

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：13201  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590760  
 研究課題名（和文）  
 腸管免疫系でのヘルパーT細胞分化制御を介した葛根湯の末梢性免疫寛容誘導作用の検討  
 研究課題名（英文）  
 Immunological tolerance induced by Kampo medicine kakkonto through the regulation of helper T cell differentiation in the mucosal immune system of the intestine.  
 研究代表者  
 門脇 真（KADOWAKI MAKOTO）  
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授  
 研究者番号：20305709

研究成果の概要（和文）：  
 食物アレルギー病態モデルでの葛根湯の腸管粘膜免疫系の抑制による治療効果の作用機構を検討した。その結果、葛根湯は、腸管粘膜免疫系での免疫応答において、ナイーブ・ヘルパーT細胞から CD25 ネガティブな CD3+CD4+FR4+Foxp3+制御性 T 細胞への分化・増殖を亢進させることにより、食物アレルギー病態モデルでのアレルギー性症状を抑制したと考えられた。しかしながら、葛根湯による制御性 T 細胞分化誘導機序の解明にはさらなる詳細な検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：  
 The mechanisms underlying the pharmacological effects of kakkonto in murine food allergy model were examined. As a result, kakkonto facilitated the differentiation from naive helper T cells to CD25 negative CD3+CD4+FR4+Foxp3+ T cells in the immunological responses within the mucosal immune system of the intestine and thereby alleviated the allergic responses. However, the further detailed investigation of the underlying mechanisms is needed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学、腸管粘膜免疫系

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

①腸管粘膜免疫機構(GMIS)：近年、全身の免疫機構とは異なる粘膜免疫機構の存在が明らかとなり、その詳細な解明が精力的に進められ、GMIS でのホメオスタシスの破綻が食

物アレルギー疾患(FA)の成因に深く関与していると考えられるようになった。しかし、FAの成因には未だ不明な点が多く、分子、細胞、組織、個体の各レベルでの基礎研究の進展が期待され、GMIS を巧みに応用した成因に基づく治療薬の開発が強く求められている。新規治療薬の開発には、ヒトの病態に類似した

病態モデル動物を用いた薬理評価が不可欠であるが、驚くべきことに2000年に清野ら(J Clin Invest, 2000)が報告するまで、アレルギー性症状を呈する有用なFAモデルはなかった。

②漢方薬を用いた前臨床・臨床研究：複数の薬理作用を持つ多成分系の複合薬物である漢方薬は、生体のホメオスタシスの維持やバランスに重きを置く薬物治療体系であり、生体の重要な制御システムである免疫系は、必然的に漢方薬治療の主要な標的となっている。漢方薬には、免疫系を賦活することにより低下した生体防御機能を高める作用を持つものや、アレルギーや自己免疫性疾患などに対しては免疫系を抑制する作用を持つものが数多くあり、症状の改善や発症の抑制が報告されている。しかし、FAに対する漢方薬の前臨床及び臨床研究は未だ報告されていない。

## (2) これまでの研究成果

①FA病態モデル：我々は既にBALB/cマウスを用いて清野らのモデルを改良し、抗アレルギー薬(マスト細胞メディエーター遊離抑制剤、ヒスタミン受容体1拮抗薬など)に抵抗性のFAモデルを確立している(Int Arch Allergy Immunol, 2008)。FAマウスは、アレルギー性下痢症状を呈し、腸管の浮腫・炎症、特異的IgE抗体の上昇、腸管の粘膜型マスト細胞の劇的な増多が観察された。また、FAは腸管神経が関与する腸管運動の異常(Biomedical Res, 2008; Neurosci Lett, 2008)や腸管での水分バランスの異常(Life Sci, 2007)などが複雑に絡む病態であることも報告している。

②漢方薬治療の合理性：免疫系、神経系及び内分泌系により精妙に調節されている消化管の疾患は、病因や病態が多岐に渡るため、単一の薬理作用を持つ薬剤を用いた治療法では治療効果に限界がある場合も多い。従って、消化管は漢方薬治療が比較的多く取り入れられている領域である。

