

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15408

研究課題名(和文) 漢方薬・大建中湯を応用した慢性大腸炎関連発癌に対する新規薬物治療戦略

研究課題名(英文) Daikenchuto, a traditional Japanese Kampo medicine, suppresses colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice

研究代表者

門脇 真 (Kadowaki, Makoto)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：20305709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：5日目から急性大腸炎を発症するDSS誘起急性大腸炎モデルに疾病前状態を予測する動的ネットワークバイオマーカー数理理論を適応し、238個の遺伝子群が最も大きくゆらいた3日目が疾病前状態、すなわち未病状態であることが分かった。本遺伝子群の多くがNK細胞に関係するため、NK細胞を除去したところ急性大腸炎は抑制され、NK細胞が未病状態から病態発症の過程で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：One approach is to focus on the pre-disease state before the development of acute colitis and colitis-associated cancer (CAC). In this study, we investigated time-course gene expression profiles of a mouse model of DSS-induced acute colitis using whole-genome microarrays. We found that 238 genes exhibited elevated fluctuations in a coordinated manner, which was a pre-disease state-specific phenomenon predicted by the dynamical network biomarker (DNB) theory and occurred two days earlier than the onset of the acute colitis. Furthermore, Daikenchuto suppressed the acute colitis and CAC in the mouse models. These 238 genes are related to NK cells which have never been investigated on acute colitis. In addition, the depletion of NK cells with anti-asialo GM1 antibodies ameliorated the acute colitis. Taken together, Daikenchuto treatment has a potential of novel therapeutic strategies targeting the pre-disease state before the development of acute colitis and CAC.

研究分野：漢方薬理学

キーワード：大建中湯 急性大腸炎 疾病前状態の予測 数理解析 経時的全遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

複数の薬理作用を持つ多成分系薬剤である漢方薬を用いた薬物治療は、システム生物医学的に生体のバランスや恒常性の維持に主眼を置いているため、生体の重要な制御システムである免疫系は、漢方薬の主要な治療標的となっている。従って、現代医療の中でも、免疫疾患や消化管疾患等の治療では漢方薬が比較的多く用いられている。

最近、厚労省指定難病で潰瘍性大腸炎(UC)等の腸管免疫疾患である炎症性腸疾患(IBD)の患者が急増している。UCは病因不明の慢性炎症疾患であり、近年、UC患者から発生する大腸炎関連発癌(CAC)が大きな問題となってきた。UCは再燃と寛解を繰り返す慢性炎症疾患であることから、これまでのUCに対する治療薬開発は、ほぼ全て急性の過剰な炎症を抑制して寛解に導くことをコンセプトに行われてきた。よって寛解導入に用いられるUC治療薬は生物学的製剤を含めてその種類は多く、患者の症状に合わせた寛解導入が可能となってきた。しかし、寛解導入に成功しても再燃する症例が多く、また発症のピークが若年層であるため極力な免疫抑制剤を長期間服用するリスクが高い等、薬剤満足度や治療満足度の高い治療薬は存在しない。

大建中湯はUCに対して有効であることが臨床報告されているが、その科学的エビデンスや詳細な作用機序は明らかにされていない。さらに、UCの最も重篤な合併症であるCACに対する大建中湯の作用は未だ明らかにされていない。

現在我々は、数理科学を生命科学に応用して、動的ネットワークバイオマーカー(DNB)解析により疾病前状態である「未病」の科学的予測を行い、予測された「未病」を規定する因子の生物学的な役割について解析を進めている。さらに、「未病」を改善させる漢方薬の探索を行い、漢方薬の効能リポジショニングによる漢方薬のさらなる利活用を図るプロジェクトを進めている。本プロジェクトから、従来の医療体系とは異なった「未病」段階での医療介入による根本的治療を目指す新たな医療戦略の構築を図っている。

2. 研究の目的

創薬リソースを、人類の長年の臨床的叡智が込められた漢方薬に求める創薬研究は、漢方薬が多数の薬理作用を持つ複合薬物であるため、多因子性疾患の治療においても大きな可能性を秘めていると考えられている。最近、様々な網羅的および数理的解析方法等の進展により、生命科学における複雑系の解析は大きく進歩している。この手法を応用することにより、漢方薬の薬理作用の全貌を解明して新規適応疾患探索を行い、漢方薬の効能リポジショニングにより、漢方薬を臨床現場で利活用することが可能となってきた。

従来の創薬研究では「病気を引き起こす分

子」(病因)を明らかにし、それを創薬標的として新薬開発を行ってきたため対症療法的な薬剤が多く、十分な薬剤満足度が得られない疾病も多くあり現在の新薬開発の行き詰まりの一因となっている。すなわち、根本的治療薬の開発を目指すには、これまでの様な疾病形質が既に獲得された状態での医療介入では限界がある。

