

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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

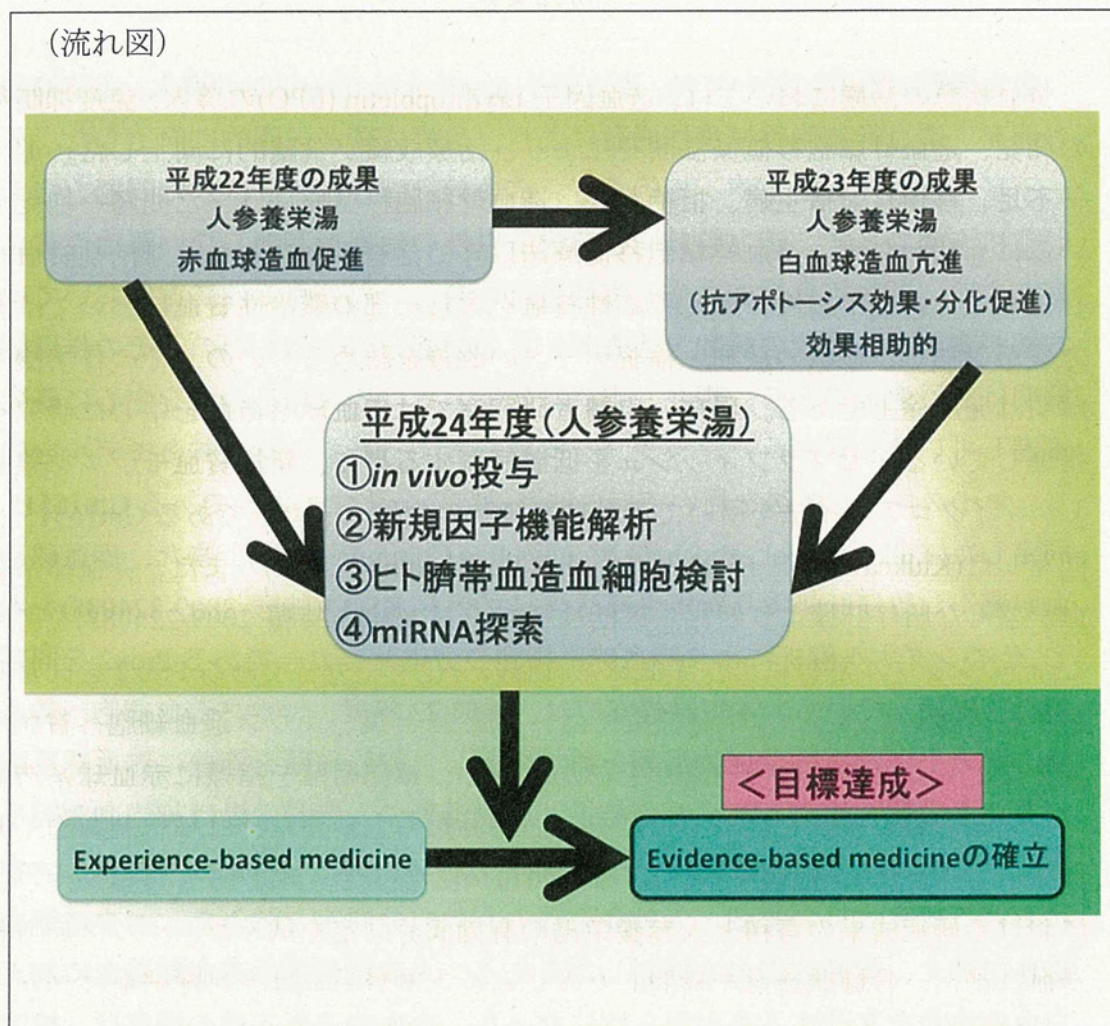
研究代表者 杉山 大介 九州大学病院・特任准教授

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、四物湯類の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。

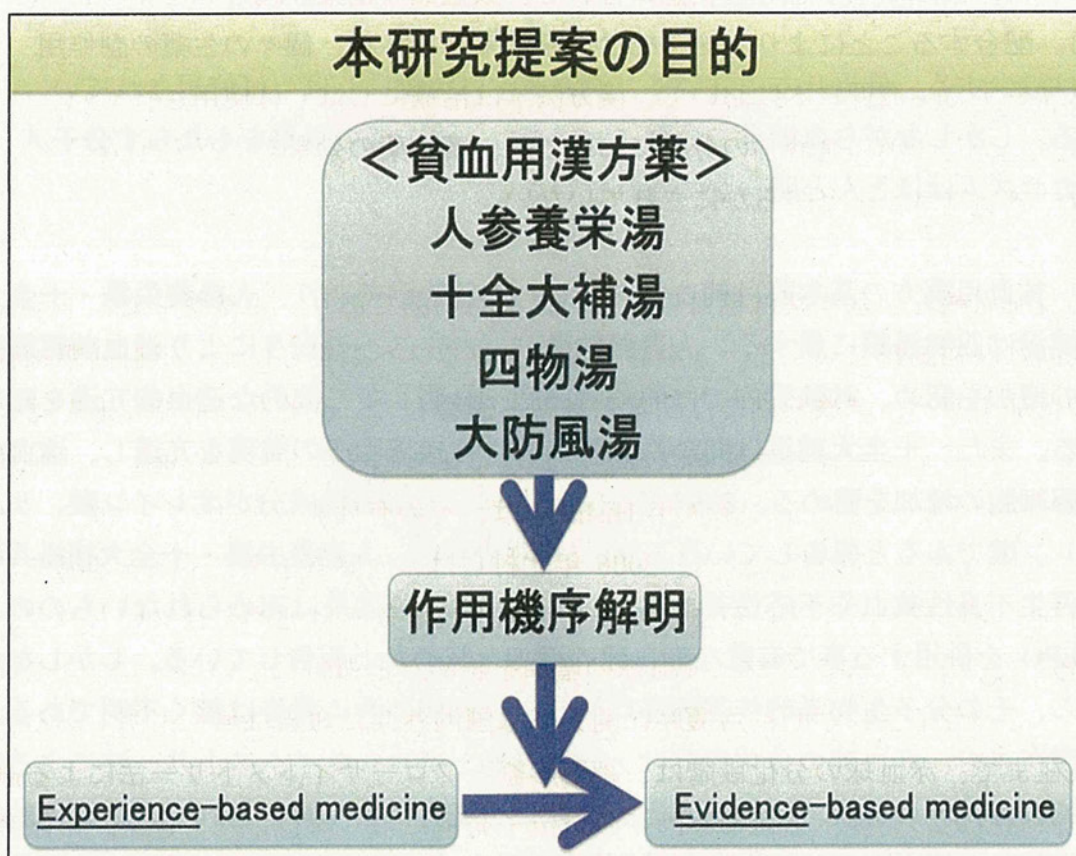


A. 研究目的

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、マウスへの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、その有効成分がオレイン酸、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を併用する事で有意な赤血球の増加を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に関して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。



