

201008022A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

貧血用漢方薬の作用メカニズム解析と有効成分の同定に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 杉山 大介

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告 貧血用漢方薬の作用メカニズム解析と有効成分の同定に関する研究----- 杉山 大介	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	27

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（総括）研究報告書

貧血用漢方薬の作用メカニズム解析と有効成分の同定に関する研究

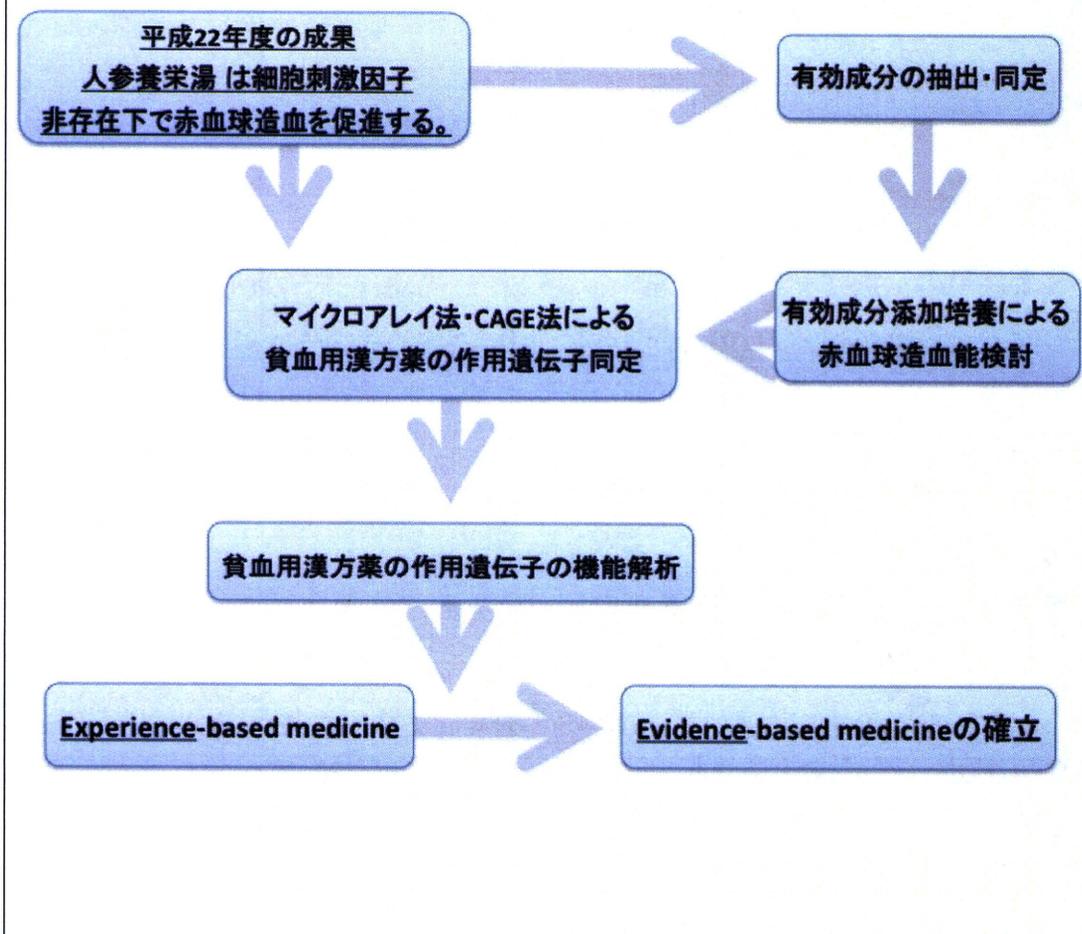
研究代表者 杉山 大介 九州大学大学院医学研究院准教授

研究要旨

貧血疾患の治療においては、造血因子 Erythropoietin (EPO) の導入、免疫抑制剤の開発、造血幹細胞移植療法開発により、治療成績が飛躍的に向上した。ドナー不足、移植片対宿主病、拒絶など造血幹細胞移植療法は未だ問題を抱えているにも関わらず、造血幹細胞移植療法以外に治療が奏功しない難治性貧血が存在する。再生不良性貧血や不応性貧血を含めた一部の難治性貧血に漢方薬が奏功し、症状の緩和・検査データの改善を認めるものの、その作用機序解明は発展途上である。現在、申請者研究室では赤血球系造血を中心に研究を推進している。ゼブラフィッシュを低温飼育する事で、新規貧血モデルを確立し、マイクロアレイ法を用いて赤血球系細胞の分化マーカーである Gm16515 を同定した (Kulkeaw et al., Biochem Biophys Res Commun, 2010)。また、赤血球系造血が盛んな胎仔肝臓より新規生理活性ペプチド KS-13 (特願 2009-224088) を考案し、そのシグナル解析より赤血球系細胞の分化マーカーである Prox2 を同定し、解析を継続している。本申請提案では、平成 22 年度、マウス造血細胞へ貧血用漢方薬として代表的な四物湯類を添加培養し、細胞増殖を指標に赤血球系造血へ与える影響を検討した。その結果、人參養榮湯は細胞刺激因子非存在下で赤血球系造血を促進する事が明らかになった。平成 23 年度は、人參養榮湯の成分に注目し、有効成分の抽出・同定を試みると共に、添加培養した造血細胞群とコントロール群において、遺伝子発現の差異をマイクロアレイ法により解析する。CAGE (Cap Analysis Gene Expression) 法は、mRNA の 5' 末端から 27 塩基をタグとして切り出す技術で、高速シーケンシング技術との組み合わせによりゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルが得られるだけでなく、マイクロ

アレイ法では解析が困難だった転写因子ネットワークの解析及び新規遺伝子の同定を可能にした。そこで減額された予算内で可能であれば、マイクロアレイ法に加えて CAGE 法も行い、貧血漢方薬投与により特異的に変動する遺伝子を同定する。

(流れ図)



A. 研究目的

東洋漢方薬は2000年以上にわたり、さまざまな疾患への治療に使用されてきた。日本においても漢方薬は臨床の場で患者投与されてきた。漢方薬は古代中国にルーツを持つが、日本でも5,6世紀より独自に発展し、日本の古代医学となり、日本文化に浸透した。漢方薬の投与は正式には漢方医学と一般的に呼ばれるが、習慣的には「漢方」という言葉だけで漢方薬・漢方医学を指す。漢方薬は菌類・きのこ類 (fungi)、ミネラル・無機物質と同様、葉, 花, 芽, 幹, 枝や植物の茎といった自然のソースの由来の生薬の配合により調合される。たった一種類の生薬では効力が限られ、副作用が出る可能性があるため、漢方薬は病態や患者の状態に合わせ、数種類の生薬を配合して作られる。配合により、総合的な治療効果が得られ、個々の生薬の副作用は減少する。最近日本において、漢方医学は治療にしばしば使用されている。しかしながら血液学の分野においては、漢方薬の効果をもたらす分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

