

201110013A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 杉山 大介

平成24(2012)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 -----	44
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	45

別紙 3

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

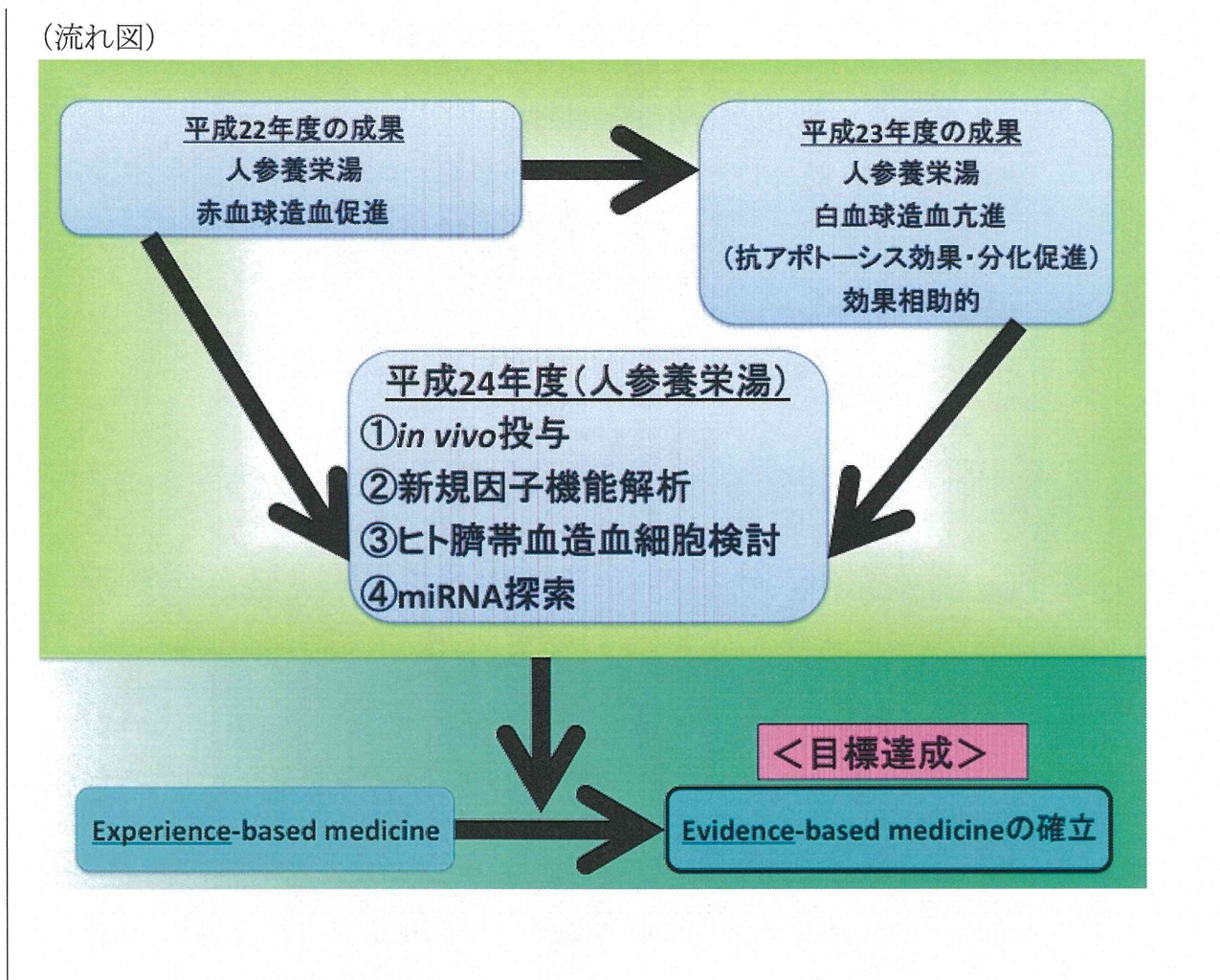
研究代表者 杉山 大介 九州大学大学院医学研究院准教授

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児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、人參養栄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、マウスにおける研究成果の蓄積と人參養栄湯の有効成分同定を試みた。マウス赤血球造血に加え、骨髓球造血を検討したところ、人參養栄湯は赤血球造血に加え、白血球造血を亢進する事が明らかになった。白血球造血亢進の機序は、抗アポトーシス効果と骨髓球分化促進による事も明らかになった。また、マウス骨髓単核球へ地黄、当帰、白朮、他 6 成分を添加培養し、細胞増殖を検討したが、人參養栄湯と同