未病とは漢方医学における基盤概念であり、人が疾病状態に遷移する前に経過する臨界状態のことである。従って、未病を科学的に予測し病状が深刻化する前に医療介入することは、新規治療コンセプトに基づく独創的、根本的な医療戦略になりうると考える。

そこで、我々は動物モデルを用いて、数理科学により開発されたDNB解析を応用して、腸管免疫疾患における未病や「病態悪化の予兆」を科学的に予測し、予測された未病に対する漢方薬を用いた医療介入の有効性を明らかにし、未病を標的とした漢方薬の効能リポジショニングによる新たな医療戦略の構築を目指している。

本研究では、DNB解析を応用し、UC患者における寛解状態から再燃状態への遷移を数理モデル化することによってUC患者の再燃を予測することができるのではないかとこの仮説を立て、予測された「再燃前」に対して漢方薬を用いた医療介入が有効かを検証すれば、「再燃前」を標的とした漢方薬の効能リポジショニングによる新たな医療戦略の構築に繋がるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

急性大腸炎モデルは、雄性BALB/cマウス(8-10週令)に3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS:36-50kDa)溶液を7日間自由飲水させて作製した。体重及び大腸炎の症状の経日的な変化を観察した。大建中湯(300mg/kg)はDSSの飲水期間中1日2回経口投与し、その効果を検討した。DSS飲水前、1日後、3日後、5日後、最終日である7日後に結腸を摘出し、DNAマイクロアレイを用いて、網羅的遺伝子発現解析を行うと共に、腸管粘膜免疫系について検討を行った。

CACモデルの作製のため、雄性BALB/cマウス(6週令)に変異原性物質アゾキシメタン(AOM:12mg/kg)を1回腹腔内投与した後、2% DSS溶液を5日間飲水投与し、16日間の休薬の後、DSS溶液の5日間飲水投与をさらに2回繰り返した。体重及び大腸炎の症状の経日的な変化を検討した。また、大建中湯(300mg/kg)はDSS飲水期間中1日2回経口投与を行い、その効果について検討を行った。

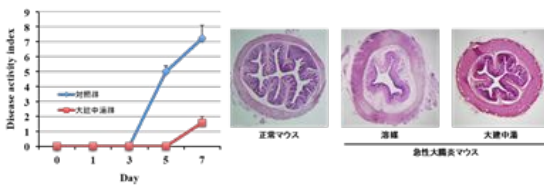
データは全て平均値 ± 標準誤差で表示した。統計学的有意差はStudent's unpaired t-testまたは一元配置分散分析(ANOVA)を行った後にDunnnett's multiple-comparison testを用いて解析した。危険率 $p < 0.05$ の場合有意とした。

4. 研究成果

・大建中湯の薬理学的効果

DSS の飲水を開始した 5 日目より潜血便、下痢などの大腸炎の症状が出現し、7 日目には結腸丈の短縮および結腸粘膜構造の破綻が観察された。大建中湯の投与は DSS 誘起急性大腸炎の発症を用量依存かつ有意に抑制した。また 7 日目には、結腸において炎症の指標であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性の上昇、ならびに炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 および IFN- γ mRNA 発現の著明な増大が認められた。大建中湯は MPO 活性および炎症性サイトカインの増大を有意に抑制した。

急性大腸炎モデルでの大建中湯の効果



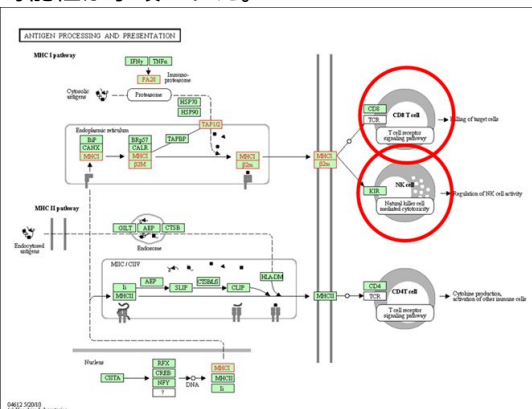
・DNB 解析

モデルマウスから、経日的に結腸組織を摘出し、各結腸における全遺伝子の発現強度を網羅的に Affymetrix Mouse GeneChip Array DNA マイクロアレイを用いて測定した。網羅的遺伝子発現解析のデータを収集後、DNB 解析を行った。

その結果、大腸炎の発症前である DSS 飲水 3 日目に DNB 解析による「揺らぎ」がピークとなり、発症の予兆を捉えることが出来たと考えられた。この「揺らぎ」は、238 個の遺伝子群 (未病遺伝子群) から構成されていた。