貧血用漢方の基本薬は補血剤と言われる四物湯であり、人参養栄湯・十全大補湯は四物湯類に属する。人参養栄湯はマウス投与により造血前駆細胞の増加を認め、試験管内では間葉系細胞へ影響し二次的に造血能亢進を認める。また、十全大補湯は間葉系細胞における接着因子の発現を亢進し、造血前駆細胞の増加を認める。1997年 Hisha らは、その有効成分はオレイン酸、リノレン酸であると報告している。2006年北村らは、人参養栄湯・十全大補湯共に再生不良性貧血や不応性貧血に対して優位な改善効果は認められないものの、EPOを併用する事で赤血球の増加を有意に認めたと報告している。しかしながら、その分子生物学的作用機序は国内外共に報告は無く不明である。現在まで赤血球の分化段階は、細胞形態とFlow cytometryによる細胞表面抗原の発現、造血転写因子の遺伝子発現により解析されてきた。申請者は独自の解析から、新規赤血球分化マーカーとしてGm16515とProx2を同定した。そこで、人参養栄湯、十全大補湯、四物湯各々を添加した培地でマウス・ヒト造血細胞単独、あるいは間葉系細胞やストローマ細胞株との共存で培養し、赤血球造血亢進の有無に関して、従来の解析方法に、real-time PCR法によるGm16515とProx2の遺伝子発現解析を加える。造血亢進が認められた条件において有効成分の抽出・同定を試みると共に、マイクロアレイ法と、最先端の分子生物学的手法の1つであるCAGE法により、特異的に変動する遺伝子を同定する。更に、同定した遺伝子のvector

を構築し、造血幹細胞などの標的細胞へ遺伝子導入して機能解析を行う事で作用メカニズムを解明する。Gm16515 と Prox2 は申請者が同定した新規赤血球分化マーカーであり、本研究により申請者独自の結果が得られる可能性が高い。また CAGE 法と次世代シーケンサーによる高速シーケンシング技術を組み合わせた漢方薬作用メカニズムに関する遺伝子プロファイリングは、申請者が知りうる限り報告は無い。試薬は既に（株）ツムラより提供されており、申請者は優位な状況にある。当該研究期間において、前半2年間に、マウスにおける研究成果を蓄積し、最後の1年間でヒト細胞を用いた実験への移行を目指す。

B. 研究方法

1. 貧血用漢方薬添加培養実験と有効成分の抽出・同定

<平成23年度：マウス実験；平成24年度：ヒト実験>

研究計画に従い、平成22年度はマウス造血細胞へ人参養栄湯、十全大補湯、四物湯、大防風湯を添加培養し、細胞増殖を指標に赤血球系造血へ与える影響を検討した。C57BL6/J マウスより骨髓を採取し、リンフォプレップ試薬を用いて単核球を調整した。15%FBS含有IMDM培地を基本培地とし、赤血球誘導条件(サイトカイン EPO 20ng/mL、SCF 20ng/mL、IL-3 20ng/mL)を陽性コントロールとした。各々の漢方を蒸留水に溶解した後、低濃度 10 µg/mL 及び高濃度 100µg/mL の濃度で添加し、骨髓単核球細胞を12日間培養した。低濃度、高濃度、両条件において、サイトカイン添加陽性コントロールには劣るものの、すべての漢方は細胞増殖活性を認めた。4つの漢方の中で、人参養栄湯は低濃度、高濃度共に細胞増殖活性が一番高かった。現在、人参養栄湯の構成成分の調整を行っており、準備が整い次第、各々の成分を添加した培養の実験に着手する。

Flow cytometry を用いて、マウス胎生期肝臓造血幹細胞集団 (CD45+/Sca-1+/c-Kit+) と骨髓造血幹細胞集団 (Lin-/Sca-1+/c-Kit+) を純化・採取し、赤血球誘導条件(サイトカイン EPO/SCF/IL-6 あるいは IL-3 添加)において、人参養栄湯の構成成分を主として添加液体培養及び半固形培養(コロニー形成法)を行う。液体培養に関しては、7日間培養の後、細胞数、Flow cytometry による細胞表面抗原発現解析 (CD71/Ter119)、real-time PCR 法による遺伝子発現解析 (*gata2*, *klf1*, *hemoglobin*, *gm16515*, *prox2*) により評価する。半固形培養に関しては、赤血球系のコロニー (CFU-E 及び BFU-E) の形成数により評価する。両者により赤血球系造血能亢進を認めた条件において、四物湯の基本構成生薬である当帰、芍薬、地黄、川きゅう4種類に加え、人参養栄湯に特有の生薬エキスを添加培養し、同様の手法で評価する。亢進を認めた条件において、生化学的手法を用いて有効成分の検討を行う。有効成分の絞り込みの過程では、同様の培養を用いる。人参養栄湯・十全大補湯は間葉系細胞へ作用すると報告されている。赤血球系造血能亢進が認められない場合、マウス骨髓間葉系細胞及びストローマ細胞株 (OP9) と上記純化・採取した細胞集団を共培養する事で、赤血球系造血の亢進が認められるか検討する。ここで亢進が認められない場合、他の四物湯類である当帰芍薬散、四君子湯類(六君子湯、加味帰脾湯)、大防風湯などについても検討を行う。平成23年度でマウス細胞