様の増殖効果を認めなかった事より、人参養栄湯の効果は相助的である事が明らかになった。

(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。

本研究提案の目的



B. 研究方法

漢方の調整

人參養榮湯、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°C 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°C で保存した。

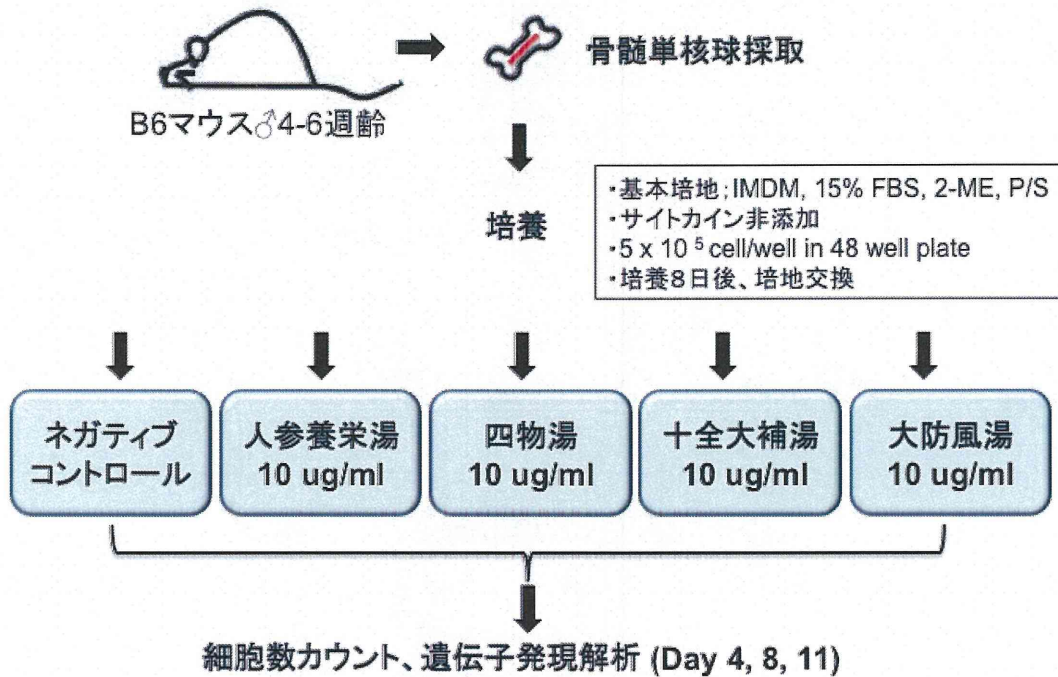
骨髄細胞の単離と培養

骨髄細胞は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。骨髄細胞は 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

方法



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。

マイクロアレイ法

マウス骨髄単核球細胞へ人参養栄湯を添加し、11日間培養した後回収した。このサンプルより RNeasy® Plus Microkit (QIAGEN)キットを用いて RNA を抽出し、セルイノベーター社へマイクロアレイ解析の委託を行った。キットはアジレントテクノロジー社のものを使用した。

遺伝子発現解析

RiboPure™ kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いて細胞サンプルより RNA を抽出し、High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Life Technologies) を用いて cDNA を合成し、遺伝子発現解析を real time-PCR (StepOnePlus™ real time PCR; Life Technologies) により行った。TaqMan プローブ法と SYBR Green 法を併用した。*c-Myc*, *Gata-1*, *CD45*, *Pu1*, *Rasgrp1* 遺伝子の TaqMan プローブは、TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies)を用いた。また、SYBR Green 法に用いたプライマーを以下の表にまとめた。

Primer qRT- PCR	Sequence (5'→3')
Bcl2-Fw	GGCTGGGACACTTTTGTGGAT
Bcl2-Rw	AAGCGCTCCTGGCCTTTC
Bcl xl-Fw	GTATTGGTGAGTCGGATTGCAA
Bcl xl-Rw	GCTGCATTGTTCCCGTAGAGA
Mcl-1-Fw	GGGCTGGTCTGGCATATCTA
Mcl-1-Rw	GCAGCTTCAAGTCCACCTTC
Bax-Fw	AGTGTCTCCGGCGAATTGG
Bax-Rw	AGCTGCCACCCGGAAGA
β-actin-Fw	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT
β-actin-Rw	GCCACCGATCCACACAGAGT