③葛根湯の治療効果：皮膚炎モデルや喘息モデル等の他のアレルギーモデルで有効な漢方薬(補中益気湯、小青竜湯、十全大補湯など)は、いずれもFAモデルでは治療効果を示さなかった。一方、葛根湯はFAモデルでの発症を抑制し、腸管の炎症や粘膜型マスト細胞数などを有意に抑制した(Int Arch Allergy Immunol, 2008)。葛根湯はFAモデルで、ヘルパーT細胞2型(Th2)系へ傾いた全身免疫系(脾臓)でのTh1/Th2バランスに対しては殆んど作用しなかったにもかかわらず、Th1及びTh2系が過剰亢進したGMIS(結腸)を抑制して治療効果を発揮した。すなわち、葛根湯はFAモデルのGMISでの免疫バランスの破綻を改善した。

⑤トランスクリプトーム解析：複数の疾患関連遺伝子が複雑に関与するアレルギー疾患の病態解析には、疾患候補遺伝子のみの解析

だけでは限界がある。また、漢方薬は複合薬物であり、多数の作用機序が考えられる。そこで、「複雑系である腸管免疫性疾患に対する漢方薬」の作用を解明しシステムとしてFA疾患や漢方薬の作用機序を理解するため、トランスクリプトーム解析(網羅的全遺伝子発現解析)を応用した。FAモデルのGMISで約40,000遺伝子を検討した結果、64個の遺伝子の発現量がFAモデルで7倍以上に増加し、葛根湯により抑制されることを見出した。特に、アレルギー疾患には関与するが、FAでは全く報告のないサイトカイン・シグナル抑制因子SOCS3が、FAの発症や葛根湯の作用に関与していることを明らかにした(Int Arch Allergy Immunol, 2008)。

⑥①培養粘膜型マスト細胞：我々は、腸管マスト細胞だけが特異的に欠損するPI3-キナーゼ欠損マウス(Nature Immunol, 2002)を用いるとFAが発症しないことより、腸管マスト細胞がFAの発症に必須であることを示した(米国消化器病学会, 2006)。FAでは、マスト細胞の2つのサブタイプのうち、結合組織型(cMC)ではなく粘膜型(mMC)がより重要な病態生理学的役割を持っているため、cMCにのみ作用する薬剤である現在の抗アレルギー薬はいずれもFAには効果を発揮できない。そこで、葛根湯のmMCへの直接的作用を検討するため、BALB/cマウスの骨髄細胞にIL-3、SCF、IL-9、TGF- $\beta$ 1を添加して培養することにより、粘膜型骨髄細胞由来マスト細胞(mBMMC)に分化誘導した。抗アレルギー薬はmBMMCに対し全く作用を示さなかったが、葛根湯及びその構成生薬である芍薬、桂皮はmBMMCの活性化を抑制した。さらに、フローサイトメトリーを用いて、葛根湯及び芍薬が細胞表面の高親和性IgE抗体受容体(Fc $\epsilon$ RI)の発現量を減少させることを見出した。Fc $\epsilon$ RIの発現抑制作用はこれまでの抗アレルギー薬には全くない新規メカニズムであり、芍薬をベースとした薬剤がイノベーティブな治療薬となりうる可能性がある。

## (3) 着想に至った経緯・今後の発展

これまでの研究から、①FAの発症・病態形成には、全身免疫系よりもGMISが重要である、②葛根湯はFAモデルでmMCの増多を抑制した、③FAモデルで上昇したmMCの活性化のマーカーとなる血中のマスト細胞プロテアーゼ1濃度は葛根湯により抑制された、④葛根湯はFAモデルのGMISにおいてTh1・Th2系の過剰亢進状態を共に抑制した、⑤免疫応答システムのバランス制御に関与するSOCS3の発現がFAモデルの腸管で上昇し、葛根湯で抑制された(トランスクリプトーム解析より)、⑥葛根湯がFAモデルで亢進した活性化T細胞に発現するCTLA-4、抗原提示細胞であるDCに強発現するepiregulin及びマスト細胞に発現し腸管リモデリングに関与