・238 個の遺伝子群 (未病遺伝子群) のオントロロジー解析 (GO 解析) 及びパスウェイ解析などの情報科学的解析

238 個の遺伝子群 (未病遺伝子群) に関して、GO 解析を行ったが、本遺伝子群の特徴を見出すことは出来なかった。しかし、KEGG を用いたパスウェイ解析により、UC の病態解析ではほとんど報告がない CD8+T 細胞や NK 細胞が UC の病因・病態に関与している可能性が示唆された。

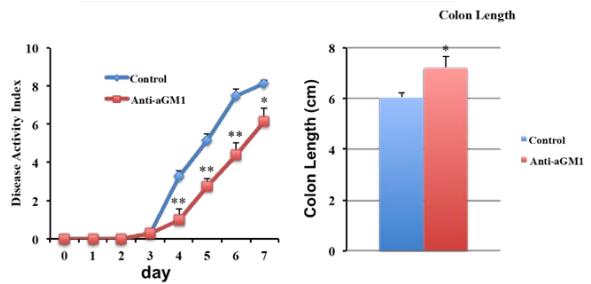


これらの細胞について詳細に解析を行うことにより、炎症性腸疾患に対する新たな治療戦略を提示できる可能性がある。

・未病遺伝子群の生物学的解析

そこで、NK 細胞を除去するため anti-asialo GM1 抗体を本モデルマウスに投与したところ、急性大腸炎は抑制され、NK 細胞が急性大腸炎の未病状態から病態発症の過程で重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、大建中湯の DNB に対する作用、238 個の遺伝子群 (未病遺伝子群) に対する作用、NK 細胞に対する作用を検討している。

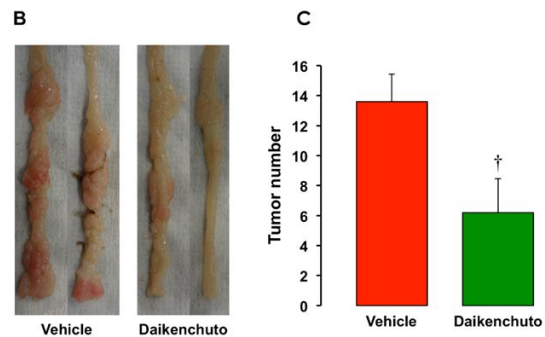
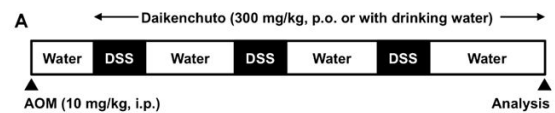
NK細胞除去抗体であるAnti-asialo GM1の効果



・マウス CAC モデルでの検討

溶媒投与群の全てのマウスにおいて腫瘍の形成が認められ、病理学的にも高頻度に悪性腫瘍が発生する CAC モデルを作製することができた。この CAC モデルにおいて、大建中湯は大腸発癌を有意に抑制した。

CAC マウスおよび大建中湯を投与した CAC マウスでの DNB 理論等による解析は現在進めているが、現在構築中の漢方薬の in silico シミュレーションによる標的タンパク質予測のデータベースを用いて検討したところ、CAC マウスで大建中湯は、“T cell signaling pathway”、“TNF-alpha signaling pathway”や“Wnt signaling pathway”に関連する遺伝子群を抑制することにより、その薬理作用を発揮すると予測された。



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 1 件)

- (1) Hayashi S., Hamada T., Zinsou D. G. A., Oshiro M., Itoi K., Yamamoto T., Kadowaki M.: PI3K p85 α Subunit-deficient Macrophages Protect Mice from Acute Colitis due to the Enhancement of IL-10 Production. *Sci Rep.*, 7: 6187, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-06464-w.

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Hayashi S., Zinsou D., Tobe K., Kadowaki M.: CD206 Positive Intestinal Macrophages Accelerate the Colonic Epithelial Wound Healing. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.
- (2) Wakabayashi N., Hayashi S., Kadowaki M.: Enhancer of IL-10 Production in Intestinal Macrophages Suppresses the Development of an Experimental Colitis in Mice. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.
- (3) Wakabayashi N., Hayashi S., Kadowaki M.: Search for an Enhancer of IL-10 Production in the Intestinal Macrophages for New Therapy against Inflammatory Bowel Disease. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 2, Kanazawa.
- (4) Hayashi S., Sendo M., Hertati A., Tobe K., Kadowaki M.: CD206 Positive Intestinal Macrophages Contribute to the Colonic Epithelial Wound Healing. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines 2017), 2017, 10, 29-11, 2, Kanazawa.
- (5) Zinsou D., Hayashi S., Kadowaki M.: Exploration for Natural Medicines that Stimulate the Production of IL-10 in Macrophages as a Therapeutic Approach in Inflammatory Bowel Disease. International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2017, 11, 10, Toyama.

〔その他〕

ホームページ

http://www.inm.u-toyama.ac.jp/jp/departments/06_gp.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

門脇 真 (KADOWAKI Makoto)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：20305709