*In vivo*漢方投与

人参養栄湯を蒸留水へ溶解し、4-6ヶ月齢の C57BL/6J マウスへ経口投与した。投与量は 100 あるいは 1000 mg/ kg とし、4週間連日投与した。これらマウスから1週間おきに血液サンプルを採取し、自動血球計算装置(Sysmex ; KX-21)で解析した。投与最終日にマウスより血液サンプルを採取し、生化学検査をオリエ

ンタル酵母工業へ委託し、解析した。

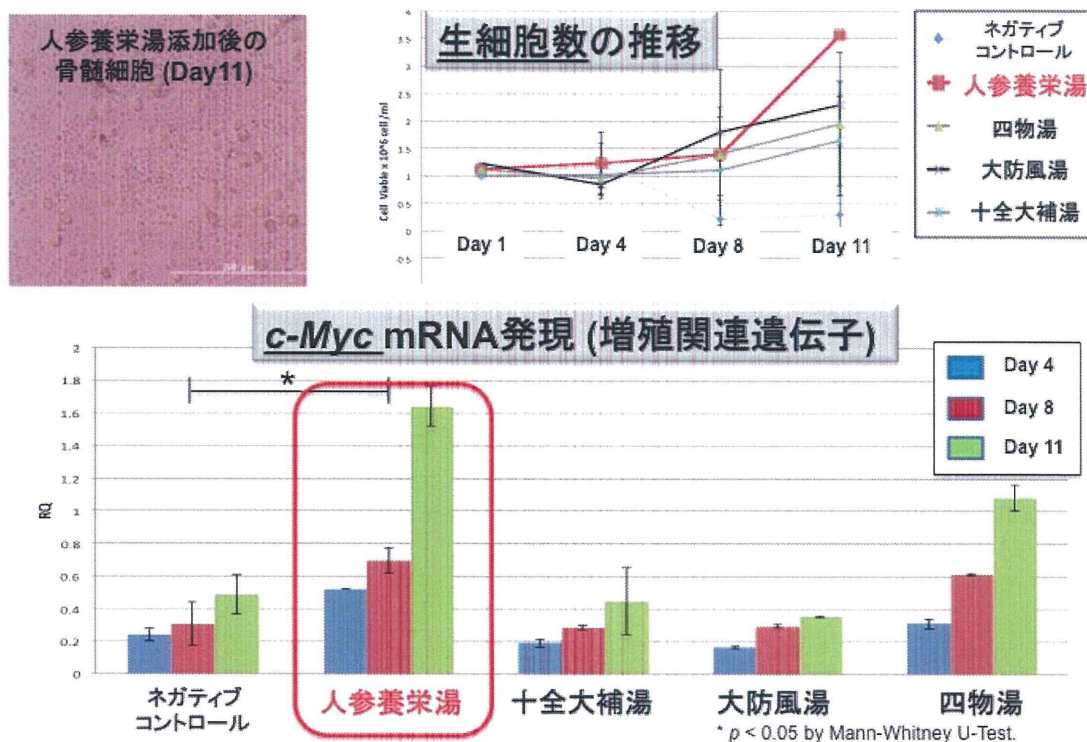
マクロファージ貪食能試験

人参養栄湯投与群、非投与群のマウスより骨髓細胞を採取し、Phagocytic Assay Kit (Cayman Chemical社) を用いて評価した。FITCの蛍光強度をFlow cytometry法で解析し、ビーズの取込みを評価する事により、マクロファージの貪食能を解析した。

