

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790616

研究課題名（和文） 葛根湯の腸管粘膜免疫系での樹状細胞を介したアレルギー性免疫応答制御作用の検討

研究課題名（英文） The effect of kakkonto in allergic immune response mediated by dendritic cells on intestinal mucosal immune system

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

研究成果の概要（和文）：

食物アレルギーの治療を目指し、アレルギー性消化器症状を発症する病態マウスを用いて漢方薬による効果を検討し、葛根湯が治療効果を示すことを見出した。また、葛根湯と構成生薬が類似した漢方薬や葛根湯の構成生薬の単一エキスや含有成分を用いて治療効果の検討を行い、葛根エキスと葛根に含まれるいくつかのイソフラボン類が治療効果を示すことを明らかにした。その治療効果には、腸管粘膜固有層でのCD4⁺foxp3⁺制御性T細胞の増加が関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, suppressed the occurrence of allergic symptoms in an FA mouse model. Furthermore, Puerariae radix extract and several isoflavones suppressed the occurrence of allergic symptoms in an FA mouse model. The proportion of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in lamina propria was significantly increased by kakkonto treatment and isoflavones treatment as compared with FA mouse model. Our data suggest that CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells induced by kakkonto and isoflavones had suppressive effects on intestinal mucosal immunity in FA mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学、葛根湯、腸管粘膜免疫、食物アレルギー、制御性 T 細胞、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、患者数の急増していることから新たな国民病とまでいわれているアレルギー性疾患の中でも、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。2008年に厚生労働科学省の研究班により疫

学的研究・調査がまとめられ、詳細な発症機序が未解明であり、特異的な治療方法・治療薬がないために、治療は最小限の原因食物の除去を原則とすることなどが報告されている。しかし、除去食は栄養的な面や精神的な面において問題があり、食物アレルギーに対する早急な対応が望まれている。

(2)一般的に、消化器疾患を含め、不定愁訴が多い疾病には漢方薬が有用な場合が多い。これまで消化管の不定愁訴は主に神経因性であると考えられてきた。しかし、ヘリコバクタ・ピロリ菌の除菌により上部不定愁訴が改善されるように、炎症や免疫系の異常は不定愁訴の病態形成に大きく関与する。従って、神経系、免疫系及び内分泌系という生体の制御システムのバランス調節作用を特徴とする漢方薬を、消化管の不定愁訴に対して適応することには、合理性があると考えられている。実際、食物アレルギーの治療においてもいくつかの漢方薬の使用が知られている(半夏瀉心湯、小柴胡湯、葛根湯、真武湯、五苓散、柴胡桂枝湯、桂枝加芍薬湯等)。しかし、これらの漢方薬の臨床応用は経験則によるものが多く、科学的検証は十分ではない。

(3)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ている。腸管粘膜免疫機構は、生体にとって必要な栄養素だけを吸収し、病原微生物や異種抗原などを排除するため局所における最前線の生体防御機構である。さらに生体存続のため腸管での腸内細菌叢の常在菌や食物抗原などに対しては、過敏で過剰な免疫応答を抑制する免疫寛容を引き起こす“非自己である異種抗原の排除と免疫寛容”を巧妙に操る高度に発達した免疫機構である。この粘膜免疫機構のホメオスタシスの破綻が食物アレルギー疾患の成因に深く関与していると考えられている。しかし、食物アレルギー疾患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、腸管粘膜免疫系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。

(4)樹状細胞は、T細胞の活性化や分化の制御を介して、抗原特異的免疫応答において中心的な役割を果たしている細胞であることが明らかになってきた。近年、特に腸管では、IgAの産生誘導やT細胞のホーミングの促進(Immunity 102:441-50.2004)などを介した免疫応答の惹起・増強や、制御性細胞として免疫寛容の誘導に関与していることが報告され(Mucosal Immunol. 2:340-50.2009)、感染症、自己免疫疾患、アレルギーなどに対する樹状細胞の制御を介した治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