B. 研究方法

漢方薬の調整

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5,000rpmで5分遠心し、上清のみ0.45 μ m孔フィルターで濾過した。漢方溶解液の保存濃度は500 μ g/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により単核球を分離後、 1×10^6 cell/mlの細胞密度で48穴培養プレートに播種、37□, 5% CO₂にて培養した。培養条件はTable1の通りである。

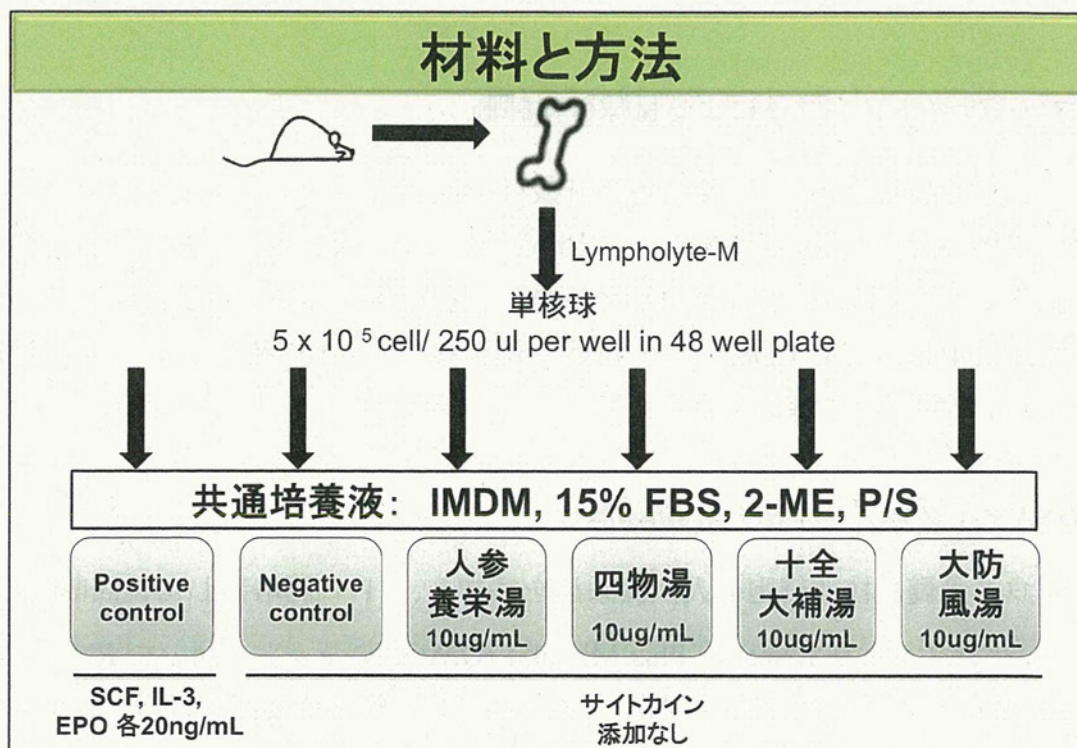


Table1 培養条件

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 μ l	828 μ l
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

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。赤血球の評価は抗マウスCD71, Ter119抗体で染色後、白血球の評価は抗マウスCD45, Gr1, Mac1, F4/80, CD4, CD8, B220抗体で染色後、 $1-5 \times 10^4$ 細胞のデータを取得しFlowJoソフトにて解析した。

DNAマイクロアレイ法と*in silico*解析

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DNA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。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 (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
Dok2-Fw	AGGAGCCAGCTGTGAAGCA
Dok2-Rw	GCTAGGGCACAGCCAGACTCT
Drosha-Fw	GACCCCGGGACTCTCTGTAGA
Drosha-Rw	CGTGTGTGCCCATGTTGAAC
Dicer 1-Fw	CTTGAGGCTGCTTCGGTTCT
Dicer 1-Rw	CAGGCCCCACGAGCAA
β-actin-Fw	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT
β-actin-Rw	GCCACCGATCCACACAGAGT

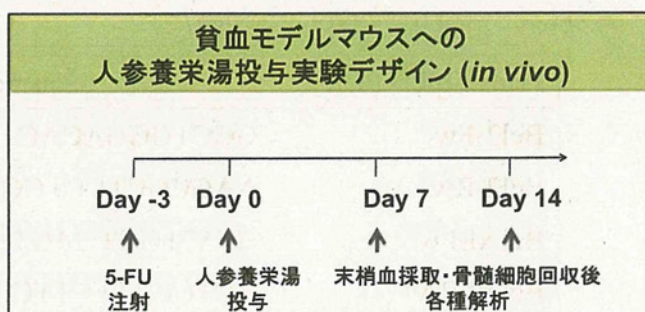
マクロファージ貪食能試験

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、ビーズの取込み評価による、マクロファージの貪食能を解析した。

In vivo人参養栄湯投与実験

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。これらのマウスから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。

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

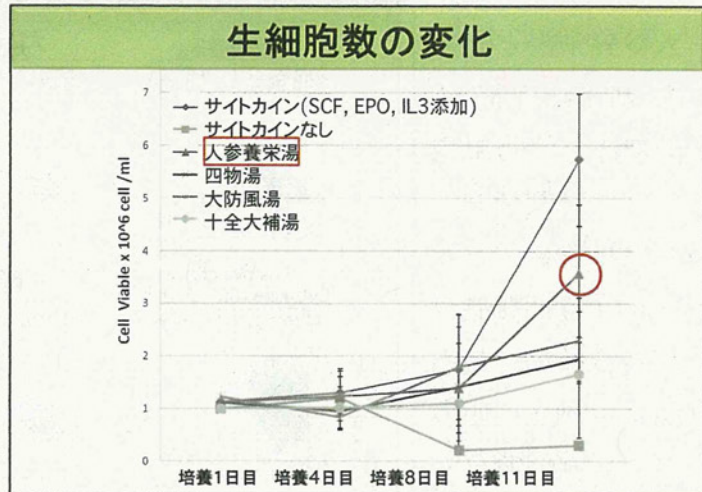
人参養栄湯による microRNA(miRNA)発現への影響を評価するため、成熟 miRNA を生成する核酸分解酵素 Droscha 及び Dicer1 の遺伝子発現を測定した。マウス骨髓より採取した単核球を人参養栄湯添加・未添加条件下で培養し、1・2・3 日目に細胞を回収した。回収後、RNAqueous®-4PCR Kit (Life Technologies) を用いて Total RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Life Technologies) により cDNA を作製した。real time PCR 法には FAST SYBR®Green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

