモンの標的臓器の重量

を測定する方法やホルモン量に応答するような酵素活性値を指標として用いる間接的な方法である。性差を示す酵素蛋白質は顎下腺プロテアーゼ以外に血漿エステラーゼ、腎臓エステラーゼ、肝臓P450など数種類のあることが知られている。しかし、これら酵素蛋白質の量的変化に関するホルモン依存性のなかで顎下腺プロテアーゼほど大きな酵素活性の変動を示すものは他にない。我々がこの種の研究の展開において幸運だったことは八味地黄丸の薬理効果の判定にマウス顎下腺プロテアーゼ活性値の変動を用いたことにあった。

マウス顎下腺は、男性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの標的臓器として知られている。この組織には上皮成長因子(EGF)や神経成長因子(NGF)などの他に、プロテアーゼ活性として検出される多種類のカリクレインが存在する。マウス顎下腺に存在するこれらの成長因子やカリクレインなどの生理活性因子は、男性ホルモンや甲状腺ホルモン量の変化に敏感に反応するため、マルチホルモン作用を解析するための恰好の実験材料として注目され多くの研究がみられるようになった。近年分子生物学の著しい進歩により多くのステロイドホルモン受容体遺伝子がクローニングされ、その結果、ホルモナー受容体-遺伝子活性化に至る機構が次第に解明されつつある。現在まで得られたマルチホルモン調節系の遺伝子レベルでの分子生物学的研究成果を八味地黄丸の薬理作用の解析に導入することにした。しかし現在までのところ、顎下腺においてマルチホルモン調節を受ける複数の生理活性に關与する遺伝子が、はたしてどのような機構によ

ってコントロールされているのか不明である。本研究では八味地黄丸の薬理効果を解明する目的でマウス顎下腺に多種多様に存在するプロテアーゼ活性を有するカリクレインに注目し、顎下腺カリクレインのテストステロン投与による量的変化を蛋白質レベル及び遺伝子レベルで解析した。その結果、マウス顎下腺において組織特異的に発現する遺伝子の転写調節因子の存在を予測することができた。

1. マウス顎下腺カリクレインの基質特異性に基づく分類

マウス顎下腺には多種類のプロテアーゼ活性を示すカリクレインや、EGFやNGFなどに結合した形で存在するカリクレインの数種類が単離されてきた。しかし多くの顎下腺カリクレインについての詳しい性質についてはよく知られていなかった。そこでマウス顎下腺カリクレイン活性を二次元電気泳動法により分離し、プロテアーゼ活性として検出し基質特異性に基づいて分類した。基質特異性の決定にはセルロースアセテート膜を基質保持体とする酵素活性検出法と二次元電気泳動法を組合せた方法を用いた。塩基性アミノ酸に富むヒストンやプロタミンを基質として用いたところ、雄マウスの顎下腺において21種類のプロテアーゼ活性泳動分離帯として検出

された。表3に示したように、このうち20種類が男性ホルモンや甲状腺ホルモンに対して量的依存性を示した。泳動分離された21種類のプロテアーゼ活性は、基質特異性により4つのタイプに分類された(表3)。すなわちポリアルギニン、ポリリジン、ベンゾイルアルギニンパラニトロアニリド(BAPNA)を分解するTYPE-1。ポリアルギニン、BAPNAを分解するTYPE-2。ポリアルギニン、ポリリジンを分解するTYPE-3。ポリアルギニンのみを分解するTYPE-4である。このような塩基性アミノ酸の合成基質に対し非常に限られた基質特異性を有することは、カリクレインが蛋白分解酵素として顎下腺において、成長因子前駆体などのペプチドを特異的な基質として認識し、これを特異的な部位で切断することによって活性型とさせるなどの重要な働きを担っていると考えられる。

4つのタイプに分類したマウス顎下腺プロテアーゼ活性の基質特異性の違いは、分類に用いた基質がいずれも低分子であり、しかも同じアミノ酸に由来した合成基質においても異なった特異性を示すことから、基質結合領域内に存在するアミノ酸配列のわずかの差異によるものと推測された。近年20種類以上のマウス顎下腺カリクレインゲノム遺伝子がクローニングされた。これらのカ

表3 顎下腺プロテアーゼの二次元電気泳動法による基質特異性
(1~21番までの番号は分離泳動帯の順に付した)

