

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08912

研究課題名(和文) iPS細胞によるドラッグ・リポジショニング法を用いた新規抗サルコペニア剤の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-sarcopenia agent using drug re-positioning method with iPS cells

研究代表者

萩原 圭祐 (Hagihara, Keisuke)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：60423183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：牛車腎気丸(GJG)は、寝たきりの誘引となるサルコペニアを改善することから、その有効成分の同定により、新たな抗サルコペニア剤の候補化合物を探索することを目的とした。SAMP8マウス由来のiPS細胞は樹立したが、in vitroでは、GJGの筋肉細胞への影響は弱かった。そこで、GJGの抗炎症作用に焦点を当てたところ、GJGは、SAMP8マウスとマウスマクロファージ様細胞株RAW264.7細胞において、TNF- α の産生抑制効果を示し、構成生薬の桂枝由来のCinnamaldehyde、牛膝由来のChikusetsusaponin が新規抗サルコペニア剤の候補となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Frailty, means the elders who need care in the near future, Sarcopenia has been noted in the physical aspect of frailty. We already reported the effect of Go-sha-jinki-Gan (GJG) on sarcopenia by using senescence-accelerated mice (SAMP8) via normalizing signal transduction through the IGF-1-Akt axis, mitochondrial-related transcription factors, and suppressed TNF- α . We investigated an active ingredient derived from components of GJG as a candidate of anti-sarcopenic drug. We established iPS cell lines derived from SAMP8 mice, however, the effect of GJG on C2C12 cells, a mice muscle cell line, was weak using several in vitro assays. Next, we focused on the anti-inflammatory effect of GJG. GJG showed an inhibitory effect on the production of TNF- α in SAMP8 mouse and mouse macrophage-like cell line RAW 264.7 cells. Cinnamaldehyde derived from Cinnamon Bark and Chikusetsusaponin - V derived from Achyranthes Root could be a candidate for new anti-sarcopenia agent.

研究分野：内科学総論

キーワード：iPS細胞 ドラッグリポジショニング サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

近年、急速な高齢化を示す本邦では、寝たきりの高齢者が 2025 年には 230 万人に達すると推計され、重大な社会問題となっている。寝たきりを引き起こす疾患としては、平成 22 年度厚生労働省国民生活基礎調査によれば、認知症、脳血管疾患を抑え、運動器の障害が第一位に挙げられている。運動器の障害の中でも、サルコペニアが寝たきり状態を誘発する重要な因子として注目を集めている。サルコペニアとは、加齢に伴う筋力の低下・および筋肉量の減少を意味し、80 才以上では 50%以上が罹患しているといわれている。サルコペニアは加齢に伴って変化する身体活動低下の他、栄養摂取量・ホルモン・炎症反応など様々な要因が関与するといわれ、サルコペニアが生じると、易転倒・転落から骨折、体動制限、サルコペニアの進行という悪循環を呈し、寝たきり状態を誘発するといわれる (Cruz-Jentoft, AJ et al. Age Ageing 2010)。サルコペニアの予防や治療は重要な課題であるが、サルコペニアに対する有効な手段としては、現在のところ、筋力トレーニングのみで、必須アミノ酸・ホルモン剤・ACE 阻害薬などの臨床研究も行われているが、十分な有効性は確認されておらず (Sayer, AA et al. Age Ageing. 2013)。新たな治療手段の開発が望まれている状況である。

研究代表者は、長年、IL-6 を中心に、関節リウマチやキャスルマン病などの炎症性疾患の基礎および臨床研究に従事し、血中 IL-6 の上昇を指標に、高齢者によく併発する筋肉の炎症性疾患であるリウマチ性多発筋痛症にトシリズマブが有用であることを世界で初めて報告した (Hagihara et al. J Rheumatol 2010)。ステロイド抵抗性であった肩の痛みや、両手のこばり、筋力低下が、IL-6 の阻害により劇的に改善しただけでなく、インシュリン自己注射が必要であった糖尿病も劇的に改善したことである。IL-6 は、筋肉が分泌する重要なサイトカインの一つであり、myokine と呼ばれることから、老化と炎症、筋肉と代謝性疾患が、強く関連することが想定された。そこで、研究代表者は、平成 23 年より、筋肉の老化であるサルコペニアの研究を開始した。漢方では、加齢によって引き起こされる、骨の退行性変化・腰膝に力が入らない・しびれといった症状を「腎虚」とよび、補腎薬とよばれる漢方薬を使用する。補腎剤の代表的方剤である牛車腎気丸 [以下 GJG] のサルコペニアへの効果を、老化促進マウスである SAMP8 を使って、検討した。その結果、SAMP8 マウスが、筋線維の減少などサルコペニアに特徴的な変化を示すことを見出し、GJG 投与でサルコペニアが回復することを世界で初めて発見した。さらに、我々は、牛車腎気丸の薬効の分子機序を明らかにすることができた。

