

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07908

研究課題名（和文）漢方薬併用経口免疫療法による食物抗原耐性獲得の検討と治療評価血液マーカーの探索

研究課題名（英文）Induction of tolerance by concomitant use of kakkonto with oral immunotherapy and exploration of candidate blood marker that enable evaluation of the effects of treatments for food allergy

研究代表者

山本 武（Yamamoto, Takeshi）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：70316181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：病態モデルを用いた食物アレルギーの治療の検討により、経口免疫療法に葛根湯を併用することが、脱感作率と耐性獲得率を向上することを明らかにした。さらに、その機序として、腸管への制御性T細胞の誘導や腸管粘膜型マスト細胞の活性抑制が関与することを明らかにした。また、葛根湯に関連した複数の成分の有効性を明らかにした。これらの結果により、食物アレルギーの治療において、経口免疫療法に葛根湯などの漢方薬を併用することの有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだ治療法が確立していない食物アレルギーに対して、臨床に則した病態モデルを用いて治療効果の検討を行い、臨床研究では利用できない腸管を用いた腸管粘膜免疫系での脱感作誘導や耐性獲得の治療機序の検討を行い、葛根湯併用による耐性獲得率向上とその機序を明らかにした。また、メタボローム解析により治療効果を示す血液バイオマーカーの探索も行った。漢方薬は既に臨床現場で使われているため、漢方薬リポジショニングとして臨床に応用し易く、独自性のある新規治療法として実現できる可能性が高く、既存の経口免疫寛容の主な問題点の改善につながる食物アレルギーの治療として社会的ニーズに答えた波及効果の高い研究になったと考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated the treatment of food allergy using an oral immunotherapy model and a sustained unresponsiveness model, and clarified that the concomitant use of kakkonto with oral immunotherapy increased the rate of desensitization and the rate of remission maintenance. Furthermore, we clarified that the induction of regulatory T cells and the suppression of mucosal mast cell activity are committed to the mechanisms underlying the treatment of food allergy. We also identified several active components associated with kakkonto. Therefore, these findings indicated that the effectiveness of oral immunotherapy in combination with Kampo medicine such as kakkonto.

研究分野：薬理学、免疫学

キーワード：食物アレルギー 経口免疫療法 腸管粘膜免疫系 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の患者数は先進国を中心に急速に増加しており、日本でも国民の2人に1人が何らかのアレルギー症状を有していると報告されている。しかし、未だ世界的にアレルギー疾患の根本的治癒に結びつく有効な治療法は確立していない。食物アレルギーも未だ治療法が確立しておらず、誤食による死亡事故の発生や基本的な治療法である除去食療法でのQOLの低下などから対応が急務とされている。経口免疫療法(OIT)は食物アレルギーを根本的に治癒する治療法として期待されているが、治療効率(食物抗原に対する脱感作誘導や耐性獲得に至る効率)が十分には高くなく、また重篤な副作用が誘発されることなどの問題があり一般診療として認可されていない。また、食物アレルギーの発症やOITによる治療機序に腸管粘膜免疫系が関与すると考えられているが、詳細は不明なままである。さらに、腸管において腸管粘膜免疫系と腸管神経系と腸管内分泌系は相互に複雑に制御し合うため、食物アレルギーの治療機序のみならず、発症機序及び病態形成に対する腸管粘膜免疫系や腸管神経系、腸管内分泌系の詳細な役割も十分には明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、食物アレルギーの治療の検討を行い、マウスOITモデルを確立し葛根湯の併用が脱感作誘導率を有意に上げることを明らかにし、この基礎研究の成果を基に葛根湯併用OITの共同臨床研究を実施している。しかし、基礎研究での葛根湯併用OITでも脱感作誘導率はまだ十分には高くなく、また最終的な耐性獲得の誘導まで検討するに至っていない。

そこで、葛根湯併用OITによる詳細な治療機序の検討、及び、OITモデルを応用した耐性獲得モデルを新たに確立して、葛根湯併用OITの耐性獲得への効果を検討することを目的とした。さらに、より効率よく脱感作、さらに耐性獲得を誘導する食物アレルギーの治療に最適化した葛根湯など漢方薬を併用した治療プロトコルを検討するため各生薬や漢方薬含有成分での検討も行い、食物アレルギーの根本的な治療法の確立に繋げることを目的とした。また、病態モデルの血液分析から臨床応用可能な耐性獲得の誘導を評価する新たな血液バイオマーカーを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OITモデルでの脱感作誘導機序の解明と治療効率向上の検討。葛根湯併用OITの詳細な治療機序を明らかにするために、食物アレルギーモデルやOITモデルに対して葛根湯の構成生薬や含有成分を併用し発症抑制率、脱感作誘導率、耐性獲得率を評価するとともに、その治療機序として、制御性T細胞の誘導を含めて腸管粘膜免疫系に対する効果及び腸管神経系に対する効果を検討した。

