

平成22年 5月14日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19390193
 研究課題名 (和文) 未病を治す医療の確立に向けた薬理基盤の構築に関する研究
 研究課題名 (英文)
 Pharmacological study to cure miby, disease-oriented state
 研究代表者
 宮田 健 (MIYATA TAKESHI)
 崇城大学・薬学部・教授
 研究者番号：90040310

研究成果の概要 (和文)：

未病すなわち半健康状態を的確に診断し、これを維持または治療することはこれからの医療を考える上で重要である。本研究では、まず、抗 MUC1 ムチン抗体が腫瘍に対する抵抗性と関連する新規マーカーとなることを提唱し、その合理性を基礎実験により検証した。また、種々の漢方薬に含まれ抗炎症作用をもつグリチルリチンの作用機序を追求し、漢方薬のような緩やかな抗炎症作用をもつ治療薬に関する新規機序を提唱した。

研究成果の概要 (英文)：

Curing disease-oriented state, very early stage of diseases before they appear, is important to preserve health and prevent illness. In this study, we found that anti-MUC1 antibody, a new anti-cancer biomarker, inhibits cancer cell growth. We also found that glycyrrhizin has glucocorticoid-like anti-inflammatory effect but not through glucocorticoid receptor. These finding may provide a new insight to care disease-oriented state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：東洋医学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた日本人の健康状態を

考えると、単純に健常者と非健常者を線引きすることは難しく、多くの半健康状態の患者

が存在すると云わざるを得ない。この半健康状態の患者とは、東洋医学的には「未病」と分類されるが、自覚症状はないものの受診すると糖尿病や脂質異常症と診断される「無症状の非健康者」、冷えや倦怠感などの自覚症状を訴えるものの医学的検査では正常と診断される「有症状の健康者」、さらには現時点では健康と見なされるものの将来的に高い確率で病気を発症する「潜在的有病者」が含まれると考えられる。

これら未病状態の患者のうち、無症状の非健康者は既に様々な現代医学的な治療が可能となっているが、有症状の健康者や潜在的有病者にはその状態を知るための的確なバイオマーカーが欠如しており、従ってそれを改善するための治療法もないのが現状である。

一方、社会的には、このような有症状の健康者の治療や潜在的有病者の健康維持には、漢方薬やサプリメントなどの代替医薬品がよく用いられ、一定の効果を上げていると考えられる。すなわち、実社会と現代医学の間には大きな乖離を生じているのが現状である。この乖離を埋めるためには、未病を科学的に把握するための新規病態マーカーの確立が必須であり、また、未病の治療に有効な代替医薬品の作用機序を解明することが重要である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では、まず、種々の腫瘍細胞の細胞膜表面に多く存在するムチン分子 MUC1 に対する抗体が、将来の癌患者となり得る潜在的有病者の新規バイオマーカーとなるのではないかとの仮説のもと、抗 MUC1 抗体のもつ生物活性を実験科学的に検討することで、その合理性を追求した。また、種々の漢方薬に含まれる生薬、甘草の主成分であるグリチルリチン (GL) の作用にも注目し、本成分の薬理活性を詳細に検討することで、未病状態の患者の健康維持を考えるための特徴的薬理学的作用を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 MUC1 抗体の生物活性に関する検討

抗 MUC1 抗体の生物活性については、種々の腫瘍細胞株の培養系を用いて評価した。培養上清中に抗 MUC1 抗体を添加し、その後の細胞内 MUC1 を免疫化学的に染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

また、細胞の増殖は WST アッセイ法により評価し、種々のシグナルタンパク質のリン酸化は Western blot 法で調べた。

(2) GL の薬理作用に関する検討

GL の抗炎症作用は、*in vivo* および *in vitro* の両実験系で検討した。*In vivo* の実験としては、マウスの気管内に LPS を注入して惹起した急性の気道炎症モデルを用い、その後の肺洗浄液中の白血球数、種々の炎症性サイトカインの mRNA 発現および分泌型粘液遺伝子 MUC5AC の発現をもとに評価した。mRNA 量の測定には、特異的プライマーを用いた Real-time PCR 法を用いた。

一方、*in vitro* の実験系としては気道上皮細胞株 A549 および NCI-H292 細胞を用い、各種サイトカインおよび MUC5AC mRNA の発現およびこれらの細胞株に導入した各種プロモーター遺伝子の活性はルシフェラーゼレポーターアッセイ法により評価した。

4. 研究成果

(1) 抗 MUC1 抗体の生物活性に関する検討

抗 MUC1 抗体を腫瘍細胞株の Panc-1 細胞に添加し、その 1 時間後の MUC1 の細胞局在を調べると、細胞膜に存在する MUC1 が抗体の処理によって細胞内へ移行することが分かった (図 1)。同様の MUC1 の局在変化は、肺上皮細胞癌 A549 および乳癌細胞株 MCF-7 でも観察され、本現象は細胞種非依存的に生じると考えられた (図 1)。