C. 研究結果

*in vitro*漢方添加による骨髓細胞の増殖評価

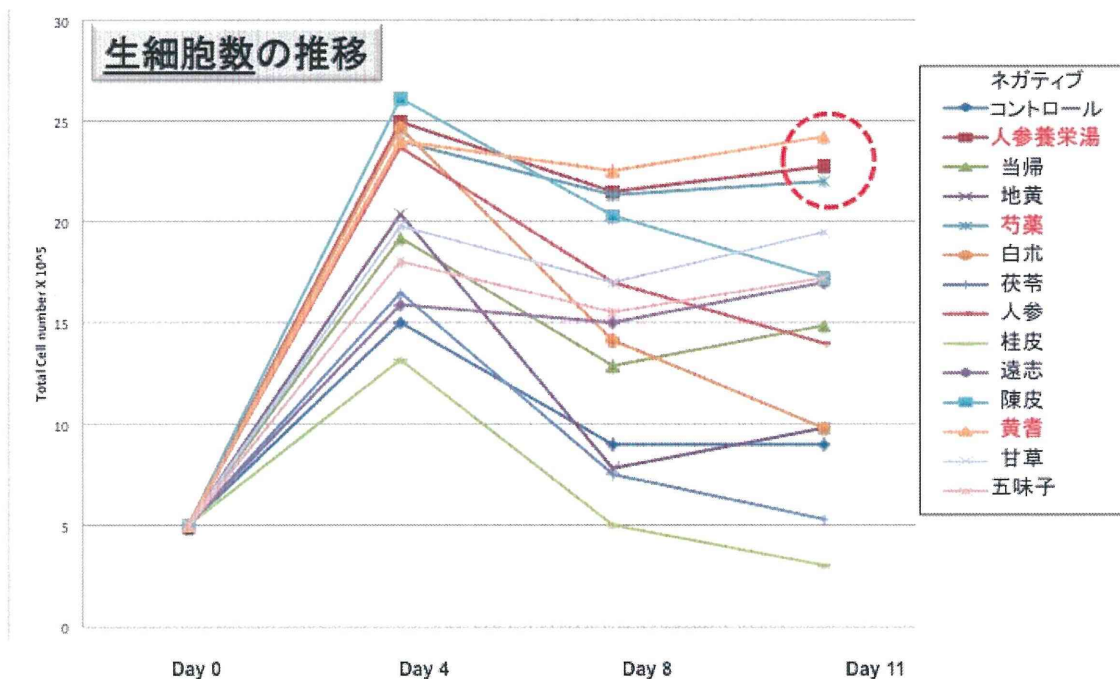
漢方添加による細胞増殖効果



マウス骨髓単核球細胞を、人參養榮湯・四物湯・大防風湯・十全大補湯を添加し、培養1、4、8、11日目に生細胞数を計測した。上図のように、培養11日目における人參養榮湯の細胞増殖効果が顕著に認められた。次に、これら培養細胞における細胞増殖関連遺伝子・*c-Myc*の遺伝子発現を検討したところ、生細胞数の結果に一致して、人參養榮湯では*c-Myc*遺伝子の発現が、ネガティブコントロールに比し顕著に亢進していた。一方、十全大補湯・大防風湯は*c-Myc*遺伝子の発現に影響を与えなかった。四物湯にも*c-Myc*の遺伝子発現亢進効果が認められたが、人參養榮湯に比し弱かった。

四物湯の構成成分は当帰、地黄、芍薬、川きゅう、であり、人參養榮湯の構成成分である当帰、地黄、芍薬、白朮、茯苓、人參、桂皮、遠志、陳皮、黄耆、甘草、五味子と3成分重複している。そこで、以降の実験は人參養榮湯及びその構成成分に注目して解析した。

