

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09234

研究課題名(和文) 葛根湯併用による安全かつ効率的な経口免疫療法による食物アレルギーの治療方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of highly effective therapy for food allergy by concomitant use of kakkonto with oral immunotherapy

研究代表者

山本 武 (Yamamoto, Takeshi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：70316181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：食物アレルギーの患者数は急増しているが、未だ根治的な治療法は存在しない。経口免疫療法(OIT)は、食物アレルギー疾患を根治し得る治療法として考えられているが、治療効率や副作用の問題があり、未だ研究段階の治療法とされている。申請者は、食物アレルギー病態モデルを用いて、葛根湯が食物アレルギーの発症を抑制することを明らかにしていることから、食物アレルギーの安全で治療効率の高い治療法の確立を目的として、OITと葛根湯の併用療法を考案し検討した。食物アレルギーを発症した病態モデルに対して、OITと葛根湯の併用療法は腸管に制御性T細胞を誘導することにより、OITによる治療効率を上げることが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病態モデルを用いて、葛根湯と経口免疫療法の併用療法が、経口免疫療法による食物アレルギーの治療効果を増加させることを明らかにした本研究成果は、未だ治療法が確立していない食物アレルギーに対する漢方薬併用した有効な治療法の確立に繋がることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Food allergies (FAs) represent an increasingly prevalent human health problem that affects a large proportion of the general population in developed countries. Despite the increasing prevalence of FA, there are no treatments available for FA. Oral immunotherapy (OIT) has been considered a promising approach for FAs. However, the current OIT strategy is limited in terms of the long-term efficacy and safety. We have previously demonstrated that kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, suppresses the occurrence of allergic symptoms in a murine model of FA. Therefore, we investigated whether kakkonto could improve the efficacy of OIT. The concomitant use of kakkonto significantly enhanced the effectiveness of OIT on the allergic symptoms by increasing regulatory T cells in the colon. These findings indicated that the combination of OIT with kakkonto represents a promising approach for FA treatment.

研究分野：消化管生理学、薬理学、免疫学

キーワード：食物アレルギー 葛根湯 経口免疫療法 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーの患者数は、先進国を中心に急速に増加しており、日本国内でも、乳児の 5 ~ 10%、幼児の約 5%、学童期以降では 1.5 ~ 3% が有病者であると推定されている。しかし、食物アレルギーを根治する治療法、あるいは発症を予防する治療薬は存在しないため、原則として発症を予防するための「除去食を用いた食事療法」が行なわれている[1]。

アレルギー患者に対する原因抗原(アレルゲン)をごく微量から増量しつつ投与し続ける免疫療法の有用性が明らかになっており、近年、花粉症に対しては、舌下免疫療法薬『シダトレン』の使用が認可された。食物アレルギーの治療に対しては経口免疫療法(OIT)が行われ、一定の効果が得られることが報告されており、食物アレルギーを根治し得る可能性が示唆されている。しかし、OIT は原因抗原の投与により行なわれるため、アナフィラキシー等の重篤な副作用が発現する場合があることや必ず耐性獲得が誘導できるわけではないこと、耐性の誘導に数年に渡る長期間の投与が必要であることなど患者への負担が多いため、未だ研究段階の治療法とされ一般診療には推奨されていない[1]。

殆どの西洋薬が単一の治療標的に対する作用のみを有していることとは異なり、複合薬物である漢方薬は複数の治療標的に作用することにより、生体の調節機構(神経系、免疫系、内分泌系等)の病的なバランスの偏りを改善することを目的としているものが多い。従って、アレルギー疾患のような多因子性疾患の治療に対し多成分系である漢方薬の有用性が示唆されており、実際にアレルギー性鼻炎に対する小青竜湯や葛根湯加川芎辛夷、アトピー性皮膚炎に対する温清飲、喘息に対する小青竜湯や麦門冬湯など、臨床的に多くの有効症例が報告されている。従って、食物アレルギーの治療に対しても漢方薬の有用性が推察される。