の実験を終了し、その結果を元に、同様の手法をヒト臍帯血 CD34 陽性細胞（理化学研究所バイオリソースセンターより購入）を用いて検討し、ヒトにおける評価を行う。

2. マイクロアレイ法・CAGE 法による作用遺伝子同定 <平成23～24年度>

赤血球系造血能亢進を認めた条件と漢方不添加コントロール群を用いて、培養1～3日目のサンプルを採取する。tRNAの抽出を行い、マイクロアレイ法を行う。また、予算上支障が無ければCAGE法（理研オミックス委託）も行う。間葉系細胞との共培養条件においては、間葉系細胞もサンプルに追加する。また、サンプリングのタイミングは、血球細胞においては *gata2* や *klf1* の遺伝子発現が高くなっている時期を狙う。得られたデータに関しては、*in silico* 解析を行い、作用遺伝子の候補を50程度抽出する。CAGE法で用いたtRNAサンプルよりcDNA合成を行い、候補遺伝子に関して real-time PCR 法を用いて遺伝子発現を比較検討する。発現差の高い遺伝子を抽出し、10以下の遺伝子に絞り込む。次に、各々の遺伝子に対する vector の構築を行う。構築した vector をリポフェクション法、電気穿孔法、レンチウイルス感染法を用いて、胎仔及び成体造血幹細胞集団、多能性幹細胞へ遺伝子導入を行う。遺伝子導入後、1～2週間赤血球誘導条件及びサイトカイン無添加条件で培養し、赤血球系細胞の亢進が認められるか検討する。評価は形態、Flow cytometry、遺伝子発現により行う。また、対応する RNAi をデザインし、先の細胞集団へ遺伝子導入を行い、培養において分化が抑制されるか検討する。良好な結果が得られなかった場合は、残りの候補遺伝子より再度遺伝子の絞り込みを行う。

<材料と方法>

漢方の調整

人参養栄湯、四物湯、十全大補湯、大防風湯の4種類の漢方薬を実験に用いた。各粉末0.25gを3mLの滅菌水に加え、ボルテックスにて混合した。60℃の湯浴にインキュベートし、溶解するまで15分毎に振とうした。その後、漢方溶解液を5000rpmで5分遠心し、上清のみ0.45μm孔フィルターを通過させた。漢方溶解液の保存濃度は500 μg/mlとし4℃で保存した。

骨髓細胞の単離と培養

骨髓細胞はC57BL/6 (B6) マウスの大腿骨から回収した。細胞はその後、27ゲージ針をゆっくり通し、2% FBS/PBSで2回洗浄した。骨髓細胞は 1.0×10^7 cells/mlで調整した。Lympholyte-Mにより単核球を調整後、 1×10^6 cell/mlの細胞密度で48穴培養プレートに播種、37°C, 5% CO₂にて培養した。培養条件はTable1の通りである。

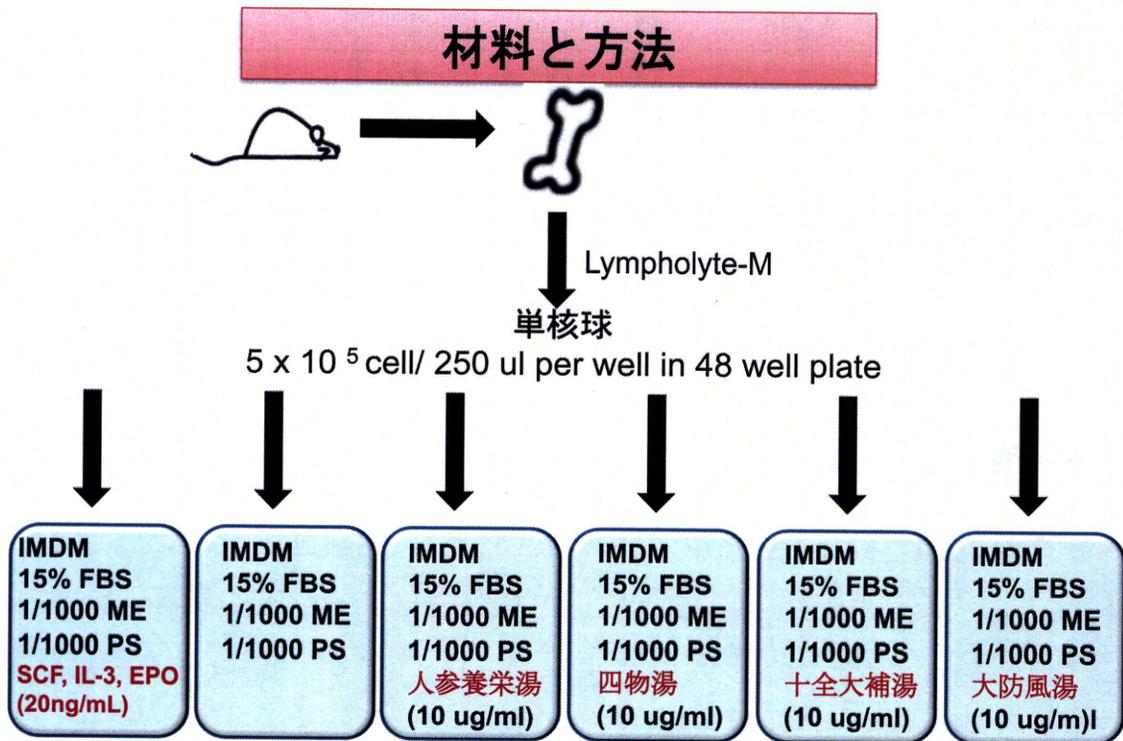


Table1 培養条件

		Negative	Positive	各漢方薬 10 ug/ml	
Stock	Final conc.	1 ml	1 ml	1 ml	
IMDM		848	818	828	ul
100x Penicillin/streptomycin	0.1%	1	1	1	ul
100x β -mercaptoethanal	0.1%	1	1	1	ul
100% FBS	15%	150	150	150	ul
2 ug/ml Epo	20 ng/ml	-	10	-	ul
2 ug/ml stem cell factor	20 ng/ml	-	10	-	ul
2 ug/mL IL-3	20 ng/ml	-	10	-	ul
漢方溶解液 500 ug/ml	10 ug/ml	-	-	20	ul

