

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08930

研究課題名(和文) 糖尿病病態における肺粘膜免疫系異常と八味丸による改善作用の解析

研究課題名(英文) Elucidation of immunoabnormality on plumonary mucosal immune system of streptozotocin-induced type I diabetes mice model and analysis of improving effect of Hachimigan

研究代表者

清原 寛章 (Kiyohara, Hiroaki)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：70161601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病では呼吸器感染症の難治・重篤化が臨床で問題になっている。Streptozotocin誘発I型糖尿病モデルマウスの肺組織ではE/P-selectinの発現低下が起こり、肺組織へのT/Bリンパ球のリクルートが著明に抑制されている可能性が示され、八味丸はP-selectinの発現低下の改善を惹起し、加えて補体第一成分の遺伝子発現も増強した。一方、肺組織でのAngiotensin 受容体(AT1a)のmRNA発現が八味丸の投与により著明に増強されたが、本糖尿病モデルマウスの肺へのウイルスRNA(PolyI:C)の接種により惹起される肺炎を八味丸の投与が強く抑制できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that diabetes patients tend to receive pulmonary infectious diseases, however effective preventive or therapeutic medical strategy have not been developed. By the present study using transcriptome analyses, it was strongly indicated that expression of E/P-selectin recruitments of T and B lymphocytes decreased in lung tissues in streptozotocin-induced type I diabete mice model. Administration to the model mice improved reduced expression of P-selectin, resulting increment of T lymphocyte recruitment in lung tissues in addition to up-regulation of complement factor, C1q. Although expression of angiotensin II receptor (AT1a) in the lung tissues of the model mice significantly increased by administration of Hachimigan, this administration also improved pneumonia induced by pulmonary inoculation of poly(I:C).

研究分野：漢方免疫薬理学

キーワード：八味丸 糖尿病 肺粘膜免疫系

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は「世界糖尿病デー」が設定されるほど世界中に広く蔓延した病気である。長期にわたる高血糖状態によって糖尿病性腎症、白内障、神経障害などの様々な合併症が引き起こされることが知られており、「糖尿病との闘いは合併症との闘い」ともいわれている。糖尿病では皮膚感染症の多発も知られているが、併せて市中感染菌による呼吸器感染症の易感染性・重篤化が臨床にて問題になっている。本病態は高血糖による呼吸器粘膜免疫系異常に起因すると想定されるが、ワクチン接種以外の有効な予防的手段は確立されていない。世界的にも糖尿病での呼吸器免疫系異常の解析例は少なく、特にその予防に着目した研究もほとんど行われてきていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、自己免疫型の streptozotocin 誘発 I 型糖尿病モデルマウスを用い、

- 1) 本モデルマウスでの肺粘膜免疫系異常の詳細を解析する
- 2) 上記肺粘膜免疫異常に対し、糖尿病の治療で頻用される漢方薬剤「八味丸」の投与による改善作用の詳細について評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) モデル動物の作成と薬剤投与：7 週齢の C57BL/6J マウス（雄性）を飼料として LabDiet5058 にて 1 週間予備飼育後、streptozotocin (STZ, 40 mg/kg) を 5 日間連続で腹腔内投与し、1 週毎に尾静脈血を用いて血糖の測定を行った。血糖値が 300 mg/dL を超えた STZ 投与 14 日目から北里大学・東洋医学総合研究所・漢方鍼灸治療センターにて患者に投薬される八味丸料処方の煎剤エキス (1 g/kg) を連日 48 日間経口投与後 (1 日 1 回)、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織および血清を採取した。

2) ウイルス性気道炎症の惹起：STZ 誘発高血糖マウスをソムノペンチルおよびイソフルラン麻酔下にて肺に poly (I:C) (25 μg/mouse) の用量で経鼻的に接種する操作を 1 日 1 回で 3 日間繰り返し、気道炎症を惹起させた。3 回目の poly (I:C) 接種 24 時間後に気管支肺胞洗浄液および肺組織を採取し、実験に供した。

4. 研究成果

4-1. 自己免疫型 STZ 誘発 I 型糖尿病モデルマウス肺での粘膜免疫系異常と八味丸投与による改善作用の解析

STZ にて処置し、300 mg/dL 以上の血糖値を示してから 30 日間マウスを飼育し、その肺での粘膜免疫系の変化の解析を行った。肺組織での免疫関連因子の変化についてトランスクリプトーム解析を行った結果、高血糖

マウスでは T および B リンパ球マーカー (CD3e および B220) の遺伝子発現が有意に低下し、肺内へのリンパ球の供給が低下している可能性が推定された (図 1)。これに対し、

