

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

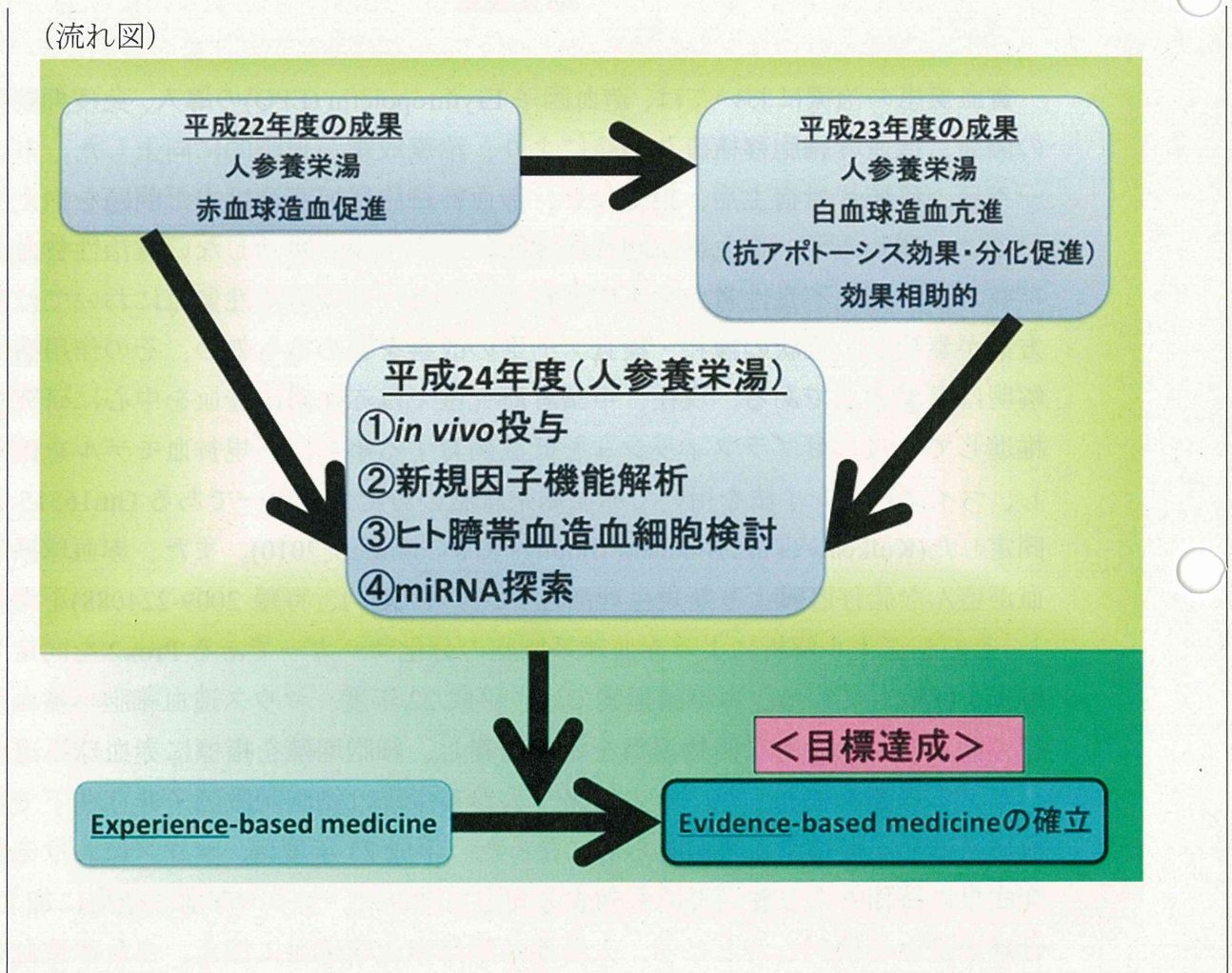
研究代表者 杉山 大介 九州大学病院特任准教授

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の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む一部の難治性貧血においては漢方薬が奏功し、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、そのシグナル解析に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、人参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、骨髓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。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人参

養栄湯を構成する生薬である地黄、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。

平成 24 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、骨髓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。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。