(2) 耐性獲得モデルの確立と葛根湯等薬物併用による耐性獲得の検討。OITモデルに対し、OIT終了後に続けて一定量の加熱処理抗原を数週間連続投与した。その後、数週間の抗原未摂取期間を設けた後、抗原投与を行い症状発症の有無により耐性獲得を評価する耐性獲得モデルを確立した。この耐性獲得モデルに対して、OIT時に加えて抗原連続投与時や抗原未摂取時に、有効性が示唆された葛根湯やその構成生薬や含有成分を併用し、耐性獲得誘導の効率を上げる検討を行った。

(3) 血液中バイオマーカーの探索。血液中成分に脱感作や耐性獲得の誘導の指標となるバイオマーカーが検出可能であれば、患者の血液のみでも治療状態の評価が可能になる。そこで、耐性獲得した病態モデルの各治療時期に血液を採取し、血中成分のメタボローム解析を行い、脱感作や耐性獲得の誘導の評価に有効なバイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

(1) 脱感作誘導機序の解明と治療効率向上の検討ため、食物アレルギーモデルや OIT モデルに対して葛根湯構成生薬や含有成分による治療効果・機序の検討を行い、葛根の主成分であるプエラリンが腸管粘膜にレチノイン酸産生を誘導し、腸管に寛容性樹状細胞や制御性 T 細胞の誘導し、食物アレルギーの発症を抑制することを明らかにした(Biochem Biophys Res Commun.2019)。また、イソフラボンが Cyp26b1 の発現を抑制することによってレチノイン酸産分解を抑制することにより、食物アレルギーの発症を抑制することも明らかにした(Biol Pharm Bull.2020)。さらに、生姜がヒト腸管上皮細胞培養株 (Caco2 細胞) において、レチノイン酸合成酵素 ALDH1A1 を増加させることを明らかにした(J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).2020)。

以上のことから、葛根湯の複数の成分が腸管におけるレチノイン酸代謝を制御することによって治療に有効性を示したことが示唆された。

また、食物アレルギーの発症及び発症抑制について、腸管の粘膜型マスト細胞が関与すること (BIOCELL.2021) や、腸管に浸潤増多した粘膜型マスト細胞は腸管神経繊維が近接し、粘膜型マスト細胞の機能制御に腸管神経系が関与することを明らかにした(Cells. 2021, Allergology Int. 2022)。

(2) 耐性獲得モデルの確立と葛根湯等薬物併用による耐性獲得の検討として、葛根湯と経口免疫療法により誘導された治療効果の長期維持(寛解維持)について病態モデルを作製して検討を行った。経口免疫療法を行なった群では、経口免疫療法による治療終了後の食物抗原(OVA)除去後の OVA 経口負荷試験において、OVA 除去期間の延長に伴い発症率が次第に上昇し、3 週間後にはほぼ全てのマウスで再び症状を発症した。一方、葛根湯併用療法を行なった群では、治療後の症状発症率は OVA 除去期間の延長に伴いわずかに増加したものの、3 週間でも治療効果は維持された。したがって、葛根湯併用療法によって寛解維持が誘導されることが示唆された。さらに、寛解維持率を上昇させるため、OVA 除去期間に葛根湯や OVA の投与による効果を検討した。その結果、経口免疫療法で用いるよりも極少量の OVA と葛根湯を投与し続けることにより、葛根湯併用療法により誘導された脱感作が 3 週間後にも維持(寛解維持)されることを明らかにした。さらに、この機序として粘膜型マスト細胞の活性抑制が関与することを明らかにした。

したがって、葛根湯併用は、脱感作を誘導するだけでなく耐性獲得にも有効であり、さらに長期投与することにより耐性獲得の効率が上がることが示唆された。

(3) 血液中バイオマーカーの探索として、病態モデル及び耐性獲得した病態モデルの各治療時期に血液を採取し、血中成分のメタボローム解析を行い、脱感作や耐性獲得の誘導の評価に有効なバイオマーカーの探索を行った。その結果、経口免疫療法や葛根湯の併用によって脂質メディエーターを中心とした炎症関連の代謝物や水溶性一次代謝物の変動が観察された。これらの代謝物について GCMS で検出された水溶性一時代謝物、LCMS で検出された脂質メディエーターを説明変数とした判別分析(OPLS-DA)を実施し、各処置が血漿中代謝物に与えた影響について評価した。OPLS-DA スコアプロットにおける検体の分布から、葛根湯は代謝物の種類によって経口免

疫療法による変化を強める方向と弱める方向に作用していることが明らかとなった。これらの血漿中代謝物の変化がどの組織の代謝変動に由来するものなのかを確認するために血漿に加えて消化管や肝臓、脾臓等の組織についてもメタボローム分析を実施した。その結果、食物アレルギーモデルに置いては腸管の炎症性メディエーターが全体的に上昇していることが明らかとなった。