(1)2000年にヒト類似の食物アレルギー性消化器症状を発症する病態モデルが報告される(J Clin Invest 106:199-206.2000)まで、食物アレルギーの有用な病態モデルはなく、治療薬の探索研究などは行われていなかった。そこで、このモデルを改良した病態モデ

ルを確立し、病因・病態解析を行い、食物アレルギー性消化器症状には腸管での水分吸収不全が関与し、症状発現に伴い水チャネルが減少していることを明らかにした(Life Sci. 81: 115-20.2007)。さらに、この食物アレルギー疾患についてのより詳細な発症機序・病態形成機序の検討、治療薬の探索とその薬理作用機序の検討を行っている。特に、各種漢方薬を用いた治療薬探索研究により、葛根湯が有効であることを明らかにした。また、作用機序の検討により、①食物アレルギーの発症・病態形成には、全身免疫系よりも腸管粘膜免疫系が重要であること、②葛根湯は食物アレルギーモデルの腸管粘膜免疫系においてTh1型及びTh2型の過剰亢進状態を共に抑制すること、③葛根湯は食物アレルギーモデルで腸管における粘膜型マスト細胞の増多を抑制すること、④葛根湯は免疫応答システムでのT細胞分化のバランスの制御に関与するSOCS3発現を抑制すること、⑤葛根湯は食物アレルギー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樹状細胞に強発現する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を抑制すること等を明らかにした。従って、葛根湯の食物アレルギーモデルでの作用機序には、ナイーブCD4⁺T細胞からTh1及びTh2細胞への分化及びT細胞の活性化の制御、さらにこの腸管粘膜免疫系の過剰亢進状態の改善に伴う粘膜型マスト細胞の遊走・活性化の抑制などが考えられた。また、ナイーブCD4⁺T細胞への抗原提示、及びそれに続くT細胞の分化・活性化という一連の免疫応答システムに対して重要な役割を果たしている樹状細胞に葛根湯が作用し、末梢性免疫寛容を誘導して過剰亢進した免疫応答を抑制し、腸管粘膜免疫機構での免疫バランスの破綻を修復すると考えられた。

そこで、本研究では葛根湯による樹状細胞の機能制御を介した腸管粘膜免疫制御作用を解明し、腸管免疫性疾患に対する葛根湯治療の科学的臨床的合理性を確立するとともに、葛根湯をリード方剤や創薬リソースとしたより有用な治療薬や新規方剤の開発に繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの病態に近い有用な病態モデルは、疾病の発症機序や病態形成機序を解明し、成因に基づく新しい治療薬を開発するために極めて重要である。そこで、ヒト類似の食物アレルギー性消化器症状を発症する病態モデルマウスを用いて検討する。BALB/cマウスを用い、水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとしてOVAの全身感作を2週間おきに2回行う。その2週間後から、OVAの経口投与を

開始し、5～6回の投与によりアレルギー性下痢症状を誘発させた。

(1) 腸管樹状細胞のサブタイプの同定と葛根湯の作用

① モデルマウスを用いた樹状細胞の分布変化の検討、及びサブタイプの同定

病態および葛根湯の治療に関与する樹状細胞のサブタイプの同定のため、正常マウス結腸、食物アレルギー性消化器症状を誘発したマウス結腸および葛根湯を投与したマウス結腸を用い、collagenase 処理により粘膜固有層から免疫系細胞を採取し、樹状細胞を各種抗体 (CD11c、mPDCA1、CD103 抗体) で染色し、フローサイトメーターにより樹状細胞サブタイプの各病態モデルにおける発現細胞数の変化を解析した。また、免疫組織学的染色により分布変化も検討した。

