

氏名（本籍）	田 中 知 明
学位の種類	博 士（薬 学）
学位記番号	薬 博 第 3 6 2 号
学位授与年月日	平 成 1 7 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科、専攻	東北大学大学院薬学研究科 （博士課程）医療薬科学専攻
学位論文題目	造血機能低下を抑制する植物成分 — （+）－ Catechin の骨髄細胞増殖活性と造血機能 障害改善効果—

論文審査委員	（主 査）教 授 大 島 吉 輝 教 授 大 内 和 雄 助教授 松 原 光 伸
--------	--

## 論文内容要旨

【序論】 造血幹細胞や造血前駆細胞を分化・増殖に導く生体内因子として、数多くのサイトカインの存在が明らかになり、がん治療において問題となる抗がん剤による極めて重篤な副作用の造血機能障害に対する支持療法として、または骨髄移植後の好中球減少症もしくは貧血時における有用な造血因子として臨床応用されている。しかし、これらのサイトカインはがん転移の促進や、これらの製剤そのものによる副作用の発現が危惧されている。かつ、これらは遺伝子組み換え技術によって製造された蛋白製剤であるため、使用期限や投与方法が制限され、また、高額であるなど問題点も抱えている。このような背景から、造血因子様の作用をもち、抗がん剤の副作用である造血機能障害を軽減することが可能な蛋白製剤以外の医薬品は、がんの化学療法に臨む患者の貧血を含めた予後の改善と、quality of life の向上に役立つ医薬品となる。そこで本研究では、造血機能低下を改善する薬物を、天然資源から見出す計画を立てた。はじめに、マウス骨髄細胞を用い、骨髄細胞の増殖活性を指標としたスクリーニング系において、活性のある植物の探索と活性成分の単離を行った。次に、活性成分について、*in vitro* と *in vivo* の実験系で造血前駆細胞増殖活性を評価した。さらに、抗がん剤 (5-fluorouracil: 5-FU) で実験的に造血機能を障害したモデルマウスに活性成分を投与し、造血機能障害の改善効果が認められるかどうかを調べた。

【本論】 マウスから骨髄細胞を分離し、これに約 20 種類の植物から得たエキスを作用させて 14 日間培養し、増殖活性を示すエキスをスクリーニングした。その結果、サルナシ (*Actinidia arguta* L) の MeOH エキスに強い活性が認められた。同エキスをを用い、コロニー形成法 (colony forming unit assay, CFU assay) を試みたところ、用量依存的に CFU 形成数を増加させることがわかった。このことから、同エキスには colony-stimulating factor (CSF) 様活性成分が含まれていることがわかった。そこで、骨髄細胞増殖活性を指標として、サルナシ MeOH エキスから成分の単離を試みた。まず同エキスを順次分配し、酢酸エチル可溶画分、*n*-ブタノール (*n*-BuOH) 可溶画分、水可溶画分の 3 つの画分を得た。それぞれの画分について活性を調べたところ、*n*-BuOH 可溶画分に活性が移行していることがわかった。そこで、*n*-BuOH 可溶画分について活性を指標として成分単離および精製を行った。その結果、(+)-catechin と (-)-epicatechin (図 1) を活性成分として見出した。

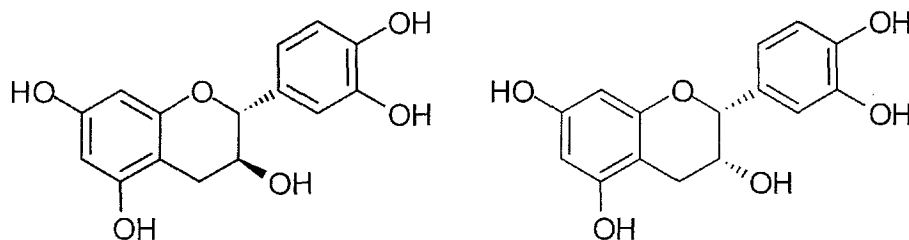


図 1 (+)-Catechin (左) と (-)-Epicatechin (右) の構造式

次に、活性成分の (+)-catechin と (-)-epicatechin を用いて、造血前駆細胞増殖作用に対する影響を詳しく

調べた。まず、*in vitro*においてCFU assayを行ったところ、(+)-catechinと(-)-epicatechinは、myeloidコロニー数を増加させた。したがって、これらはCSF様作用を示すことが判明し、これらのcatechin類が、サルナシに含まれる造血前駆細胞増殖活性成分の一部と考えられた。

また、(+)-catechinは、interleukin-3 (IL-3)により誘導されるcolony forming unit-culture (CFU-c)の発現を顕著に増加させた。このことから、(+)-catechinは、IL-3により誘導される未分化な造血前駆細胞の増殖をさらに増殖する効果があることがわかった。また、(+)-catechinは、より分化の進んだ前駆細胞であるmacrophage-colony stimulating factorの存在下で発現するコロニー (CFU-M) 数を濃度依存的に増加させた。したがって、(+)-catechinは、未分化なmyeloid前駆細胞がmonocyte系前駆細胞へ分化する前駆細胞に対して作用するということが明らかになった。