する amphiregulin を抑制した（トランスクリプトーム解析より）こと等が明らかとなった。従って葛根湯の作用機序は、(a) MC プロジェニターから mMC への分化・増殖の抑制、(b) MC プロジェニターの腸管への遊走の抑制、(c) mMC の活性化の抑制、(d) ナイーブ T 細胞から Th1 及び Th2 細胞への分化の制御、(e) DC 及び Th 細胞機能の抑制などが考えられる。この中で、①、④、⑤及び⑥から、(d) 及び(e)の「GMIS において、抗原提示細胞である DC からナイーブ CD4+Th 細胞への抗原提示、それに続く CD4+Th 細胞の分化という一連の免疫応答システムが異常亢進して免疫制御機構が破綻し FA が発症する。葛根湯は、GMIS において末梢性免疫寛容を誘導して免疫応答システムの過剰亢進状態を抑制し、制御機構を正常化させる」という作業仮説を立てることができると考える。その他、②及び③から考えられる(a)及び(b)は、葛根湯の直接作用ではなく、葛根湯による免疫応答システムの改善の結果であると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、新たな国民病ともなっているアレルギー性疾患の中で、食物アレルギーは様々なアレルギー性疾患が連続して発症する「アレルギーマーチ」の引き金となる疾患であるが、現在の抗アレルギー薬は食物アレルギーには有効ではなく、未だ有用な治療薬は開発されていない。これまで我々は、ヒトの病態に類似した「抗アレルギー薬が効果を示さない食物アレルギー病態モデル」を確立し、このモデルで葛根湯が有効であることを報告してきた(Int Arch Allergy Immunol, 2008)。

食物アレルギーの成因には、腸管粘膜免疫系の破綻が関与していると考えられている。従って、葛根湯の免疫薬理学的作用機序は、主に、腸管粘膜免疫系での粘膜型マスト細胞に対する抑制作用や腸管粘膜免疫系での免疫応答バランスの調節作用などが考えられる。

この中で、本研究は、葛根湯の末梢性免疫寛容誘導作用を介した免疫応答バランスの調節作用を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

BALB/c マウスに鶏卵蛋白を全身及び腸管局所感作することにより、食物アレルギー病態モデルマウスを作製し、腸管粘膜免疫系の検討を行った。

食物アレルギー病態モデルマウスの結腸全組織、粘膜固有層単核細胞(LPMC)及び LPMC から分離した各種免疫細胞より RNA を抽出し、サイトカイン等の発現量変化の検討、また、各種 CD 抗体を用いた免疫組織化学的検討及びフローサイトメーターにより

免疫細胞の検討を行った。

さらに、マウスの腸間膜リンパ節より樹状細胞を、脾臓より CD4+ T 細胞を分取した。分取した CD4+T 細胞は、増殖を評価するために CFSE による蛍光染色を行った。分取した樹状細胞と CD4+ T 細胞を 1:10 の割合で混合し、抗原として OVA ペプチドを添加し、葛根湯もしくは溶媒を添加した培地中で 3 日間培養を行った。CD4+ T 細胞の分化・増殖評価は、クラスター形成の観察および CFSE を指標とした FACS 測定により行った。

## 4. 研究成果

【結果】これまで報告したように、葛根湯は食物アレルギー病態モデルマウスの結腸において、亢進した結腸局所の腸管粘膜免疫系を抑制することによりアレルギー性症状を抑制した。この病態モデルマウスの結腸において CD4+細胞の増多が観察されたが、葛根湯投与による明らかな変化は見られなかった。また、LPMC での CD3+CD4+細胞数の解析によっても同様の結果が得られた。しかし、CD3+CD4+Foxp3+細胞（制御性 T 細胞）の割合は、葛根湯投与により病態モデルマウスに対して約 2 倍に増加し、CD3+CD4+CD69+細胞（活性化 T 細胞）の割合は、葛根湯投与により約 1/2 倍に減少した。さらに、LPMC から分取した CD4+細胞の遺伝子発現解析では、葛根湯投与により Foxp3 mRNA（制御性 T 細胞）の発現が増加し、CTLA-4 mRNA（活性化 T 細胞）の発現が減少した。従って、この腸管粘膜免疫系の抑制には、葛根湯によるナイーブ CD4+T 細胞の制御性 T 細胞への分化誘導を介したエフェクター T 細胞の活性化抑制機構が関与することが示唆された。