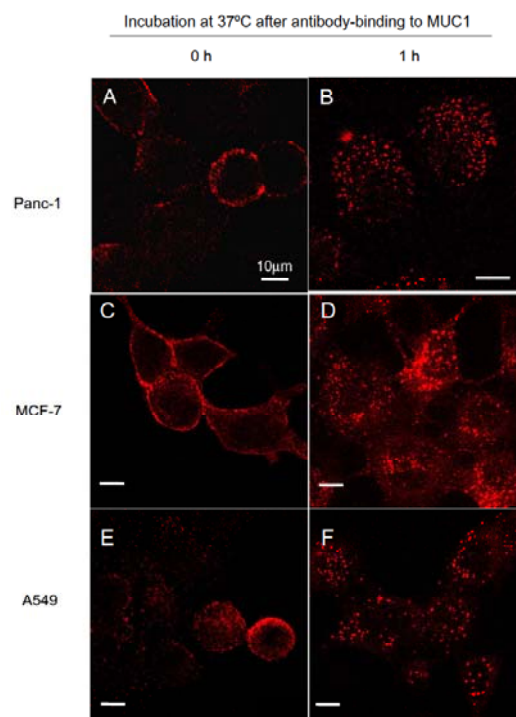


図 1. 各種癌細胞株の MUC1 の局在に対する抗 MUC1 抗体の作用

この局在変化の機序についても種々の検討を行ったが、抗 MUC1 抗体は、癌細胞の MUC1 分子と結合すると、MUC1 の細胞内取込みを誘発することが分かった。また、この細胞内取込みは Na^+/H^+ 交換系および脂質ラフトの阻害薬によって抑制されたため、マクロピノサイトーシスが関わっていると推定された。

癌細胞の細胞膜上で MUC1 は癌細胞の増殖と深く関わる EGF 受容体と共局在していることが知られている。すなわち、抗 MUC1 抗体による MUC1 の細胞内取込みは、この EGF 受容体をも細胞内へ取り込ませ、細胞の増殖能を低下させる可能性がある。そこで、抗 MUC1 抗体の癌細胞の増殖に対する作用を検討した。その結果、抗 MUC1 抗体は EGF で誘発した Panc-1 細胞の増殖を著明に抑制することが分かった。

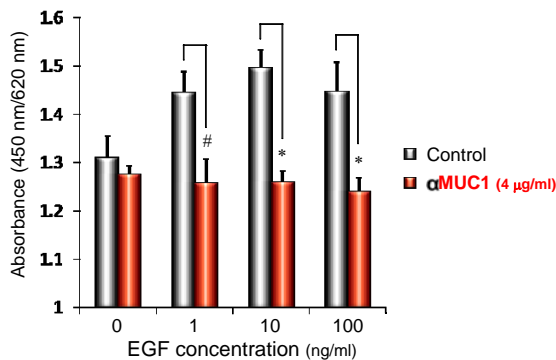


図 2. 抗 MUC1 抗体による Panc-1 細胞の増殖抑制作用

* : $p < 0.05$ vs control.

なお、本成績とよく相関して、抗 MUC1 抗体は細胞膜表面の EGF 受容体を細胞内へ局在変化させること、および EGF 受容体の下流シグナルである ERK のリン酸化を抑制することも確認した。

(2) GL の薬理作用に関する検討

まず、GL が抗炎症作用をもつか否かを *in vivo* および *in vitro* の実験系により調べた。まず、マウスの気管内に細菌毒素 LPS を注入して作製した気道炎症モデルでの GL の作用を調べた。LPS 処理後の肺洗浄液中の白血球数を測定すると、GL は対象薬として用いた dexamethasone (DEX) と同様に、白血球数を著明に減少させた (図 3)。これとよく相関して、LPS 処理の 7 日目の気管上皮中の粘液産生細胞すなわち杯細胞数を計測すると、GL は DEX と同様これを著明に減少させた。興味深いことに、DEX を 7 日間投与した動物では、体重の減少および胸腺の萎縮といったステロイド薬に特徴的な副作用が認められたが、

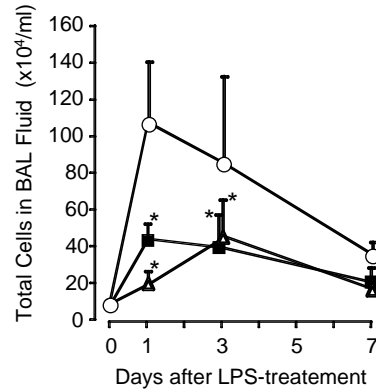


図 3. LPS で誘発したマウス肺洗浄液中の白血球の増加に対する GL および DEX の作用

○ : control, ■ : GL, △ : DEX, * : $p < 0.05$ vs control.

