第53回日本東洋医学会学術総会

第15回日本東洋医学会奨励賞受賞講演

子宮内膜発癌に対する十全大補湯の抑制作用

丹羽 憲司

岐阜大学医学部臓器病態学講座女性生殖器学分野, 岐阜, 〒500-8705 岐阜市司町40

Preventive Effects of Juzen-taiho-to on Endometrial Carcinogenesis in Mice

Kenji NIWA

Department of Obstetrics & Gynecology and Pathology, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu-city 500-8705, Japan

Abstract

Two experiments were conducted to determine effects of Juzen-taiho-to on endometrial carcinogenesis in mice. In the first experiment, Juzen-taiho-to treatment (2 weeks) decreased the levels of estradiol-17 β (E₂) - stimulated expression of c-fos/jun mRNA and their oncoproteins, determined by reverse transcription-polymerase chain reaction and Southern blot analysis, and immunohistochemical method, in the uteri of ovariectomized mice. For the second experiment, 93 female ICR mice were given N-methyl-N-nitrosourea (MNU) solution (1 mg/100 g body wt.) and normal saline (as controls) into their left and right uterine corpora, respectively, and were divided into four groups. Group 1 was given 0.2% Juzen-taiho-to and 5 ppm E₂-containing diet. Group 2 was given 5 ppm E₂-containing diet alone. Group 3 was exposed to 0.2% Juzen-taiho-to containing diet alone. Group 4 was kept on the basal diet alone and treated as a control. Juzen-taiho-to treatment significantly decreased incidences of the uterine endometrial atypical (P<0.01), complex (P<0.05) and simple hyperplasias (P<0.01), under estrogenic stimulation. It is suggested that Juzen-taiho-to has an inhibitory effect on E₂-related endometrial carcinogenesis in mice, relevantly through suppression of estrogen-induced c-fos/jun-expression.

Key words : Juzen-taiho-to, prevention, c-fos/jun, endometrium, mice.

要旨

エストロゲン過剰刺激によるマウス子宮内膜癌モデルには c-fos/jun や内因性サイトカイン IL-1 α , TNF- α や COX-2 の変動も関与していると考えられる。内膜発癌の化学予防に十全大補湯漢方製剤が有効であり、その抑制作用の主成分は四物湯であると推察された。

一方、ヒトにおけるタイプIの子宮内膜癌の予防にはエストロゲン刺激を避け、子宮内膜増殖症の時点から管理していくことが重要であり、十全大補湯などの漢方を含む薬物による化学予防の実際の対象は内膜増殖症を有するハイリスクグループであると考えられる。

キーワード : 十全大補湯, 化学予防, c-fos/jun, 子宮内膜, マウス

佐藤 選考委員長をさせていただきましたけれども、奨励賞はお2人受賞されるということになりました。丹羽憲司先生をご紹介させていただきたいと思えます。

丹羽先生は、岐阜大学の産婦人科の玉舎教授のご一門でございすけれども、昭和60年3月に岐阜大学医学部をご卒業になり、病理学第1講座の大学院に入学され、平成元年に医学博士を取得しておられます。平成元年から産婦人科文部教官助手、それから講師併任で平成13年から外来医長になっておられ

ます。

日本産婦人科学会認定医、日本東洋医学会会員、日本内分泌学会代議員、日本臨床細胞学会指導医、評議員等々、それから日本ステロイドホルモン学会評議員、日本生殖内分泌学会評議員、日本産婦人科腫瘍学会評議員等を務めておられます。ご専門は婦人科腫瘍病理学、東洋医学ということで、今回は「子宮内膜発癌に対する十全大補湯の抑制作用」というのが受賞の論文になっております。いくつかの英語の原著論文を出しておられまして、いくつか出され

たのがすべて評価されたと私は理解しております。

それでは、ただいまから丹羽憲司先生の奨励賞受賞講演を拝聴させていただきたいと思います。先生、よろしくお願いします。

丹羽 座長の佐藤先生には過分な紹介ありがとうございます。このたびは大変名誉ある日本東洋医学会奨励賞をいただきまして、まことにありがとうございます。日本東洋医学会石橋会長、荻原会頭をはじめ、会員の先生方にここにあらためて御礼申し上げます。