GJG は、血中の IGF-1 を上昇させ、Akt のリン酸化シグナルの改善から、筋萎縮の改善

や筋肉中のグリコーゲンの合成を改善し、PGC-1 の発現増強に代表されるミトコンドリア機能の回復や、TNF- α の発現を低下させ、抗炎症効果を示すなど、GJG は、複数のシグナルのバランスを改善させ、抗サルコペニア作用を示すことが明らかになった。

2. 研究の目的

GJG の有効成分を同定することにより、新たな抗サルコペニア剤を開発する候補化合物を同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) SAMP8 マウス由来 iPS 細胞の作成。

妊娠 12 日齢の SAMP8 マウス胎仔線維芽細胞 (以下 MEF) を採取し、山中因子を導入し、被験細胞用 MEF を、フィーダー細胞上に播種し、9 日間培養し、iPS 細胞様コロニーを、6 クローン確認した。6 クローンから、最も品質のいいクローンを選択し、テラトーマ形成試験を行った。

2) GJG 構成生薬由来の化合物ライブラリーから有効成分を同定するためのスクリーニング系の確立。

C2C12 細胞の分化方法および免疫蛍光染色
マウス骨格筋由来細胞である C2C12 筋芽細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS)、100U/ml ペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco 's modified Eagle 's medium DMEM 培地で、5%CO₂、37 °C の条件下で培養した。100%コンフルエントになったところで、2%horse serum を含む DMEM に交換し、96 時間分化させた。C2C12 筋管細胞を、一次抗体反応 (Ab: anti-sarcomeric α -actinin) を 4 °C で一晩行い、二次抗体 (Ab: anti-mouse IgG) を室温で 1 時間反応させた後、Alexa で発色、DAPI で核染・封入し蛍光顕微鏡で観察し、分化を確認した。その条件で、C2C12 筋管細胞に GJG および GJG 由来化合物ライブラリーを添加した。

C2C12 細胞を用いた ATP の評価方法

C2C12 筋芽細胞 (5x10⁴cells/ml) を 96 穴プレートに播種し、96 時間で筋管細胞に分化させた後に、分化培地に交換 24 時間後に GJG を添加し、Intracellular ATP 測定キット (東洋ビーネット株式会社) を用いて、細胞内における ATP 量を測定した。

C2C12 細胞を用いたグリコーゲンの定量方法
上記と同様に C2C12 筋芽細胞 (5x10⁴cells/ml) を筋管細胞に分化させた後 GJG を添加し、Glycogen Colorimetric Assay Kit (BioVision) を用いて、細胞溶解液のグリコーゲン量を測定した。

RAW264.7 細胞を用いた TNF- α の評価方法
マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞 (1x10⁵cells/ml) を 96 穴プレートに播種し、10%ウシ胎児血清 (FBS)、100U/ml ペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco 's modified Eagle 's

s medium DMEM 培地で 5%CO₂、37 °C の条件下で 48 時間培養した。その後、10、100ug/ml の GJG または GJG 由来化合物を含む無血清 DMEM 培地に交換し、24 時間培養した。さらに、LPS 濃度が 10ng/ml になるように培地に添加し、24 時間培養した。培養上清に産生された TNF- α の量は Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA kit (R&D Systems)を用いて測定した。

3)SAMP8 マウスを用いた GJG の有効性の再検討

SAMP8 マウス 7 週から飼育し、8 週から GJG、八味地黄丸 (GJG の構成生薬から牛膝と車前子抜いたもの)、六味丸 (八味地黄丸から桂枝、ブシ抜いたもの)を混餌で食べさせマウスの筋肉量を評価し、サイトカイン発現などの検討を行った。同時に、8 週、16 週、24 週、32 週から GJG を混餌で食べさせ、4 週ごとに、体重、握力を評価した。