生細胞の評価

培養4, 8, 11日後にトリパンブルー染色を行い、生細胞を計測した。また培養8, 11日後にPI染色を行い、フローサイトメーター解析を行った。

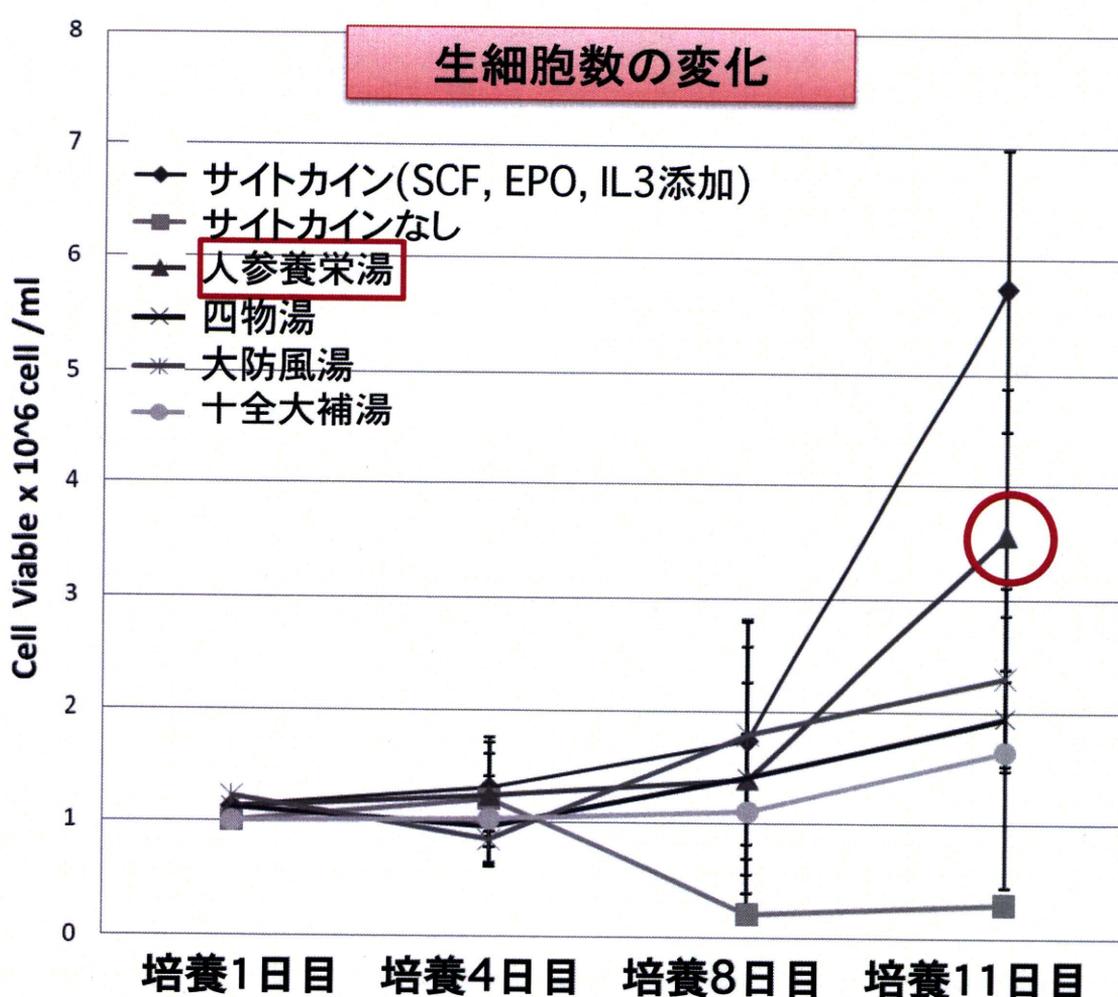
フローサイトメトリーによる赤血球分化評価

漢方薬添加後の赤血球分化はフローサイトメトリー法で評価した。培養細胞はPBS下、室温で30分インキュベートした。細胞は抗マウス Ter119-PE 抗体 (2 μ g/ml)、抗マウス CD71-FITC 抗体 (5 μ g/ml) で染色後、 1×10^4 細胞をデータ取得し FlowJo ソフトにて解析した。

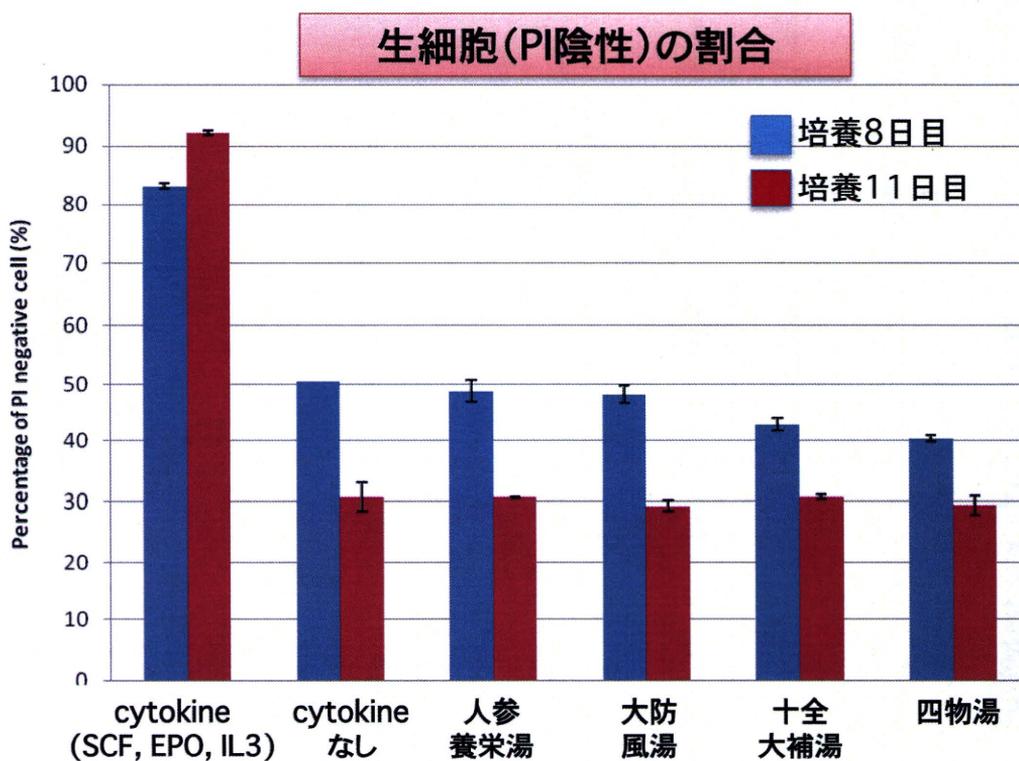
C. 研究結果

単核球の増殖と生細胞の評価

単核球はTable1に示した条件で培養した。造血サイトカイン IL3, SCF, EPO 添加ポジティブコントロール群では生細胞が増加した一方、サイトカイン不添加ネガティブコントロール群では生細胞数が減少した。4種類の漢方添加 (10 μ g/ml) 群のうち、人參養榮湯添加で最も生細胞の増加が認められ、続いて大防風湯、四物湯、十全大補湯の順であった。