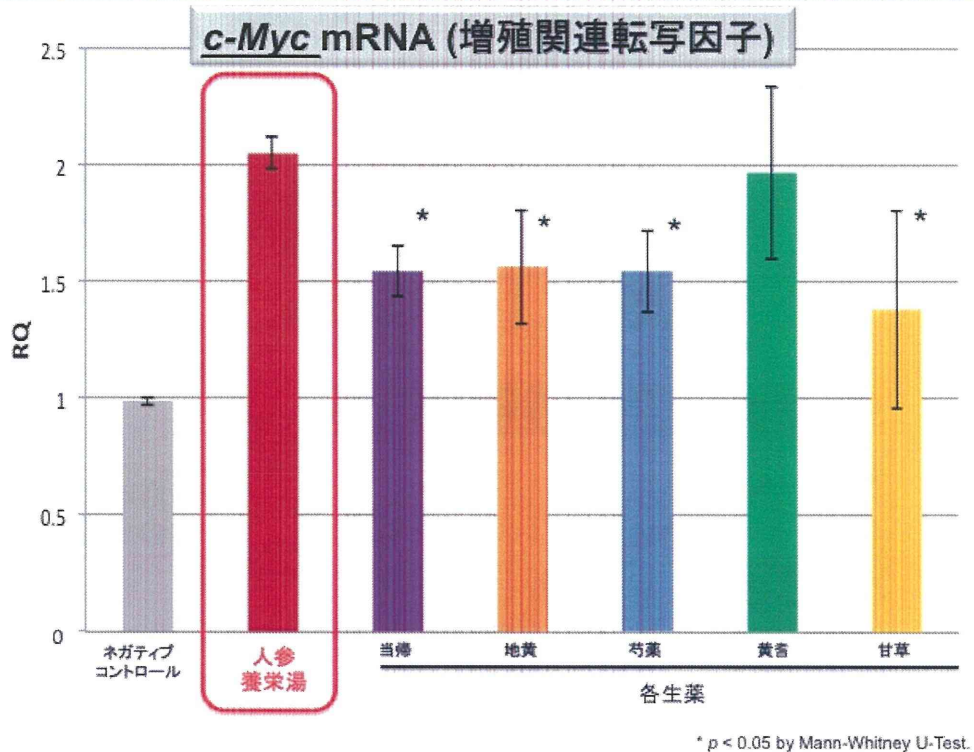
含有生薬の相助的効果 (in vitro) 1



マウス骨髄単核球細胞へ、人参養栄湯の生薬構成成分である当归、地黄、芍薬、白朮、茯苓、人参、桂皮、遠志、陳皮、黄耆、甘草、五味子を添加して培養した。上図のように、茯苓、桂皮では、コントロールに比し細胞増殖効果が認められなかったが、他の成分では細胞増殖効果が認められた。中でも、培養11日目における芍薬、黄耆の効果は顕著だった。

そこで、人参養栄湯、芍薬、黄耆に注目し、遺伝子発現解析を行った。

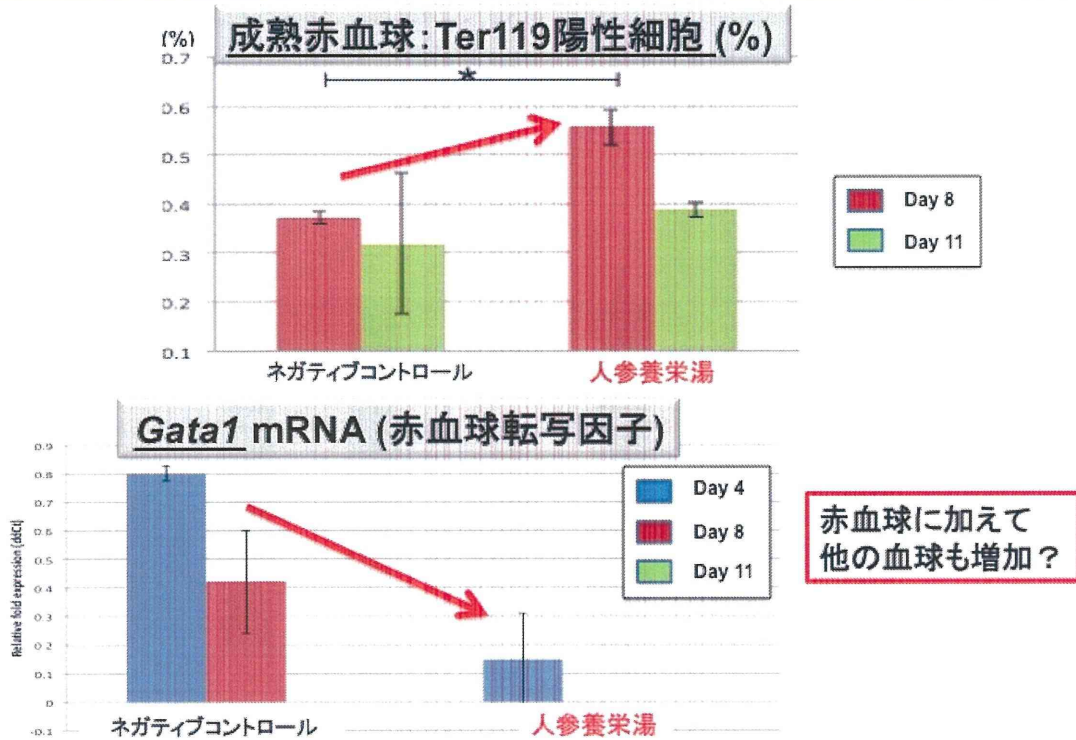
含有生薬の相助的効果 (in vitro) 2



マウス骨髄単核球細胞へ人参養栄湯、当帰、地黄、芍薬、黄耆、甘草を添加して培養し、11日目にサンプルを回収した。本サンプルを用いて細胞増殖関連遺伝子・*c-Myc*の遺伝子発現を検討したところ、すべてのサンプルにおいて*c-Myc*遺伝子の発現亢進が認められた。しかしながら、当帰、地黄、芍薬、甘草は人参養栄湯よりも発現亢進に対する影響が低い事が明らかになった。一方、黄耆は人参養栄湯と同等の*c-Myc*遺伝子の発現亢進効果を認めた。

