

人參養栄湯による 間葉系幹細胞を介した老化抑制



隠岐 勝幸¹⁾、吉原 誠一¹⁾、梁 夏恩¹⁾、高橋 隆二²⁾、乾 明夫³⁾

1) 株式会社バイオメティクスシンパシーズ 研究開発部

2) クラシエ製薬株式会社 漢方研究所

3) 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 漢方薬理学講座

はじめに

超高齢化社会に直面しているわが国において、健康的な老化を迎えることは重要な課題の一つである。健康な状態と要介護状態の中間に位置し、身体的機能や認知機能の低下がみられる状態のことを指す言葉として、「フレイル (Frailty)」と日本老年医学会が2014年に提唱している。予防医学の概念であり、漢方でいう「未病状態」である。

個体レベルの老化と細胞レベルの老化の関連は不明な点が残されているものの、近年の研究により直接的な関連があることが徐々に明らかになってきている。つまり、細胞レベルでの老化の予防・治療が健康寿命の延長(アンチフレイル)のための解決策の一つになると考えることができる。

を開始させるが、老化した細胞は細胞周期の恒久的停止、細胞の巨大化および扁平化、細胞周期阻害因子p21・p16の発現上昇など共通の特徴を示す。このときダメージが小さければ細胞は細胞周期を復帰させ再び増殖するが、ダメージが大きいと恒久的な細胞周期の停止である細胞老化を引き起こす。細胞老化に陥るとSenescence-associated secretory phenotype (SASP) が起こり、SASP因子と呼ばれるタンパク質等を放出することが明らかとなっている(図1)²⁾。SASP因子は単一のタンパク質ではなく、老化細胞から放出される因子群であり、様々な炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素など種々のタンパク質から成り立っていることが知られている³⁾。

細胞老化とは

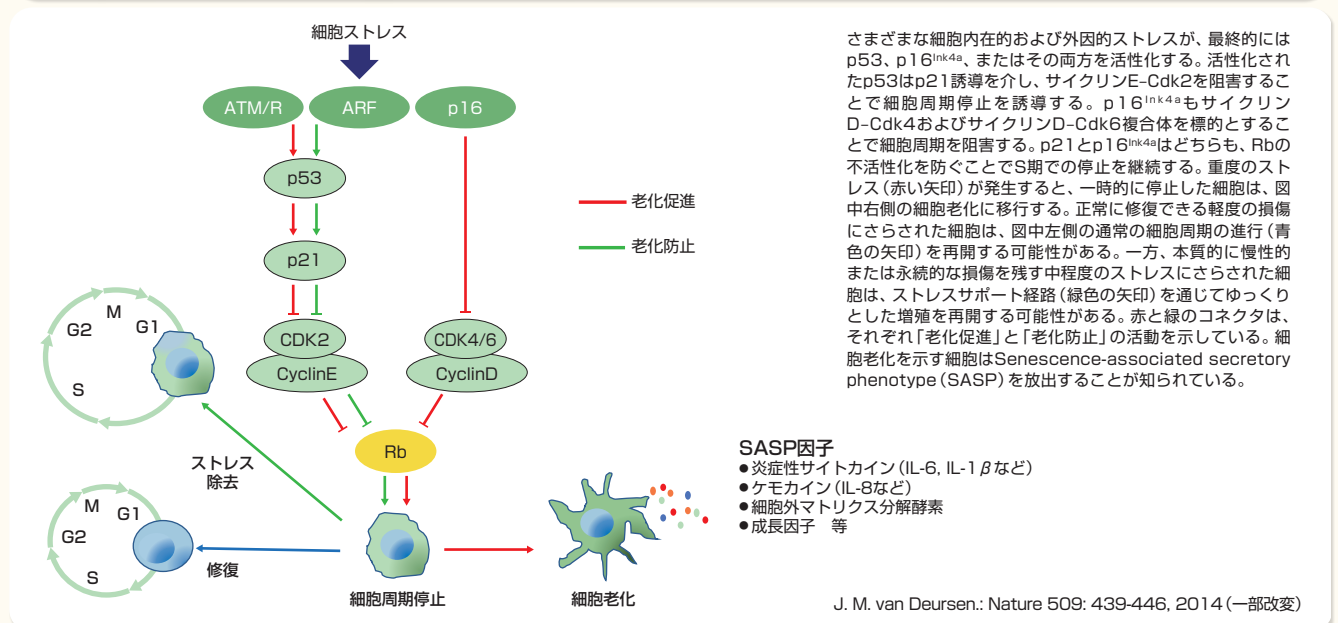
細胞老化は細胞に不可逆的な細胞周期の停止が起こる現象である。すでに1960年代にHayflickによってヒト線維芽細胞を継代し続けると細胞増殖が停止する現象が報告されており¹⁾、がん細胞などを除く一般的な正常細胞で観察される老化現象と考えられている。様々な刺激が老化

