

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590712

研究課題名（和文）薬物トランスポーターMDR-1を制御する漢方薬の薬剤耐性疾患への応用

研究課題名（英文）Effects of kampo medicines on drug-resistance mediated by ABC transporter, MDR-1

研究代表者 花輪 壽彦（Hanawa Toshihiko）

北里大学 東洋医学総合研究所 所長

研究者番号：40164892

研究成果の概要（和文）：癌の化学療法や自己免疫疾患のステロイド療法などの薬物治療において、薬剤耐性の克服は重要な課題である。薬物トランスポーターのひとつである MDR-1 は、細胞内に取り込まれた薬物を細胞外へ排出し、種々な薬剤に対する耐性を引き起こす原因になっている。本研究では、漢方薬が MDR-1 の薬物排出機能を抑制し、抗癌剤やステロイド剤に対する薬剤耐性を解除する可能性があることを示した。漢方薬は、抗癌剤やステロイド剤との併用によって、これらの薬剤の有効性を高める効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Drug resistance is a problem in the treatment of diseases, such as autoimmune disease and malignancy. MDR-1, a member of drug transporters, causes drug resistance via the exclusion of intracellular drugs. In this study, the kampo medicines suppressed the efflux function of MDR-1, suggesting that the resistance to anticancer drugs or steroidal antiinflammatory drugs may be overcome by the medicines. The combined application of modern and traditional medicines is expected to be useful for the treatment of drug-refractory diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・東洋医学

キーワード：漢方薬、東洋医学、薬剤耐性、癌、膠原病、抗癌剤、ステロイド、MDR-1

1. 研究開始当初の背景

薬物トランスポーターのひとつである MDR-1 (multidrug resistance-1) は、抗癌剤

に対する多剤耐性癌細胞に過剰発現していたことから、はじめて同定されたトランスポーターであり、広い基質特異性を持っている

(Juliano, RL, et al., Biochim. Biophys. Acta., 455, 152-162, 1976)。癌の化学療法において、MDR-1 高発現の多剤耐性癌細胞の出現は、治療を困難にする。また、最近、膠原病の治療において、ステロイドに対する抵抗性の原因のひとつに、リンパ球のMDR-1 発現増加が関与していることが報告された (Tsujiura, S., et al., Genes to Cells, 9, 1265-1273, 2004)。このように、MDR-1 は種々の疾患の薬剤耐性を引き起こす原因になっており、MDR-1 の発現や機能を抑制する方法を見つけることは重要な課題となっている。漢方薬は、癌の補助療法として投与されるが、漢方薬の併用により化学療法の継続が可能となる症例がある。また、膠原病のひとつであるリウマチの治療時に、ステロイドと漢方薬を併用すると、低用量のステロイドで治療を継続できる症例がある。そこで、漢方薬のMDR-1 に対する作用を解析した。

2. 研究の目的

これまで漢方薬については、MDR-1 阻害作用について系統的な検討は行われていない。本研究では、癌の補助療法や自己免疫疾患に処方される漢方薬に注目し、MDR-1 に対する作用を解析した。

(1) 癌の薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析：

培養系での薬剤耐性の抑制効果の検証と、*in vivo*の抗癌剤治療モデルでの解析を目指し、ヌードマウスに移植可能な上皮系癌細胞株であるヒト肝癌由来HuH-7細胞に着目し、HuH-7細胞からMDR-1高発現株の樹立を行った。本細胞株を用いて、癌の補助療法に用いられる漢方薬のMDR-1に対する効果の解析をおこなった。

(2) 膠原病の薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析：アドリアマイシン耐性細胞株K562/ADMを用いて、膠原病の治療に用いられる漢方薬の効果解析した。また、本研究から見出された八味地黄丸について、ステロイド減量困難

なミクリツ病患者に、ステロイドとの併用投与を行い、その効果について詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) 癌の薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析：