以上の結果から、人参養栄湯の骨髄単核球細胞増殖効果は、相助的である事が明らかになった。

人參養榮湯による赤血球系分化の促進 (*in vitro*)



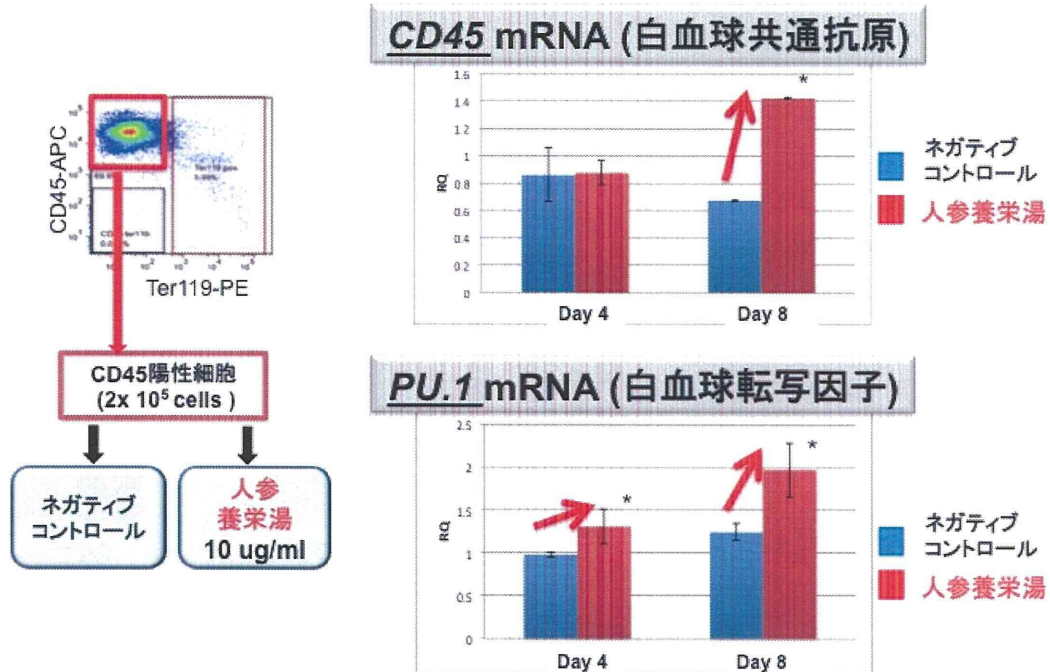
マウス骨髄単核球細胞へ人參養榮湯を添加して培養し、8・11日目において成熟赤血球のマーカであるTer119のタンパク質発現を、Flow cytometry法で解析した（上図上段）。培養8日では、コントロールに比しTer119陽性細胞は約1.5倍増加したが、培養11日目では顕著な差を認めなかった。

人參養榮湯の赤血球分化・増殖促進効果を遺伝子レベルで検討するため、赤血球転写因子遺伝子である*Gata1*遺伝子の発現をreal-time PCR法で解析した（上図下段）。培養4・8日目においては、コントロールに比し*Gata1*遺伝子の発現低下が認められた。また、培養11日目では、コントロール、人參養榮湯添加群共に、*Gata1*遺伝子の発現は認められなかった。

以上の結果から、人參養榮湯による骨髄単核球細胞の増殖効果は、赤血球以外の細胞が増殖している事に起因する事が示唆された。

そこで、人參養榮湯の白血球に対する増殖効果に関して検討を行った。

人参養栄湯による白血球分化の促進 (in vitro)



Compare to negative control * $p < 0.05$ by Mann-Whitney U-Test.

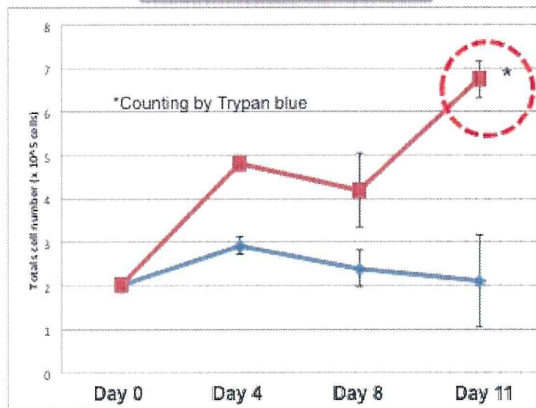
血球以外の細胞（例えば間葉系細胞や血管内皮細胞）のみを評価するため、骨髓単核球細胞をCD45とTer119に対する抗体で染色し、Flow cytometry法により白血球集団であるCD45陽性細胞分画を採取した。次に、同様にCD45陽性細胞を人参養栄湯添加群と非添加群で培養し、白血球の分化マーカー遺伝子であるCD45遺伝子及び白血球、特に骨髓球の分化転写因子遺伝子・PU.1の発現をreal-time PCR法で検討した。