人參養栄湯と老化

人參養栄湯は、伝統的に気血双補剤として多彩な心身の症状に使用されてきた。現在では臨床で体力低下・全身倦怠感・食欲不振・寝汗・冷え症・貧血(ICD-10)に対して汎用される。

われわれは老化モデルマウス(クロトー欠損マウス)における人參養栄湯の効果について研究を進めており、本誌

図1 細胞老化カスケード



でも報告している⁴⁾。簡単にその内容を紹介すると、人參養榮湯の経口投与は以下の結果を示していた。

1. クロトー欠損マウスの老化病態を改善し、30%近い寿命延長効果を示した。
2. サルコペニアを軽減し、骨密度の低下を改善した。
3. 消化管の幹細胞を増加させ、絨毛構造の異常を軽減した。
4. 肺気腫(肺胞腔の拡大)や小脳の萎縮(原因不明)を改善し、プルキンエ細胞の増加傾向を示した。
5. 心重量の増加を抑制し、一方精巣萎縮を軽減し、その重量を増加させた。
6. 胸腺や二次リンパ組織の老化に伴う萎縮を改善し、T細胞、NK細胞、B細胞を増加させ免疫機能を強化した。

これら多くの臓器・組織への人參養榮湯の作用は、幹細胞の増加やテロメア短縮の有意な抑制が見られたことから、若返り効果であることが推測された。

間葉系幹細胞(MSC)と老化

2015年に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法)が施行されたことでも分かる通り、近年再生医療に注目が集まっている。老化を含めた機能不全になった臓器の再生を大きな目的の一つとする再生医療の応用がアンチフレイルの場面でも大いに期待されている。様々な細胞を用いた治療が行われているが、われわれは特に間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)の可能性に注目している。MSCは骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞など、間葉系に属する細胞への分化能をもつとされる細胞で、骨髄、脂肪、臍帯、羊膜など多くの臓器に存在していることが知られている多能性幹細胞である。胚性幹細胞(ES細胞)やiPS細胞のような全ての細胞・臓器に分化できる能力はないものの、ES細胞のように受精卵を犠牲にすることによる倫理的な問題も、iPS細胞のように樹立に遺伝子導入をすることによるがん化の可能性も、MSCの利用は比較的低いため利用しやすいと考えられている。

体内のMSCの数は年齢を経るにつれ減少することがよく知られている。一方、機能的にも高齢者から採取したMSCは細胞老化が進んでいると考えられている。実際、若齢者(18歳未満)と高齢者(70歳以上)からそれぞれ採取した骨髄由来MSCを比較したところ高齢者のMSCにおいてSASP因子の放出が多く、免疫調節特性が大幅に低下したことが報告されている⁵⁾。続く実験において造血幹細胞を高齢者のMSCに曝露させたところ造血幹細胞の炎症性因子の放出を誘発し、SASP因子依存的に造血幹細胞のクローン原性を低下させていた。このことは老化したMSCが体内の周りの環境にも影響し、疾患を誘導する可能性があることを示唆している。