(2) 葛根湯の有効生薬・有効成分の同定

① モデルマウスを用いた葛根湯及び構成生薬、含有化合物の検討

葛根湯と同様にその構成生薬 (葛根、麻黄、桂皮、芍薬、甘草、大棗、生姜) や構成生薬が類似した漢方薬を、モデルマウスに投与し有効性を検討した。また、代謝産物も有効成分となる場合があるため、代謝物の血中薬物動態を明らかにした。

(3) マウス骨髄由来樹状細胞を用いた葛根湯の作用の検討

① マウス骨髄由来樹状細胞の確立

近年、樹状細胞は大きく古典的樹状細胞 (cDC : conventional Dendritic Cell) と形質細胞様樹状細胞 (pDC : plasmacytoid Dendritic Cell) に分類されており、マウス骨髄細胞からこの各樹状細胞サブタイプへの分化誘導法が報告され、機能の解明が進展した。そこで、マウス大腿骨から骨髄細胞を採取し、病態モデルで葛根湯の作用を明らかにした樹状細胞サブタイプへ GM-CSF あるいは Flt3L 等を用いて分化誘導を行った。

② マウス骨髄由来樹状細胞の成熟化にたいする葛根湯の作用の検討

樹状細胞は、抗原取り込み後に成熟化しナイーブCD4⁺T細胞に抗原提示を行い、T細胞の分化を誘導する。そこで、葛根湯の樹状細胞に対する詳細な効果を検討するために、マウス骨髄由来樹状細胞に葛根湯およびその有効成分を作用させ、樹状細胞の成熟化に対する効果を検討した。

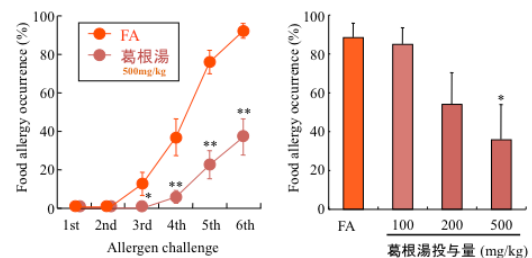
③ マウス骨髄由来樹状細胞の抗原提示能とCD4⁺T細胞の分化制御に対する葛根湯の作用の検討

マウス骨髄由来樹状細胞を抗原提示細胞

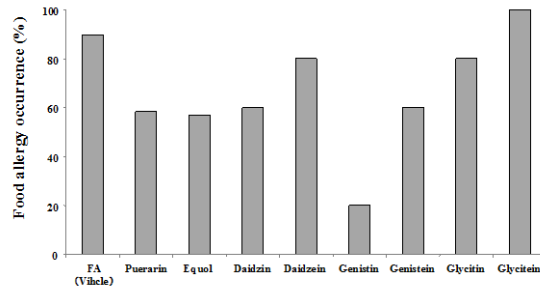
としてOVA特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウス (DO11.10 マウス) の脾臓より採取したナイーブCD4⁺T細胞と共培養し、OVAによる抗原刺激を行った。各種CD4⁺T細胞 (Th1/Th2/Th17/Treg) への分化のマスター転写因子 (T-bet、GATA3、ROR γ 、Foxp3 等) を染色し、フローサイトメーターにより分化・増殖を測定し、樹状細胞による抗原提示能とT細胞の分化制御の検討を行った。この系において葛根湯もしくはその有効成分を作用させ、樹状細胞による制御機能への効果を検討した。また、この共培養を各Th1環境 (IL-12 及び抗CD4抗体)、Th2環境 (IL-4 及び抗IFN- γ 抗体)、Th17環境 (IL-23、IL-6 及びTGF- β)、Treg環境 (TGF- β 、抗CD4抗体及び抗IFN- γ 抗体) で行い、免疫状態が与える影響の検討も行った。

4. 研究成果

(1) 病態マウスは、OVA 全身感作後に OVA の経口投与を繰り返すことによって、アレルギー性消化器症状を発症した。この病態モデルに対して、葛根湯の経口投与は、アレルギー性消化器症状を抑制することを明らかにした。また、そのアレルギー性消化器症状の治療効果は、濃度依存的であった (図)。