C. 研究結果

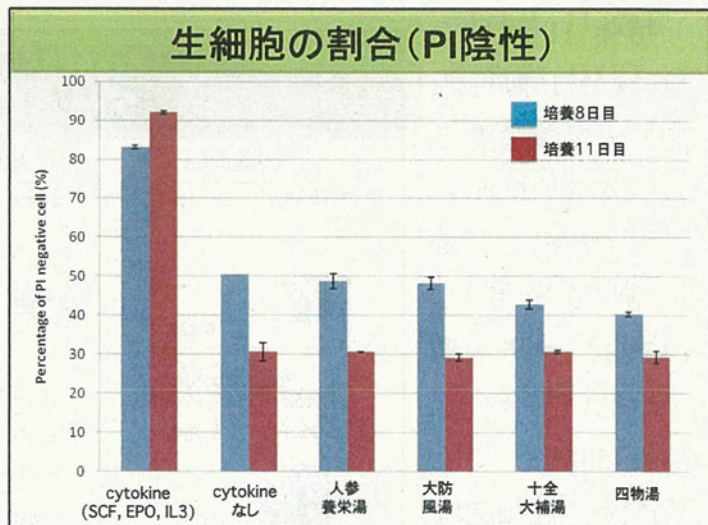
平成22年度

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数が増加した一方、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 種類の漢方薬添加 (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。



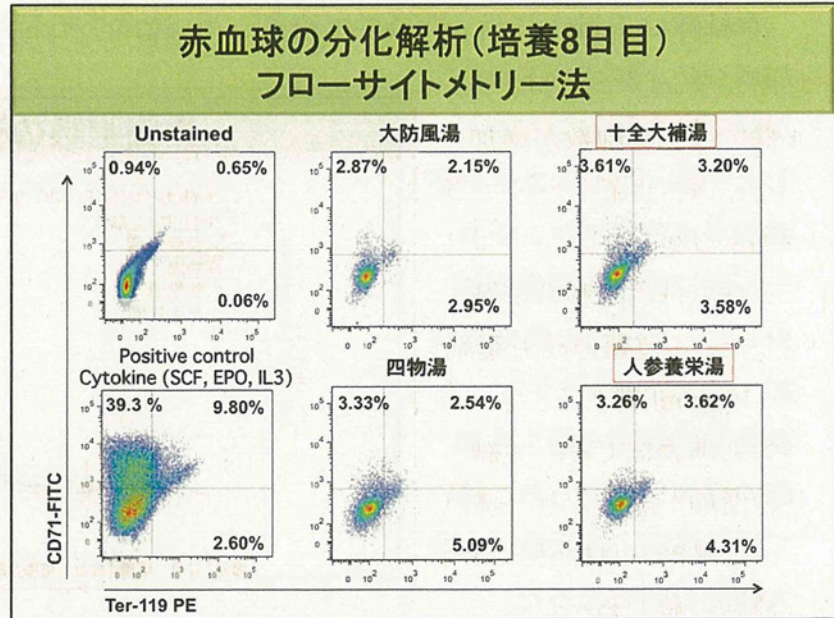
また、培養8, 11日目の生細胞の割合についてPI陰性を指標に評価したところ、培養8日目で人參養榮湯と大防風湯はネガティブコントロール(サイトカイン非添加)とほぼ同様の約50%の生細胞率であったのに対し、十全大補湯と四物湯ではやや低い約40-43%の生存率であった。また培養11日目では4種類の漢方薬添加群はネガティブコントロールと同様の約30%の生細胞率であった。



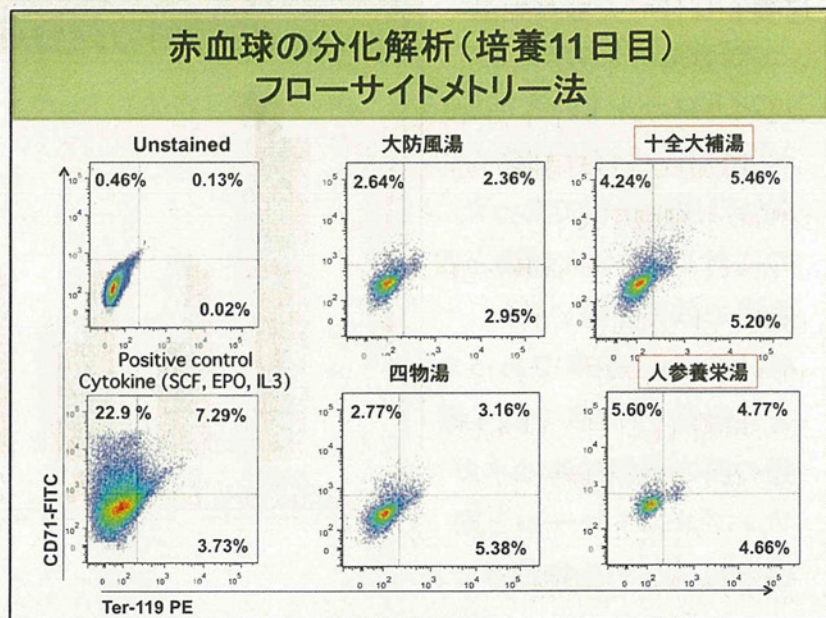
赤血球分化の評価

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%)。

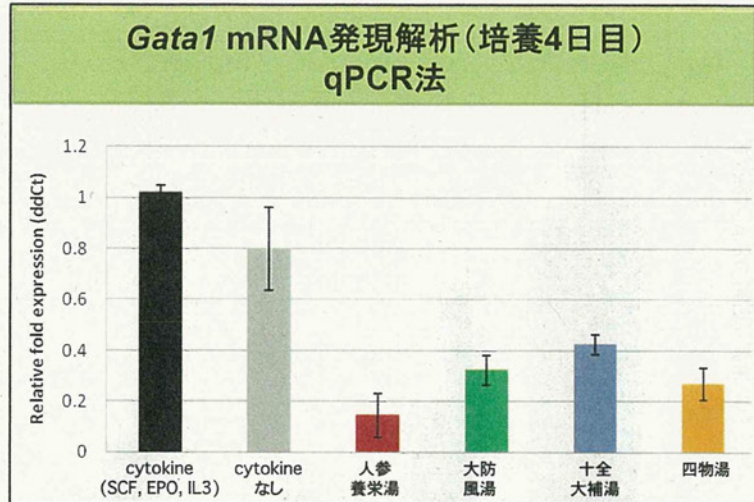


培養11日目では、CD71 陽性細胞は人參養榮湯で最も高く(10.4%)、十全大補湯でも高い割合を示し(9.7%)、大防風湯では低い割合を示した(5.0%)。また Ter119 陽性細胞は、十全大補湯で最も高く(10.7%)、人參養榮湯でも高い割合を示した(9.4%)のに対し、大防風湯では低い割合にとどまった(5.3%)。