また、妊娠特有の高血圧性障害として、血管新生障害を

特徴とする子癇前症という疾患がある。子癇前症の女性(PE)および正常血圧の妊娠女性(NP)から摘出された腹部脂肪由来MSC(それぞれPE-MSCとNP-MSCとする)ではPE-MSCの方が強い老化の表現形(SASP因子が多い、MSC生存率や増殖率が低い、血管新生障害を持つなど)を示した。老化細胞除去剤ダサチニブで処理することにより、PE-MSCのアポトーシスを有意に増加させ、p16などSASP因子の遺伝子発現を減少させるとともに血管新生能の回復を示した⁶⁾。すなわち異常なMSCが疾患を誘発していると考えられる。

ここで用いられているダサチニブ(商品名:スプリセル[®])はチロシンキナーゼ阻害薬であり慢性骨髄性白血病(CML)などに国内でも適用されている抗がん剤である。その一方で老化細胞特異的にアポトーシスを引き起こす老化細胞除去剤としての効果が見出されている⁷⁾。古くは、細胞老化等により損傷したDNAの修復が追いつかなくなった状態ががん化の引き金と考えられていたが、近年がん化抑制のメカニズムの一つとして細胞老化が作用しているとも考えられており⁸⁾、一言で説明はできない。ダサチニブが持つ老化細胞除去能力と抗がん作用を考えると非常に興味深く、今後の研究の発展に期待したい。

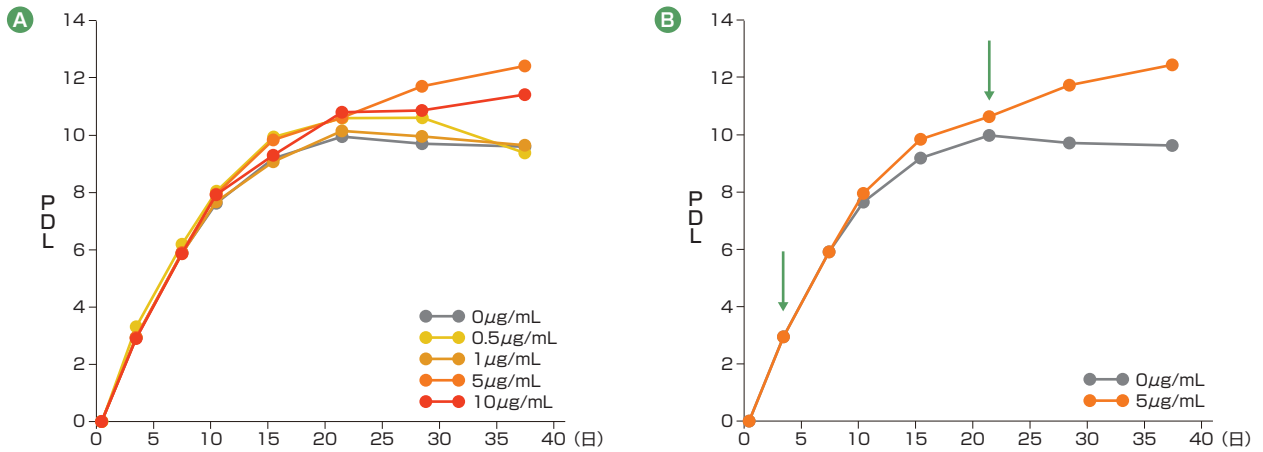
人參養榮湯とMSC

ここまで述べてきたようにMSCの老化が体内の様々な細胞に働きかけ、結果として全身的な症状悪化につながることを示唆されている。われわれは老化に及ぼすMSCの影響に注目し、人參養榮湯のMSCに対する影響について調べた。ヒト脂肪由来MSCに人參養榮湯を、濃度を変化させて添加し培養した。図2(次頁参照)に結果を示したようにコントロール(0 μ g/mLグレー線)と比較して、人參養榮湯の添加は、濃度非依存的ではあるがグラフの傾きが緩やかになるのが抑えられた(図2A:次頁参照)。すなわち適度な人參養榮湯の添加が、脂肪由来MSCの増殖の停止すなわち老化現象を抑制すると考えられた。データは割愛するが、この人參養榮湯によるMSCの老化抑制作用は脂肪由来MSCだけではなく、ヒト臍帯由来MSCでも観察されたため、ある程度普遍的な現象であると考えられた。