Type	ESTP No.	Substrate specificities				Inhibition	
		Poly-L-arginine	BAPNA	Poly-L-lysine	BPTI	Zn ²⁺	Androgen- dependence
1	1	+++	+++	+++	+	+++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+
	3	+++	+++	+++	+++	+++	+
	4	++	++	++	+++	+++	+
	5	+++	++	+	-	+++	+
	6	+	+	+	+	+++	+
2	7	+	++	-	-	+++	+
	8	+	++	-	+++	+++	+
	9	++	++	-	++	+++	+
	10	+	+	-	+++	+++	+
	11	+++	++	-	-	+++	+
3	12	+	-	+	+	+++	+
	13	+	-	+	++	+++	+
4	14	+	-	-	+	+++	+
	15	+	-	-	+	+++	+
	16	+++	-	-	-	++	+
	17	+++	-	-	-	+++	+
	18	+++	-	-	-	+++	+
	19	+++	-	-	-	+++	+
	20	++	-	-	-	+++	+
	21	+++	-	-	-	+++	+

表4 顎下腺の生理活性蛋白質に関与する遺伝子群

第3染色体→独立した遺伝子座に	{ EGF遺伝子 FGF遺伝子
第7染色体→顎下腺カリクレイン遺伝子群	
第17染色体→H-2遺伝子座付近の塩基配列となんらかの関係あり。 (HR-AとHR-Bの八味地黄丸に対する応答性が異なる。)	

表5 マウス顎下腺(マルチホルモン調節系器官)に含有される生理活性蛋白質を支配する遺伝子

男性ホルモン依存性	<i>*mGK-1</i> → unidentified <i>*mGK-3</i> → γ -NGF (Pot-transcriptional modification) (により 7, 9, 11が生産) <i>*mGK-4</i> → α -NGF <i>*mGK-9</i> → EGF-Bp・type-C <i>*mGK-13</i> → EGF-Bp・type-B <i>*mGK-22</i> → EGF-Bp・type-A <i>*mGK-16</i> → γ -renin <i>PNF-1</i> → unidentified <i>*mGK-5</i> → unidentified	顎下腺カリクレイン遺伝子	顎下腺に含有されている生理活性蛋白質
非依存性	<i>*mGK-6</i> → proteinase F1 Amylase <i>*Ribonuclease</i>		

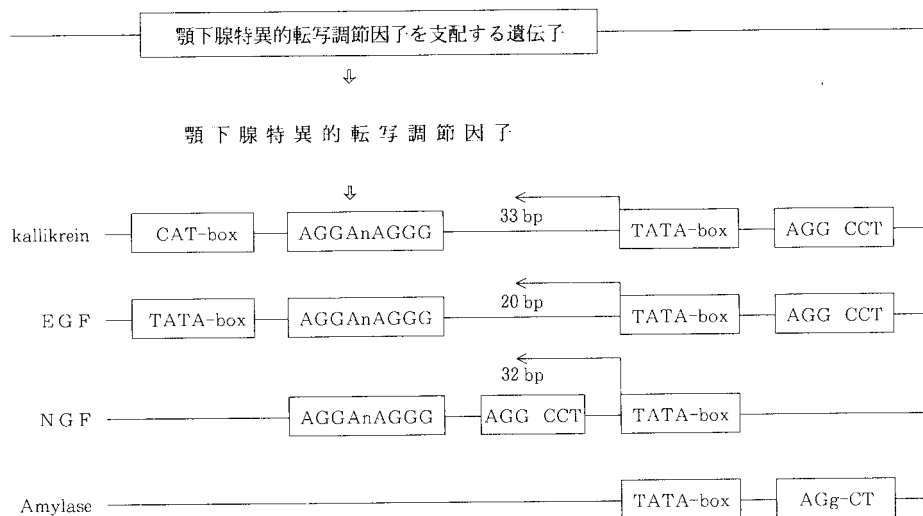
**mGK* → マウス顎下腺カリクレイン遺伝子記号
 数字は電気泳動分離帯の番号

リクレイン遺伝子は染色体7番上に連座して存在することが明らかとなった。現在までに異なった10種類の遺伝子の転写過程が顎下腺において確認された。表4, 表5に顎下腺の生理活性蛋白質に関与する遺伝子を示してある。これら遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列の相同性は約75~80%と非常に高く、いずれの遺伝子においてもセリンプロテアーゼに特異的に保存されているアミノ酸配列の存在が確認された。しかし基質結合領域と考えられる部位においてはアミノ酸配列パターンが異なっており、おそらくこのアミノ酸配列の差異によってこれら顎下腺に存在するカリクレインの基質特異性が決定されているものと推測される。

2. マウス顎下腺における遺伝子発現機序の解析

男性ホルモン, 甲状腺ホルモン投与によるEGF, NGF及びカリクレインなどのメッセンジャーRNA(mRNA)量の変化を性別, 臓器別に検討した。その結果, カリクレイン遺伝子はマウス顎下腺において多量に発現しており, 特に雄においては雌の約10倍もの遺伝子発現が認められた。雄マウス去勢によりカリクレインmRNA量は去勢12日目で雌のレベルにまで低下した。去勢雄マウスや雌マウスへの甲状腺ホルモン, 男性ホルモン投与によりカリクレインmRNA量は, ホルモン投与後4日目で雄のレベルにまで上昇した。また雄への甲状腺ホルモン投与はカリクレインmRNA量に変化を与えなかった。同様の結果がEGF及びNGF遺伝子で観察された。顎下腺以外の臓器では, これら遺伝子のmRNA量はホルモン投与により変化しなかった。このように,