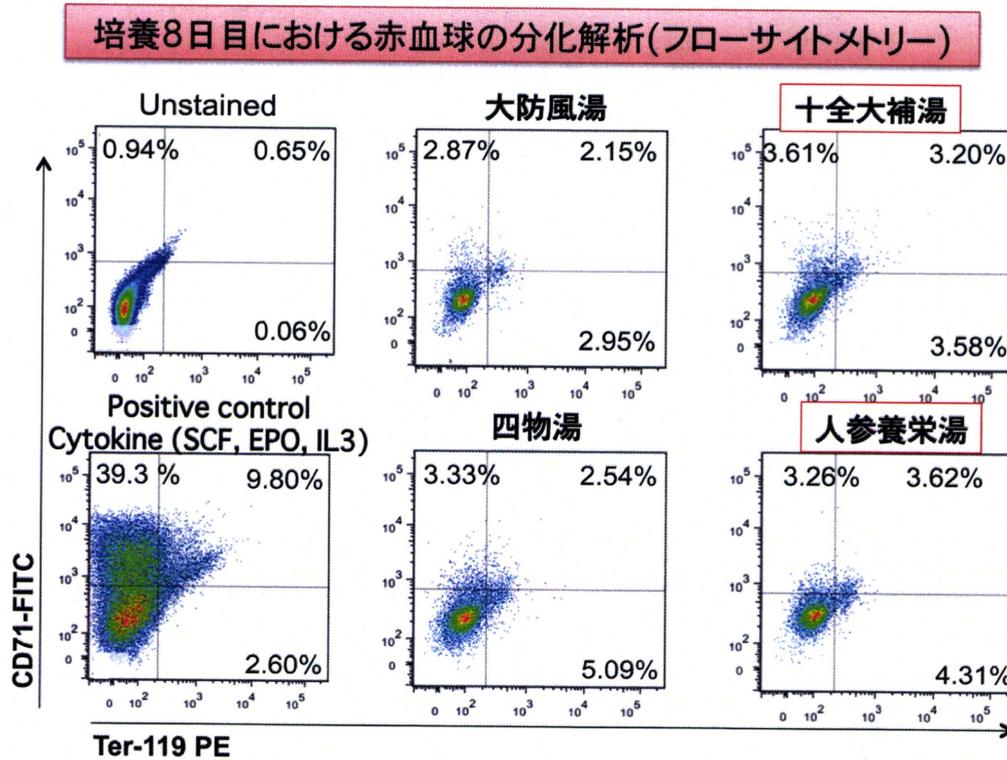
また、培養 8, 11 日目の生細胞の割合について PI 陰性を指標に評価したところ、培養 8 日目で、人参養栄湯と大防風湯はネガティブコントロール（サイトカイン非添加）とほぼ同様の約 50%の生細胞率であったのに対し、十全大補湯と四物湯ではやや低い約 40-43%の生存率であった。また培養 11 日目では4種類の漢方薬添加群はネガティブコントロールと同様の約 30%の生細胞率であった。



赤血球分化の評価

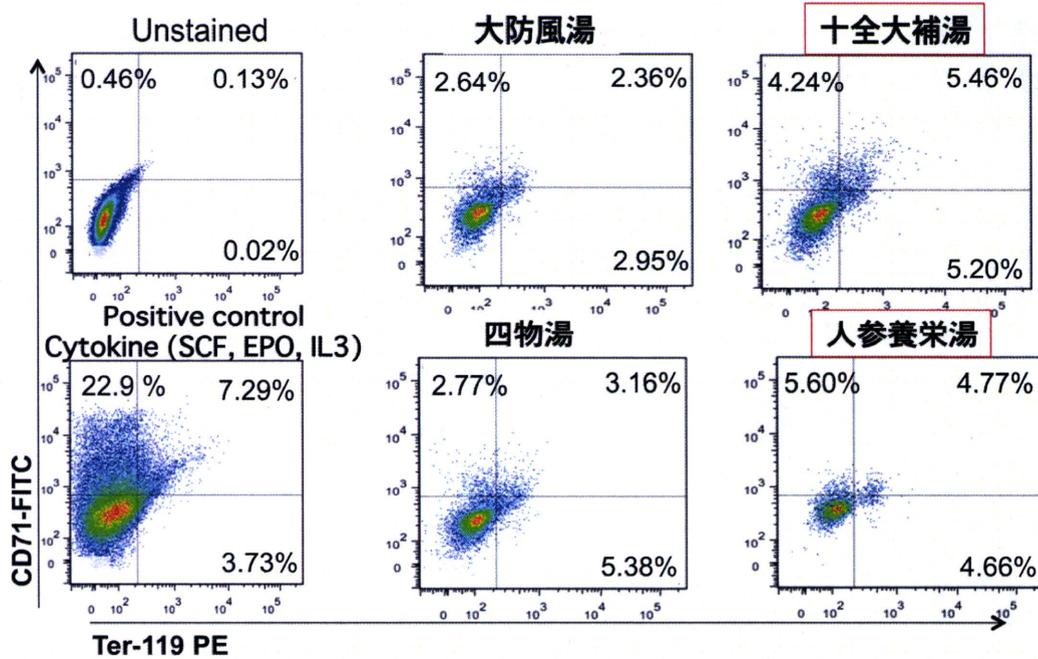
4種の漢方薬を添加後、培養8, 11日目で、CD71(増殖マーカー)、Ter119(成熟赤血球マーカー)発現を検討した。

培養8日目では、CD71陽性細胞は人參養榮湯と十全大補湯で高く(6.8%)、大防風湯では低い割合を示した(5.0%)。またTer119陽性細胞は、人參養榮湯で最も高く(7.9%)、四物湯でも高い割合を示した(7.5%)のに対し、大防風湯では低い割合にとどまった(5.1%)。



