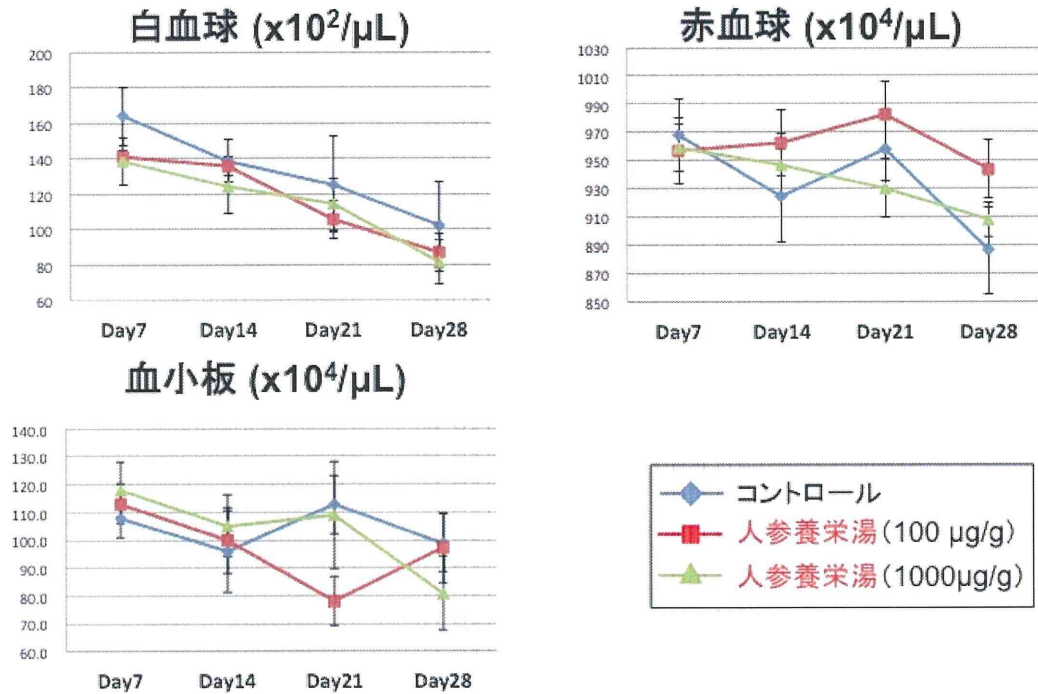


人參養榮湯添加マウス骨髄単核球細胞のマイクロアレイデータ4/11

ProbeID	GeneSymbol	Description	BM40NC_Neg 1.1kb, 1.5kb, 2.0kb	BM40NC_Neg 1.1kb, 1.5kb, 2.0kb	BM40NC_Neg 1.1kb, 1.5kb, 2.0kb	BM40NC_Neg 1.1kb, 1.5kb, 2.0kb	Component 1	Component 2	Component 3	PrimaryAccession	RefSeq Accession
A55_P020320	Fat2	Mus musculus fatty acid binding protein 2, muscle and heart (Fat2). mRNA (NM_010174)	14248435	2951781	P	M	1.6411446	1784025	NM_010174		NM_010174
A55_P020303	Dad2	Mus musculus disintegrin-like metalloprotease type 2 (Dad2). mRNA (NM_010092)	28271725	400181	P	P	1.2113333	1423544	NM_010092		NM_010092
A55_P020340	Cdk17a	Mus musculus cyclin dependent kinase inhibitor 17 (Cdk17a). transcript variant 2. mRNA (NM_009818)	3153355	169093	P	P	1.032028	7849025	NM_009818		NM_009818
A55_P04817	Nup50	Mus musculus nucleoporin 50 (Nup50). mRNA (NM_022454)	4841015	15244	P	P	1.084401	3140254	NM_022454		NM_022454
A55_P012828	Cas2b	Mus musculus G-protein-coupled receptor family G protein subunit 5, member 2 (Gpr52b). transcript variant 2. mRNA (NM_022420)	1937186	18941	A	P	4.961271	961271	NM_022420		NM_022420
A55_P012829	Cas2a	Mus musculus G-protein-coupled receptor family G protein subunit 5, member 1 (Gpr52a). transcript variant 1. mRNA (NM_022420)	1937186	18941	A	P	1.189228	6178364	NM_022420		NM_022420
A55_P020292	C12orf62	Mus musculus C12orf62 protein (C12orf62). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020293	C12orf61	Mus musculus C12orf61 protein (C12orf61). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020294	C12orf60	Mus musculus C12orf60 protein (C12orf60). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020295	C12orf59	Mus musculus C12orf59 protein (C12orf59). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020296	C12orf58	Mus musculus C12orf58 protein (C12orf58). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020297	C12orf57	Mus musculus C12orf57 protein (C12orf57). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020298	C12orf56	Mus musculus C12orf56 protein (C12orf56). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020299	C12orf55	Mus musculus C12orf55 protein (C12orf55). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020300	C12orf54	Mus musculus C12orf54 protein (C12orf54). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020301	C12orf53	Mus musculus C12orf53 protein (C12orf53). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020302	C12orf52	Mus musculus C12orf52 protein (C12orf52). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020303	C12orf51	Mus musculus C12orf51 protein (C12orf51). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020304	C12orf50	Mus musculus C12orf50 protein (C12orf50). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020305	C12orf49	Mus musculus C12orf49 protein (C12orf49). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020306	C12orf48	Mus musculus C12orf48 protein (C12orf48). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020307	C12orf47	Mus musculus C12orf47 protein (C12orf47). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020308	C12orf46	Mus musculus C12orf46 protein (C12orf46). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020309	C12orf45	Mus musculus C12orf45 protein (C12orf45). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020310	C12orf44	Mus musculus C12orf44 protein (C12orf44). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020311	C12orf43	Mus musculus C12orf43 protein (C12orf43). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020312	C12orf42	Mus musculus C12orf42 protein (C12orf42). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020313	C12orf41	Mus musculus C12orf41 protein (C12orf41). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020314	C12orf40	Mus musculus C12orf40 protein (C12orf40). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020315	C12orf39	Mus musculus C12orf39 protein (C12orf39). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020316	C12orf38	Mus musculus C12orf38 protein (C12orf38). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020317	C12orf37	Mus musculus C12orf37 protein (C12orf37). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020318	C12orf36	Mus musculus C12orf36 protein (C12orf36). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020319	C12orf35	Mus musculus C12orf35 protein (C12orf35). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020320	C12orf34	Mus musculus C12orf34 protein (C12orf34). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020321	C12orf33	Mus musculus C12orf33 protein (C12orf33). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020322	C12orf32	Mus musculus C12orf32 protein (C12orf32). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020323	C12orf31	Mus musculus C12orf31 protein (C12orf31). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020324	C12orf30	Mus musculus C12orf30 protein (C12orf30). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020325	C12orf29	Mus musculus C12orf29 protein (C12orf29). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020326	C12orf28	Mus musculus C12orf28 protein (C12orf28). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020327	C12orf27	Mus musculus C12orf27 protein (C12orf27). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020328	C12orf26	Mus musculus C12orf26 protein (C12orf26). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020329	C12orf25	Mus musculus C12orf25 protein (C12orf25). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020330	C12orf24	Mus musculus C12orf24 protein (C12orf24). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020331	C12orf23	Mus musculus C12orf23 protein (C12orf23). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020332	C12orf22	Mus musculus C12orf22 protein (C12orf22). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020333	C12orf21	Mus musculus C12orf21 protein (C12orf21). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020334	C12orf20	Mus musculus C12orf20 protein (C12orf20). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020335	C12orf19	Mus musculus C12orf19 protein (C12orf19). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020336	C12orf18	Mus musculus C12orf18 protein (C12orf18). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020337	C12orf17	Mus musculus C12orf17 protein (C12orf17). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020338	C12orf16	Mus musculus C12orf16 protein (C12orf16). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020339	C12orf15	Mus musculus C12orf15 protein (C12orf15). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020340	C12orf14	Mus musculus C12orf14 protein (C12orf14). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020341	C12orf13	Mus musculus C12orf13 protein (C12orf13). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020342	C12orf12	Mus musculus C12orf12 protein (C12orf12). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020343	C12orf11	Mus musculus C12orf11 protein (C12orf11). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020344	C12orf10	Mus musculus C12orf10 protein (C12orf10). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020345	C12orf9	Mus musculus C12orf9 protein (C12orf9). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020346	C12orf8	Mus musculus C12orf8 protein (C12orf8). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020347	C12orf7	Mus musculus C12orf7 protein (C12orf7). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020348	C12orf6	Mus musculus C12orf6 protein (C12orf6). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020349	C12orf5	Mus musculus C12orf5 protein (C12orf5). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020350	C12orf4	Mus musculus C12orf4 protein (C12orf4). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020351	C12orf3	Mus musculus C12orf3 protein (C12orf3). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020352	C12orf2	Mus musculus C12orf2 protein (C12orf2). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020353	C12orf1	Mus musculus C12orf1 protein (C12orf1). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020354	C12orf0	Mus musculus C12orf0 protein (C12orf0). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020355	C12orf-1	Mus musculus C12orf-1 protein (C12orf-1). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020356	C12orf-2	Mus musculus C12orf-2 protein (C12orf-2). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020357	C12orf-3	Mus musculus C12orf-3 protein (C12orf-3). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020358	C12orf-4	Mus musculus C12orf-4 protein (C12orf-4). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384	148715	NM_010181		NM_010181
A55_P020359	C12orf-5	Mus musculus C12orf-5 protein (C12orf-5). mRNA (NM_010181)	8943035	148715	P	P	1.9549384				