われわれが行なった条件のうち最も老化抑制効果が高かった濃度(5 μ g/mL)における培養日数の短い細胞(人參養榮湯添加3日目)と、長い細胞(人參養榮湯添加21日目)それぞれからRNAを抽出し、SASP因子を含む老化に関連する幾つかの遺伝子(表:次頁参照)について遺伝子発現量を比較した。

その結果、細胞老化に関わることが知られているp16、p21がMSCの継代を経ることで増加することが確認され、この増加は人參養榮湯を添加し続けることで抑制された(図3A,B:次頁参照)。また、SASP因子の一つであるIL-6の継代を重ねることによる発現増加は確認できなかった

図2 人參養榮湯によるMSC老化抑制作用



10mg/mLとなるよう人參養榮湯水を加え抽出した。抽出後遠心し上澄をフィルター滅菌した。培地で1000倍希釈したものを10µg/mLと表記した。継代時に細胞を計数し、「log(培養終了時の細胞数/培養開始時の細胞数)×3.33で算出した値を累積」することで求められる、細胞集団倍加数 (population doubling level; PDL) を算出した。

A. MSCを3000cm²の細胞密度でT25フラスコに播種し、37℃、5%CO₂条件下、無血清MSC培地(バイオメテックスシンパシズ社)で培養した。人參養榮湯添加量を変化させ、添加時のPDLを0として表した。

B. 人參養榮湯5µg/mLの時の細胞増殖の様子を示した。図中矢印で示したところ(3日目及び21日目)でRNAを回収し、qPCRに供した。

表 本実験で検討した遺伝子群

遺伝子名	特徴・機能	老化が及ぼす変化
<i>p16</i>	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子	発現上昇
<i>p21</i>	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子	発現上昇
<i>Sirt1</i>	長寿遺伝子	発現低下
<i>IL-6</i>	炎症性サイトカイン	発現上昇
<i>IGFBP4</i>	IGFsに結合することによりその活性を抑制	発現上昇

が、人參養榮湯の添加で*IL-6*の発現は抑制される傾向が見られた(図3C)。本研究では人參養榮湯を5µg/mLとなるように使用したが、10µg/mLとしたときにはより強い*IL-6*発現抑制効果が観察された(data not shown)。インスリン様増殖因子(IGF)-1に結合しその機能を抑制することが知られているInsulin-like Growth Factor Binding Protein 4(IGFBP4)は、細胞老化の過程で増加することが知られている。本研究でもその遺伝子発現の増加が確認され、その発現は人參養榮湯の添加で抑制された(図3D)。一方、老化とともに発現量が減少することが広く知られているサーチェイン遺伝子(*Sirt1*)の発現はMSCの継代で低下したものの、人參養榮湯で低下の抑制はみられなかった(図3E)。

細胞老化を引き起こす原因は様々であり、細胞内でのシグナル伝達経路も様々である(図1)。そのため今回の検討もその一面を表しているに過ぎない。「人參養榮湯と老化」「MSCと老化」はこれまで独立して研究が進められてきた分野であり、それぞれの分野でデータの蓄積があるものの「人參養榮湯とMSC」を結びつける研究はわれわれが知っている限りでは見当たらない。本研究において「人參養榮湯→MSC老化抑制→個体老化抑制・疾患予防」の道筋を明