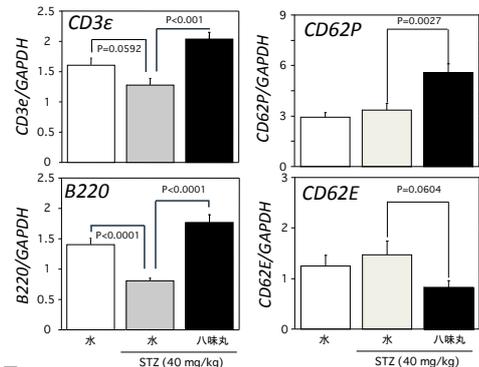


図1 自己免疫型I型糖尿病モデルマウス肺組織でのリンパ球および接着因子mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

先天性感染防御因子としての抗菌タンパクや補体成分、T リンパ球サブセットなどについては高血糖での大きな変化を認めることはできなかった (図 2 および 3)。一方、高血

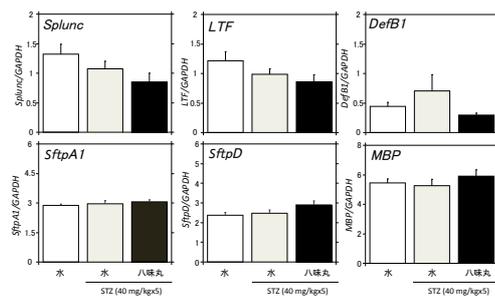


図2 自己免疫型I型糖尿病モデルマウス肺組織での先天性感染防御因子類mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

糖マウスへの八味丸の投与においては、低下した T、B リンパ球マーカーの発現上昇とともに、Th1 および Th2 のマーカー転写因子遺伝子 (T-bet、GATA3) の発現上昇、リンパ球のリクルートに関係する接着分子の CD62P (P-selectin) および血管内皮の修復マーカーの 4 型コラーゲン α 1 (Col4A1) の遺伝子発

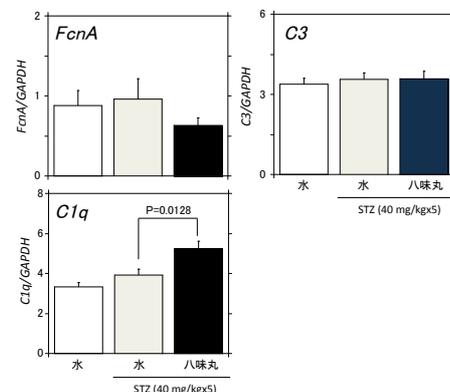


図3 自己免疫型I型糖尿病モデルマウス肺組織での補体成分mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

現の上昇が認められ、低下した肺へのリンパ球のリクルートが血管内皮細胞の修復に伴う接着分子の発現上昇に基づき回復することが推定された (図1および3-5)。また、先天性感染防御因子のうち、肺胞上皮細胞で生産される補体第一成分 (C1q) の遺伝子発現も上昇していた (図3)。また、骨髄系細胞のマーカー遺伝子の発現変化を検討した結果、八味丸投与群で Gr-1 mRNA の顕著な発現上昇が認められた。近年、Gr-1 陽性マクロファージ様の細胞の中には制御性機能を有する細胞集団が存在し、糖尿病モデルで腎臓などに集積し、糖尿病性腎症の進展を抑制することが報告されている。本制御性細胞は **TEK receptor tyrosine kinase (Tie-2)** 陽性細胞

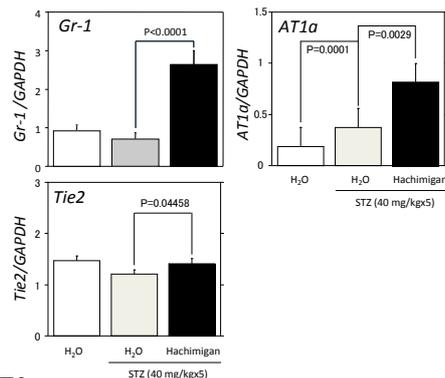


図6 自己免疫型糖尿病モデルマウス肺組織での抑制性マクロファージ関連マーカーおよびアンジオテンシンII受容体mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

の遺伝子発現の上昇も八味丸投与により確認され、リンパ球上の本受容体の発現を八味丸が上昇させている可能性が考えられた。

4-2. 自己免疫型 STZ 誘発 I 型糖尿病モデルマウスにおけるウイルス性気道炎症に対する八味丸の作用の解析

近年、リンパ球やマクロファージ上の AT1a 受容体は糖尿病腎症の進展に抑制的な作用を及ぼす制御性機能を有することが推定されている。このため、自己免疫型 STZ 誘発 I 型糖尿病モデルマウスの肺で認められた AT1a 受容体の発現上昇が病原体の呼吸器感染に伴う肺炎の制御に関与しうる可能性が期待された。そこで、高血糖状態を 30 日間持続させた C57BL/6 マウスにウイルス RNA アナログの poly (I:C) を経鼻的に肺接種し、ウイルス性気道炎症を惹起させ、本炎症性病態に対する八味丸投与の影響の検討を行った。その結果、水投与群では有意に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の myeloperoxidase 活性が上昇していたが、八味丸投与によりその上昇は著明に抑制された (図7)。また、BALF 中の好中球ケモカイン (CXCL10) および炎症サイト