GL ではこれらの副作用は認められなかった。

一方、*in vitro* の実験でも GL は DEX とよく似た遺伝子発現調節作用をもつことが分かった。A549 細胞を $\text{TNF-}\alpha$ で刺激し誘発した IL-8 の mRNA 発現およびプロモーター活性の亢進に対し、GL および DEX は濃度依存的な抑制を示した (図 4)。GL によるこの作用は DEX と同様に転写因子 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の抑制であると

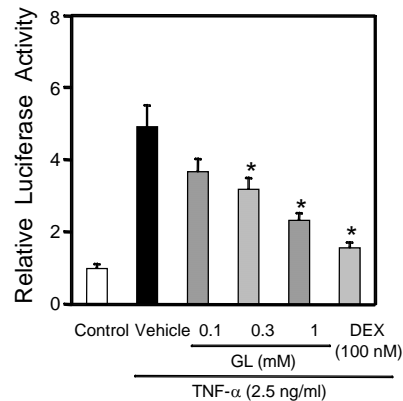


図 4. $\text{TNF-}\alpha$ による IL-8 プロモーターの活性化に対する GL および DEX の作用

* : $p < 0.05$ vs control.

考えられた。しかし、その詳細な機序は異なっており、GL は $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の DNA 結合を抑制することが分かった。さらに GL は気道粘液の主成分である MUC5AC の mRNA 発現も転写レベルで抑制し、去痰作用も期待できることが分かった (図 5)。

さらに、GL による遺伝子発現調節作用の特性を明らかにするためにマイクロアレイ法

による解析も行った。GLを投与したマウスの肺での遺伝子発現パターンをDEXとクラスタリング解析により比較すると、意外にも殆ど一致せず、特にINF- γ 依存性の遺伝子発現はGLにより選択的に抑制されることが分かった。

以上の成績は、未病状態の患者の将来の癌発症のリスクを考える上で、また炎症に基づく未病の治療を考えるための薬理概念の構築に寄与する重要な知見であると考えられる。

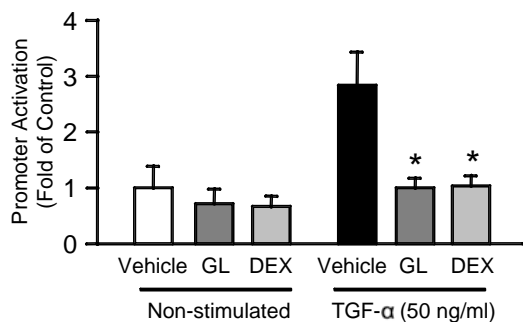


図5. TGF- α で誘発したMUC5ACプロモーターの活性化に対するGLおよびDEXの作用

*: $p < 0.05$ vs control

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 21 件)

- ① Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y, Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression in vivo and in vitro. J Pharmacol Sci, 査読有, 2010, in press.
- ② Hisatsune A, Kawasaki M, Nakayama H, Mikami Y, Miyata T, Isohama Y, Katsuki H, Kim KC. Internalization of MUC1 by anti-MUC1 antibody from cell membrane through the macropinocytotic pathway. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 388, 2009, 677-682.
- ③ Horie I, Maeda M, Yokoyama S, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Isohama Y. Tumor necrosis factor- α decreases aquaporin-3 expression in DJM-1 keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 387, 2009, 564-568.
- ④ Takei H, Baba Y, Hisatsune A, Katsuki H,

Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y. Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor-kappaB activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors. J Pharmacol Sci, 査読有, 2008, 106: 460-468.

- ⑤ Koga T, Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Miyata T, Isohama Y, Kim KC. TNF- α induces MUC1 gene transcription in lung epithelial cells: its signaling pathway and biological implication. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, 293, 2007, 693-701.
- ⑥ Kuwahara I, Lillehoj EP, Koga T, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. The signaling pathway involved in neutrophil elastase stimulated MUC1 transcription. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有, 37, 2007, 691-698.

[学会発表] (計 39 件)

- ① 堀江一郎, 久恒昭哲, 香月博志, 宮田 健, 磯濱洋一郎, ケラチノサイトの水チャネルaquaporin-3の発現を増加させる生薬の探索研究, 第26回和漢医薬学会大会, 2009年8月30日, 千葉市.
- ② 磯濱洋一郎, 西本裕樹, 久恒昭哲, 香月博志, 宮田 健, グリチルリチンの気道粘液産生抑制作用の薬理学的特性, 第27回気道分泌研究会, 2008年4月12日, 東京.
- ③ 武井啓典, 小黒夏子, 久恒昭哲, 香月博志, 宮田 健, 磯濱洋一郎, 補中益気湯の抗炎症作用の薬理学的特性, 第24回和漢医薬学会大会, 2007年9月8日, 富山市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 健 (MIYATA TAKESHI)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：90040310

(2) 研究分担者

磯濱洋一郎 (ISOHAMA YOICHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10240920

横溝和美 (YOKOMIZO KAZUMI)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80240919

(H20-H21：連携研究者)

久恒昭哲 (HISATSUNE AKINORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：50347001

(H20-H21：連携研究者)