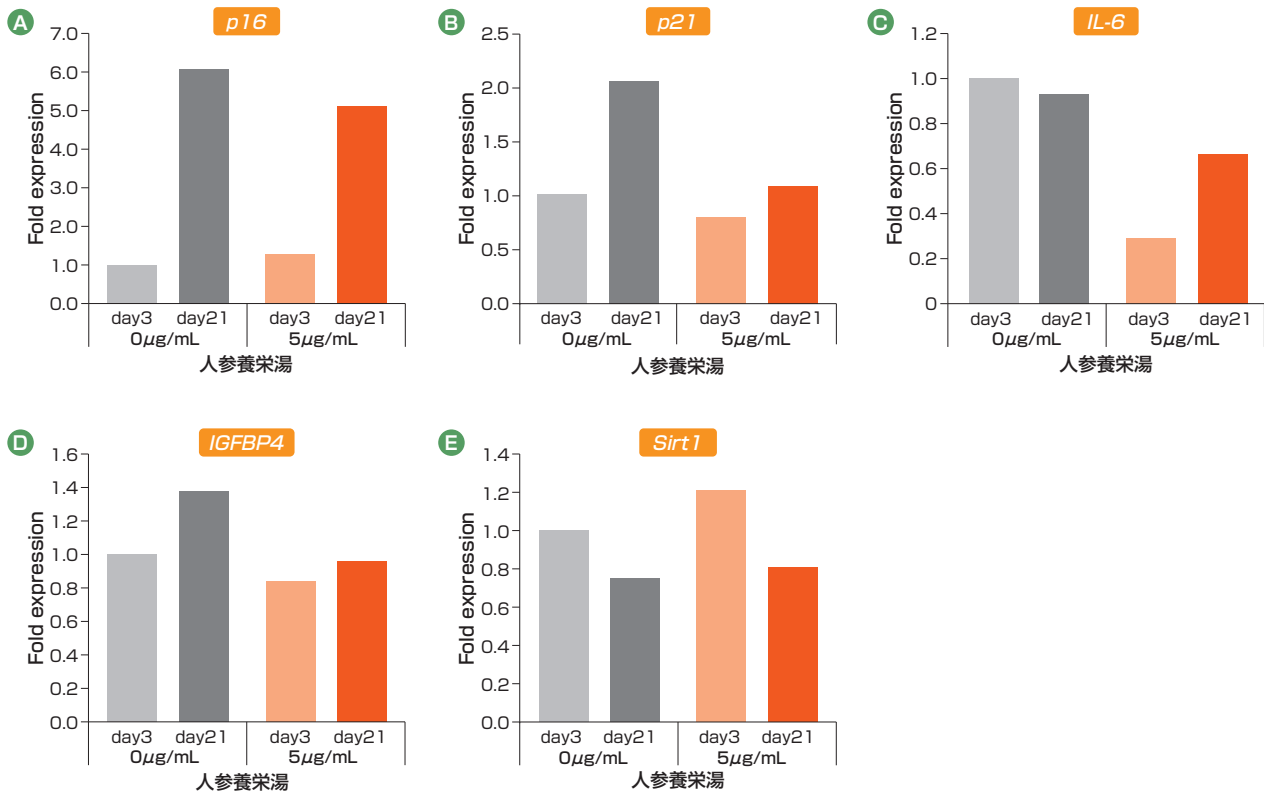
らかにする新たな手がかりが得られた。MSCに対する人參養榮湯の反応量などの実験レベルでの検討事項に始まり、人參養榮湯に晒されたMSC自体の変化及びMSCが他の細胞に及ぼす影響・個体に及ぼす影響の解明など課題は山積みであるが、古くから使われている漢方薬が老化という現代の大きな問題の解決の可能性を秘めていることを考えると非常に楽しみである。また、今回行ったMSCに対する人參養榮湯添加の*in vitro*実験だけではわからないが、MSCが放出する成長因子などの有効成分と人參養榮湯が従来含む成分が生体内で相乗的に効果を示すと非常に興味深いと考えており、今後の研究課題である。

おわりに

老化細胞除去剤としてのダサチニブを用いた研究について、別の研究報告がある。若齢マウスに老化誘導した脂肪由来MSCを移植するだけで、運動量低下などの全身性の老化現象が観察され、これらのマウスに対してダサチニブとケルセチンの合剤を投与すると若返りを示すことをメイヨークリニック(米国ミネソタ州ロチェスター)のジェームズ・カークランド医師らが報告している⁹⁾。彼らはダサチニブとケルセチンの経口投与がヒトでの若返り効果を示すことを検証するために、現在フェーズ2の治験を70歳以上の健康人を対象に進行中である(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04313634)。抗がん剤がアンチフレイル薬として適用される日が近づいているのかもしれない。

人參養榮湯がMSCを介して抗老化作用を示すこと、そして個体の老化を抑制することを証明し、安全で安価なアンチフレイル薬として人參養榮湯が出回る日を迎えられることを願ってやまない。