申請者はこれまで食物アレルギーに対する治療法の開発を目指し、抗原摂取により消化器症状を呈するマウス食物アレルギー病態モデルを作製して漢方薬の有効性の検討を行い、漢方薬の葛根湯が食物アレルギーの発症を抑制することを明らかにしている[2]。さらに、その作用機序の検討を行い、多成分系の複合薬物である葛根湯の複数の有効成分による複数の作用機序として、結腸粘膜での制御性 T 細胞の誘導[3]、粘膜型マスト細胞の増多の抑制[2]、粘膜型マスト細胞の脱顆粒の抑制[2,4-6]などの薬理作用を示すことを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ治療方法が確立されていない食物アレルギーの治療法を確立するために、申請者がこれまでにマウス食物アレルギー病態モデルを用いた研究により、制御性 T 細胞誘導などの複数の機序を介し、食物アレルギーの発症を予防的に抑制することを明らかにしている漢方薬の葛根湯を併用し、食物アレルギーを根本的に治療する可能性がある治療法として考えられる経口免疫療法の治療効率や副作用の発症の問題を改善し、安全で治療効果の高い治療法の確立に繋げることを目的とした。そこで、臨床で行われている経口免疫療法を食物アレルギー病態モデルに行う経口免疫療法モデルを確立し、葛根湯の併用が経口免疫療法による食物アレルギーの治療をより安全かつ効率的に行うことが出来るのか検討すると共に、その治療機序の詳細を検討した。

3. 研究の方法

BALB/c マウスに卵白アルブミン(OVA)を水酸化アルミニウムゲルと混和し全身感作を行い、その後、粗精製 OVA 溶液の経口投与を繰り返し、アレルギー性消化器症状(下痢)を誘発させた(図1)。この食物アレルギー病態モデルマウスに対して、食物アレルギー治療のために、OVA 投与による経口負荷試験を行い、症状確認後に実験的 OIT として、現在臨床で行われている OIT と同様に、食物抗原である OVA を加熱処理し、0.5 mg から、1 mg、2 mg、4 mg、8 mg、12 mg、18 mg、20 mg (/日)と段階的に投与量を増やしながらかつ 8 日間投与した。OIT 後に再び経口負荷試験として OVA を投与し、OIT による治療効果を検討した。

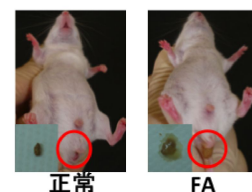


図1. 食物アレルギー病態モデル

OIT や OIT と葛根湯の併用療法の治療効果の評価後に、機序の検討として食物アレルギーの発症に関与することが示唆されている腸管粘膜免疫系についての効果を検討するため、結腸での制御性 T 細胞の誘導やマスト細胞への影響等の検討を行なった。

4. 研究成果

消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスに対し、加熱 OVA 投与による OIT は、OVA 経口負荷試験による消化器症状の発症率を未治療群(FA 群)と比較して有意に低下させ、食物アレルギーに対する治療効果を示した。OIT と葛根湯の併用療法(OIT+kakkonto 群)により、症状発症率はさらに低下し、OIT のみよりもさらに強力な治療効果を示した(図2)。従って、葛根湯の併用は有効であり、OIT と葛根湯の併用療法は食物アレルギーの治

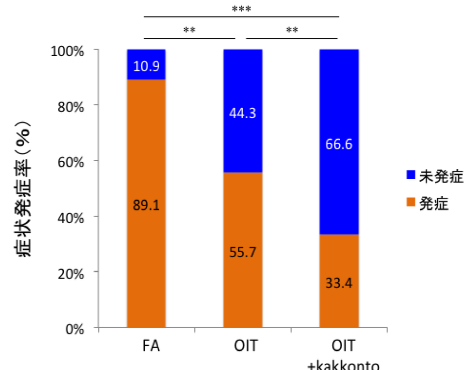


図2. 各治療後の症状発症率

療効率が高いことを明らかにした。しかし、葛根湯のみの投与では治療効果が見られなかったことから、葛根湯は OIT による治療効果を上げることを明らかにした。

OIT および OIT と葛根湯の併用療法の治療機序の検討として、腸管粘膜免疫系に対する効果を明らかにするため、近位結腸における Th2 型サイトカイン IL-4 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。Normal 群と比較して有意に高い FA 群の IL-4 mRNA 発現量は、OIT 群で低く、OIT+kakkonto 群ではさらに低くなることを明らかにした(図3)。また、近位結腸から抽出した RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析によっても、リアルタイム PCR の結果と同様に、Th2 型応答関連遺伝子群の発現量は FA 群では高く、OIT 群では低く、OIT+kakkonto 群ではさらに低いことを明らかにした[4]。従って、OIT および OIT と葛根湯の併用療法により、結腸において過剰に亢進した Th2 型応答が抑制されることを明らかにした。