In vivo 人参養栄湯 投与実験1

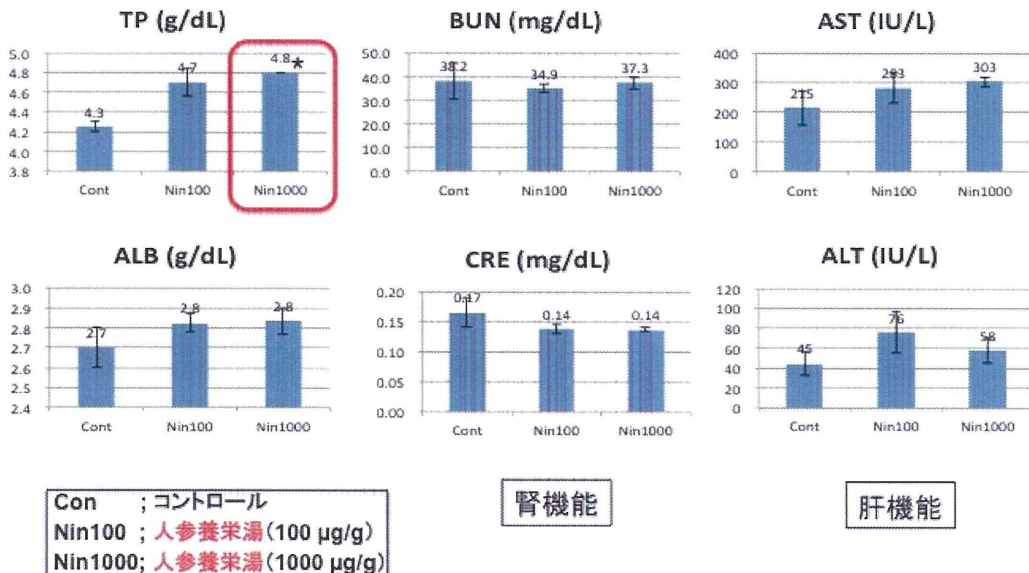
- 投与後の血球数推移 -



*In vitro*培養における人参養栄湯の白血球増殖効果を*In vivo*で検証するため、人参養栄湯を成体マウスへ連日経口投与（低用量100 µg/g BW、高用量100 µg/g BW）し、1週間おきに採血して血液細胞数を解析した。上図に示すように、コントロールに比し、人参養栄湯の白血球増殖効果は認められなかった。赤血球に対しては、人参養栄湯低用量投与群では増殖傾向が認められたが、統計的有意差は認められず、高用量投与群でも変化が認められなかった。また、血小板に対しては、特に変化が認められなかった。