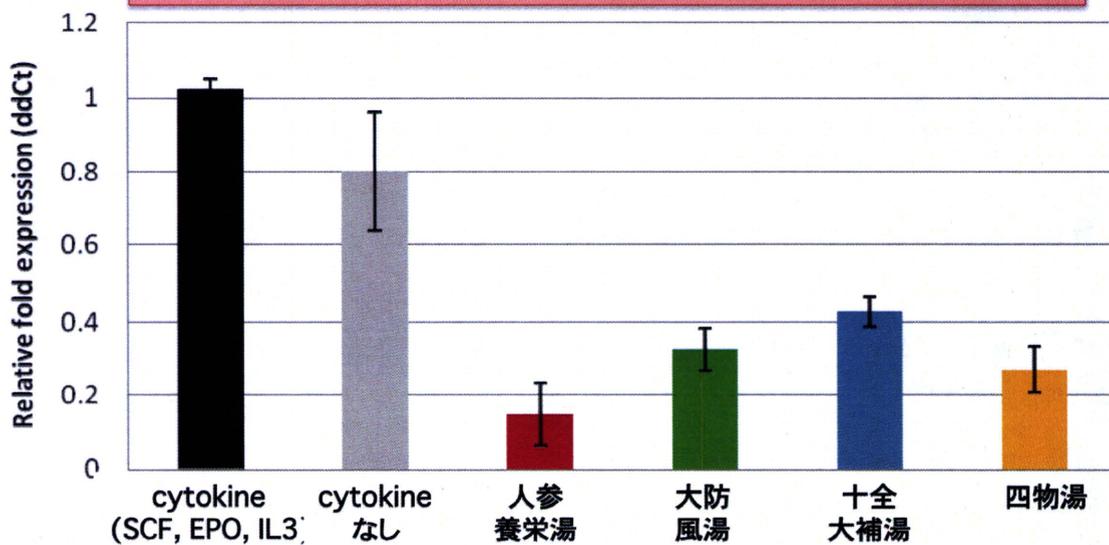
培養11日目では、CD71陽性細胞は人參養榮湯で最も高く(10.4%)、十全大補湯でも高い割合を示し(9.7%)、大防風湯では低い割合を示した(5.0%)。またTer119陽性細胞は、十全大補湯で最も高く(10.7%)、人參養榮湯でも高い割合を示した(9.4%)のに対し、大防風湯では低い割合にとどまった(5.3%)。

培養11日目における赤血球の分化解析(フローサイトメトリー)



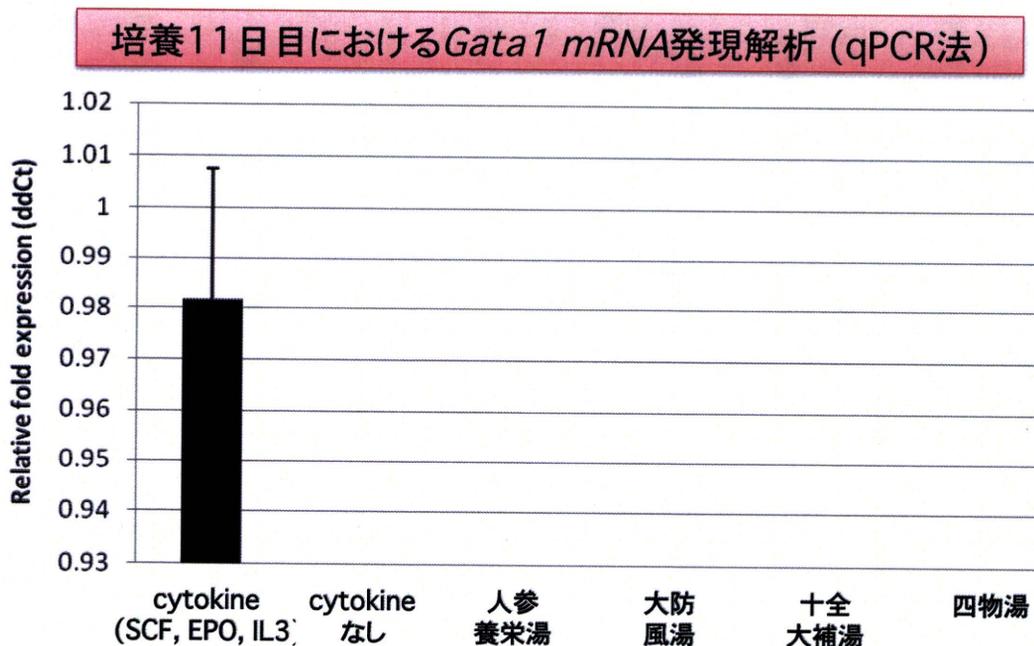
また、4種の漢方薬を添加後、赤血球系特異的な *Gata1*, *Klf1* の mRNA 発現を検討した。

培養4日目における *Gata1* mRNA 発現解析 (qPCR法)

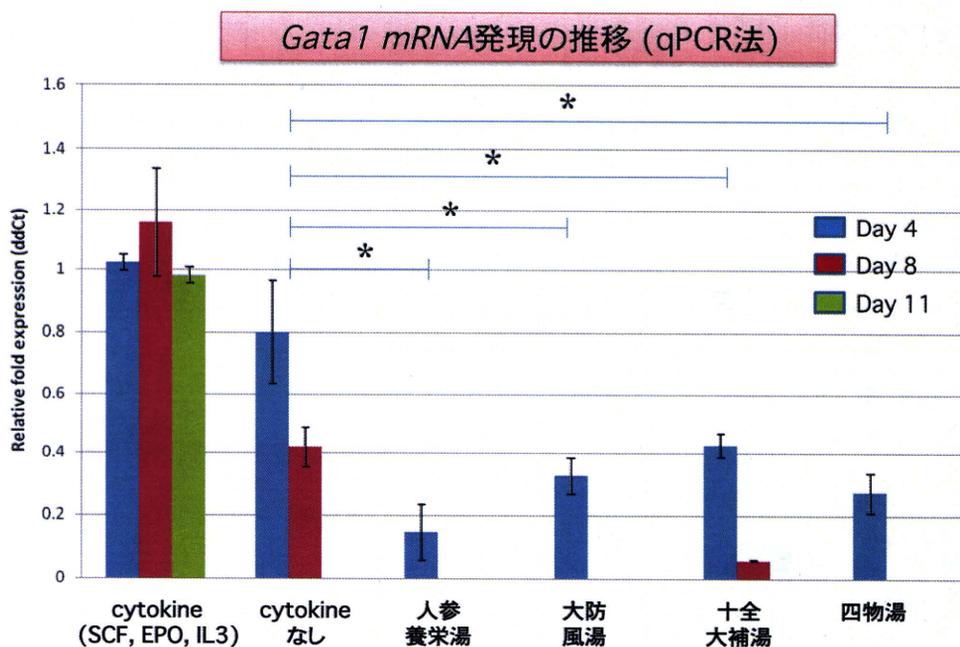


培養4日目では、4種類の漢方薬間では十全大補湯添加群の *Gata1* 発現が最も高く、人参養栄湯では最も低かった。また漢方薬添加群に対しネガティブコントロール（Cytokine 非添加）において *Gata1* mRNA の高発現が認められた。