申請者らはこれまでに、粘膜型マスト細胞がアレルギー性消化器症状の発症に関与することを明らかにしている[2,6]。そこで次に、粘膜型マスト細胞に対する効果について検討を行った。粘膜型マスト細胞に特異的に発現するマウスマスト細胞プロテアーゼ 1 (mMCP-1) の血漿中濃度を ELISA により測定し、粘膜型マスト細胞の脱顆粒について評価した。OIT+kakkonto 群において、FA 群と OIT 群に対し血漿中 mMCP-1 濃度の有意な低下が認められた(図4)。また、近位結腸の RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析によっても、マスト細胞の脱顆粒関連遺伝子群の発現量が FA 群では高く、OIT 群で低く、OIT+kakkonto 群ではさらに低くなることを明らかにした[7]。しかし、mMCP-1 抗体を用いた免疫組織化学的検討により、結腸の粘膜型マスト細胞の細胞数は減少していないことを明らかにした。従って、OIT と葛根湯の併用療法により、粘膜型マスト細胞の脱顆粒が抑制されることが示唆された。

制御性 T 細胞が免疫寛容の確立に重要な役割を担っていることや、経口免疫療法の機序のひとつとして考えられていること、また申請者らは葛根湯による食物アレルギー発症予防効果の機序のひとつとして制御性 T 細胞の増加を明らかにしている[3]ことから、OIT と葛根湯の併用療法による治療機序への Foxp3+制御性 T 細胞の関与を検討するため、Foxp3+制御性 T 細胞の分布の割合をフローサイトメーターにより測定した。結腸の粘膜固有層の細胞における Foxp3+制御性 T 細胞の割合は FA 群に比較して OIT 群で有意に増加し、OIT+kakkonto 群でさらに有意に増加した(図5)。一方、腸間膜リンパ節の単離細胞および末梢血リンパ球中では、Foxp3+制御性 T 細胞の割合に有意な変化はなかった。したがって、食物アレルギーの治療に対して結腸の Foxp3+制御性 T 細胞が重要な役割を担い、OIT や OIT と葛根湯の併用療法により Foxp3+制御性 T 細胞が増加することにより治療効果が誘導されたことが示唆された。また、OIT と葛根湯の併用療法では Foxp3+制御性 T 細胞がさらに誘導され、この高い誘導率が高い治療効果に繋がることを示唆された。これまでに、制御性 T 細胞が Th2 免疫応答を抑制することやマスト細胞の脱顆粒を抑制することが報告されていることから、この結腸での Foxp3+制御性 T 細胞の誘導が重要な機序のひとつであり、制御性 T 細胞の作用によって結腸の Th2 型応答の抑制や粘膜型マスト細胞の脱顆粒の抑制が誘導されたと推測された。

さらに、Foxp3+制御性 T 細胞の誘導には TGFβ やレチノイン酸が関与することが報告されている。しかし、本病態モデルでは、近位結腸の RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析により TGFβ の変化は検出されなかった。一方、レチノイン酸に関しては、OIT+kakkonto 群で、複数のレチノイン酸の代謝関連酵素がレチノイン酸量を増加させる方向に制御されることを明らかにした。したがって、OIT と葛根湯の併用療法による Foxp3+制御性 T 細胞の増加機序には、レチノイン酸量の増加が関与することが示唆された。

以上の研究成果から、葛根湯の OIT への併用が制御性 T 細胞誘導亢進等の機序を介し OIT による食物アレルギーの治療効率を増加させることを明らかにし、この併用療法が食物アレルギーの治療法の確立に繋がる可能性を示した。

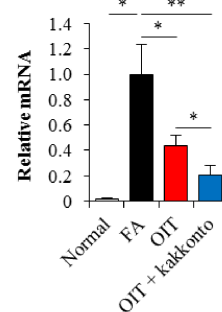


図3 近位結腸のIL-4 mRNA発現変化

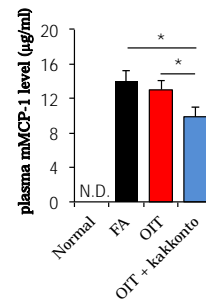


図4 血漿中mMCP-1量の変化

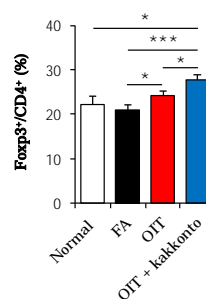


図5 結腸制御性T細胞の割合

<引用文献>

- 厚労省研究班報告 食物アレルギーの手引き 2017
- Yamamoto T et al.: Int Arch Allergy Immunol. 148: 175-185.2009
- Yamamoto T et al.: Int Arch Allergy Immunol.;169:146-56. 2016
- Kageyama-Yahara N et al.: Biochem Biophys Res Commun.416:283-8.2011
- Kageyama-Yahara N et al.: FEBS Lett. 584:111-118. 2010
- Yamamoto T et al.: Clin Dev Immunol. 2012:721085. 2012

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Nagata Y, Yamamoto T, Hayashi M, Hayashi S, Kadowaki M.: Improvement of Therapeutic Efficacy of Oral Immunotherapy in Combination with Regulatory T Cell-Inducer Kakkonto in a Murine Food Allergy Model. PLoS One. 2017 Jan 20;12(1):e0170577. doi: 10.1371/journal.pone.0170577. eCollection 2017.