4) 候補化合物の細胞内シグナルへの影響、膜透過性、代謝安定性など物性の検討。以上 1 - 3 で得られた結果を基に、候補化合物の検討を行った。

4. 研究成果

1) SAMP8 マウス由来 iPS 細胞の作成。

マウス胎児線維芽細胞由来 iPS 細胞を 3 匹の雄性 NOD/ShiJic-scid Jcl (NOD-SCID) マウス (9 週齢) の精巣 (右側) 被膜下に移植後 12 週に精巣部に形成した腫瘍の病理組織学的検査を実施し、3 胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) への分化を観察した。各検体の腫瘍を 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、各腫瘍から 2 カ所を切り出し、以下常法に従ってパラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し光学顕微鏡で観察した。その結果、全動物の精巣部に形成した腫瘍内に外胚葉由来である神経系組織 (神経膠組織及び未熟な神経上皮組織) 及び扁平上皮組織、中胚葉由来である軟骨組織、及び内胚葉由来である線毛円柱上皮組織及び無線毛円柱上皮組織と 3 胚葉に由来する組織を認めことから、精巣部に形成した腫瘍は奇形腫であると考えられた。作成した iPS 細胞様クローンが多分化能を有することが確認されたことから、我々は、老化促進マウス由来の iPS 細胞株を樹立することができた。

マウス胎児線維芽細胞由来 iPS 細胞 (クローン 1c1) のテラトマ形成試験 (試験番号: 1512185) - 病理組織学的検査 (精巣被膜下腫瘍, 個体番号: No. 01)

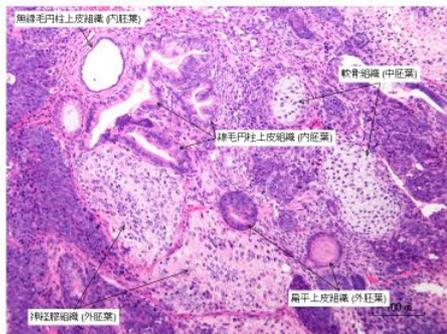
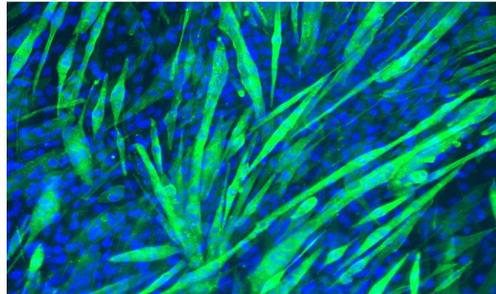


図 1. No. 01 精巣被膜下腫瘍 HE染色, 200倍。外胚葉、中胚葉及び内胚葉の各組織が1視野に認められる。

2) GJG 構成生薬由来の化合物ライブラリーから有効成分を同定するためのスクリーニング系の確立。

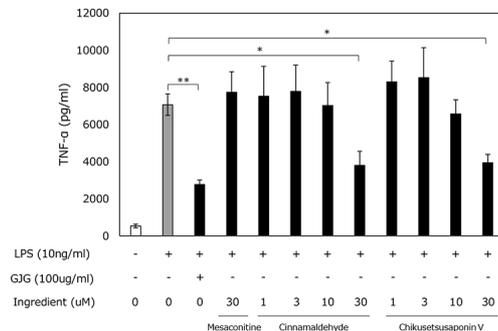
C2C12 細胞の分化・免疫蛍光染色結果
ATP の評価結果 グリコーゲンの定量結果



添付の図のように、C2C12 筋管細胞に分化した状態を免疫染色により評価可能となったが、GJG を添加しても、分化の促進、ATP の発現量、グリコーゲンの蓄積量は、有意な変化を示さなかった (図表添付せず)。当初の予想とは異なり、GJG の抗サルコペニア効果は、筋肉細胞への直接効果ではない可能性が示唆された。

RAW264.7 細胞を用いた TNF- α の発現結果
一方、GJG は、マウス由来マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において、濃度依存性に TNF- α の発現量を抑制した。再現性が確認されたことから、GJG 由来の化合物イブライリー 20 種類を使って、同様な検討をおこなったところ、構成生薬の桂枝由来の Cinnamaldehyde、牛膝由来の Chikusetsusaponin が、細胞毒性を認めずに、TNF- α の発現量を抑制した。