次に、*in vivo*での(+)-catechinの造血前駆細胞増殖作用を調べるために、(+)-catechinを実験的造血機能障害モデルマウスに投与して、造血前駆細胞に対して増殖作用を示すのかどうかを検討した。実験的モデルマウスは、抗がん剤の5-FUを150 mg/kgの用量でマウスに尾静脈内投与して作製した。このモデルマウスでは骨髄中のmyeloidコロニーとCFU-cコロニー数は、正常マウスのそれと比較して強く抑制されていた。このモデルマウスに100 mg/kg/dayの用量の(+)-catechinを経口投与して得られる骨髄細胞では、コントロール群と比べ有意なmyeloidコロニーとCFU-cの誘導が認められた。したがって、(+)-catechinは、*in vitro*と同様に*in vivo*においても造血前駆細胞増殖作用を示すことが明らかとなった。また、(+)-catechinとIL-3を併用すると、それぞれを単独投与した場合よりもコロニーの発現数が顕著に増加することもわかった。よって、(+)-catechinは、単独でも*in vivo*での造血前駆細胞増殖作用を示すが、IL-3との併用により、その効果がさらに強くなることがわかった。

以上の結果から、(+)-catechinは造血前駆細胞増殖作用を示すことが明らかになったため、次に抗がん剤による副作用の造血機能障害に対する軽減効果について調べた。造血機能障害軽減効果は、5-FU (150 mg/kg)を投与して作製した造血機能障害モデルマウスを用い、(+)-catechinを腹腔内に投与して末梢血中の血球数に及ぼす影響を解析した。その結果、(+)-catechinは5-FUにより血球数が減少する毒性期と血球数が回復する回復期において、末梢血白血球数を増加させることがわかった。

さらに(+)-catechinは、造血機能障害モデルマウスにおいて、脾臓や骨髄細胞数も毒性期および回復期で増加させることもわかった。そこで、(+)-catechinによって回復・増加した末梢血白血球、脾臓および骨髄細胞は、どのような細胞集団であるかを調べるため、Tリンパ球、Bリンパ球、顆粒球および単球各種系統分化特異抗原抗体を用いてフローサイトメトリー法によって解析した。その結果、末梢血白血球、脾臓および骨髄細胞が減少した毒性期において、(+)-catechinによって回復する細胞集団は、CD11b<sup>+</sup>とGr-1<sup>+</sup>であることがわかった。このことから、(+)-catechinは抗がん剤で減少する白血球細胞のうち、myeloid系細胞の顆粒球と単球系の細胞を増加させることが明らかとなった。

**【結論】** 骨髄増殖活性を示す成分の探索を試みたところ、数種の植物エキスのうちサルナシに最も強い活性が認められ、サルナシに含まれる活性成分として(+)-catechinを得た。(+)catechinはCSF様作用を示し、

CFU-c のような造血前駆細胞に対する増殖作用を示した。また (+)-catechin は、CFU-M のような骨髄細胞の中の monocyte 系前駆細胞の増殖・分化を促進させ、増殖および分化段階にある造血前駆細胞に対して、系統特異的に増殖を誘導する作用があることが示唆された。さらに、(+)-catechin は、5-FU による造血機能障害モデルマウスに対して、造血前駆細胞の増殖を誘導したことから、(+)-catechin は *in vitro* と *in vivo* で造血前駆細胞増殖作用を示すことが明らかとなった。

次に、抗がん剤による (+)-catechin の造血機能障害軽減効果について検討を行った。その結果、(+)-catechin は、5-FU によって減少した末梢血中の白血球数を増加させた。さらに、(+)-catechin は5-FU によって減少した脾臓および骨髄細胞数も増加させた。また、フローサイトメトリー法による解析から、(+)-catechin によって増加した白血球系細胞は、顆粒球や単球系の細胞集団であることがわかった。したがって、(+)-catechin は、myeloid 系前駆細胞の中でも比較的分化の進んだ前駆細胞の増殖を選択的に誘導する効果があることが明らかになった。

本研究の結果から、(+)-catechin は、抗がん剤の治療においてしばしば認められる白血球減少症や顆粒球減少症などに対して、これを改善する新たな医薬品、あるいはリード化合物となる可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

造血機能障害（骨髄機能抑制）は、薬物治療における重大な副作用の一つであり、とりわけ、がんの化学療法においては治療の大きな妨げとなっている。したがって、造血機能障害を改善、軽減する新たな治療方法を見いだすことは、重要な研究課題となっている。本研究は、造血機能障害を軽減できる医薬品のシーズを植物資源から見いだすことを目的として行われたものである。

まず、培養骨髄細胞に対する増殖活性を指標にして多種の植物エキスをスクリーニングし、サルナシのメタノールエキスに強い活性を見いだすとともに、同エキスから活性成分として (+)-catechin および (-)-epicatechin を単離した。つぎに、単離した (+)-catechin の骨髄前駆細胞に対する増殖活性を評価し、(+)-catechin が前駆細胞に対して増殖活性があることが明らかにした。つづいて、5-FU を静脈内に大量投与することで誘導した造血機能障害モデルマウスを用いて (+)-catechin の *in vivo* における骨髄前駆細胞増殖活性を評価し、(+)-catechin が *in vivo* でも骨髄前駆細胞を増殖させることを明らかにした。さらに、5-FU による造血機能低下に対する (+)-catechin の改善効果について末梢血レベルで解析を行った。その結果、(+)-catechin は5-FU 誘導造血機能障害モデルマウスにおいて減少する末梢血中の白血球数を増加させることを明らかにするとともに、増加した白血球が顆粒球および単球類であることをフローサイトメトリー法により明らかにした。

以上のように本研究は、(+)-catechin には5-FUによる骨髄毒性を軽減する効果があり、造血機能障害を改善する薬物開発のリードになる可能性があることを明らかにしたもので、造血機能障害を改善する医薬品を開発する上で貴重な知見を含んでいる。よって、本論文を博士（薬学）の学位論文として合格と認める。