荻原会頭の本学会の抄録巻頭のご挨拶にもありますように、米国におきまして1994年のFDAによります栄養補助食品法案の承認によりまして、complementary and alternative medicineとしての伝統医学が見直されてきております。つい先日まで米国出張しておりまして、ASCO meetingの参加、MD Anderson Cancer CenterとMoffit Cancer Centerでの研修の機会を得ました。その際、世界最大のCancer CenterのGynecologic Oncologistsの先生方も漢方治療に興味を示しておられました。前置きはそれくらいにしまして早速始めさせていただきます。

「子宮内膜発癌に対する十全大補湯の抑制作用」ということで、講演させていただきます。日本で食事の欧米化とともにライフスタイルの変化によりまして、子宮内膜癌は増加傾向にございますので、内膜発癌をターゲットとして実験しています。

まず漢方とchemoprevention(化学予防)ですけれども、癌は遺伝子の病気で、多くの癌関連遺伝子の

集積として発生いたします。ヒトの発癌には食事、喫煙、炎症の3因子が主に挙げられ1次予防としては14か条、植物性食品とか肥満を避けるのかも重要で、さらにももちろん禁煙も入っております。ハイリスクグループを対象とした薬剤による癌のchemopreventionも重要でありまして、古来から漢方医学で「未病を治す」と呼ばれる発想は、最近の西洋医学におけるchemopreventionと目標を同じくしていると考えております。

さてこれから大きく3つに分けてお話をしたいと思いますが、もともと有効なモデルのなかった子宮内膜癌モデルを作りまして、数年前は甘草エキスとグリチルリチンの影響を検討しておりましたので、まずそのお話をして、そのあとが今回のメインの内容でございます十全大補湯のchemopreventionの話をする予定でございます。そして、分子生物学的なアプローチのことで、最終的には人間のための研究をしておりますので、人間におけるchemopreventionの可能性をお話したいと思っております。

まずヒトの子宮内膜癌のリスクファクターについて述べますと、高齢やエストロゲン単独のHRTなどがございすけれども、ほとんどエストロゲンに関連したものがリスクファクターとしてあげられます。プロゲステロゲンの裏打ちのないエストロゲンの上昇が内膜癌のリスク因子にあると考えられております。

ヒトの内膜癌は大きく2つに分けられると考えられ、Type Iは若年発症で増殖期内膜から発生し、

エストロゲンの持続刺激によってびまん性に増殖してまいります。通常はER, PgR 陽性で、予後良好です。全体の70~80%を占めると考えられています。Type II といわれているものは高齢発症の傾向があり、萎縮内膜から発生し、エストロゲン依存性が乏しく、ER, PgR 陰性で、一般に予後不良と考えられています。

内膜癌のモデルですが、胃、大腸、肝臓、肺など、ほとんどすべての臓器に対してラットやマウスのゲッ菌類を用いた動物実験モデルはありますが、卵巣と脾臓と子宮内膜の有効なモデルはないと言われていました。そこで、我々は子宮内膜癌モデルの開発を始めました。

図1のように、発癌の Two step theory に基づきま

して、initiation は N-methyl-N-nitrosourea (以下 MNU) という内分泌や神経系に腫瘍を発生しやすい DNA に直接作用する carcinogen を用いております。Promotion phase に天然最強のエストロゲンである estradiol-17 β (以下 E₂) を混餌投与しております。MNU は 1 mg/100g 体重で、E₂ の投与量は 5 ppm としました。そうしますと、図2左のような内膜病変が発生してまいります。

こういった病変を顕微鏡で研究して診断しますと、ヒトの子宮内膜増殖症とか腺癌に形態的に大変類似しています。こういった病変を4病変に診断しました。図3左のような大小の嚢胞状の腺管の拡大を認め、いわゆる Swiss cheese like といわれる endometrial hyperplasia simple といわれる病変です。図3右は、

図2

図3

腺管と腺管の背中が合ったような, back-to-back の配列を取った endometrial hyperplasia complex の診断となりました。

こういった病変は, 癌ではありませんので, エストロゲン投与によって頻繁に90%以上に発生してまいります。

さらに, 図4左のように細胞異型が伴ってくるのが atypical endometrial hyperplasia という病変であります。さらに構造異型とか細胞異型を伴って浸潤癌となったのが図4右で, 腺癌と診断しております。