図3 人參養栄湯によるMSC老化関連遺伝子発現量変化



老化関連遺伝子の発現を図2で回収したRNAを用いたqPCR定量 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) を行ない、各時点での遺伝子発現量を解析した。各遺伝子の値をハウスキーピング遺伝子GAPDHで補正し、人參養栄湯0μg/mL 3dayの値を1とした時の相対値を示した。
A: p16, B: p21, C: IL-6, D: IGFBP4, E: Sirt1

【参考文献】

- 1) L. Hayflick: The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636, 1965
- 2) J. M. van Deursen: The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509: 439-446, 2014
- 3) F. Rodier, et al.: Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192: 547-556, 2011
- 4) 乾 明夫 ほか: クロト一欠損マウスにおける補剤の寿命延長効果. *phil漢方* 82: 24-27, 2021
- 5) D. Gnani, et al.: An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell* 18: e12933, 2019
- 6) S. Suvakov, et al.: Targeting senescence improves angiogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with preeclampsia. *Biol Sex Differ* 10: 49, 2019
- 7) Y. Zhu et al.: New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-X_i inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* 9: 955-963, 2017
- 8) S. Komura, et al.: Cell-type dependent enhancer binding of the EWS/ATF1 fusion gene in clear cell sarcomas. *Nat Commun* 10: 3999, 2019
- 9) M. Xu, et al.: Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24: 1246-1256, 2018

お詫びと訂正

phil漢方 81号(2020年10月1日発刊号)に掲載されたBASIC RESEARCH 2「抑肝散加陳皮半夏の不眠症に対する作用機序と副作用について」におきまして、表中のゾルピデムにおいて誤解を招く記載がございました。ご愛読をいただいております諸先生にご迷惑をおかけしたことをお詫びし、ここに訂正いたします。訂正後の表は以下のとおりです。

表 睡眠薬副作用一覧

薬剤名	睡眠薬種類	対象者	調査症例数	副作用発現件数	主な副作用(上位3症状)	出典
抑肝散加陳皮半夏	漢方薬	不眠症患者および神経症患者	1,200例	26例(2.17%)	下痢(0.25%)、腹部不快感、嘔吐、軟便(各0.17%)	医学と薬学 77(2): 263-276, 2020
ジアゼパム	ベンゾジアゼピン系睡眠薬		1,221例	315例(25.8%)		添付文書より抜粋
プロチゾラム	ベンゾジアゼピン系睡眠薬		6,548例	256例(3.91%)	残眠感・眠気(2.20%)、ふらつき(1.01%)、頭重感(0.76%)	添付文書より抜粋
ゾルピデム*	非ベンゾジアゼピン系睡眠薬	統合失調症及び躁うつ病に伴う不眠症を含む患者	1,102例	190例(17.2%)	ふらつき(4.0%)、眠気(3.4%)、頭痛(2.8%)、倦怠感31例(2.8%)	添付文書より抜粋
ゾピクロン	非ベンゾジアゼピン系睡眠薬		11,677例	831例(7.12%)	にがみ(4.18%)、ふらつき(0.89%)、眠気(0.51%)	添付文書より抜粋
エソピクロン	非ベンゾジアゼピン系睡眠薬	不眠症患者	325例	156例(48%)	味覚異常(36.3%)、傾眠(3.7%)	添付文書より抜粋
ラメルテオン	メラトニン受容体作動薬		1,864例	194例(10.4%)	傾眠(3.4%)、頭痛(1.0%)、倦怠感(0.5%)	添付文書より抜粋
スボレキサント	オレキシン受容体拮抗薬	不眠症患者	254例(日本人61例)	53例(20.9%)	傾眠(4.7%)、頭痛(3.9%)、疲労(2.4%)	添付文書より抜粋
レンボレキサント	オレキシン受容体拮抗薬	不眠症患者	884例(日本人155例)	249例(28.2%)	傾眠(10.7%)、頭痛(4.2%)、倦怠感(3.1%)	添付文書より抜粋

*対象者は副作用発現頻度の算出根拠として添付文書上の記載に基づくもので、効能・効果の対象患者とは異なる。