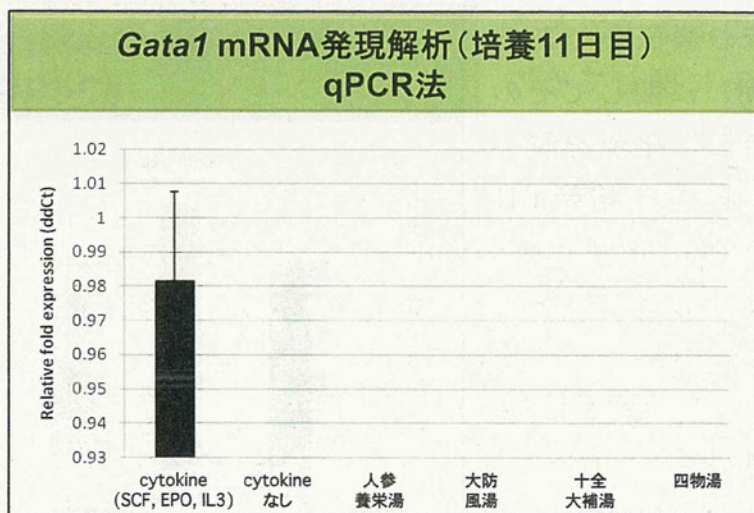
また、4種の漢方薬を添加後、赤血球系特異的な *Gata1*, *Klf1* の遺伝子発現を検討した。

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* 遺伝子の高発現が認められた。

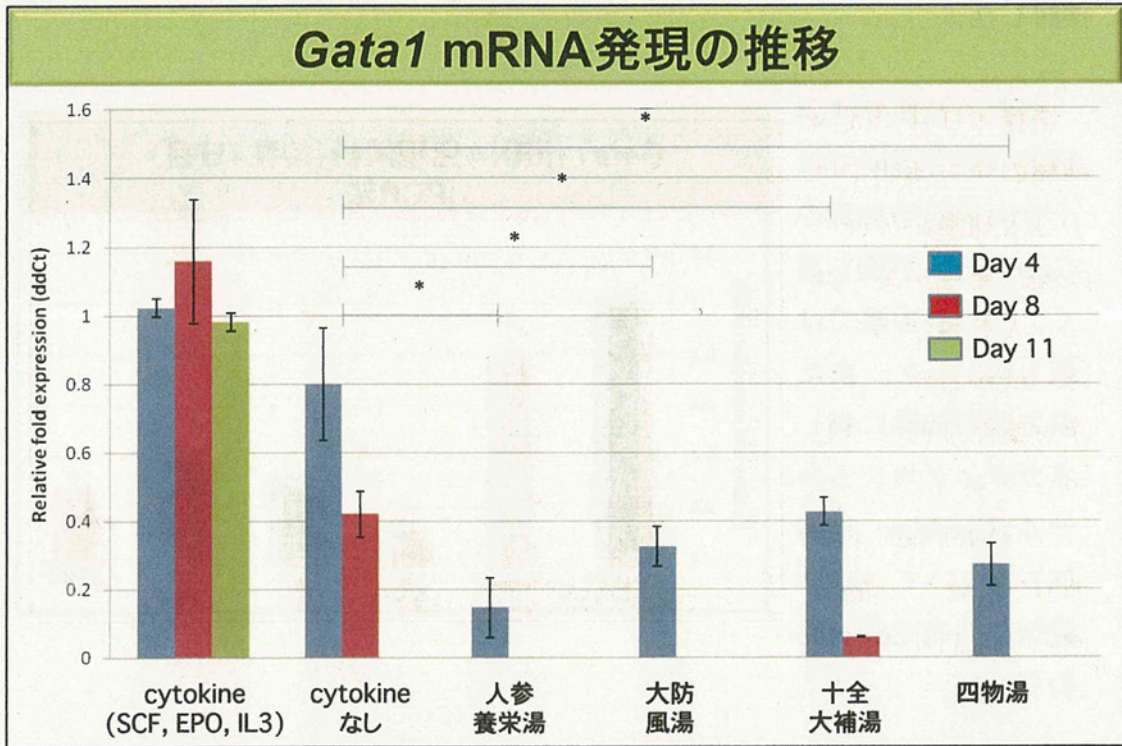


培養8日目では、4種類の漢方薬間では十全大補湯添加群の *Gata1* 発現が最も高く、四物湯では最も低かった。(人参養栄湯、大防風湯は single well でのみの発現確認の為、発現量は低いと判断した。)また8日目においても4日目と同様、漢方薬添加群に対しネガティブコントロールにおいて *Gata1* 遺伝子の高発現が認められた。

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において *Gata1* 遺伝子の発現は認められず、ポジ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。

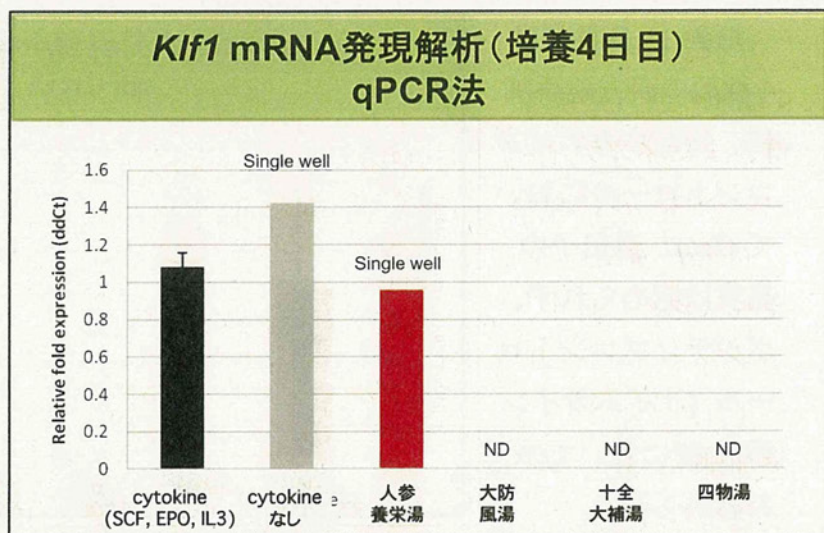


培養 4, 8, 11 日目での *Gata1* 遺伝子発現の推移を下図にまとめた。



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* 遺伝子の発現が最も高く、この時期に赤血球造血が最も盛んであると考えられた。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、人参養栄湯ではその発現が最も低かった。