In vivo 人参養栄湯 投与実験2

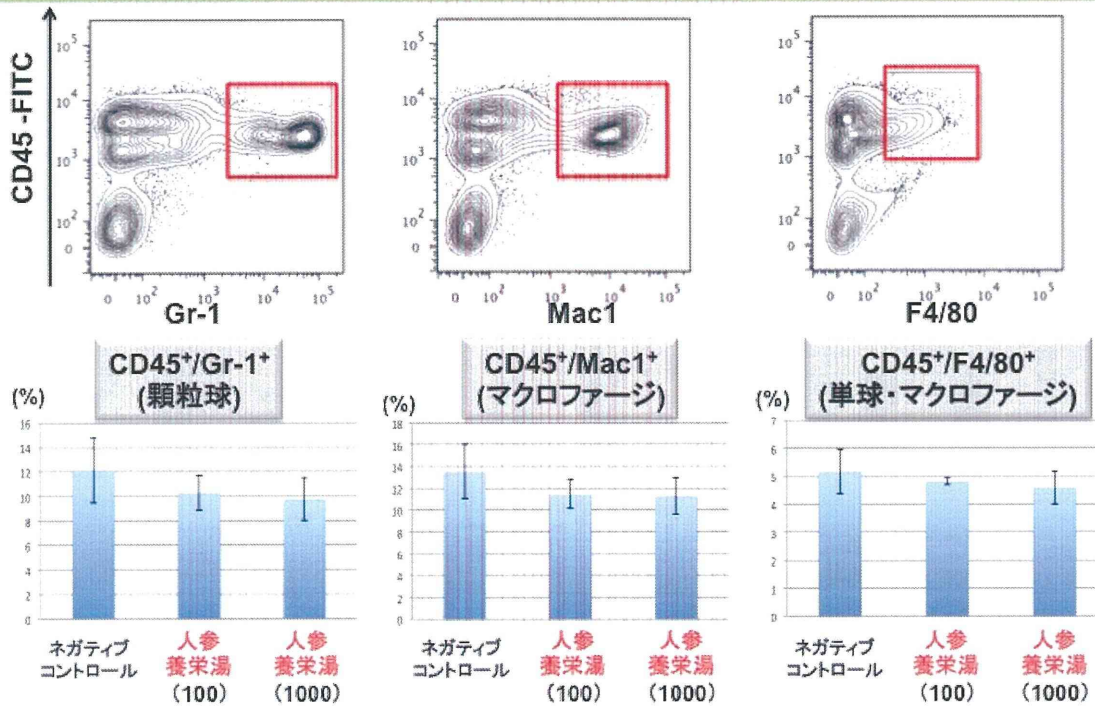
- 投与28日後の生化学検査 -



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

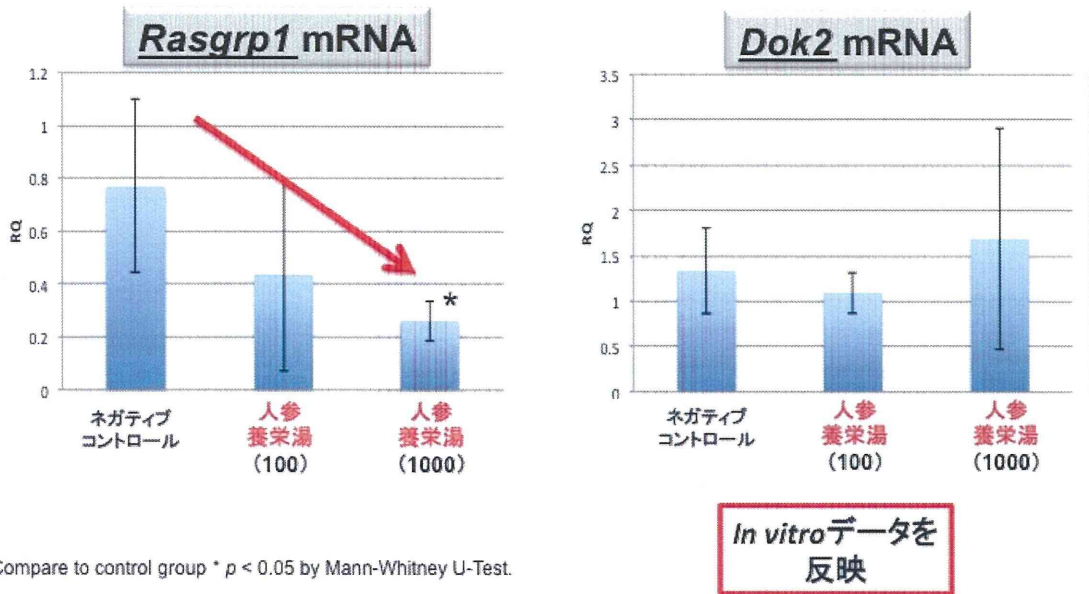
次に、人参養栄湯経口投与28日後に採血し、血液生化学検査を行った。上図に示すように、肝機能検査（AST、ALT）、腎機能検査（BUN、CRE）はコントロール・低用量群・高用量群において顕著な差は認められなかった。一方、TP（総タンパク）は高用量群で高値であり、統計学的有意差を認めた。しかしながら、ALB（アルブミン）では差を認めなかったことから、人参養栄湯高用量投与群では、ガンマグロブリンが高値になっている可能性が示唆された。