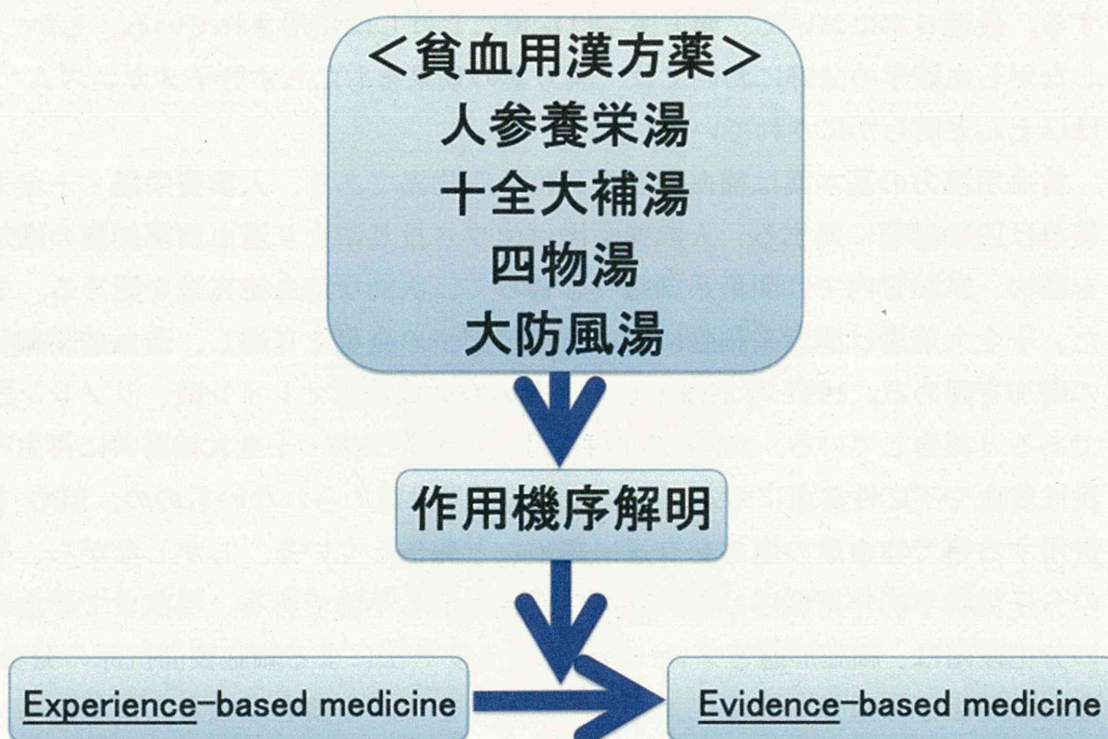
## A. 研究目的

東洋漢方薬は2,000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へ投与されてきた。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由来の生薬の配合により調合される。一種類の生薬のみでは効力が限られ、副作用が出る可能性もあるため、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。配合することにより、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て二次的な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、細胞形態とフローサイトメトリー法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

### 漢方薬の調整

人参養栄湯を実験に用いた。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 $1.0 \times 10^7$  cells/ml で調整した。Lympholyte-Mにより単核球を分離後、 $1 \times 10^6$  cell/ml の細胞密度で 48穴培養プレートに播種、37□, 5% CO<sub>2</sub>にて培養した。培養条件はTable1の通りである。

**Table1** 培養条件

コンポーネント	最終濃度	ネガティブ コントロール	人参養栄湯添加群 10 ug/ml
IMDM		848 µl	828 µl
100x Penicillin/streptomycin	0.1%	1	1
100x β-mercaptoethanol	0.1%	1	1
100% FBS	15%	150	150
漢方溶解液 500 ug/ml	10 ug/ml	-	20
Total		1 mL	1 mL

### フローサイトメトリーによる血球分化評価

人参養栄湯添加または投与後の血球分化をフローサイトメトリー法で評価した。培養細胞は PBS に浮遊させ、室温で 30 分インキュベートした。細胞は抗マウス CD45, Gr1, Mac1, F4/80, CD4, CD8, B220 抗体で染色後、 $1-5 \times 10^4$  細胞のデータ取

得し FlowJo ソフトにて解析した。

### DNAマイクロアレイ後の*in silico*解析

アジレントテクノロジー社の DNA マイクロアレイ後解析後、DAVID を用いて分類解析を行った (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)。

<参考文献>

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.

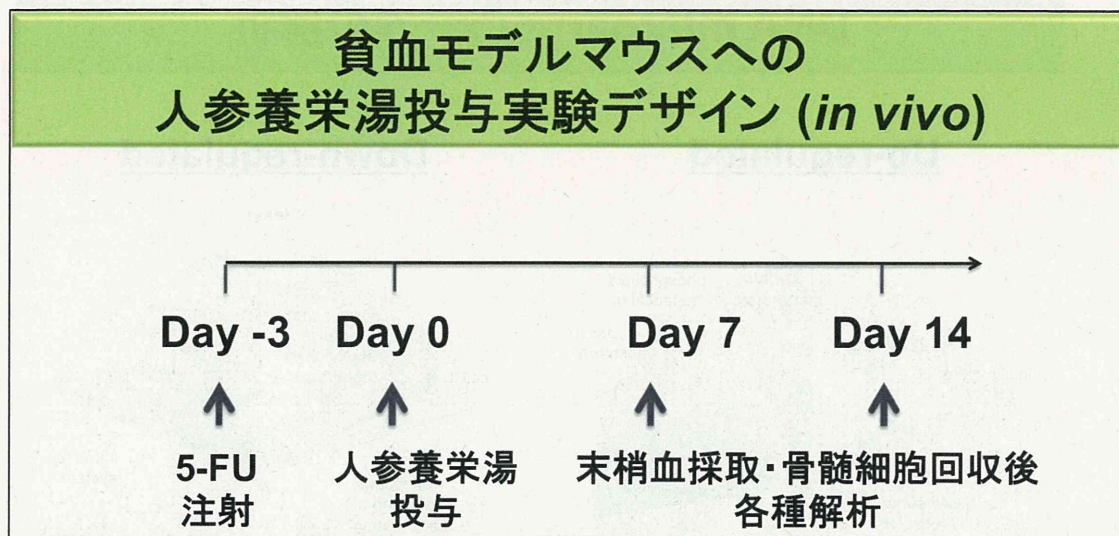
Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.