Origin GJG	Ingredient (30uM)	TNF- α production (% of control)	Cell viability (% of control)
Rehmannia Root	Isoacteoside	127.68	95.76
Rehmannia Root	Catalpol	102.14	71.48
Rehmannia Root /Plantago Seed	Aucubin	70.95	99.47
Cornus Fruit	Morroniside	99.16	90.14
Cornus Fruit	Loganin	82.77	95.35
Alisma Rhizome	Alisol A	79.01	46.51
Moutan Bark	Benzoylpaconiflorin	113.54	99.23
Moutan Bark	Paconiflorin	159.12	97.30
Moutan Bark	2'-Hydroxy-4'-methoxyacetophenone	174.57	101.10
Moutan Bark	1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose	57.86	15.42
Cinnamon Bark	Cinnamaldehyde	34.52	100.17
Processed Aconite Root	Benzoylmesaconine	66.18	100.96
Processed Aconite Root	Mesaconitine	77.80	99.97
Processed Aconite Root	Neoline	83.64	93.06
Processed Aconite Root	Benzoylhyaconine	68.19	95.08
Processed Aconite Root	Benzoylaconine	89.36	98.50
Achyranthes Root	Chikusetsusaponin V	31.50	99.67
Achyranthes Root	Inokosterone	65.61	100.69
Plantago Seed	Geniposidic acid	54.56	93.21
[ref.]Gardenia Fruit	Genipin	114.78	100.08

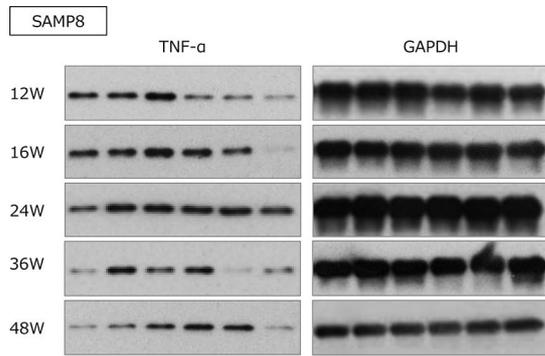


* P < 0.05 vs LPS (10ng/ml)-treated alone
** P < 0.01 vs LPS (10ng/ml)-treated alone
Turkey-Kramer

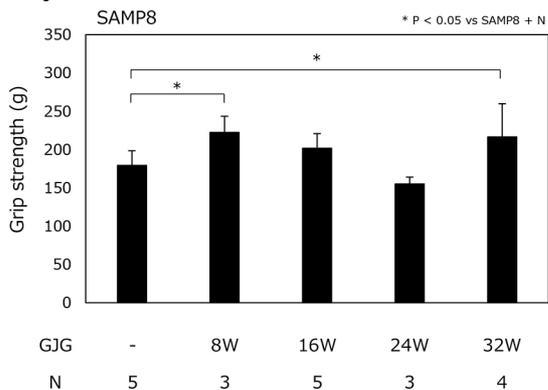
さらに検討したところ、Cinnamaldehyde、Chikusetsusaponin は、LPS 刺激による RAW264.7 細胞 TNF- α の発現量を用量依存性に抑制することが確認された。

3) SAMP8 マウスを用いた GJG の有効性の再検討

SAMP8 に、八味地黄丸、六味丸を混餌で食べさせたところ、六味丸は抗サルコペニア効果を示さず、八味地黄丸は、GJG より抗サルコペニア効果が弱かった (図表示さず)。以上のことから、牛膝、車前子、桂枝、プシが抗サルコペニア効果に必要であることが示された。この結果は、in vitro の結果と整合性のあるものであった。そこで、GJG の SAMP8 マウスにおける TNF- α の発現を検討したところ、GJG は、12 週目と 36 週目において、TNF- α の発現を抑制していた



さらに、8 週、16 週、24 週、32 週から GJG を介入した結果では、8 週と 32 週からの介入で、SAMP8 マウスの握力が有意に改善していた。

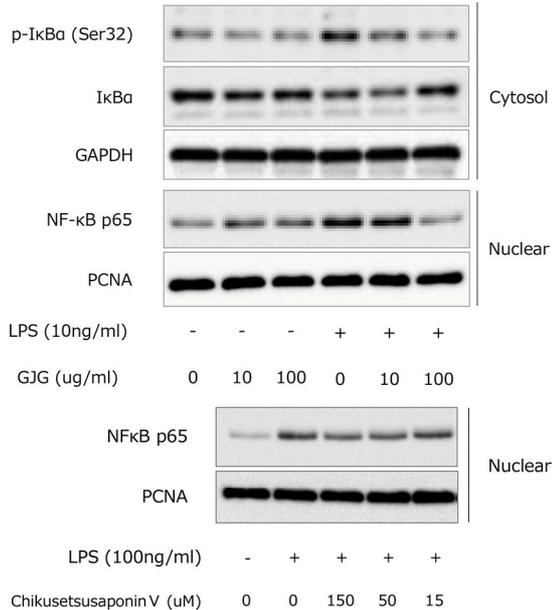


以上の結果をまとめると、現段階では、GJG は、TNF- α の発現抑制を介して、SAMP8 マウスのサルコペニアを改善していることが想定されたことから、SAMP8 マウス由来の iPS 細胞株を筋肉細胞に分化させての検討は、今回は行わず、抗炎症作用に焦点を当て、解析を行った。