図3 ホルモン依存性のカリクレイン, EGF, NGF遺伝子のプロモータ領域にある共通の塩基配列
 (ホルモン非依存性のAmylase遺伝子にはこの塩基配列は見当たらない)



EGF, NGF 及びカリクレインといった完全に独立した染色体上の位置に存在する遺伝子が、マウス顎下腺においてのみ男性ホルモン及び甲状腺ホルモンなどの複数の異なったホルモンにより、いずれも非常に類似した転写調節が行われていることが明らかになった。

以上の結果から、マウス顎下腺においてホルモン調節を受け、しかも組織特異的に発現する転写調節因子が各遺伝子の転写を調節している可能性が示唆された。1987 年以降、ステロイドホルモンレスポンスエレメント (HRE) と呼ばれるステロイドホルモン受容体が結合する DNA 塩基配列がホルモン支配下のプロモーター領域に同定されるようになった。マウス顎下腺では、EGF, NGF, カリクレインなどの生理活性因子が男性ホルモンや甲状腺ホルモンに依存性を示すにもかかわらず、これら遺伝子のプロモーター領域には HRE を見いだすことができなかった。よってこれら遺伝子の転写活性化機構は、ホルモン受容体がこれら遺伝子のプロモーター領域に直接作用するのではなく、組織特異的な転写調節因子が間接的に関与している可能性が示唆された。すなわち顎下腺に特異的に発現する転写調節遺伝子が存在し、この遺伝子プロモーター領域に HRE が存在すると考えられる。この転写調節に应答する機構はホルモン投与により、新たに合成された蛋白質 (顎下腺特異的転写調節因子) が生理活性因子に関する遺伝子のプロモーター領域

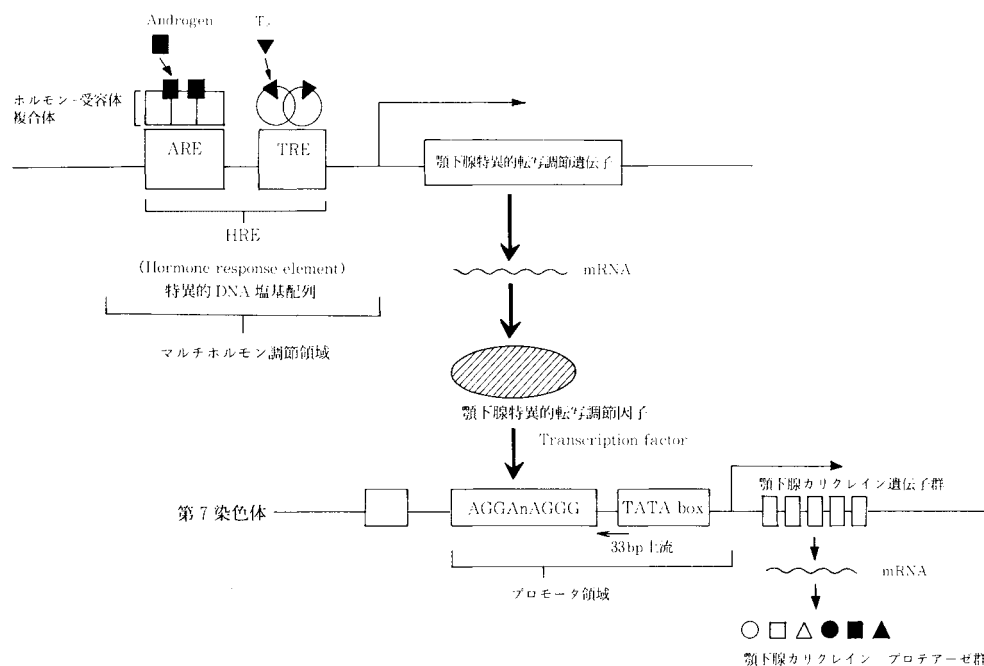
に結合することによって発現を調節する、といった機構の存在が推測される。EGF, NGF 及びカリクレイン遺伝子群のプロモーター領域の塩基配列を解析したところ、これら遺伝子プロモーター領域に共通した (AGGA n AGGG) なる塩基配列が存在し、これが転写調節因子結合領域である可能性が示唆された (図 3, 図 4 参照)。