### 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 法 (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。*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')
Dok2-Fw	AGGAGCCAGCTGTGAAGCA
Dok2-Rw	GCTAGGGCACAGCCAGACTCT
Drosha-Fw	GACCCCGGACTCTCTGTAGA
Drosha-Rw	CGTGTGTGCCCATGTTGAAC
Dicer 1-Fw	CTTGAGGCTGCTTCGGTTCT
Dicer 1-Rw	CAGGCCCCACGAGCAA
β-actin-Fw	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT
β-actin-Rw	GCCACCGATCCACACAGAGT

## In vivo人参養栄湯投与実験



貧血モデル作製には、既報に基づき5フルオロウラシル(5FU)を用いた。5FU投与後3日目以降、蒸留水へ溶解した人参養栄湯を、4-6ヶ月齢のC57BL/6Jマウスへ経口投与した。投与量は1,000 mg/kg body weightとし、2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。

### microRNA発現解析

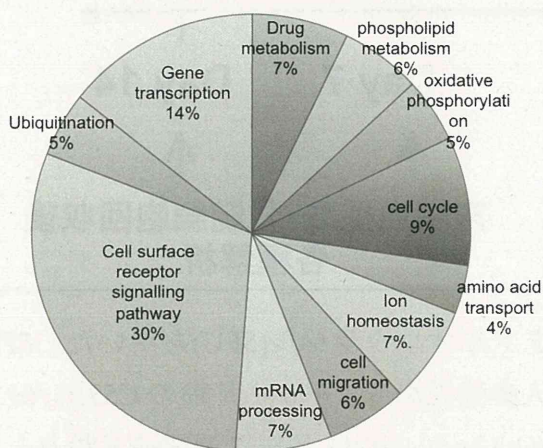
人参養栄湯によるmicroRNA(miRNA)発現への影響を評価するため、成熟miRNAを生成する核酸分解酵素Drosha及びDicer1の遺伝子発現を測定した。マウス骨髓より採取した単核球を人参養栄湯添加・未添加条件下で培養し、1・2・3日目に細胞を回収した。回収後RNAqueous®-4PCR Kit (Life Technologies)を用いてTotal RNAを抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Life Technologies)によりcDNAを作製した。real time PCR法にはFAST SYBR®Green Master Mix (Life Technologies)を用い、Drosha及びDicer1の遺伝子発現を評価した。

## C. 研究結果

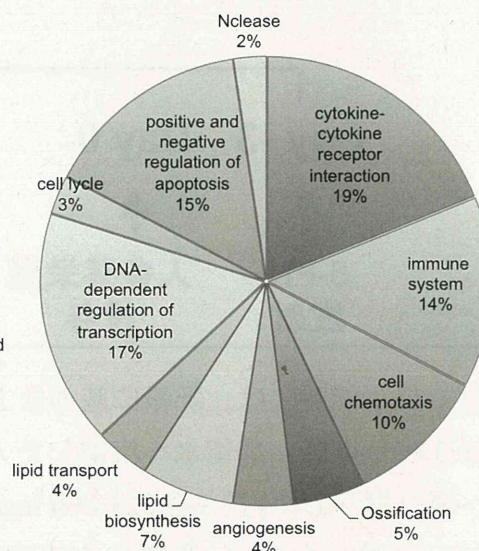
### DNA microarrayデータの解析

## DNA microarrayデータの解析

### Up-regulated



### Down-regulated



昨年度において、人参養栄湯添加条件下における遺伝子発現の網羅的解析を行うため、骨髄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、DNAマイクロアレイ法で解析した。その結果を元に、コントロール群に対して人参養栄湯添加群で発現が亢進した分子(上図・Up-regulated)、発現が低下した分子(上図・Down-regulated)に関してDAVIDを用いて(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)分類した。その結果、発現亢進分子(Up-regulated)は、Cell surface receptor signalling pathway関連分子 (30%)をはじめ、Gene transcription関連分子 (14%)、Cell cycle関連分子 (9%)、Drug metabolism関連分子・Ion homeostasis関連分子・mRNA processing関連分子 (各7%)、Phospholipid metabolism関連分子・Cell migration関連分子 (各6%)等が含まれた。発現低下分子(Down-regulated)は、Cytokine-cytokine receptor interaction関連分子 (19%)をはじめ、DNA-dependent regulation of transcription関連分子 (17%)、Positive and negative regulation of apoptosis関連分子 (15%)、Immune system関連分子 (14%)、Cell chemotaxis関連分子 (10%)、Lipid biosynthesis関連分子 (7%)、Ossification関連分子 (5%)等が含まれた。

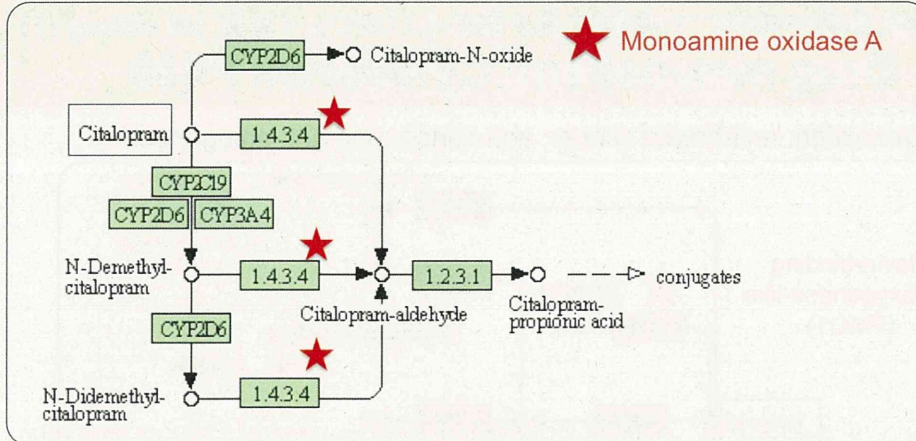




人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (in silico) (3)