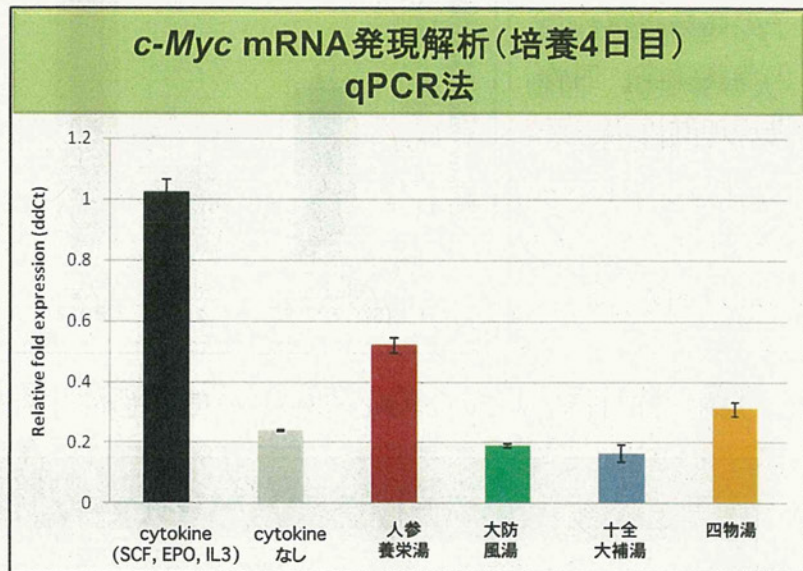
さらに *Gata1* の下流の遺伝子である *Klf1* に関してその遺伝子発現を調べたところ、培養 4 日目では、ネガティブコントロールと人参養栄湯でわずかに *Klf1* 遺伝子の発現が認められたが、他の大防風湯、十全大補湯、四物湯ではその発現は認められなかった。



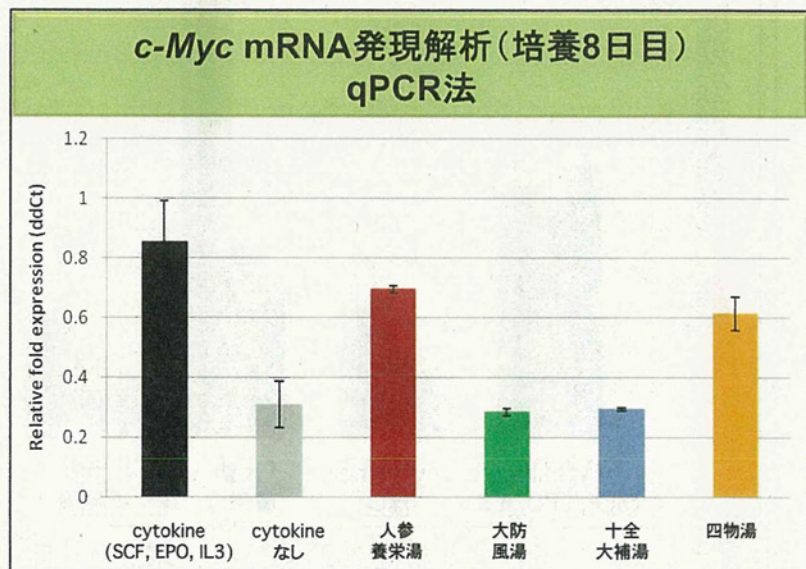
細胞増殖の評価

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* の遺伝子発現を検討した。

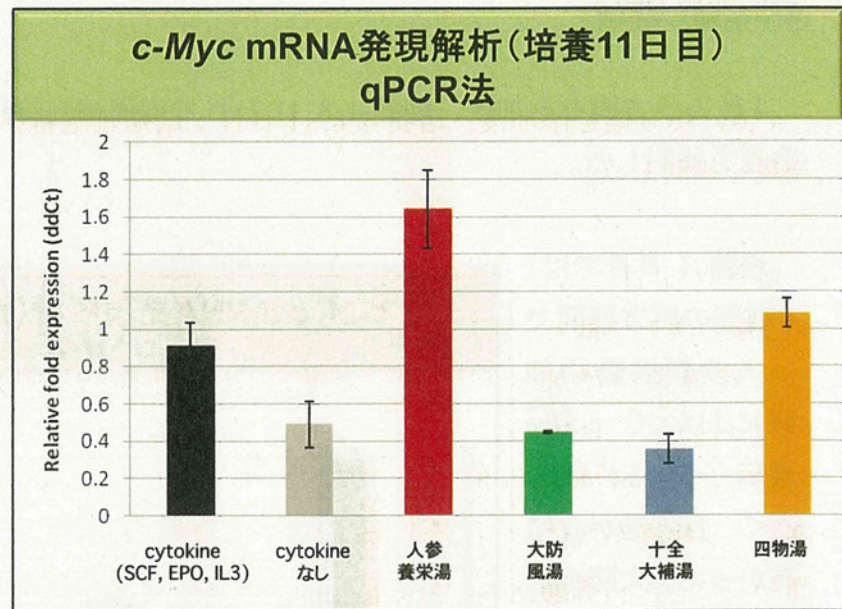
培養4日目では、4種類の漢方薬間では人參養栄湯添加群において *c-Myc* 遺伝子発現が最も高く、四物湯が次に高かった。大防風湯、十全大補湯添加群はネガティブコントロール(Cytokine非添加)よりも低発現であった。



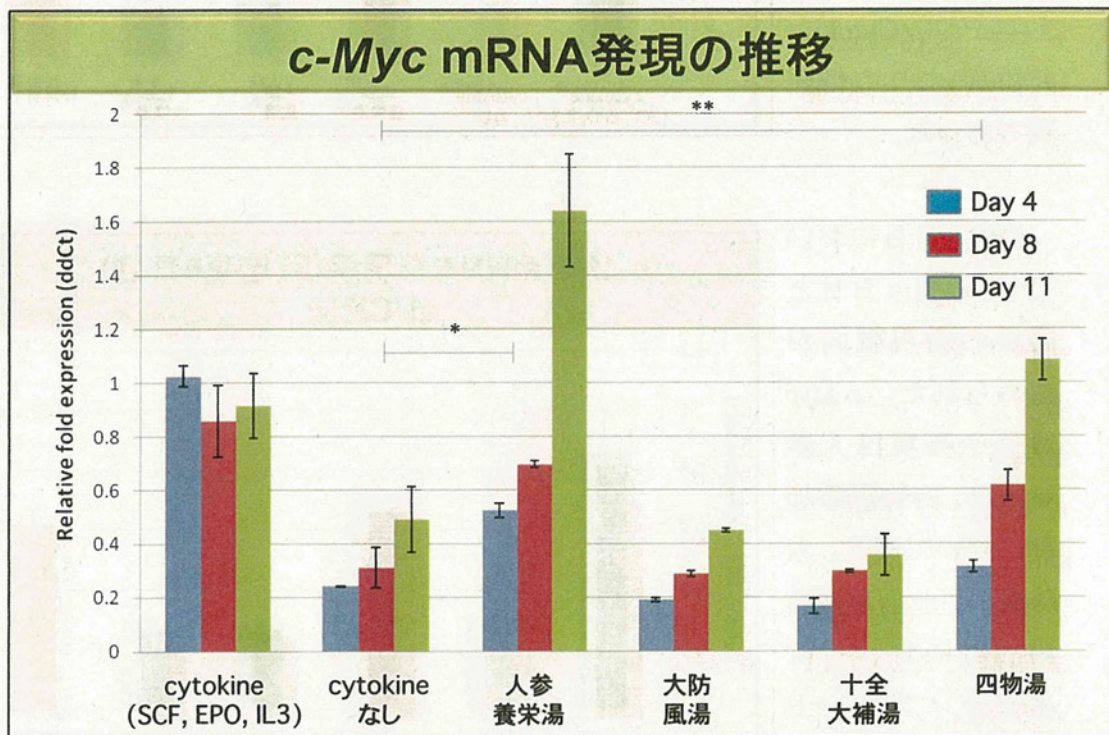
培養8日目においても、培養4日目と同様の発現傾向が認められた。*c-Myc* 遺伝子発現は人參養栄湯、四物湯添加群において高く、大防風湯、十全大補湯添加群においてはネガティブコントロールよりも低発現であった。