そこで、図 4 に示したような顎下腺における生理活性蛋白質を支配する遺伝子の転写過程のマルチホルモン調節機構に関する仮説が考えられた。

おわりに

マウス顎下腺には多くの生理活性因子が存在する。これらの生理活性因子の中でカリクレイン類は、プロテアーゼ活性として検出でき、またその種類も多く、成長因子との結合性、特に男性ホルモンや甲状腺ホルモンによる活性調節を受ける。そこでマウス顎下腺カリクレイン (プロテアーゼ活性) を指標酵素として八味地黄丸の薬理効果を薬理遺伝学的研究方法で研究を展開することで「証」と「方剤」の対応関係の一部を明らかにすることができた。現在までにこれらカリクレイン遺伝子群は 20 種類以上のゲノム遺伝子としてクローニングされていて、いずれも第 7 番染色体上に存在していることが明らかにされてきている。

図 4 マウス顎下腺における生理活性因子を支配する遺伝子の転写過程におけるマルチホルモン調節機構に関する仮説



われわれの最近における研究によると、男性ホルモン作用の比較的強いセリ科植物である蛇床子エキスは精巣におけるステロイド合成に対して影響をおよぼし、性機能障害を改善させる働きを有し、血清中のテストステロン量を増加させることが明らかになった。そして蛇床子エキスに熟地黄エキスを混合して投与することで、顎下腺カリクレインプロテアーゼ活性値が上昇した。これは蛇床子エキスの作用によってもたらされた血清テストステロンの増量が地黄エキスの影響により男性化作用の強いデヒドロテストステロン量を増加させることに基づいていることを明らかにした。

今後我々は八味地黄丸の薬理作用に対する応答性の差異をもつマウス系統を用いてその効果を比較検討することで、顎下腺の EGF, NGF 及びカリクレイン遺伝子のプロモーター領域に共通して存在する転写調節因子結合領域と考えられる塩基配列に八味地黄丸投与によってもたらされる未知の生体物質によってなにが起こるかを明らかにしたいと考えている。それが八味地黄丸成分のホルモン調節系への関与を明らかにするアプローチの1つであると考えているからである。

以上の研究成果は、参考文献に示したように金溶奎、ハムデイ・タイエ、黄愛萍、黒澤信幸らとの共同研究によって得られた発表報告を基盤としてまとめたものであり、八味地黄丸ならびに六味地黄丸構成生薬は、大峰堂薬品工業株式会社より供与されたものを使用した。ここに感謝の意を表したい。

References

- 1) Kim Yong Kyu and Ogita, Z.: The physiological Effect of Musk Ether Extracts. *Proc. Symp. WAKAN YAKU* **14**, 167-171, 1981.
- 2) Taie, H. and Ogita, Z.: A significant effect of Hachimi-zio-gan on arginine aminopeptidase in mice submaxillary gland. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **2**, 411-417, 1985.
- 3) Taie, H. and Ogita, Z.: The effect of Rokumi-gan on arginine aminopeptidase in submaxillary gland of mice. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **3**, 143-147, 1986.
- 4) Taie, H. and Ogita, Z.: Responsiveness of mouse submaxillary gland arginine aminopeptidase to Aconiti tuber extract. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **3**, 177-183, 1986.
- 5) Huang, A. and Ogita, Z.: Androgen-dependent effect of Rehmanniae Radix on trypsin-like protease of the mouse submaxillary gland. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **5**, 191-199, 1988.
- 6) Huang, A. and Ogita, Z.: A circannual rhythm in trypsin-like protease activity of the mouse submaxillary gland and the influence of the Oriental medicines on it. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **6**, 20-26, 1989.
- 7) Huang, A. and Ogita, Z.: The effect of Gomi-gan on trypsin-like protease of the mouse submaxillary gland. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN YAKU* **6**, 58-63, 1989.
- 8) Huang, A. and Ogita, Z.: Sexual difference in enzyme activities in the mouse. *Physico-chem. Biol.* Vol. **33**, 47-53, 1989.
- 9) Kurosawa, N. and Ogita, Z.: Method for the detection of substrate-specific protease activity absorbant of substrate by using cellulose acetate membrane as a absorbant of substrate. *Physico-Chem. Biol.* vol. **32**, 49-54, 1988.
- 10) Kurosawa, N. and Ogita, Z.: Classification of mouse submaxillary gland esterase activities by their substrate specificities. *Electrophoresis* **10**, 189-194, 1989.
- 11) Kurosawa, N. and Ogita, Z.: Saliva proteases, useful marker enzyme for androgen. *Physico-Chem. Biol.* Vol. **33**, 55-60, 1989.
- 12) Kurosawa, N. and Ogita, Z.: Gene expression analysis in mouse submaxillary gland. *Electrophoresis* Vol. **35**, No. 5, 1991.
- 13) Shinohara, T. and Ogita, Z.: Pharmacological action of *monnidris fructus* L. (unpublished 1994)

1) Kim Yong Kyu and Ogita, Z.: The physiological Effect of