[学会発表](計 14 件)

山本 武.: 制御性 T 細胞誘導薬を経口免疫療法に併用した食物アレルギーの新たな治療法の開発. 若手シンポジウム, 日本薬学会北陸支部 第 130 回例会, 2018, 11, 18, 富山.

Yamamoto T.: Therapeutic effect and preventive effect of kakkonto on food allergy. 2018 CAP Sikchi symposium, The Relationship between Medicinal Food and Nutrition in Health Care, 2018, 9, 6-7, Jeju, Korea.

山本 武, 長田 夕佳, 門脇 真.: 葛根湯併用経口免疫療法による食物アレルギー治療の寛解維持効果についてモデルマウスを用いた検討. 第 35 回 和漢医薬学会学術大会, 2018, 9, 1-2, 岐阜.

山本 武.: 葛根湯の制御性 T 細胞誘導作用を活用した食物アレルギーの新規治療法の開発研究. 学術貢献賞受賞講演, 第 35 回 和漢医薬学会学術大会, 2018, 9, 1-2, 岐阜.

長田 夕佳, 山本 武, 門脇 真.: 経口免疫療法モデルマウスを用いた 葛根湯併用療法の寛解維持効果の検討. 第 67 回日本アレルギー学会学術大会, 2018, 6, 22-24, 千葉.

山本 武.: マウス食物アレルギー病態モデルを用いて新たに見出した葛根湯併用経口免疫療法の根本的治療法としての提案. シンポジウム, 第 65 回日本実験動物学会, 2018, 5, 16-18, 富山

Nagata Y, Yamamoto T., Kadowaki M.: Long-Term Effect of Combined Therapy of Oral Immunotherapy and Japanese Traditional Medicine Kakkonto on Food Allergy Mice. American Academy of Allergy Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, 2018, 03, 02-05, Orlando.

山本 武, 長田 夕佳, 林 美智慧, 苟 巧, 門脇 真.: 経口免疫療法と葛根湯の併用療法による食物アレルギーの治療効果増加の機序の検討. 第 34 回和漢医薬学会学術大会, 2017, 8, 26-27, 福岡.

山本 武.: 『食物アレルギーの治療法の確立への葛根湯の応用』 - 葛根湯による腸管粘膜免疫系の制御作用を介した効果 -. 天然薬物研究方法論アカデミー 第 20 回研究集会. 2017, 8, 5, 東京.

Yamamoto T., Nagata Y., Hayashi M., Kadowaki M.: Intestinal Regulatory T Cells Induced by Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, Improve Therapeutic Efficacy of Oral Immunotherapy in Food Allergy Model Mice. 18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2017), 2017, 7, 19-22, Washington DC.

長田 夕佳, 山本 武, 門脇 真.: 食物アレルギー病態モデルに対する葛根湯と経口免疫療法の併用療法によるレチノイン酸代謝酵素抑制を介した制御性 T 細胞の誘導. 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 2017, 6, 16-18, 東京.

長田 夕佳, 山本 武, 林 美智慧, 門脇 真.: 腸管制御性 T 細胞誘導能を持つ葛根湯と経口免疫療法の併用療法は食物アレルギー病態モデルでの治療効果を亢進させる. 日本薬学会 北陸支部 第 128 回例会, 2016, 11, 27, 金沢.

山本 武, 長田 夕佳, 林 美智慧, 門脇 真.: 経口免疫療法による食物アレルギーの治療における葛根湯の併用効果のモデルマウスを用いた検討. 第 33 回和漢医薬学会学術大会, 2016, 8, 27-28, 東京.

長田 夕佳, 山本 武, 門脇 真.: 葛根湯と経口免疫療法の併用療法モデルによるレチノイ

ン酸代謝酵素抑制を介した制御性 T 細胞の誘導. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会,
2016, 6, 17-19, 東京.

6 . 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 靖典

ローマ字氏名：Ito Yasunori

研究協力者氏名：長田 夕佳

ローマ字氏名：Nagata Yuka

研究者番号(8 桁): 80802016

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。