①細胞：HuH-7細胞(JCRB0403)はヒューマンサイエンス研究支援バンクより分譲された。

②抗癌剤耐性株の樹立：HuH-7細胞をMDR1の基質であるパクリタキセル存在下で長期間培養し、生存細胞をクローニングし、MDR-1高発現株Pac-1細胞を樹立した。③漢方薬：株式会社ツムラより供与された漢方薬エキス原末26種類（五苓散、温経湯、越婢加朮湯、四逆散、葛根湯、五積散、温清飲、大柴胡湯、香蘇散、三黄瀉心湯、滋陰降火湯、半夏厚朴湯、大防風湯）を用いた。④MDR-1に対する作用の解析：Pac-1細胞に500 μ g/mlまたは1000 μ g/mlの各漢方薬エキス溶液を添加し、30分間保温した後、カルセイン-AMを添加して30分間保温後、494nmの蛍光強度を測定した。

(2) 膠原病の薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析：

①細胞株：K562/ADM細胞(JCRB 1002)はヒューマンサイエンス研究支援バンクより分譲された。K562/ADMはヒト骨髄性白血病細胞K562由来のアドリアマイシン耐性株である。②漢方薬：株式会社ツムラより供与された漢方薬エキス原末（麻黄湯、麻杏薏甘湯、柴苓湯、補中益気湯、温清飲、十全大補湯、人參養榮湯、八味丸、真武湯）を用いた。③MDR-1に対する漢方薬の作用：K562/ADMに各エキス原末をそれぞれ10 μ g/ml, 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1mg/mlの濃度で添加し、24, 48, 72時間後にカルセインAMを加え、15分間保温した後、細胞を洗浄し、カルセインの蛍光強度をGuava EasyCyte Plusを用いたフローサイトメトリーで評価した。④臨床研究：本研究は、北里大学東洋医学総合研究所倫理委員会の承認を得たのち、文章及び口頭で研究内容を説明し、本人の了解を得た後に行った。

対象は、日本シェーグレン症候群研究会が提唱した IgG4 関連ミクリッツ病の診断基準 15 の 3 項目をすべて満たす 58 歳女性の患者 1 名である。プレドニゾロン 15mg/日による内服治療の一カ月後に、クラシエ八味地黄丸料エキス細粒 (6g/日) を投与し、漢方薬投与の開始前後で末梢血の採取を行った。患者の末梢血単核球分画に抗 CD4・抗 CD25 モノクローナル抗体を添加し、4℃で 40 分間留置後、洗浄し、Guava EasyCyte Plus を用いたフローサイトメトリー法で CD4+CD25+細胞の割合を測定した。患者血清をエスアールエル社に送付し、血清の総 IgG 値、および IgG サブクラス (IgG1~4) の測定を依頼した。

4. 研究成果

(1) がんの薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析：①耐性株の樹立：HuH-7細胞から、パクリタキセル耐性Pac-1細胞を樹立した。MDR-1遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRで解析した結果、Pac-1細胞は、親株HuH-7より78倍高かった。またパクリタキセル耐性能を評価した結果、親株のIC₅₀値が 10 nMだったのに対し、Pac-1では280 nMであった (図1)。Pac-1はMDR-1の基質のカルセインAMの取り込み量が減少し、MDR-1阻害剤ベラパミルによって、それが回復した。これらの結果から、Pac-1はMDR-1の高発現によって、パクリタキセルに対する感受性が低下したことが示唆された。

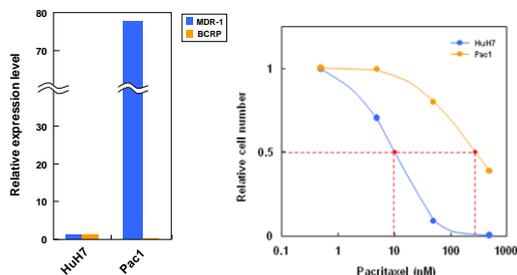


図1 HuH-7細胞及びPac-1細胞のMDR-1遺伝子発現とパクリタキセルに対する感受性

② Pac-1細胞のカルセイン取り込み量に対する漢方薬の効果：カルセインAMは疎水性分子で、細

胞膜に浸透し、細胞内で非特異的エステラーゼによって蛍光カルセインに変換される。MDR-1高発現のPac-1細胞中では、カルセインAMはカルセインに変換される前にMDR-1によって細胞外へ排出されるため、細胞内の蛍光強度が低下する。しかしMDR-1を抑制されると、カルセインが細胞内に蓄積し、蛍光強度が上昇する。この方法を用いて、漢方薬のMDR-1に対する効果を調べた。