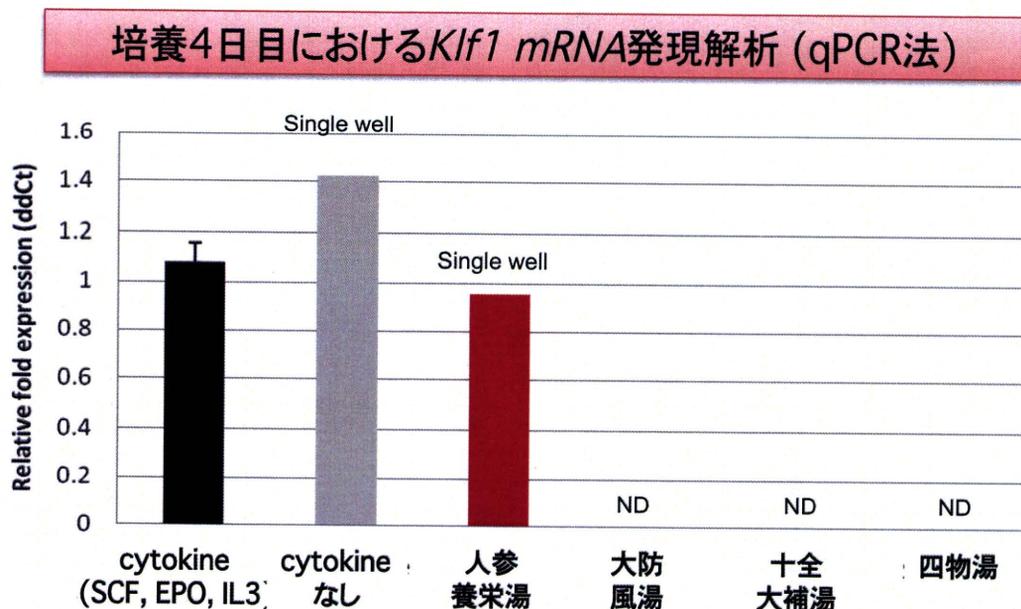
培養8日目では、4種類の漢方薬間では十全大補湯添加群の *Gata1* 発現が最も高く、四物湯では最も低かった。（人参養栄湯、大防風湯は single well でのみの発現確認の為、発現量は低いと判断した。）また8日目においても4日目と同様、漢方薬添加群に対しネガティブコントロールにおいて *Gata1* mRNA の高発現が認められた。培養11日目では、4種類の漢方薬添加群、またネガティブコントロール（サイトカイン添加）群においてのみ認められた。



培養4, 8, 11日目での *Gata1* mRNA 発現の推移を下図にまとめた。ポジティブコントロール群を参照すると、培養8日目で *Gata1* mRNA の発現が最も高く、この時期に赤血球造血が最も盛んだと考えられた。4種類の漢方薬添加群ではどの群においても、ネガティブコントロールと比較した場合、有意差が認められた。また4種類の漢方薬間では培養4, 8日目共に十全大補湯添加群の *Gata1* 発現が最も高く、人參養栄湯ではその発現が最も低かった。

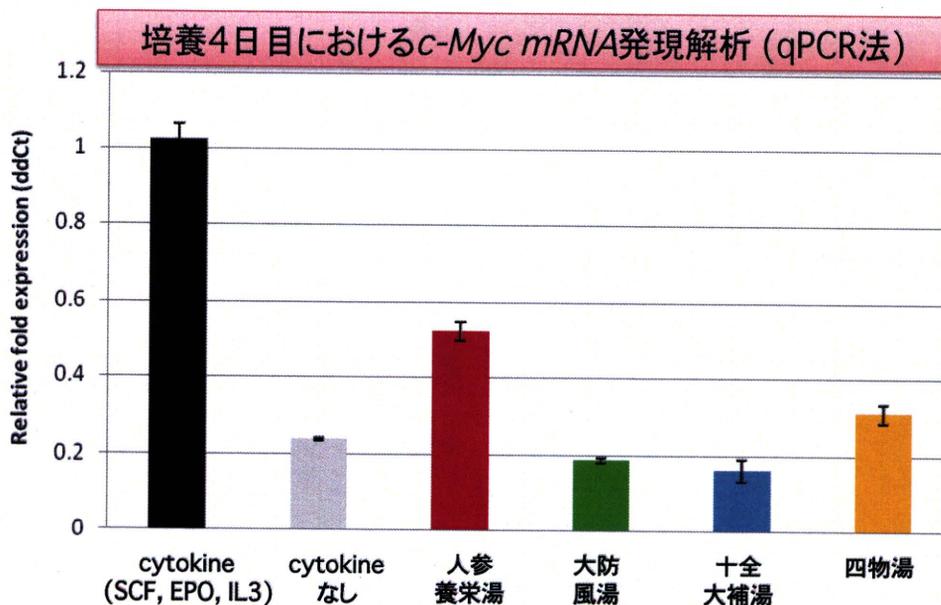


さらに Gata1 の下流の遺伝子である *Klf1* に関してその mRNA 発現を調べたところ、培養4日目では、ネガティブコントロールと人参養栄湯でわずかに *Klf1* mRNA の発現が認められたが、他の大防風湯、十全大補湯、四物等ではその発現は認められなかった。