次に, 図5のように内因性エストロゲン欠乏状態にしたマウスに, エストロゲンに加えて, 被験物質を投与し, その影響を検討しております。方法としては RT-PCR 法にサザン・プロットで発現を比較し, 蛋白発現とその局在は免疫染色で確認しております。

エストロゲン・レセプターを介して通常 classical な estrogen responsive element を介して作用を発揮す

ると考えられていたのですが, 1997年に Peach らが, 抗エストロゲン剤が, エストロゲン・レセプターを介して c-fos や c-jun という dimmer を形成する, activating protein-1 (AP-1) サイトの方が, 比較的 rapid で major な route であると報告しています。という訳で, まず, c-fos/jun の mRNA, 蛋白発現を検討することにしました。

さらに, サイトカインに関しては, 大腸発癌や子宮内膜発癌に関係する pro-inflammatory factor と呼ばれるサイトカインのうちの, IL-1 α と TNF- α の変動が発癌に密接に関係しているといわれておりましたので, これらも検討することにしておりました。

また, 最近の prevention で重要と言われております, アラキドン酸からプロスタグランジン産生に至る律速酵素である COX-2 という酵素が, 炎症や発癌に関係するといわれておりまして, この COX-2 の発現も検討しております。

図 4

図 5

実際、数年前に行った実験ですが、甘草エキスと
いいますと、漢方方剤の日本にある方剤の約75%に
含まれており、その甘草エキスの主成分がグリチルリ
チンで、重量比で約10%ですが、この甘草エキス
とグリチルリチンに関してまず検討しました。漢方
薬は経口で内服しませんと代謝されて効果を発揮し
ませんので、エストロゲンに混餌投与しまして、食
餌としてマウスに自由摂取させております。

short-term の実験は卵巣摘出マウスに対して、E2
は5 ppm で甘草エキスは0.625%で、グリチルリチ
ンは0.0625%、先程の *c-fos*/*jun*, *IL-1 α*, *TNF-α*, *COX*

-2 発現に関して検討しました。

図6が短期実験で、甘草エキスとグリチルリチン
の影響を観察しましたが、エストロゲン単独ですと、
コントロールレベルに比べて当然有意に発現が増加
しますが、甘草を併用投与しますと有意に抑制しま
して、これはRT-PCR とサザンブロットの結果です
が、グリチルリチンにおきましても有意に抑制して
おります。甘草の方がよりいっそう抑制率が高かっ
たということです。

図7に示すように *IL-1 α* 発現に関しては、E2 投
与によって過剰発現して、甘草、グリチルリチン併

図6

図7

用投与により有意に抑制されています。

図8に示すようにTNF- α 発現も有意に甘草とグリチルリチンで抑制されております。

図9に示すようにCOX-2も有意にE2の過剰発現について有意に抑制されております。

そういったものが蛋白発現も同様な傾向を示しております。こういった背景があり、長期実験を計画しました。実験期間は30週とし、doseは先程の短期実験と同様なdoseで甘草エキスが0.625%でグリチルリチンが0.0625%としました。

図10が最終的な内膜病変の発生頻度です。陽性対

照群は、MNUとestradiolで35%程度のマウスに腺癌が発生しますが、腺癌では甘草やグリチルリチン併用投与で減少傾向を示しました。異型増殖症発生頻度は甘草やグリチルリチン併用投与で有意に発生頻度を抑制しております。ともに甘草エキスの方がグリチルリチンよりも抑制率が高い結果を得ました。

ここまですを一応まとめますと、こういったエストロゲン等によってfos/junなどは発現が亢進し、甘草とグリチルリチンの併用投与でc-fos発現は有意に抑制されました。内因性のサイトカインでありますTNF- α やIL-1 α も甘草エキスとグリチルリチン

図8

図9

の併用投与で抑制されました。COX-2 発現もこのグリチルリチンや甘草で抑制され、異型増殖症の発生頻度を有意に抑制させました。

甘草エキスの主成分はグリチルリチンですが、甘草エキスにはグリチルリチンばかりではなく、他のイソフラボンなども含まれております。そういったイソフラボンの影響もあり、グリチルリチン単独よりも甘草エキスの方が抑制作用が強いのではないかと推察しております。その後の別の実験ですが、イソフラボンで同様の実験を行いました。イソフラボンの genistein と daidzein に関しては、これは実際