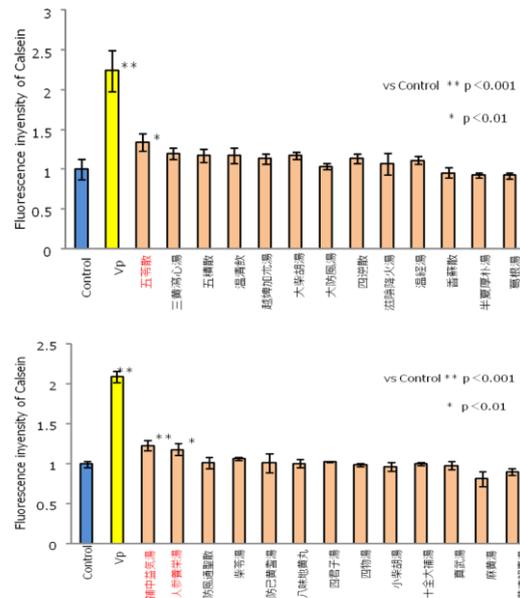


図2 500 µg/mlの漢方薬エキスを添加したときのカルセインの取り込み量

500 µg/ml の漢方薬エキスを添加した結果 五苓散、補中益気湯、人参養栄湯によって、細胞内の蛍光強度が有意に上昇した (図3)。また、1000 µg/ml の漢方薬エキスを添加した結果、五苓散、三黄瀉心湯、補中益気湯、人参養栄湯、防風通聖散によって、細胞内の蛍光強度が有意に上昇した (図4)。以上の結果から、五苓散、補中益気湯、人参養栄湯、防風通聖散、および三黄瀉心湯は、MDR-1の機能を抑制し、カルセインの取り込みを増加させる効果があることが明らかになった。

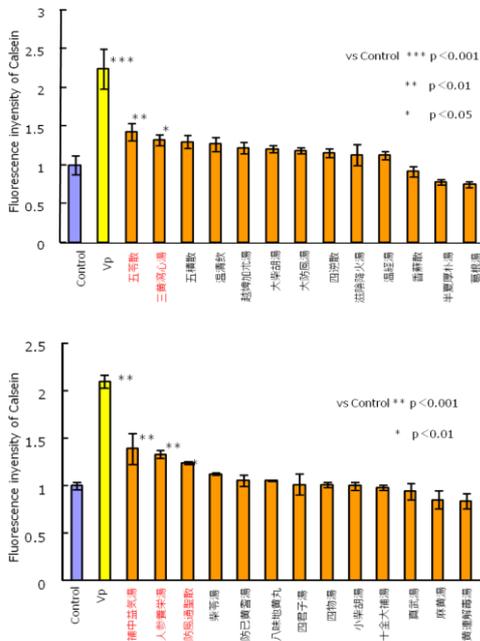


図4 1000 μg/mlの漢方薬エキスを添加したときのカルセインの取り込み量

MDR-1の働きは、細胞内ドメインのATPaseによるATP加水分解エネルギーに依存した能動輸送である。このATPaseに対する漢方薬の作用については、佐藤らが、MDR-1を含む膜画分を用いて、50種類の漢方薬について解析している。本研究で薬物排出抑制効果のあった五苓散、補中益気湯、人參養榮湯、防風通聖散は、MDR-1のATPase活性を有意に阻害することが報告されている (Sato, T., et al., Bio. Pharm. Bull., 32, 2018-2021, 2009)。

したがってこれらの漢方薬は、MDR-1のATPase活性を阻害することで、MDR-1の薬物排出を抑制することが示唆された。

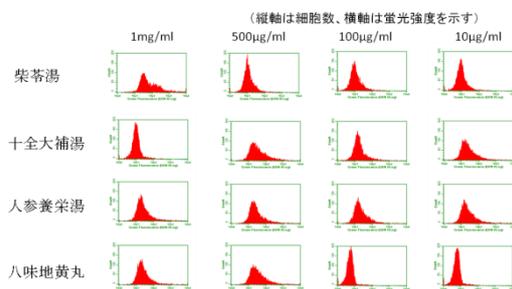
本研究で薬物排出抑制効果のあった漢方薬の構成生薬について、共通する生薬を調べたところ、5種類全ての漢方薬で共通する生薬はなかったが、甘草と当帰が3種類の漢方薬に共通の生薬であった。甘草については、佐藤らが、ATPase阻害活性を有する漢方薬に共通する生薬として重要性を示唆していた。そこで、甘草及びその主成分のグリチルレチン酸に