さらに、詳細なデータ解析を継続し、有効な血液中バイオマーカーの探索を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 YAMAMOTO Takeshi、KATSUKI Yosuke、KANAUCHI Yuya、HAYASHI Shusaku、KADOWAKI Makoto	4. 巻 44
2. 論文標題 Allergic inflammation disrupts epithelial electrogenic electrolyte transport through cholinergic regulation in the mouse colon	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 31～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.44.31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kadowaki Makoto、Yamamoto Takeshi、Hayashi Shusaku	4. 巻 71
2. 論文標題 Neuro-immune crosstalk and food allergy: Focus on enteric neurons and mucosal mast cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 278～287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2022.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanauchi Yuya、Yamamoto Takeshi、Yoshida Minako、Zhang Yue、Lee Jaemin、Hayashi Shusaku、Kadowaki Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates murine experimental Th2-type colitis by suppressing the migration of plasmacytoid dendritic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04154-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Yue、Yamamoto Takeshi、Hayashi Shusaku、Kadowaki Makoto	4. 巻 141
2. 論文標題 Suppression of plasmacytoid dendritic cell migration to colonic isolated lymphoid follicles abrogates the development of colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111881～111881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.111881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yashiro Tomoe, Ogata Hanako, Zaidi Syed Faisal, Lee Jaemin, Hayashi Shusaku, Yamamoto Takeshi, Kadowaki Makoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathophysiological Roles of Neuro-Immune Interactions between Enteric Neurons and Mucosal Mast Cells in the Gut of Food Allergy Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1586 ~ 1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10071586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 WANG XIAOYU, YAMAMOTO TAKESHI, KADOWAKI MAKOTO, YANG YIFU	4. 巻 45
2. 論文標題 Identification of key pathways and gene expression in the activation of mast cells via calcium flux using bioinformatics analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 395 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/biocell.2021.012280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Nagata Y, Hayashi S, Kadowaki M.	4. 巻 43
2. 論文標題 Isoflavones Suppress Cyp26b1 Expression in the Murine Colonic Lamina Propria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1945-1949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00355.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagata Y, Yamamoto T, Kadowaki M.	4. 巻 66
2. 論文標題 Ginger Increases ALDH1A1 Expression and Enhances Retinoic Acid Signaling in a Human Colonic Epithelial Cell Line.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 462-467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3177/jnsv.66.462.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Zhang Y, Kigasawa A, Hayashi S, Kadowaki M.	4. 巻 2020
2. 論文標題 Therapeutic Benefit in Allergic Dermatitis Derived from the Inhibitory Effect of Byakkokaninjinto on the Migration of Plasmacytoid Dendritic Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evid Based Complement Alternat Med.	6. 最初と最後の頁 9532475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/9532475.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Takeshi, Matsunami Emi, Komori Koji, Hayashi Shusaku, Kadowaki Makoto	4. 巻 516
2. 論文標題 The isoflavone puerarin induces Foxp3+ regulatory T cells by augmenting retinoic acid production, thereby inducing mucosal immune tolerance in a murine food allergy model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 626 ~ 631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山本 武, 後藤由佳, 門脇 真.
2. 発表標題 葛根湯併用経口免疫療法による食物アレルギー治療の粘膜型マスト細胞脱顆粒抑制作用とその機序の検討.
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 武, 後藤由佳, 門脇 真.
2. 発表標題 食物アレルギー病態マウスを用いた長期葛根湯併用による経口免疫療法の寛解維持効果向上の検討.
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kato T., Ito Y., Yamamoto T., Shimizu M., Itazawa T., Adachi Y., Kadowaki M., Adachi Y.
2. 発表標題 An evaluation of the effects of Kakkonto in combination with dietary advice in children with food allergies through a non-randomized controlled trial.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 武, 宋 夢テイ, 後藤由佳, 門脇 真.
2. 発表標題 葛根湯併用経口免疫療法による食物アレルギー疾患の寛解維持誘導について病態マウスを用いた検討.
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 武, 宋 夢テイ, 後藤由佳, 門脇 真.
2. 発表標題 食物アレルギー病態マウスを用いた葛根湯と経口免疫療法の併用療法による寛解維持効果の検討.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (第69回日本アレルギー学会学術大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 武, 林美智慧, 長田夕佳, 門脇 真
2. 発表標題 葛根湯と経口免疫療法の併用療法による粘膜型マスト細胞の活性化抑制を介した脱感作誘導率の向上
3. 学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto T., Gou Q., Kadowaki M.
2. 発表標題 AhR agonist combined with oral immunotherapy can alleviate food allergy by induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the colon of food allergy model mice.
3. 学会等名 19th International Congress of Mucosal Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Song M., Yamamoto T., Nagata Y., Kadowaki M.
2. 発表標題 Induction of desensitization by combined therapy with oral immunotherapy and kakkonto in food allergy.
3. 学会等名 第36回 和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	Shanghai University of TCM		