そこで、多くの制御性 T 細胞に発現する CD25 抗原に対する中和抗体を投与したところ、これまでと同程度にアレルギー性症状が観察された。しかも、抗 CD25 中和抗体を投与したにもかかわらず、葛根湯のアレルギー性症状抑制作用は影響を受けなかった。そこで、抗 CD25 中和抗体投与マウスで葛根湯による LPMC 中の CD3+CD4+FR4+Foxp3+細胞の変動を検討した。葛根湯投与群における抗 CD25 中和抗体投与による脾臓および腸間膜リンパ節での CD4+リンパ球中の CD25+細胞は減少したが、LPMC 中の CD3+CD4+FR4+Foxp3+細胞は増加していることが明らかになった。従って、葛根湯は本病態モデルにおいて結腸の CD25 ネガティブな CD3+CD4+FR4+Foxp3+制御性 T 細胞を増加させることにより、ヘルパー T 細胞の Th1 と Th2 への分化、さらに活性化を抑制することで治療効果を示すことが示唆された。

さらに、CD4+ T 細胞の分化・増殖の指標としてのクラスター形成は、OVA ペプチドの濃度依存的に増加し、葛根湯の濃度依存的に

減少した。CFSE で標識した CD4+T 細胞の FACS 解析でも、OVA ペプチドの濃度依存的に CD4+T 細胞が増殖し、葛根湯の濃度依存的に CD4+T 細胞の増殖は減少した。制御性 T 細胞の検討では、誘導条件として培地中に TGF-β、レチノイン酸、IL-2、anti IL-4、anti IFN-γ を添加したが、クラスター形成は葛根湯の濃度依存的に減少した。また、Foxp3 を指標として制御性 T 細胞を検討したが、葛根湯は濃度依存的に増殖した CD4+T 細胞での制御性 T 細胞の割合を減少させた。さらに、樹状細胞のみを培養し葛根湯が樹状細胞に与える影響を検討した。その結果、葛根湯は樹状細胞の生存率および樹状細胞膜表面抗原の CD11c、MHC classII、CD80、CD86 の発現に影響を与えなかった。従って、葛根湯は樹状細胞と T 細胞の in vivo 共培養系においても、CD4+T 細胞の分化・増殖を抑制した。このことから、葛根湯は in vivo で樹状細胞 - CD4+T 細胞系を制御し免疫抑制作用を示すことが示唆された。しかし、葛根湯は in vivo での制御性 T 細胞への誘導条件においても CD4+T 細胞分化・増殖を抑制した。in vivo 系により確認された葛根湯による T 細胞分化誘導効果にはさらなる詳細な機序解明が必要である。

【考察および結論】これまで報告したように、葛根湯は病態モデルマウスの結腸において、亢進した結腸局所の腸管粘膜免疫系を抑制することによりアレルギー性症状を抑制した。この腸管粘膜免疫系の抑制には、葛根湯によるナイーブ CD4+T 細胞の制御性 T 細胞 (CD3+CD4+Foxp3+細胞) への分化誘導を介したエフェクター T 細胞の活性化抑制機構が関与することが示唆された。しかし、抗 CD25 中和抗体を投与したにもかかわらず、葛根湯のアレルギー性症状抑制作用は阻害されず、LPMC 中の CD3+CD4+FR4+Foxp3+細胞は増加していることが明らかになった。従って、葛根湯は、本病態モデルにおいて結腸の CD25 ネガティブな CD3+CD4+FR4+Foxp3+制御性 T 細胞を増加させることにより、ヘルパー T 細胞の Th1 と Th2 への分化、さらに活性化を抑制することで治療効果を示すことが示唆された。さらに、葛根湯は樹状細胞と T 細胞の in vivo 共培養系においても、CD4+T 細胞の分化・増殖を抑制したが、制御性 T 細胞への分化・増殖も抑制した。