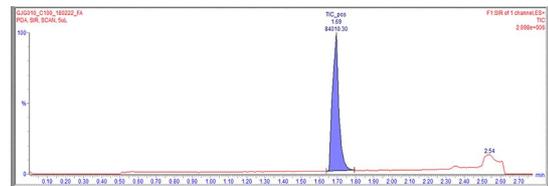
4) 候補化合物の細胞内シグナルへの影響、膜透過性、代謝安定性など物性の検討。

以上の結果から、桂枝由来の Cinnamaldehyde、牛膝由来の Chikusetsusaponin を、新規抗

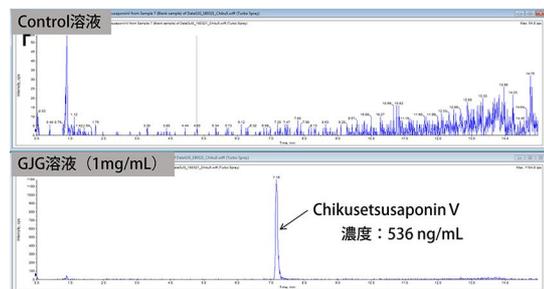
サルコペニア剤の候補化合物と考えられた。そこで、GJG、Cinnamaldehyde、Chikusetsusaponin の TLR4 の細胞内シグナルへの影響を検討した。その結果、GJG、化合物は、TLR4、Myd88 の発現量は変化させなかった (図表示さず)。一方、GJG、Chikusetsusaponin は、LPS 刺激での NF- κ B p65 の核内移行を用量依存性に抑制した。桂枝由来の Cinnamaldehyde は、このアッセイでは、確認できなかった。



以上の結果から、Chikusetsusaponin が、新規抗サルコペニア剤の候補化合物と考えられた。そこで、大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター 構造展開ユニット (ADMET チーム) (兼) 附属化合物ライブラリー・スクリーニングセンターの協力の下、Chikusetsusaponin の分析を行った。図に示すように、LC-MS による分析では、Chikusetsusaponin の 1% DMSO/PBS に対する溶解度は非常に良好であった



次に、GJG 溶解物における Chikusetsusaponin の濃度を LC-MS で測定したところ、Chikusetsusaponin のシングルピークを確認できた。



次に、ヒト大腸細胞株である CaCo-2 細胞を使い、経口での吸収を想定した膜透過性の検討では、Chikusetsusaponin の膜透過性は非常に低かった (Papp < 0.1)。

Theme	Cpd.	報告値	
		Papp (cm/sec x 10 ⁻⁶)	Class
GJG	GJG010	<0.1	低

同時に、ヒトとラットの肝ミクロソームを用いた検討では、Chikusetsusaponin の代謝安定性は非常に高かった。

Theme	Cpd.	報告値 (%)			
		ヒト		ラット	
		10min	60min	10min	60min
GJG	GJG010	86	89	88	92

以上の結果から、Chikusetsusaponin は経口吸収に課題があるが、いったん吸収されれば代謝安定性が高く、新規抗サルコペニア剤の候補となりうると考えられた。少なくとも、GJG の有効性を示すバイオマーカーとして活用できることが予想された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

萩原圭祐、フレイル・サルコペニア対策における漢方補腎薬の役割について、臨床栄養、132、295-302、2018

<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/eiyo/EiyoArticleDetail.aspx?BC=061323&AC=5309>

山本亜沙子、中田英之、萩原圭祐、腎虚と補腎剤、アンチ・エイジング医学、13、40-45、2017

http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0038_1306

Yusei Takemoto, Shoya Inaba, Lidan Zhang, Kousuke Baba, Keisuke Hagihara, So-ichiro Fukuda, An herbal medicine, Go-sha-jinki-gan(GJG), increases muscle weight in severe muscle dystrophy model mice、Clinical Nutrition Experimental、16、13-23、2017
<https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2017.08.003>

萩原圭祐 フレイルとサルコペニアの発症機構と漢方療、Progress in Medicine、37(2)、149-153、2017

http://www.lifesci.co.jp/pm/20170310_7505/

Nakanishi M, Aya Nakae, Kishida Y, Baba K, Noriko Sakashita, Masahiko Shibata, Hideki Yoshikawa, Hagihara K.