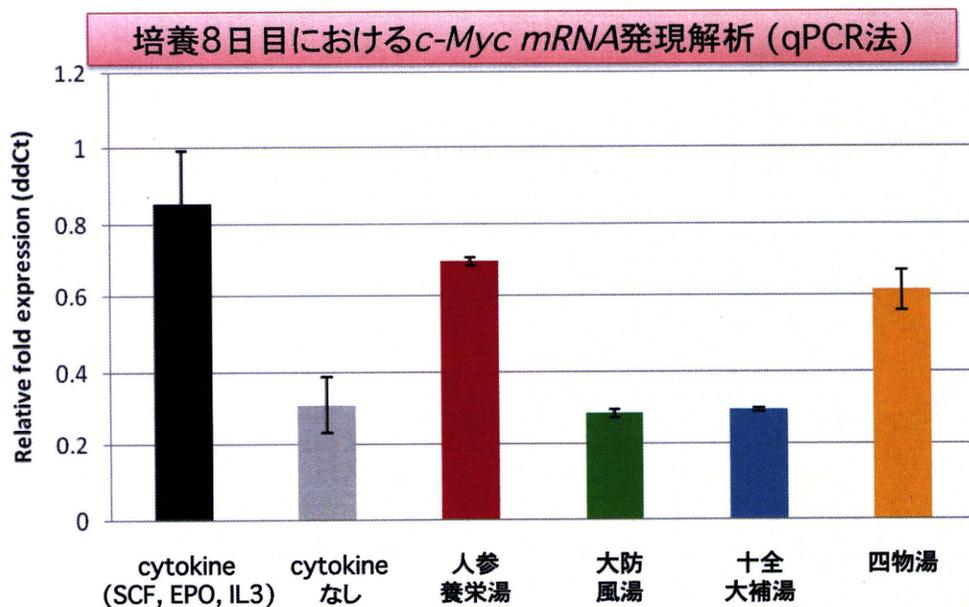
細胞増殖の評価

4種の漢方薬を添加後、培養4, 8, 11日目で増殖細胞特異的な *c-Myc* の mRNA 発現を検討した。

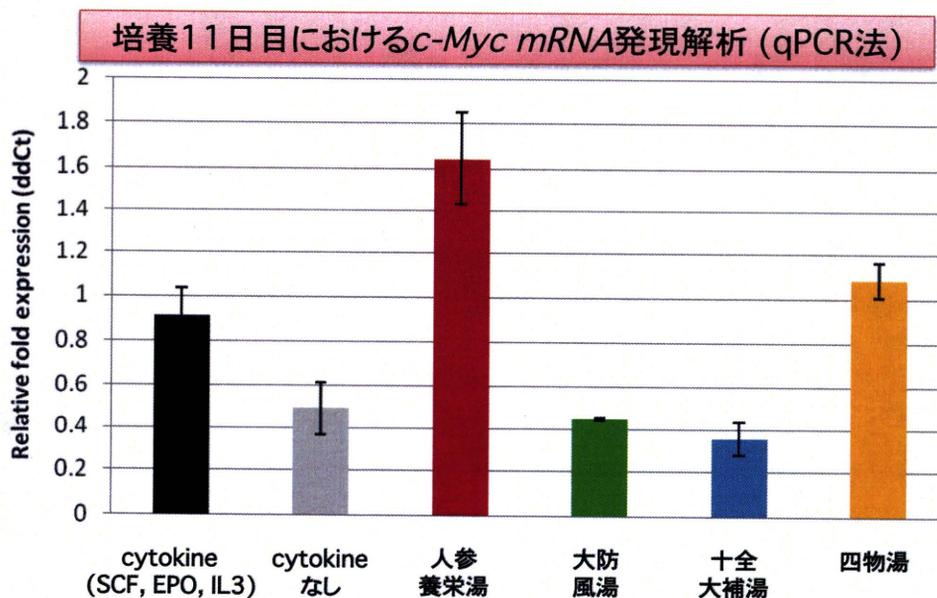


培養4日目では、4種類の漢方薬間では人参養栄湯添加群において *c-Myc* mRNA 発現が最も高く、四物湯が次に高かった。大防風湯、十全大補湯添加群はネガティブコントロール (Cytokine 非添加) よりも低発現であった。

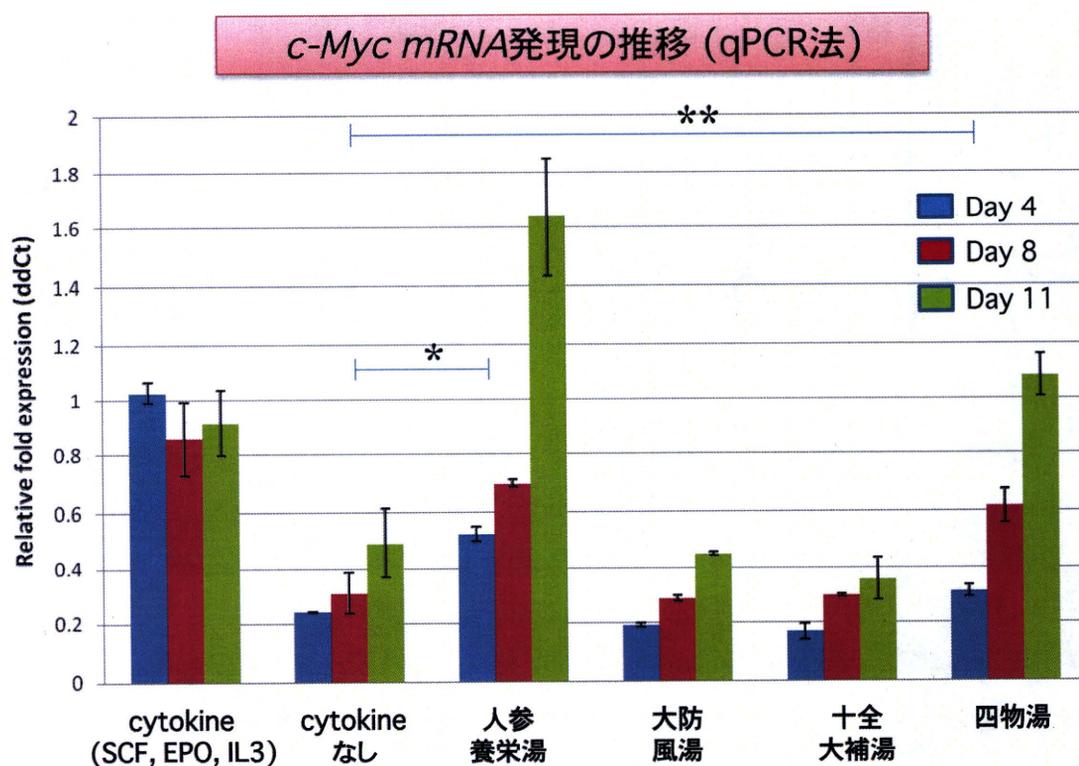
培養8日目においても、培養4日目と同様の発現傾向が認められた。*c-Myc* mRNA 発現は人参養栄湯、四物湯添加群において高く、大防風湯、十全大補湯添加群においてはネガティブコントロールよりも低発現であった。



培養11日目においても、培養4, 8日目と同様の発現傾向が認められたが、驚くべきことに、*c-Myc* mRNAの高発現認めた人参養栄湯、四物湯添加群はポジティブコントロール（サイトカイン添加）を上回る発現量であった。



培養4, 8, 11日目での *c-Myc* mRNA 発現の推移を下図にまとめた。ポジティブコントロール群を参照すると、培養11日間を通して、*c-Myc* 発現に大きな変動はなく、細胞が一定に増殖していたと考えられた。人参養栄湯および四物湯添加群はネガティブコントロールと比較した場合、*c-Myc* mRNA 発現に有意差が認められた。また全ての漢方薬添加群において、培養日数が進むにしたがって、*c-Myc* 発現が亢進することが明らかとなった。



(倫理面への配慮)

ヒト検体を入手する際、事前に医学研究院等倫理委員会で承認を得る。

本実験計画を遂行するにあたり、遺伝子組換え実験と動物実験における承認を既に得ている。

遺伝子組換え実験計画承認番号：22-74

動物実験承認番号：A23-109-0