In vivo 人参養栄湯 投与実験 - 投与28日後の白血球分布 -



人参養栄湯は*In vitro*培養において白血球増殖効果を認めた事より、人参養栄湯経口投与により、白血球分画、特に骨髓球である顆粒球・マクロファージ・単球の増殖に影響があるかFlow cytometry法で検討した。上図のように、コントロールに比して人参養栄湯経口投与群は顕著な差を認めなかった。

In vivo 人参養栄湯 投与実験 - 投与28日後の遺伝子発現解析 -

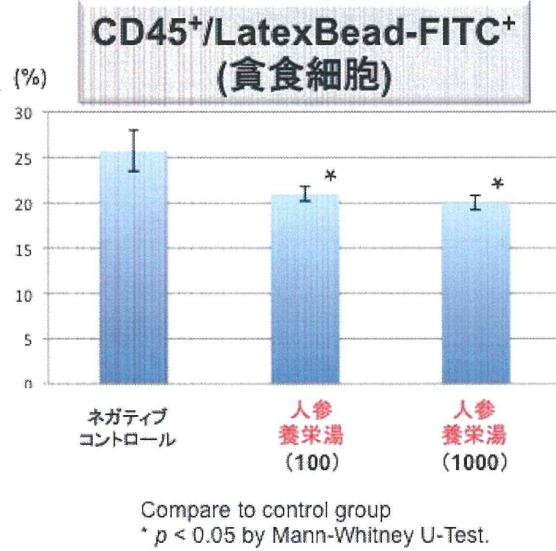
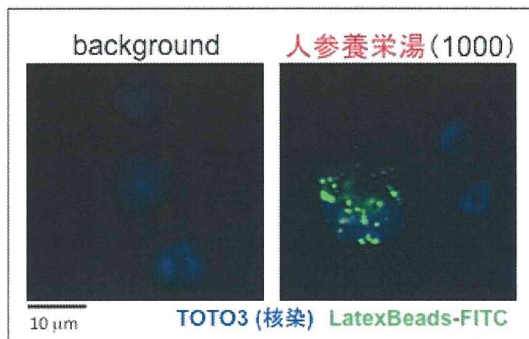
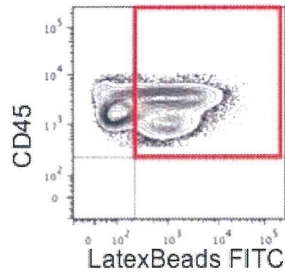