には甘草には入っていないのですが、子宮内膜発癌を抑制し、甘草エキスとグリチルリチンの関係を support します。ただし、まだ甘草に含まれているフラボノイドに関しては同様な実験は検討しておりません。

さて、ここからが十全大補湯の話になるのですが、十全大補湯は文献的に見ますと、中国では宋代に最初の記載が認められるそうです。日本では鎌倉時代に伝えられたとされております。日本では主に滋養強壮、いわゆる補剤として使用されております。文献的に、日本、韓国、中国、台湾など伝統医療が行

図10

図11

われている東アジアで最も共通して臨床応用されているのが十全大補湯とのことです。ですが、量や比に関しては、多少の幅がありますが、その応用目標も各国共通といわれているそうです。

実際、現代医療では十全大補湯の適用として、体力、気力ともに衰弱した状態で、具体的には担癌状態や、化学療法、放射線療法を受けているような、いわば人工的虚証といわれるような患者さんが最適な適応となると考えております。

十全大補湯は気血相補剤で、サイトカインの誘導や抗体産生、抗腫瘍作用の効果増強、抗癌剤・放射

線治療等の副作用の軽減が多く報告されております。実験的にも肝転移作用の抑制などが報告されております。そういった多数の基礎的、臨床的な報告があります。

十全大補湯を用いていろいろな検討をしました。実験系は同じですが、まず短期実験では内因性のエストロゲンを除去した状態で、十全大補湯と四物湯、四君子湯、補中益気湯、アスピリンがコントロールです。重量比はネズミが食べてくれる量から算出して、人間の7.5 g/day から、ネズミの体重が35g ぐらいなのですが、そこからネズミの食べる量で計算

図12

図13

したのが十全大補湯は0.2%という dose になりました。そこからあとは重量比で計算してまいりますと、四物湯が0.08%, 四君子湯が0.07%, 補中益気湯が十全大補湯と同じで0.2%というふうにして実験を組み立てました。ターゲットは先程の fos/jun とサイトカインと COX で、同じように実験を行いました。

c-fos mRNA の発現に関しては、図11に示すように E2 投与により過剰発現し、十全大補湯と四物湯併用投与では有意に抑制されますが、四君子湯投与により、c-fos mRNA 発現はむしろ増加しました。

図12が IL-1 α mRNA 発現ですが、十全大補湯と

四物湯では有意差をもって抑制しましたが、四君子湯ではこれもむしろ逆に発現が増加しております。

図13が TNF- α mRNA というサイトカインですが、E2 で過剰発現しまして、これは十全大補湯が1番、四物湯が2番で四君子湯も抑制しております。

図14が COX-2 の発現ですが、COX-2 の発現も十全と四物湯併用で E2 で過剰発現したものを抑制していますが、四君子湯はむしろ増加しております。

このような短期実験の結果に基づきまして、図15のような長期実験を計画しました。十全大補湯と四物湯はおそらく抑制効果を示すだろうということで

図14

図15

行いましたが、補中益気湯はメカニズムが違います。比較的癌化を抑制するような報告がありますので、補中益気湯で長期実験は考えました。

方法としては同じですが、carconogenを投与しまして、エストロゲンと十全と、あと漢方方剤を併用で、混餌投与しまして、30週で子宮摘出して病理学的に検討しました。

図16が最終的な発生頻度の比較ですが、これが陽性コントロールで、MNUとE₂により発生した、前列が腺癌で後ろが異型増殖症です。十全大補湯は有意に抑制しております。腺癌も異型増殖症の発生頻

度も抑制しております。四物湯も同じような傾向を示しておりますが、補中益気湯併用投与では腺癌はほとんど変わらずに、異型増殖症はむしろ増えてしまっております。

ここで少しまとめますと、十全大補湯と四物湯投与によって、c-fos発現は有意に抑制されました。四君子湯に関してはむしろ発現増加したようなところも多々ありました。サイトカインも同じような傾向を示しまして、長期的に十全大補湯と四物湯の併用によりまして子宮内膜癌と異型増殖症は発生頻度を有意に減少せしめました。