## Drug metabolism: Cytochrom P450

Citalopram: anti-depression drug

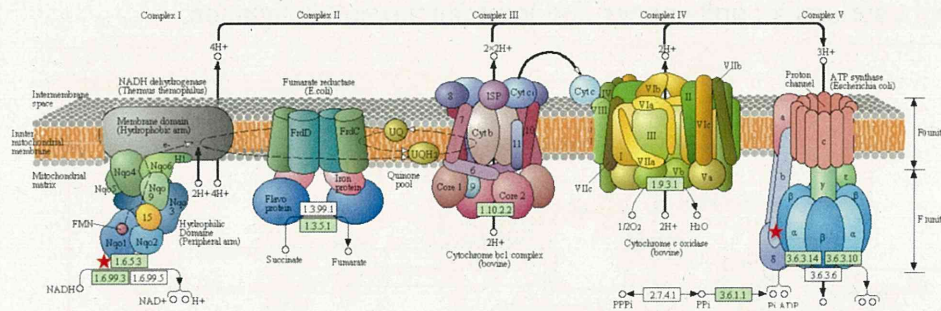


Monoamine oxidase A catalyzes the oxidative deamination of biogenic and xenobiotic amines and has important functions in the metabolism of neuroactive and vasoactive amines in the central nervous system and peripheral tissues.

人參養榮湯添加細胞にて発現亢進を認めるパスウェイ検索 (in silico) (4)

## Oxidative phosphorylation

The metabolic pathway in which the mitochondria in cells reform ATP, energy source for cells.

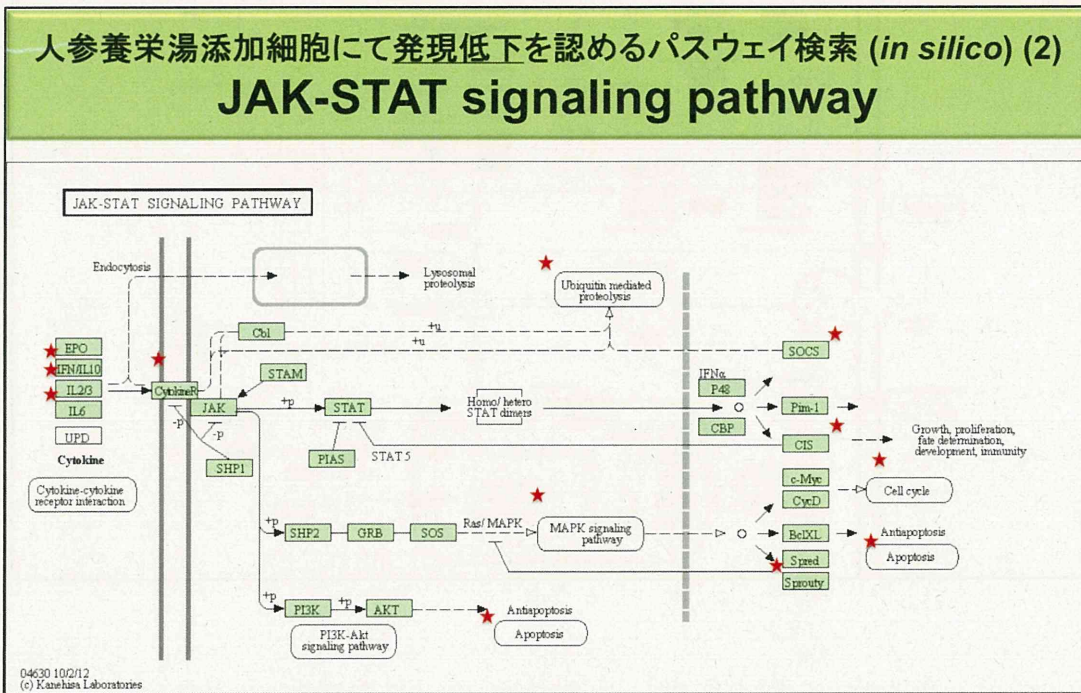
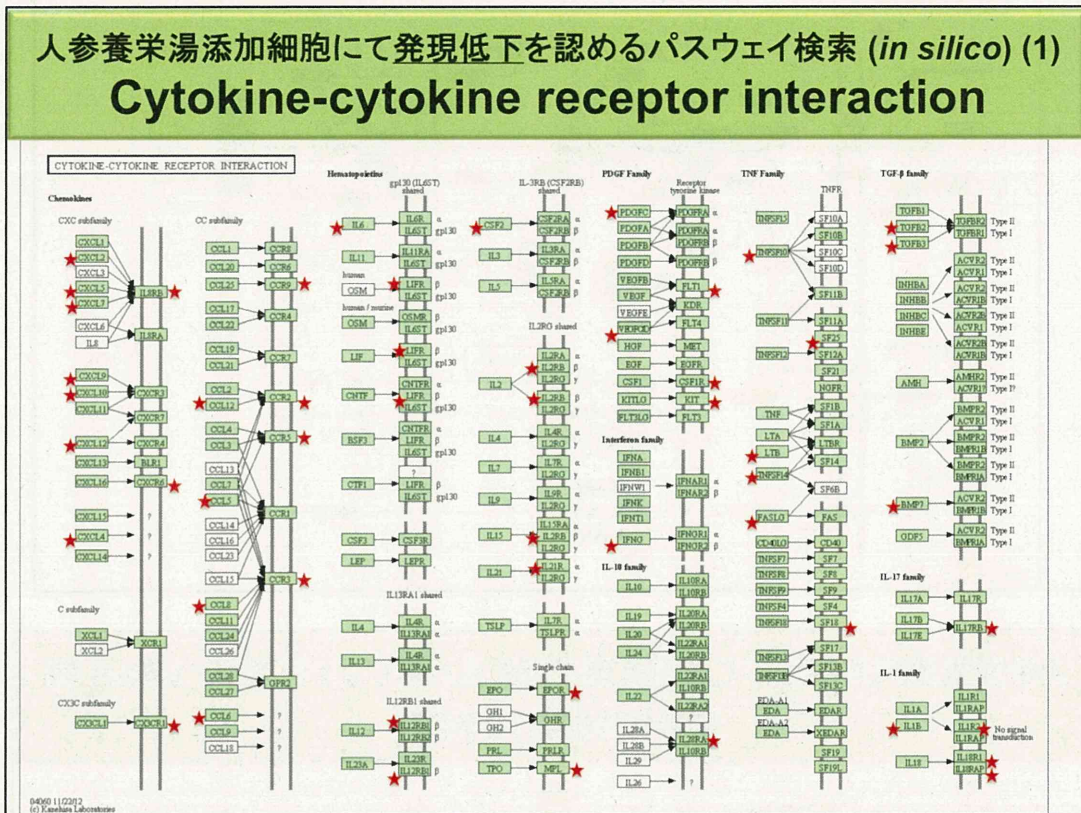


★ NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4

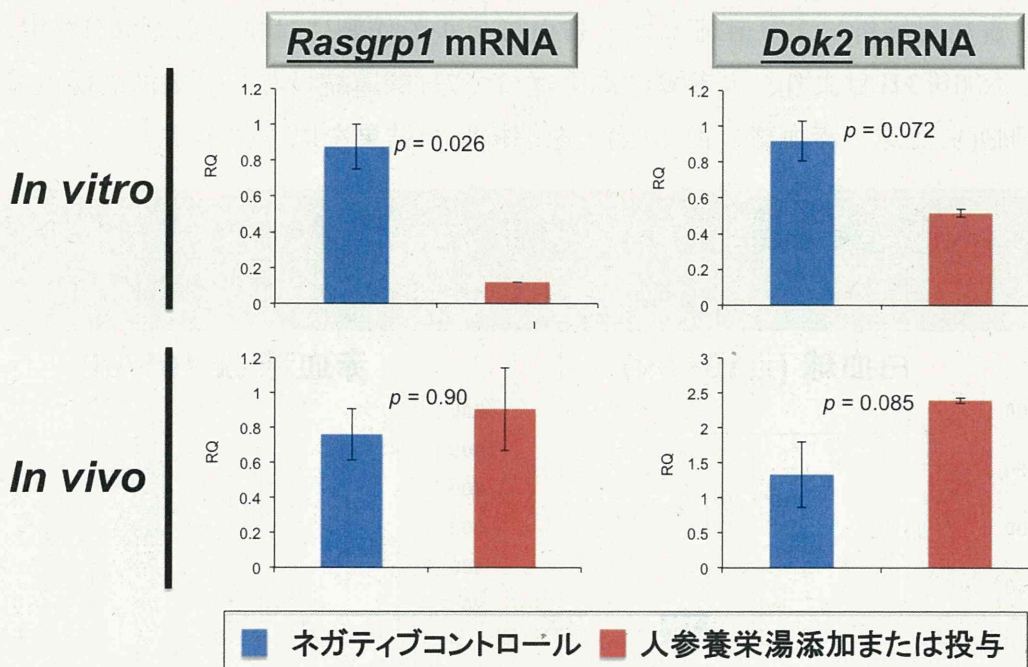
★ ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting mitochondrial F<sub>1</sub> complex, beta subunit



人參養榮湯添加群で発現低下を認めるパスウェイの*in silico*解析を行った。代表的な関与パスウェイを以下6つ示す。赤色の星印はマイクロアレイ解析にて人參養榮湯添加で発現が低下した分子を示す。