培養4日目では、CD45遺伝子の発現は著変を認めなかったが、PU.1遺伝子の発現は亢進を認めた。また、培養8日目では、CD45遺伝子・PU.1遺伝子共に発現亢進を認めた。

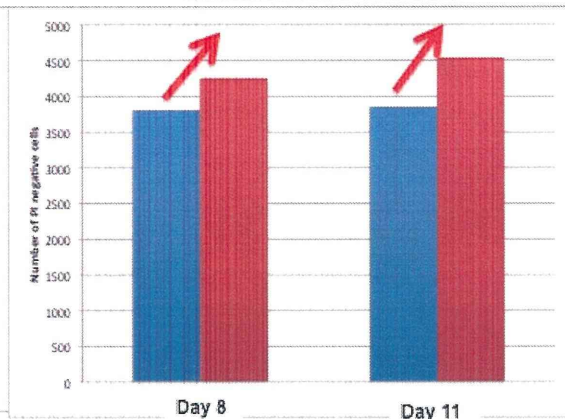
以上の結果から、人参養栄湯の骨髓細胞増殖効果は、白血球の分化促進及び増殖に起因する事が明らかになった。

人參養榮湯の抗アポトーシス効果 (in vitro) 1

生細胞数の推移



生細胞:PI 陰性

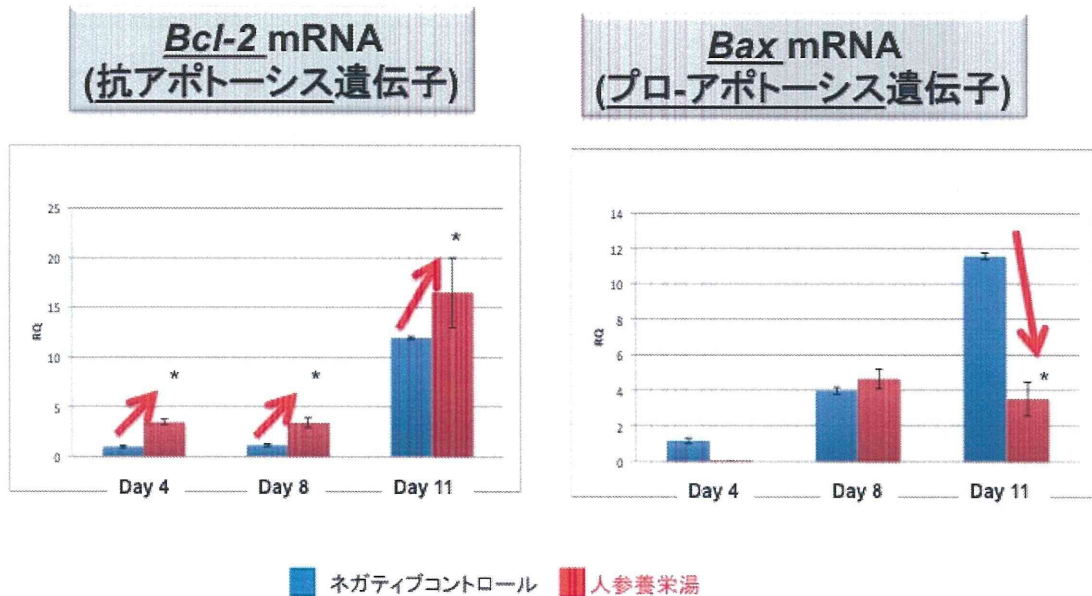


■ ネガティブコントロール ■ 人參養榮湯

Compare to negative control * $p < 0.05$ by Mann-Whitney U-Test.