従って、葛根湯は腸管粘膜免疫系での免疫応答において、CD25 ネガティブな CD3+CD4+FR4+Foxp3+制御性 T 細胞への分化・増殖を亢進させることにより、食物アレルギー病態モデルでのアレルギー性症状を抑制したと考えられる。しかしながら、葛根湯による制御性 T 細胞分化誘導機序の解明にはさらなる詳細な検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Yamamoto T, Tsubota Y, Kodama T, Kageyama-Yahara N, Kadowaki M: Oral Tolerance Induced by Transfer of Food Antigens via Breast Milk of Allergic Mothers Prevents Offspring from Developing Allergic Symptoms in a Mouse Food Allergy Model.

Clinical and Developmental Immunology Volume 2012 (2012), Article ID 721085, doi:10.1155/2012/721085, 査読有り

② Kageyama-Yahara N., Suehiro Y., Yamamoto T., Kadowaki M.: Rab5a regulates surface expression of FcεRI and functional activation in mast cells.

Biological & Pharmaceutical Bulletin 34:760-763, 2011. 査読有り

③ Kageyama-Yahara N., Wang X., Katagiri T., Wang P., Yamamoto T., Tominaga M., Kadowaki M.: Suppression of phospholipase Cγ1 phosphorylation by cinnamaldehyde inhibits antigen-induced extracellular calcium influx and degranulation in mucosal mast cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications 416:283-288, 2011. 査読有り

④ Kageyama-Yahara N., Wang P., Wang X., Yamamoto T., Kadowaki M.: The inhibitory effect of ergosterol, a bioactive constituent of a traditional Japanese herbal medicine saireito on the activity of mucosal-type mast cells.

Biological & Pharmaceutical Bulletin 33:142-145, 2010. 査読有り

⑤ Kageyama-Yahara N., Suehiro Y., Maeda F., Kageyama S., Fukuoka J., Katagiri T., Yamamoto T., Kadowaki M.: Pentagalloylglucose down-regulates mast cell surface FcεRI expression in vitro and in vivo.

FEBS Letter. 584:111-118, 2010. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

国際学会 (計 2 件)

① Kadowaki M.: Traditional Chinese-Japanese medicine research in mucosal immunity.

East-West Scientific Symposia on Allergy & Traditional Oriental Medicine, 2010. 4.15-16, Luoyang, China

② Yamamoto T., Fujiwara K., Yoshida M., Kadowaki M.: Effect of kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, on the differentiation of CD4+ T cells in the colon of food allergy model mouse.

International Congress of Mucosal Immunology, 2009. 7. 5-9, Boston, U.S.A.

国内学会（計3件）

①山本武，原優加，門脇真：樹状細胞を介した葛根湯によるエフェクターT細胞の分化・増殖の抑制。

第28回和漢医薬学会学術大会，2011.8.27-28，富山。

②山本武，藤原加苗，坪田悠真，門脇真：食物アレルギー病態モデルにおける葛根湯の新規制御性T細胞を介した腸管粘膜免疫抑制作用。

第27回和漢医薬学会学術大会，2010.8.28-29，京都。

③山本武，藤原加苗，氣賀澤愛，吉田益奈子，門脇真：食物アレルギー性消化器症状誘発病態モデルにおける葛根湯による制御性T細胞への分化亢進を介する腸管粘膜免疫系の制御機構（プレナリーセッション講演）。

第26回和漢医薬学会学術大会，2009.8.29-30，千葉。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

門脇真 (KADOWAKI MAKOTO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授  
研究者番号：20305709

### (2)研究分担者

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