培養 11 日目においても同様の発現傾向が認められたが、驚くべきことに *c-Myc* 遺伝子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)を上回った。



培養 4, 8, 11 日目での *c-Myc* 遺伝子発現の推移を下図にまとめた。



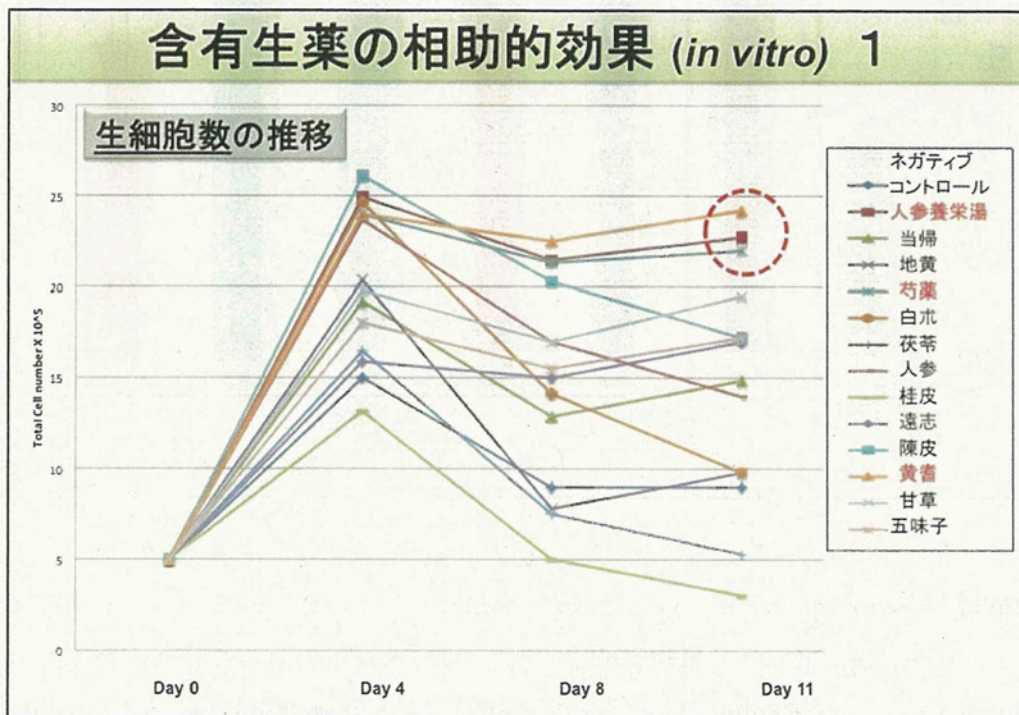
ポジティブコントロール群を参照すると、培養 11 日間を通して、*c-Myc* 発現に大きな変動はなく、細胞が一定に増殖していたと考えられた。人参養栄湯および四物湯添加群はネガティブコントロールと比較した場合、*c-Myc* 遺伝子発現に有意差が認められた。また全ての漢方薬添加群において、培養日数が進むにしたがって、*c-Myc* 発現が亢進することが明らかとなった。

平成23年度

In vitro 人参養栄湯または構成生薬添加による骨髓細胞の増殖評価

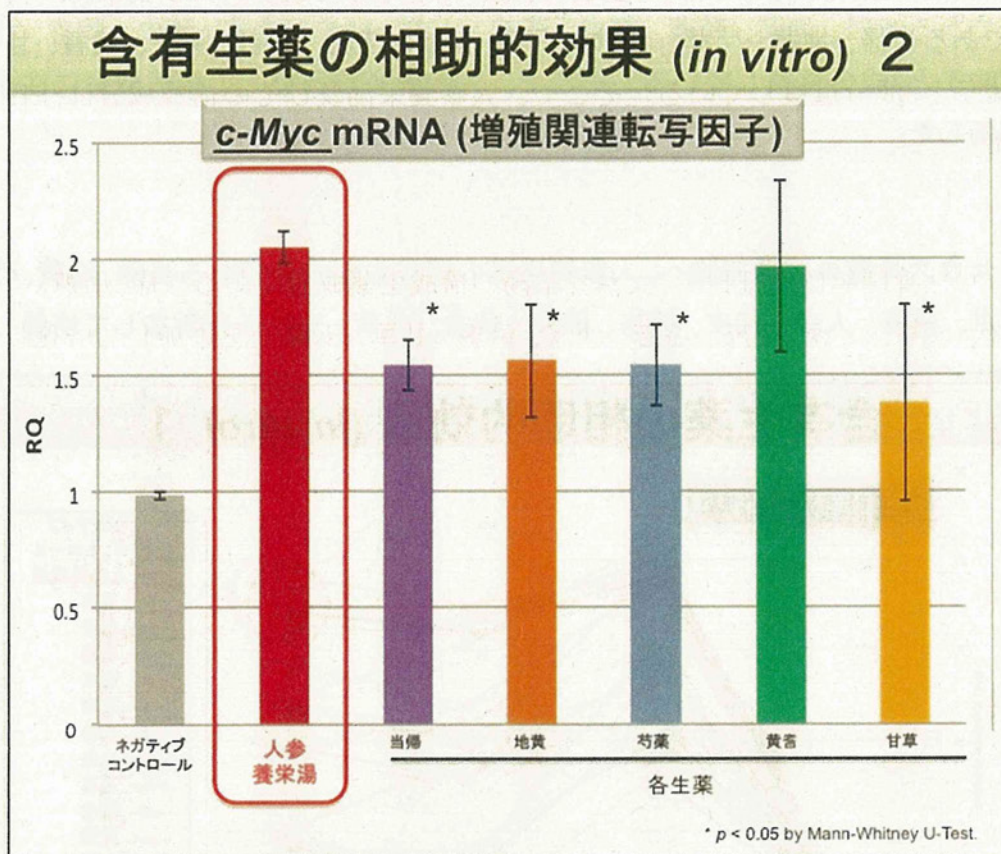
四物湯の構成成分は当帰、地黄、芍薬、川きゅうであり、人参養栄湯の構成成分である当帰、地黄、芍薬、白朮、茯苓、人参、桂皮、遠志、陳皮、黄耆、甘草、五味子と3成分重複している。そこで、人参養栄湯及びその構成成分に注目して解析した。

マウス骨髓単核球細胞へ、人参養栄湯の構成生薬成分である当帰、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。