人參養榮湯の白血球増殖効果が、細胞死を誘導するアポトーシスの抑制に依るか検討するため、Propidium Iodide (PI) 染色を行いFlow cytometry法で評価した。骨髓単核球細胞を人參養榮湯添加群と非添加群で培養し、細胞数を計測した（上図左）。次に、アポトーシスを誘導した細胞はPI陽性となるため、PI陰性細胞、即ちアポトーシスにより細胞死が誘導されていない細胞集団の比率を求め、総細胞数へ乗した。上図右に示すように、培養8・11日目において、アポトーシスが誘導されていない生細胞が増加している事が明らかになった。そこで、次に人參養榮湯の抗アポトーシス効果を検討した。

人參養榮湯の抗アポトーシス効果 (in vitro) 2

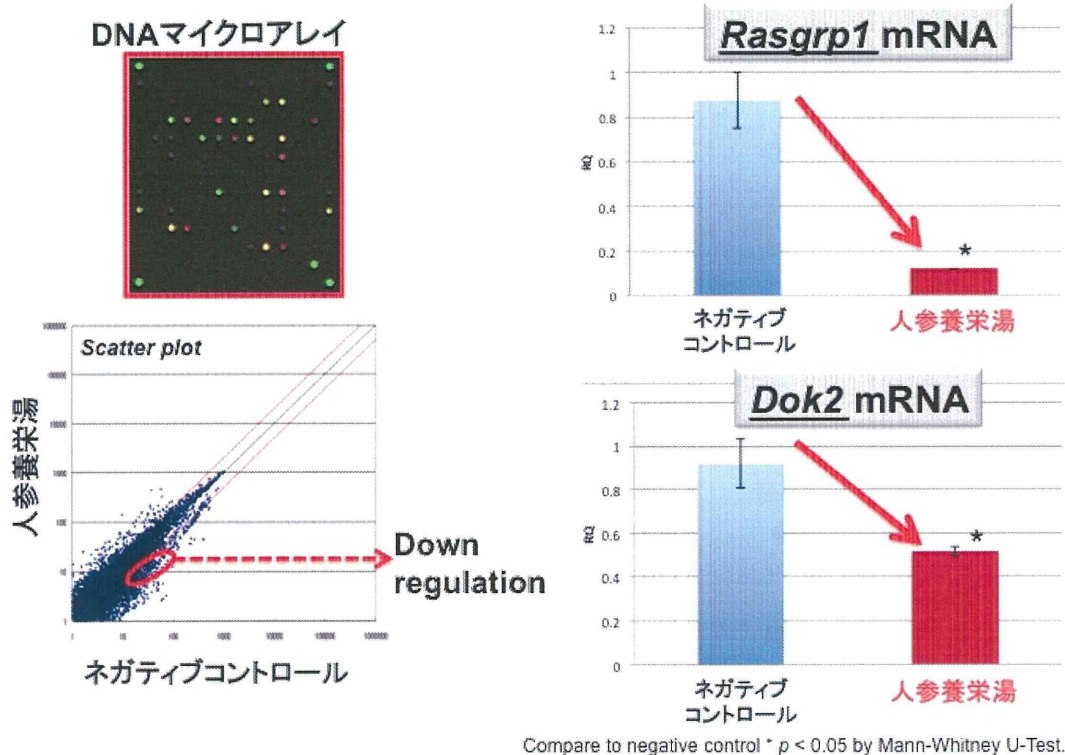


Compare to negative control * $p < 0.05$ by Mann-Whitney U-Test.

人參養榮湯の血球に対する抗アポトーシス効果を遺伝子レベルで検討するため、抗アポトーシス遺伝子である*Bcl-2*と、プロ・アポトーシス遺伝子（アポトーシスが誘導される際に発現が認められる）*Bax*の発現をreal-time PCR法で解析した。培養4・8・11日目においては、コントロールに比し*Bcl-2*遺伝子の発現亢進が認められた。一方、培養11日目において、コントロールに比し*Bax*遺伝子の発現低下が認められた。

以上より、人參養榮湯は白血球の分化促進効果と抗アポトーシス効果を保持し、その結果白血球を増殖する事が明らかになった。

人参養栄湯添加後の網羅的遺伝子発現解析



人参養栄湯添加による遺伝子発現の網羅的解析を行うため、骨髓単核球細胞を人参養栄湯添加群と非添加群で培養し、11日目にサンプルを回収した。本サンプルをセルイノベータ社へ委託し、マイクロアレイ法で解析した（データの詳細は下表参照）。

マイクロアレイデータより当研究室で解析実績のある遺伝子に注目し、白血球造血に関与する*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現をreal-time PCR法で解析した（上図右）。人参養栄湯添加群では、*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現低下が認められた。