マウス骨髄単核球細胞の人参養栄湯添加 *in vitro* 培養では、*Rasgrp1* 遺伝子と *Dok2* 遺伝子の発現低下が認められた。そこで、人参養栄湯経口投与マウスより骨髄細胞を採取し、*Rasgrp1* 遺伝子と *Dok2* 遺伝子の発現を real-time PCR 法で検討した。*In vitro* データに一致し、*Rasgrp1* 遺伝子はその発現低下が認められたが、*Dok2* 遺伝子では認められなかった。

In vivo 人参養栄湯 投与実験

- 投与28日後の白血球における貪食能検討 -

(Cayman社Phagocytosisアッセイキットを使用)



人参養栄湯がマクロファージの機能に影響を与えるか検討するため、人参養栄湯経口投与マウスより骨髄単核球細胞を採取し、マクロファージの貪食能を評価した。上図のように、非投与群に比し、貪食能低下が認められた。現在その原因を検討中である。

(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

D. 考察

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。その結果、人参養栄湯は他の漢方に比べてマウス骨髄造血細胞を増殖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参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、白血球造血を検討したところ、人参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。培養11日目では、PI (Propidium Iodide) を取り込まない生細胞数が、人参養栄湯を添加した群で多く認められ、培養細胞のアポトーシス阻害が示唆された。そこで、抗アポトーシス遺伝子である*Bcl-2*と、アポトーシス誘導遺伝子である*Bax*の発現を検討したところ、培養11日目において、コントロールと比較して有意に遺伝子発現の変化が認められた。Flow cytometry法により培養細胞のCD45（白血球マーカー）の発現を検討したところ、CD45陽性細胞の増加が認められた。更に、*CD45*遺伝子の発現と、骨髄球分化マーカーである*Pu. 1*遺伝子の発現を検討したところ、培養8日目において、その発現亢進が認められた。以上より、人参養栄湯の白血球造血亢進の機序は、抗アポトーシス効果と骨髄球分化促進による事が明らかになった。また、マウス骨髄単核球へ地黄、当帰、白朮、茯苓、人参、桂皮、芍薬、黄耆、甘草をそれぞれ添加培養し細胞増殖を検討したが、人参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。そこで、マウス骨髄単核球へ人参養栄湯を添加培養したサンプルを用いてマイクロアレイ法で解析した。人参養栄湯が影響を及ぼす遺伝子群の抽出を行い、特に*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子に注目した。マウス骨髄単核球細胞の人参養栄湯添加*in vitro*培養では、*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現低下が認められた。そこで、人参養栄湯経口投与マウスより骨髄細胞を採取し、*Rasgrp1*遺伝子と*Dok2*遺伝子の発現をreal-time PCR法で検討した。*In vitro*データに一致し、*Rasgrp1*遺伝子はその発現低下が認められたが、*Dok2*遺伝子では認められなかった。以上の結果から、*in vitro*のデータは一部*in vivo*投与のデータを反映している事が明らかになった。今後、人参養栄湯の白血球造血亢進作用の更なる機序解明と臨床応用の検討が必要である。

E. 結論

人参養栄湯は*in vitro*においてマウス骨髄単核球細胞、特に白血球を増殖する。その作用は特定の生薬成分に依存するのではなく、生薬複合体として活性を保持する事から、その効果は相助的である事が明らかになった。また、人参養栄湯は白血球の分化促進効果と抗体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。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる研究成果は得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(原著)

1. Mizuochi M, Fraser ST, Biasch K, Horio Y, Kikushige Y, Tani K, Akashi K, Tavian M and Sugiyama D.

Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic transition during early embryogenesis.