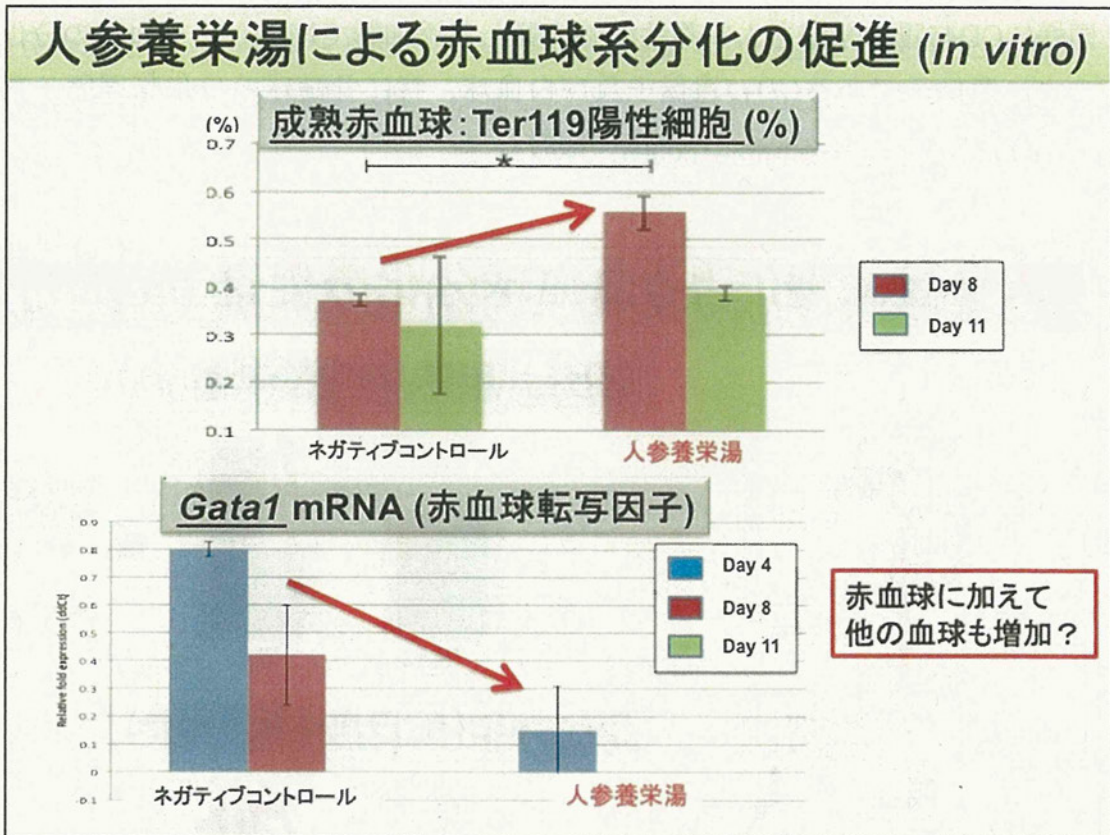


上図のように、茯苓、桂皮では、コントロールに比し細胞増殖効果が認められなかったが、他の成分では細胞増殖効果が認められた。中でも、培養11日目における芍薬、黄耆の効果は顕著だった。

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。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。



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。



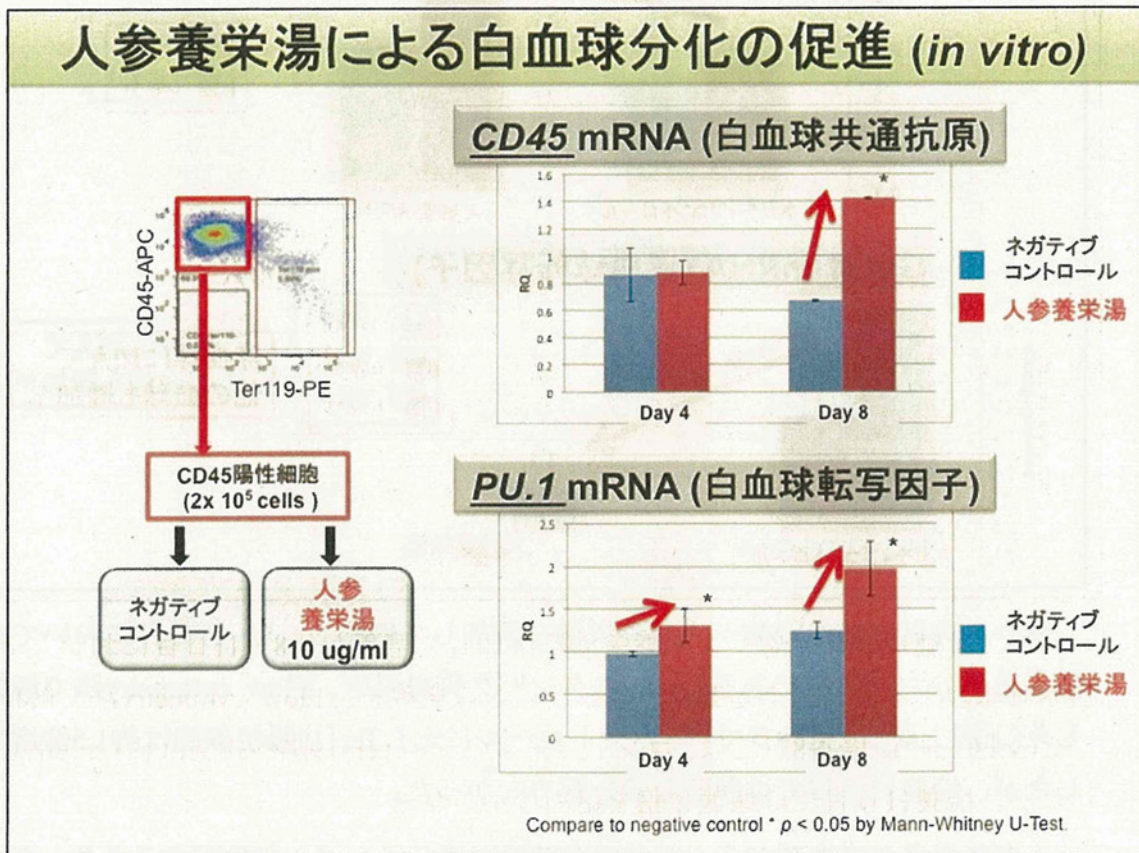
マウス骨髄単核球細胞へ人参養栄湯を添加して培養し、8・11日目において成熟赤血球のマーカであるTer119のタンパク質発現を、Flow cytometry法で解析した(上図上段)。培養8日目では、コントロールに比しTer119陽性細胞は約1.5倍増加したが、培養11日目では顕著な差を認めなかった。

人参養栄湯の赤血球分化・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、人参養栄湯添加群共に、Gata1遺伝子の発現は認められなかった。

以上の結果から、人参養栄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。そこで次に、人参養栄湯による血球分化への効果を検証した。