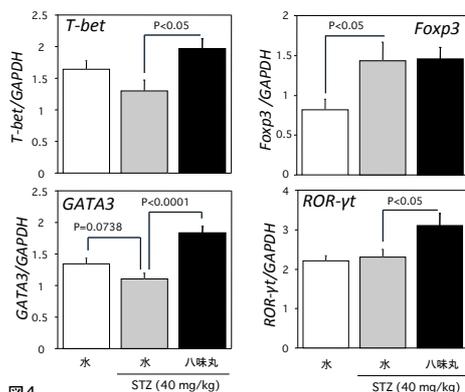


図4 自己免疫型糖尿病モデルマウス肺組織でのTリンパ球サブセットマーカー分子mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

であることが明らかとされていることから、

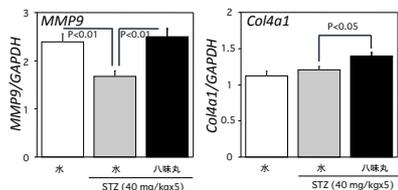


図5 自己免疫型糖尿病モデルマウス肺組織での血管内皮修復関連因子mRNAの発現変化と八味丸投与の影響

肺組織での Tie-2 遺伝子の発現変化を検討した結果、八味丸投与群で程度は低いが発現上昇が認められ、本制御性細胞のリクルートも起こっている可能性が考えられた (図6)。

一方、一般に高血糖病態ではアンジオテンシン転換酵素の活性化が起こり、angiotensin II (Ang II) が過剰誘導される。その I 型受容体 (AT1a) は血管内皮細胞上では Ang II との反応により炎症反応を促進することが知られている。高血糖モデルマウスの肺での AT1a の遺伝子発現の変化を検討した結果、高血糖病態で上昇し、八味丸投与でさらに顕著に上昇することが判明した (図6)。本実験と平行して行った、高用量の STZ の処置で誘導した毒性型 I 型糖尿病モデルマウスを用いた検討において、肺と共に脾臓での AT1a

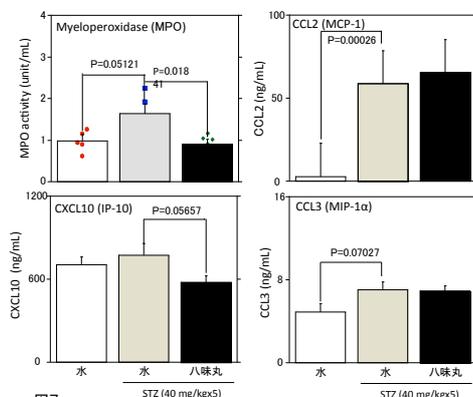


図7 自己免疫型糖尿病モデルマウスの気管支肺胞洗浄液中のミエロペルオキシダーゼ活性およびケモカイン量の変化と八味丸投与の影響

カイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β) 量も poly (I:C) 接種により上昇していたが、八味

丸の投与により有意に低下し、高血糖モデルマウスでのウイルス性気道炎症を八味丸が改善することが強く示唆された（図7および8）。

今後は、高血糖による感染性気道炎症の憎悪の有無を検討すると共に、細菌性気道炎症への有用性を評価する。加えて、高血糖モデルマウスの肺での補体第一成分などの先天性感染防御因子の産生への八味丸の作用、

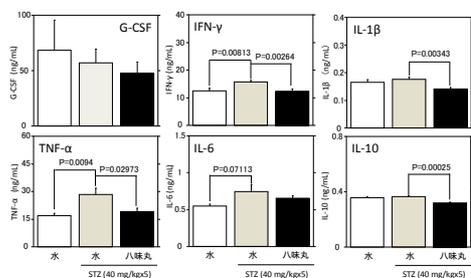


図8 自己免疫型糖尿病モデルマウスへのpoly(I:C)接種による気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量の変化と八味丸投与の影響

AT1a 受容体の発現細胞の特定と、その気道炎症への影響など検討を行っていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清原 寛章 (KIYOHARA Hiroaki)
北里大学大学院感染制御科学府・教授
研究者番号：7 0 1 6 1 6 0 1

(2) 研究分担者

永井 隆之 (NAGAI Takayuki)
北里大学大学院・感染制御科学府・准教授
研究者番号：0 0 1 7 2 4 8 7

(3) 研究分担者

丸山 弘子 (MARUYAMA Hiroko)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号：5 0 1 2 9 2 6 9

(3) 連携研究者

及川 哲郎 (OIKAWA Tetsuro)
北里大学・東洋医学総合研究所・副所長
研究者番号：1 0 3 7 0 1 6 5