## DNA microarrayデータの検証

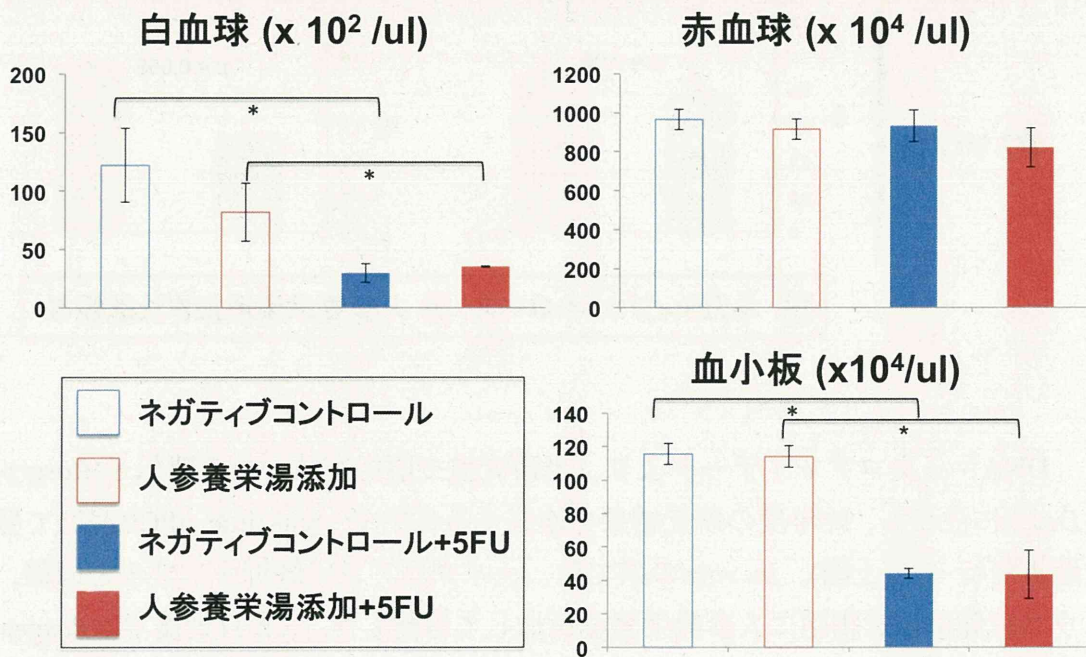


DNAマイクロアレイデータより、当研究室で解析実績のある遺伝子(*Rasgrp1*, *Dok2*)に注目し、昨年度の研究結果を検証する目的で、real-time qPCR法にて発現解析を行った(上図)。*In vitro*の系では、マイクロアレイ解析サンプルと同様、マウス骨髄単核球細胞に人參養榮湯を添加して培養した。培養11日後では*Rasgrp1*, *Dok2* mRNAともにネガティブコントロール群に比べて添加群において発現が有意に抑制されていた( $p < 0.05$ )。 *In vivo*の系では、マウスへ人參養榮湯投与後28日目に解剖し、骨髄単核球を回収した(コントロール群6匹；人參養榮湯群8匹)。投与28日後では*Rasgrp1* mRNAはネガティブコントロール群と添加群でその発現に差は認められなかった(上図・左下)。一方、*Dok2* mRNAはネガティブコントロール群に比べて添加群で発現が亢進する傾向が認められた(上図・右下)。これらの結果より、少なくとも本解析系では、*in vitro*のmRNA発現結果が、*in vivo*にそのまま反映されない事が示唆された。

## 5FU誘導性貧血モデルの作製と人参養栄湯投与実験

上述の*in vivo*解析系では健常な成体マウスへの人参養栄湯投与実験を行った。人参養栄湯は本来、貧血患者に対する治療薬として使用されているため、次に我々は貧血モデルマウスにおける、人参養栄湯の影響を遺伝子発現解析及びタンパク質発現解析により評価した。貧血モデルの作製には抗がん剤5FUを用いた。5FU添加後3日目より、人参養栄湯を経口で7日間連続投与し、末梢血採血後に血液細胞(白血球、赤血球、血小板)数を解析した結果を以下に示す。

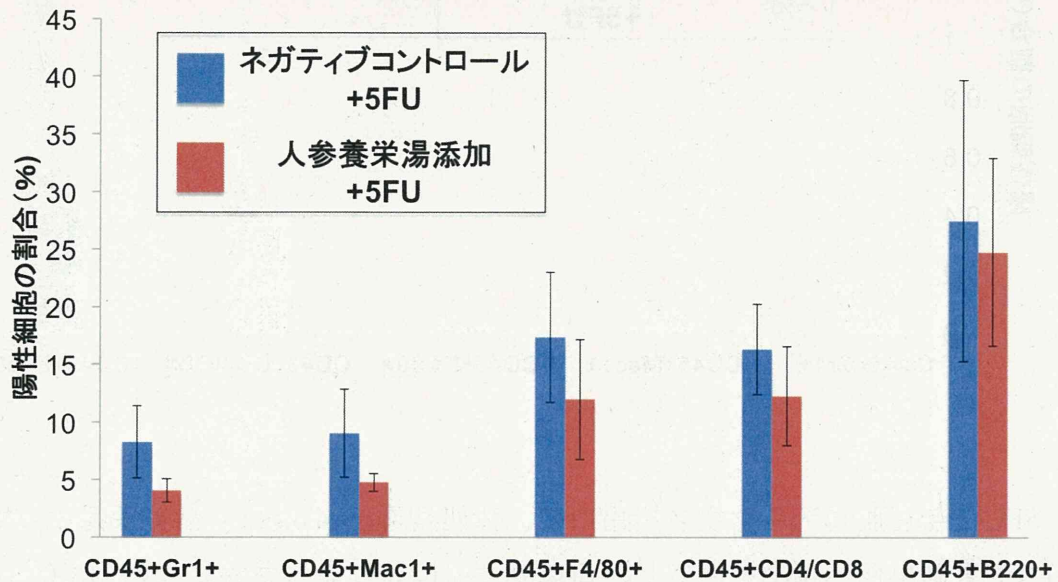
### 人参養栄湯投与後の血液パラメーターの変化 (*in vivo*)



白血球(上図・左上)、血小板(上図・右下)においてはネガティブコントロール、人参養栄湯添加に関わらず、5FU誘導群にて7日後では血球数の有意な減少を認めたものの、赤血球(上図・右上)においては血球数減少を認めなかった。さらに、5FU誘導群において、ネガティブコントロール群(青塗り)と人参養栄湯添加群(赤塗り)を比較した場合、白血球数は人参養栄湯添加群において、1.2倍増加が認められた。一方、赤血球数減少し、血小板数は変化が認められなかった。これらの結果より、5FU誘導性貧血モデルにおいて、人参養栄湯は白血球造血を亢進することが示唆された。