白血球造血の評価

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、特に骨髄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。

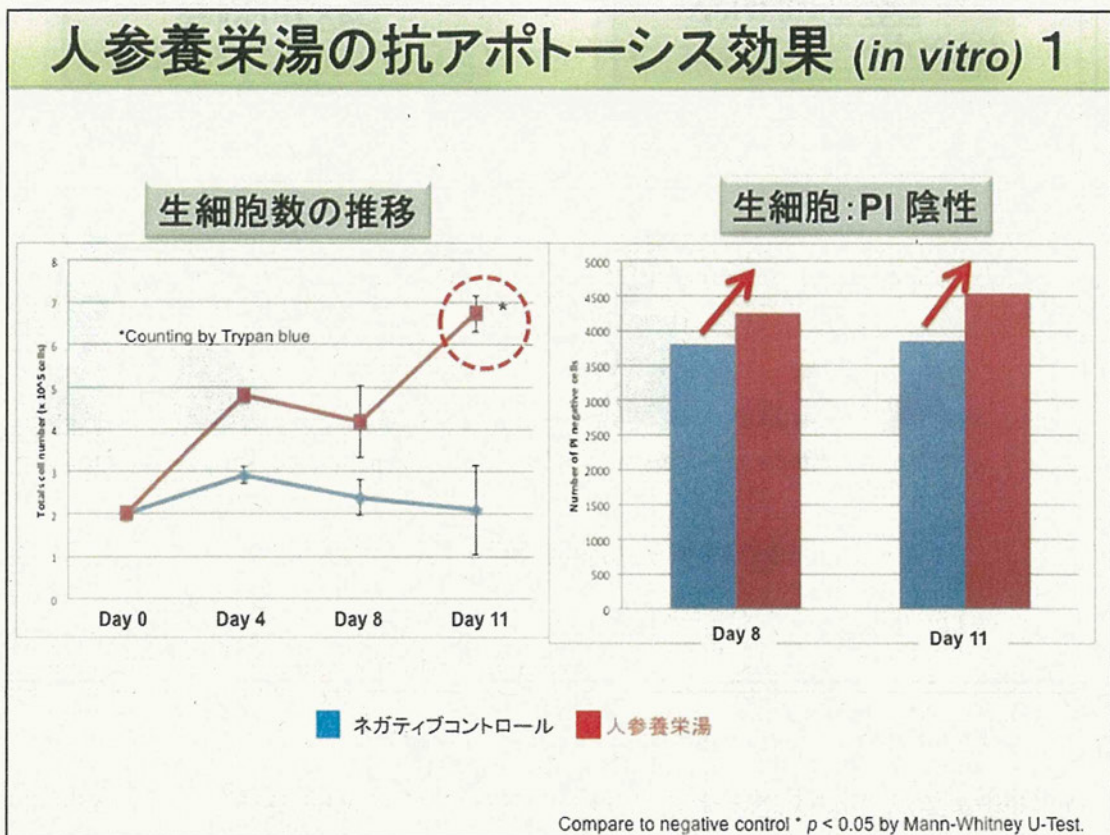


培養4日目では、*CD45*遺伝子の発現は著変を認めなかったが、*PU.1*遺伝子の発現は亢進を認めた。また、培養8日目では、*CD45*遺伝子・*PU.1*遺伝子共に発現亢進を認めた。

以上の結果から、人参養栄湯の骨髄細胞増殖効果は、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。

抗アポトーシス効果の評価

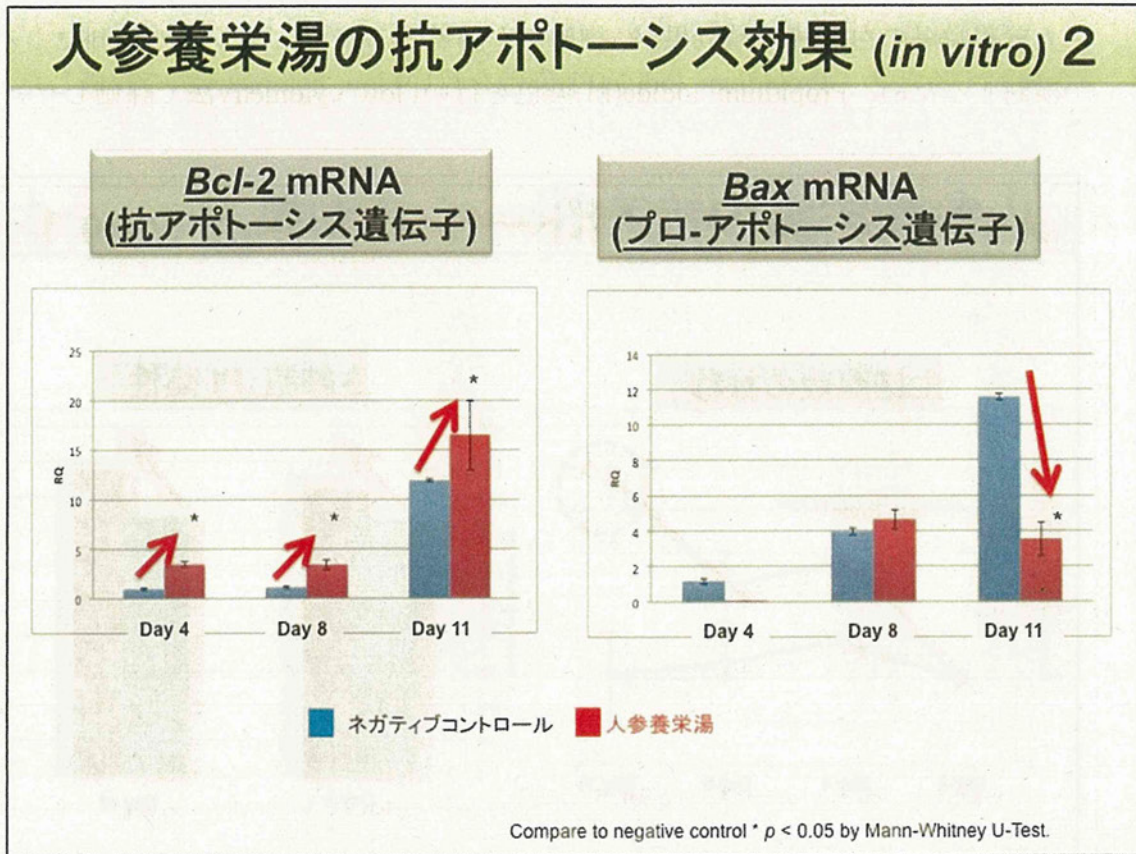
人参養栄湯の白血球増殖効果が、細胞死を誘導するアポトーシスの抑制によるか検討するため、Propidium Iodide(PI)染色を行いFlow cytometry法で評価した。



骨髓単核球細胞を人参養栄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、人参養栄湯添加群では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、次に人参養栄湯の抗アポトーシス効果を検討した。



人参養栄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、人参養栄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。