ついて解析を行ったが、これらはカルセインの取り込み量に影響を与えなかった。この結果から、我々は、漢方薬のMDR-1に対する作用は、ある特定の生薬の作用ではなく、漢方薬を構成する複数の生薬の複合作用である可能性が高いと考えている。

本研究で見出された五苓散、補中益気湯、人參養榮湯、防風通聖散、および三黄瀉心湯は、臨床において化学療法や放射線療法の副作用の軽減、腹水・胸水の治療などに用いられている。これらの漢方薬がMDR-1の薬物排出作用を阻害し、抗癌剤の癌細胞内への取り込みを増加させることが示唆されたことから、抗癌剤とこれらの漢方薬との併用によって、抗癌剤の有効性を高める効果が期待される。

(1) 膠原病の薬剤耐性に対する漢方薬の効果の解析: ①本研究で解析した9処方については、24時間の処理では、明らかな Calcein-AM の排出抑制効果を認めなかった。しかし、48時間処理では 1mg/ml の柴苓湯で、明らかな Calcein-AM の排出抑制活性を認め、さらに72時間処理したところ、1mg/ml の柴苓湯、10~500 μg/ml の十全大補湯、10 μg~1mg/ml の人參養榮湯、及び、500 μg~1mg/ml の八味丸で、明らかな Calcein-AM の排出抑制活性を認めた (図1)。

図1: 漢方薬添加72時間後の蛍光強度



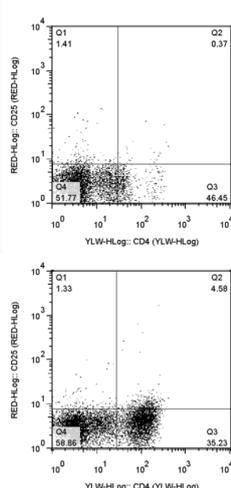
②本研究で、八味丸に薬剤耐性を抑制する効果があることが示唆されたことを踏まえ、膠原病の症例における八味丸の有効性について検討した。ステロイド減量困難となったミクリツ病で八味丸の証に合致した患者に、ステロイドと八味丸を

併用したところ、ステロイド量を減量することに成功した。したがって、八味丸はMDR-1を阻害することでステロイド耐性から回復させると考えられ、ステロイド減量困難症例の新たな治療法として期待された。

次に八味丸について、ヒトの CD4+CD25+細胞に及ぼす作用についての解析を行った。CD4+CD25+細胞は免疫反応を制御し自己反応性 T 細胞クローンを鎮静化させるが、ある種の自己免疫疾患では末梢血中の CD4+CD25+細胞の減少が観察されている。

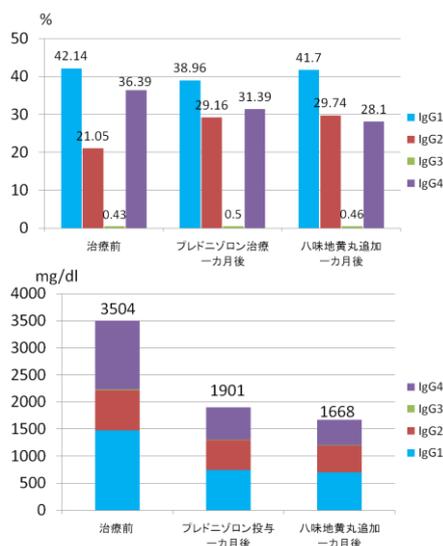
CD4⁺CD25⁺細胞の割合は、漢方薬開始前 0.37%であったが、1ヶ月後には 4.58%に増加した (図 2)。

図2: 患者末梢血単核球表面におけるCD4/CD25の発現状態
 上段: ステロイド投与一カ月後(八味地黄丸投与前)
 下段: 八味地黄丸追加投与一カ月後



IgG サブクラスの分析では、IgG1 の割合が 42.14% (治療開始前) → 38.39% (プレドニゾン開始後一カ月) → 41.7% (八味地黄丸追加後一カ月) とほぼ横ばいであったのに対し、IgG4 は 36.39% → 31.39% → 28.1% と一貫して低下傾向を示した。総 IgG 値も 3504mg/dl → 1901mg/dl → 1668mg/dl と低下しており、唾液腺の腫脹も、プレドニゾン開始後、八味地黄丸追加後で一層の改善を認めている (図 3)。