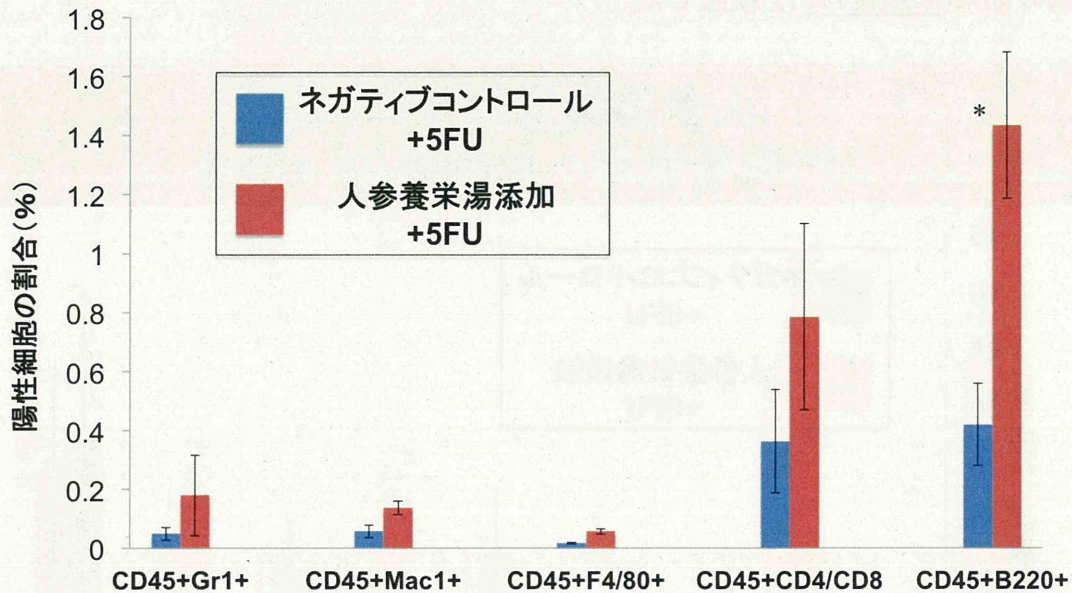
次に我々は、白血球造血の中で具体的にどの種類の白血球造血が亢進したのかを確認する目的で、5FU投与貧血モデルマウスを用いて、無処理群(n=6)及び人參養榮湯添加群(n=4)より骨髓単核球細胞を採取し、白血球造血における人參養榮湯の効果(添加後7日)を検証した。

## 人參養榮湯投与による 白血球造血への効果(*in vivo*)



CD45(白血球マーカー)、Gr1(顆粒球マーカー)、Mac1(顆粒球・マクロファージマーカー)、F4/80(マクロファージマーカー)、CD4/CD8(Tリンパ球マーカー)、B220(Bリンパ球マーカー)を組み合わせて白血球造血をフローサイトメトリー解析にて評価した。人參養榮湯添加群(上記・赤塗り)は無添加群(上記・青塗り)に比して、各陽性細胞の割合(%)が低い傾向を認めた(CD45+/Gr1+は3.6倍、CD45+/Mac1+は0.49倍、CD45+/Gr1+は0.53倍、CD45+/F4/80+は0.69倍、CD45+/CD4CD8+は0.75倍、CD45+/B220+は0.90倍)ものの、全てにおいて有為差は認められなかった。この結果は、人參養榮湯添加7日では白血球造血を亢進しないことを意味する。次に添加後14日目にて白血球造血を検討した。

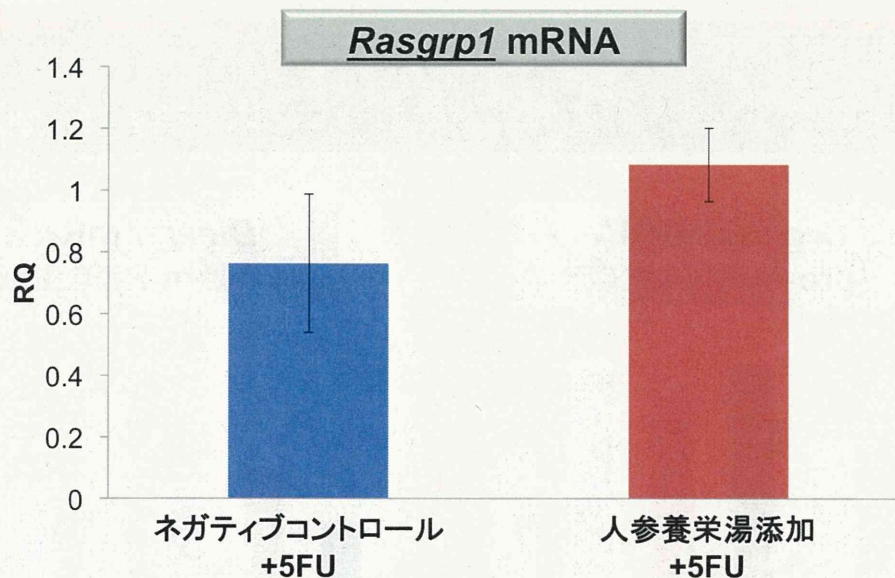
## 人參養榮湯投与による 白血球造血への効果(*in vivo*)



5FU投与貧血モデルマウスを用いて、無処理群(n=4)及び人參養榮湯添加群(n=4)より骨髓単核球細胞を採取し、白血球造血における人參養榮湯の効果(添加後14日)を検証した。上述の結果と同様の方法で評価した結果、人參養榮湯添加群(上記・赤塗り)は無添加群(上記・青塗り)に比して、各陽性細胞の割合(%)が高い傾向を認めた(CD45+/Gr1+は3.6倍、CD45+/Mac1+は3.6倍、CD45+/Gr1+は2.3倍、CD45+/F4/80+は3.0倍、CD45+/CD4CD8+は2.2倍、CD45+/B220+は3.4倍)。このうち有為差は認められたのは、CD45+B220+のBリンパ球のみであった。この結果から、人參養榮湯は*in vivo*において、とくにBリンパ球造血を亢進することが示唆された。