PlosOne (in press).

2. Kulkeaw K, Inoue T, Mizuochi C, Horio Y, Ishihama Y and Sugiyama D.

Ectopic expression of Hmgn2 antagonizes mouse erythroid differentiation in vitro.

Cell Biol Int 36(2): 195-202, 2012.

3. Inoue T, Kulkeaw K, Okayama S, Tani K and Sugiyama D.

Variation in Mesodermal and Hematopoietic Potential of Adult Skin-derived Induced Pluripotent Stem Cell Lines in Mice.

Stem Cell Reviews and Reports 7(4): 958-968, 2011.

4. Sugiyama D, Kulkeaw K, Mizuochi C, Horio Y and Okayama S.

Hepatoblasts comprise a niche for fetal liver erythropoiesis through cytokine production

Biochem Biophys Res Commun. 410(2): 301-306, 2011.

5. Kulkeaw K, Ishitani T, Kanemaru T, Ivanovski O, Nakagawa M, Mizuochi C, Horio Y, Sugiyama D.

Cold exposure down-regulates zebrafish pigmentation.

Genes to Cells 16(4): 358-367, 2011

(総説)

6. Inoue T, Tani K and Sugiyama D.

Mesodermal and Hematopoietic Differentiation from ES and iPS Cells.

Stem Cell Reviews and Reports (in press).

(著書)

7. Sugiyama D, Inoue T and Kulkeaw K.

Stem cell maintenance in embryos and adults.

Year Book of SCIENCE & TECHNOLOGY 2011 (McGRAW-HILL) 258-261, 2011

2. 学会発表

(国際学会)

1. Inoue T, Kulkeaw K, Horio Y, Okayama S, Mizuochi C, Srinoun K, Tani K, 杉山大介,

Variation in hematopoietic potential of adult and embryonic skin-derived iPSC lines.

Cell Symposia (Stem Cell Programming & Reprogramming)

December 8-10, 2011, Lisbon (Portugal)

ポスター発表

(国内学会)

2. 杉山大介, Kulkeaw Kasem, Kanitta Srinoun, 水落ちよ, 堀尾有可, 井上朋子
肝芽細胞による胎生期赤血球造血の制御機構

第73回日本血液学会学術集会総会, 名古屋, 2011年10月16日

口頭発表

3. 井上朋子, Kulkeaw Kasem, Kanitta Srinoun, 水落ちよ, 堀尾有可, 杉山大介
成体及び胎仔マウス皮膚由来 iPS 細胞における造血能の比較検討

第73回日本血液学会学術集会総会, 名古屋, 2011年10月14日

口頭発表

4. 水落ちよ, Kulkeaw Kasem, Kanitta Srinoun, 堀尾有可, 井上朋子, 杉山大介
マウス卵黄嚢における造血細胞ニッチの検討

第73回日本血液学会学術集会総会, 名古屋, 2011年10月14日

ポスター発表

5. Kanitta Srinoun, Kulkeaw Kasem, 水落ちよ, 堀尾有可, 井上朋子, 杉山大介
Ninjin Yoeito and Juzen Taihoto, Japanese Kampo drugs accelerate mouse erythropoiesis in vitro

第73回日本血液学会学術集会総会, 名古屋, 2011年10月15日

ポスター発表 travel award

6. Kulkeaw Kasem, Kanitta Srinoun, 水落ちよ, 堀尾有可, 井上朋子, 杉山大介

Identification of novel genes regulating erythropoiesis by cold-exposed