図16

図17

しかし、四君子湯ベースの補中益気湯投与による影響はほとんどなかったということでした。

十全大補湯と四物湯が抑制効果を示しました。ですから、これを構成成分から考えますと、今回の十全の抑制効果は四物湯がまずベースにあるだろうと考えられました。

補中益気湯は四物湯ベースの薬がほとんど含まれておらず、四君子湯がベースの薬ですので、抑制効果をあまり示さなかったのではないかと思われました。

十全大補湯は、マウスの子宮内膜発癌に対して抑制的に作用しました。AP-1 site を形成します c-fos/jun ばかりでなく、サイトカインの発現も抑制して、COX の発現も関与していることが示唆されました。十全の抑制作用のメインパートは四物湯と思われました。四君子湯の影響はあまりはっきりしないというか、抑制効果は認めませんでした。

まとめを図17に示します。プロゲステロンの裏打ちのないエストロゲンの上昇が、正常子宮内膜から内膜増殖症、内膜癌に進みまして、主に抗エストロゲン作用と考えられます fos/jun の発現抑制から抗炎症作用と考えられます IL-1 α 、TNF- α の発現抑制、COX-2 の発現抑制などが関与しているものと考えられました。十全大補湯としましては、四物湯、四君子湯に黄耆、桂皮が入っておりまして、四物湯単独よりもほかの成分が入っていた方が十全大補湯としての作用でよりいっそう効果的だと考えられました。

動物実験をヒトの実際の臨床にあてはめまして、人間のことを考えたいと思ひまして、ヒトの子宮内膜発癌に対する化学予防剤としての十全大補湯の可能性ということで一部研究を開始しています。当然、当大学倫理委員会の承認を得ています。対象としましては若年性の子宮内膜異型増殖症患者や内膜腺癌初期の1A期の患者さんで妊孕性温存希望が強い方を対象に十分な説明と同意を得て行っております。全面掻爬プラス黄体ホルモン療法が、若年性の温存の方に対しては現在のスタンダードと考えられておりますので、これをやらないとさすがに倫理的に問題がありますので、ここにプラス抗凝固作用を擁するアスピリン、それから十全大補湯などを投与して、その効果を COX-2 発現も検討中です。

COX-2 mRNA 発現はアスピリンと十全大補湯の

併用で減少傾向を示しました。臨床効果といいますが、通常は6カ月の治療が行われるものですが、まだ治療中で、治療期間の短縮等々に関する臨床効果に関しては、まだ全くデータは出ておりません。

今後は子宮内膜癌の全癌病変と考えられる、endometrial hyperplasia complex で、これは放置しますと約30%が癌化を示すといわれておりますが、こういった排卵障害を有するような患者さんの内膜増殖症などがターゲットになると考えておりますので、今後はそういった方を対象に症例を重ねたいと思っております。

最後に、マウスの子宮内膜発癌に対して十全大補湯は抑制的に作用しまして、その抑制作用は fos/jun やサイトカインや COX-2 の発現も関与していました。十全の抑制作用のメインは四物湯にあると考えられました。ヒトの子宮内膜発癌に対しても臨床応用の可能性があるものと考えております。

今回、講演の機会を与えてくださいました東洋医学会会頭の荻原先生に深謝いたします。また、座長の労をお取りくださいました佐藤先生に深謝いたします。このたびは日本東洋医学会奨励賞をいただきまして、本学会の会員の先生方に深謝いたします。今回の発表内容はもちろん私だけではなく、玉舎教授の指導の下で村瀬先生や森下先生、橋本先生、田上先生、連 先生、高 先生などの共同研究で行われたものをまとめたものです。

今回の研究の一部は科研費や日本漢方医学研究所の研究予算によっております。使用した漢方方剤の原末はすべてツムラから提供いただきました。以上でございます。ありがとうございました。

佐藤 どうもありがとうございました。子宮内膜発癌に対する十全大補湯の抑制効果ということで、まずマウスで発癌モデルを作られまして、甘草、さらには十全大補湯ということで、いろいろなマーカー、c-fos/jun や TNF- α なども測られ、さらに形態的にも確かめられたということです。

現在、さらに臨床応用も考えているということになっておりまして、大変すばらしい研究であると思ひます。ぜひ今後も研究を進められて、なおいっそう漢方医学、それから最終的には患者さんの癌の予防、治療に役に立つということが期待されるころであります。どうもありがとうございました。