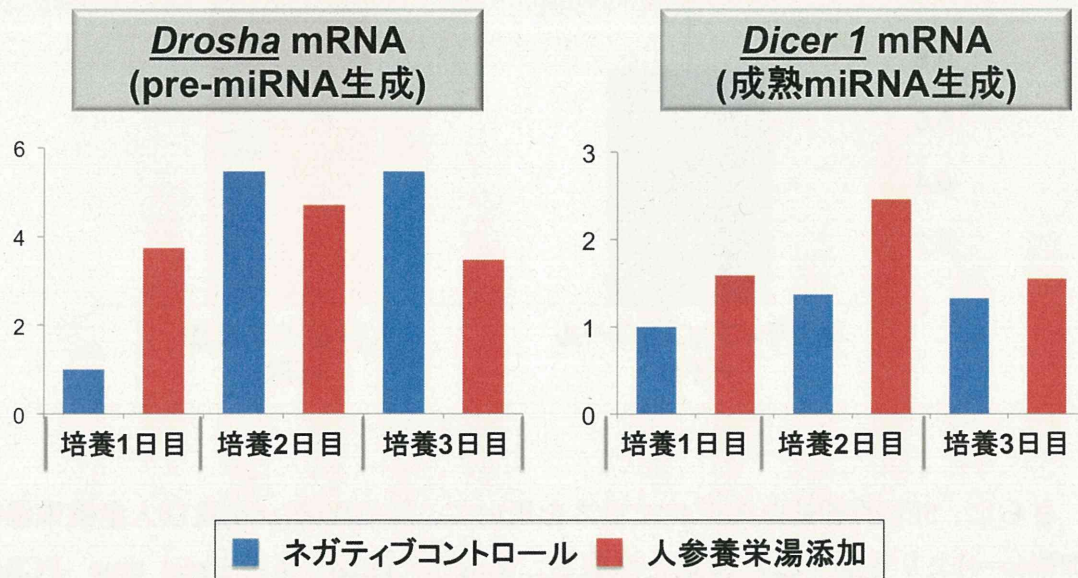
## 人参養栄湯投与後の遺伝子発現の変化 (*in vivo*)



さらに、5FU誘導貧血モデルマウスを用いて、無処理群(n=4)及び人参養栄湯添加群(n=4)より骨髓単核球細胞を採取し、*Rasgrp1* mRNA発現をreal time -PCR法により、比較検討したところ、人参養栄湯添加後14日において、*Rasgrp1* mRNA発現は、人参養栄湯添加群で発現が1.42倍亢進していた(有為差は認められなかった)。この結果は、上述の健常な成体マウスへの人参養栄湯投与後の発現結果と異なる。

## miRNA発現解析

### 人参養栄湯添加後の miRNA生成遺伝子発現の変化 (*in vitro*)



さらに人参養栄湯がmiRNAの生成、成熟に与える影響を確認するために、マウス骨髄単核球を用いて、その効果を検討した。miRNA生成の指標として、成熟miRNAを生成する核酸分解酵素、*Drosha*及び*Dicer 1*の発現解析を行った。*Drosha*は培養後1日後において、人参養栄湯添加群で発現亢進し、その後発現抑制を認めた。*Dicer 1*は培養後1-3日後において、人参養栄湯添加群で常に発現亢進を認めた。これらの結果から、人参養栄湯が共通して*Drosha*, *Dicer 1*発現を亢進させるのは培養1日後であることが明らかとなった。実際に*Drosha*タンパク質、*Dicer*タンパク質として核酸分解を行いmiRNAが生成されるのため時間差が生じることを考慮し、培養2日後の細胞を用いて、miRNAアレイ解析を行っている段階である。

(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

DNAマイクロアレイ法にて、人参養栄湯添加条件下での遺伝子発現の網羅的解析を行った。マウス骨髄単核球細胞培養11日後で、コントロール群に対して人参養栄湯添加群の遺伝子発現を比較した場合、発現亢進分子の中には、Cell surface receptor signaling pathway関連分子 (30%)、Gene transcription関連分子 (14%)、Cell cycle関連分子 (9%)等が、また発現低下分子は、Cytokine-cytokine receptor interaction関連分子 (19%)をはじめ、DNA-dependent regulation of transcription関連分子 (17%)、regulation of apoptosis関連分子 (15%)等が含まれた。血液細胞を含め、細胞の増殖・分化を制御するタンパク質群として既に知られているサイトカインはリガンドとして働き、特定の細胞表面受容体を介して細胞内シグナルを活性化させる。中にはシグナル下流が明らかなものもあり、最終的には転写因子を活性化することで、標的遺伝子の発現を制御する。DNAマイクロアレイの結果より、人参養栄湯(または含有構成生薬)はマウス単核球では受容体を介したシグナル経路およびサイトカインシグナルを制御していること、また転写制御を行うことが示唆された。本研究においては、人参養栄湯の細胞への取り込み機構の解明や、機能解析によるシグナル経路の同定には至っていないものの、得られたデータベースは作用機序の解明という点で大変有用だといえる。

DNAマイクロアレイの候補分子の検証を*in vitro*, *in vivo*で行った結果、白血球造血を亢進する*Rasgrp1* mRNAおよび*Dok2* mRNAに関して*in vitro*, *in vivo*の発現結果が一致する結果ではなかった。*In vitro*では人参養栄湯の直接的な効果を検討するためにサイトカインは添加していないのに対し、*in vivo*ではマウス体内にサイトカインはじめとする活性物質が含まれるため、人参養栄湯以外のfactorの影響も反映されて人参養栄湯自体の効果がマスクされた可能性が原因の一つとして考えられる。よって実験系(解析日数、培養条件、解析細胞等)の検討が必要だと考えられる。

貧血マウスモデルを用いた *in vivo* 人参養栄湯投与実験では、既報と同様に赤血球数に加え、白血球数が増加した。特にBリンパ球造血に加え、マクロファージ造血が亢進したことを、各種マーカー発現および遺伝子発現レベルで示した点で本研究は新規性が高いと言える。