Go-sha-jinki-Gan (GJG) ameliorates allodynia in chronic constriction injury model mice via suppression of TNF- expression in the spinal cord、Molecular Pain、12、1-16、2016

<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1744806916656382>

萩原圭祐 サルコペニアに対する漢方療法の可能性、最新医学 サルコペニア 診断と治療の ABC、112、171-178、2016

http://www.saishin-igaku.co.jp/abc_n/backnum/abc112.html

萩原圭祐 サルコペニアと漢方療法の可能性について、医薬ジャーナル、51(9)、87-94、2015

https://www.iyaku-j.com/iyaku/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=30415

萩原圭祐 牛車腎気丸 抗サルコペニア効果における分子薬理機序について 整形外科漢方処方マニュアル、Orhopaedics、28(5)、23-30、2015

<http://www.zenniti.com/f/b/show/b01/729/zc01/1.html>

[学会発表](計 12 件)

萩原圭祐、心と体のレジリエンスを高める漢方医学 漢方補腎薬の抗サルコペニア効果について、第 1 回日本リハビリテーション医学会秋季学術集、2017

萩原圭祐、フレイル・サルコペニア対策での漢方医学の役割、第 34 回和漢医薬学会、2017

萩原圭祐、フレイル・サルコペニア対策における漢方補腎薬の役割について、第 17 回日本抗加齢医学会総会、2017

萩原圭祐、フレイル・サルコペニアにおける漢方補腎薬の役割について、第 15 回日本臨床中医薬学会学術大会、2016

Nakanishi M, Nakae A, Kishida Y, Sakashita N, Baba K, Shiimoto C, Shibata M, Yoshikawa H, Hagihara K : Go-sha-jinki-Gan (GJG) attenuated allodynia via suppression of the TNF- derived from microglia in chronic constriction injury model、16th World Congress on Pain (IASP 2016) in Yokohama, Japan、2016

馬場孝輔、岸田友紀、中西美保、望月秀樹、吉川秀樹、萩原圭祐、牛車腎気丸は、活性化ミクログリアを抑制し、老化促進マウスの認知機能を改善する、第 58 回日本老年医学会学術集会、2016

萩原圭祐、高齢者医療における漢方薬～効果的な使い方、今後の可能性を探る～、フレイル・サルコペニア対策での漢方医学の役割-漢方補腎薬の抗サルコペニア効果について、第 58 回日本老年医学会学術集会漢方実践セミナー、2016

中西美保、中江 文、岸田友紀、柴田政彦、吉川秀樹、萩原圭祐、牛車腎気丸は脊髄後角の TNF 発現抑制を介して神経障害性疼痛を軽減させる、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016

萩原圭祐、フレイルサルコペニアでの東洋医学の役割 - オーバービュー牛車腎気丸の抗サルコペニア効果について、第 18 回国際東洋医学会学術大会 (The 18th International Congress of Oriental Medicine) 2016

萩原圭祐、漢方補腎薬の抗サルコペニア効果について、第 3 回日本サルコペニア・悪液質・消耗性疾患研究会、2016

萩原圭祐、岸田友紀、中西美保、馬場孝輔、山本亜沙子、吉川真希、塩本千晴、吉川秀樹、牛車腎気丸の抗サルコペニア効果 - マウスとヒトにおける検討、第 2 回日本サルコペニア・フレイル研究会研究発表会、2015

岸田友紀、中西美保、萩原圭祐、ヒトにおける牛車腎気丸の抗サルコペニア効果の検討、第 57 回日本老年医学会学術集会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称：筋の老化防止用組成物

発明者：萩原圭祐

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許権

番号：特許第 6088044 号

取得年月日：平成 29 年 2 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

新聞掲載

萩原圭祐、漢方薬、癌治療に活用 高齢者医療でも効果期待、日本経済新聞、2017 年 4 月 24 日付

記者会見

萩原圭祐、超高齢化社会におけるフレイル・サルコペニアと漢方～伝統医学と先進医学の融合による高齢者医療～、第 137 回漢方医学フォーラム、東京 日本記者クラ

ブ、2017 年 11 月 17 日

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kanpou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 圭祐 (HAGIHARA, Keisuke)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：60423183

(2) 研究分担者

岸田 友紀 (KISHIDA, Yuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：20423163

(3) 研究協力者

布村 一人 (NUNOMURA, Kazuto)

大阪大学・薬学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：なし