図3: IgGサブクラス解析の結果
 上段: 各IgGサブクラスの割合の変動
 下段: 総IgG値の変動



本症例ではステロイド治療開始一カ月後の CD4⁺CD25⁺T 細胞の割合が極めて小さく、このことは、ステロイド治療のみでは自己に対する免疫寛容の状態に誘導できず、ステロイド依存状態を作ってしまう可能性を示唆している。それに対し、八味地黄丸導入後一ヶ月で CD4⁺CD25⁺T 細胞はほぼ正常の値に近づいている。IgG サブクラス解析の結果によると、ステロイド治療単独では IgG1 および IgG4 いずれも低下しているが、八味地黄丸の追加後は IgG4 のみ低下傾向を示しており、八味地黄丸が何らかの免疫調整作用を及ぼし、IgG4 を過剰産生する病的クローンを抑制した可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Tsuda T, Kobayashi K, Seki K, Yashiro S, Ino T, Kato K, Hanawa T: The effect of a Japanese traditional medicine, hachimijiogan (kampo), on regulatory CD4⁺CD25⁺T cells in Mikulicz's disease. *Altern Ther Health Med*, 査読有 16:60-63, 2010.

② Tsuda T, Yashiro S, Gamo Y, Watanabe K,

Hoshino T, Oikawa T, Hanawa T: Discrepancy between clinical course and drug-induced lymphocyte stimulation tests in a case of saireito-induced liver injury accompanied by Sjögren syndrome. J Altern Complement Med, 査読有 16:501-505,2010

③ Tsuda T, Yashiro S, Gamo Y, Watanabe K, Hoshino T, Hyuga S, Oikawa T, Hanawa T: Corticosteroid sparing effect of hachimijiogan in Mikulicz's disease: a case report. Kampo Med, 査読有 60:513~518,2009.

④ Ito H, Hyuga S, Hyuga M, Watanabe K, Tsuda T, Oikawa T, Hanawa T: Suppression of motility of human breast cancer cells by human serum after intake of maoto. J Trad Med, 査読有 26:51~60,2009.

⑤ Watanabe K, Hyuga S, Hyuga M, Sekiguchi A, Endo M, Tsuda T, Oikawa T, Yamaguchi T, Hanawa T: Unkeito, a traditional Kampo formula, exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity: Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice. J. Trad Med, 査読有 26:18~24,2009.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 津田篤太郎ら、シェーグレン症候群に合併した漢方薬による薬剤性肝障害の一例、第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2010 年 4 月 22-25 日、神戸
- ② Hyuga, et al., Maoto, a kampo medicine, suppresses the HGF-induced motility and scattering by directly inhibiting phosphorylation of MET, The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA2009) in Yokohama, 2009. 10.3
- ③ 津田篤太郎ら、八味地黄丸によりプレドニゾロン減量が可能となった 2 症例、第 60 回日本東洋医学会学術総会、2009 年 6

月 19 日—6 月 21 日、東京

- ④ 津田篤太郎ら、がん細胞の薬剤耐性に対する漢方薬の作用～MDR-1 に対する検討から～、第 25 回和漢医薬学会学術大会、2008 年 8 月 30 日-31 日、大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：麻黄を成分とする MET 阻害剤

発明者：花輪壽彦、日向須美子、日向昌司

権利者：北里大学、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：PCT/JP2010/055622

出願年月日：2010 年 3 月 30 日

国内外の別：国際

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/toui-ken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花輪 壽彦 (Hanawa Toshihiko)

北里大学 東洋医学総合研究所 所長

研究者番号：4 0 1 6 4 8 9 2

(2) 研究分担者

日向 須美子 (Hyuga Sumiko)

北里大学 東洋医学総合研究所

臨床研究部 室長

研究者番号：6 0 3 5 3 4 7 1

(3) 連携研究者

日向 昌司 (Hyuga Msashi)

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部

主任研究官

研究者番号：5 0 2 5 1 6 5 8