構成生薬が葛根湯と類似した漢方薬である桂枝湯や升麻葛根湯、他のアレルギー性疾患に用いられている補中益気湯、小青竜湯、十全大補湯などを用い治療効果を検討した結果、升麻葛根湯のみが治療効果を示した。そこで、葛根湯と升麻葛根湯のみに含まれる構成生薬である葛根の抽出エキスを病態モデルに投与した。葛根エキス投与によってもアレルギー性消化器症状は抑制された。葛根は成分としてイソフラボンであるプエラリンを多く含み、その他にも複数のイソフラボンを含んでいる。そこで葛根含有イソフラボン類およびその代謝イソフラボン等のイソフラボン類についてアレルギー性消化器症状の治療効果について検討を行った (5mg/kg, po)。葛根の成分であるプエラリンやダイゼイン、その代謝物であるエクオールがアレルギー性消化器症状に対し治療効果を示した。また、その他のイソフラボン類も治療効果を示した (図)。



病態マウスに対し葛根湯投与は、腸管粘膜固有層のCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞を増加させた。また、治療効果を示したイソフラボンでも、腸管粘膜固有層においてCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞が増加した。従って、葛根湯の効果は、葛根中の成分であるイソフラボンの効果であることが示唆された。CD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞を増加させることにより、腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の亢進が抑制され、アレルギー性症状が改善したと推測された。

腸管粘膜免疫系において樹状細胞は免疫制御の中心的な役割を担い、ナイーブCD4⁺T細胞に抗原提示を行い、T細胞の分化・増殖を制御する。そこで、葛根湯による腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の亢進の抑制による治療効果を検討するために、腸管粘膜固有層の樹状細胞の割合と分布の変化をフローサイトメーターおよび免疫染色により解析した。病態モデルおよび葛根湯投与マウスにおいてmPDCA1⁺CD11c^{int}樹状細胞(pDC)の割合・分布に変化は見られなかった。しかし、葛根湯投与マウスにおいて、CD103⁺CD11c⁺樹状細胞は増加傾向が確認された。そこで、葛根湯の効果についてCD103⁺CD11c⁺樹状細胞(cDC)に対する効果を検討した。

腸管の樹状細胞はわずかであり詳細な検討は困難である。そこで、マウス骨髄細胞を採取し、培養液中にGM-CFSを添加し骨髄由来樹状細胞を分化誘導しcDCとして用いた。この未成熟の骨髄由来樹状細胞に対し、成熟化および抗原取り込み能に対する葛根湯の効果を検討した。LPS刺激による樹状細胞の成熟化とFITC標識したOVAを抗原とした抗原取り込み作用に対して葛根湯処置は効果を示さなかった。

次に、樹状細胞の抗原提示によるナイーブCD4⁺T細胞の増殖作用を検討した。葛根湯処置はT細胞の増殖を抑制したが、制御性T細胞の増加は誘導しなかった。

葛根湯が、制御性T細胞を誘導することにより腸管粘膜免疫系を制御し、食物アレルギーの治療することが示唆された。また、その効果は、イソフラボンによる効果であることが示唆された。葛根湯による制御性T細胞の増加の誘導機序については、今後より詳細な

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6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. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:721085. doi: 10.1155/2012/721085 (査読あり)
- ② Wang X, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Yamamoto T, Kadowaki M.: Sphingosine kinase-1-dependent and -independent inhibitory effects of zanthoxyl fructus to attenuate the activation of mucosal mast cells and ameliorate food allergies in mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:862743. doi:10.1155/2012/862743 (査読あり)
- 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Dec 16;416(3-4):283-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.014 (査読あり)
- ④ Kageyama-Yahara N, Suehiro Y, Yamamoto T, Kadowaki M.: Rab5a regulates surface expression of FcεRI and functional activation in mast cells. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(5):760-3. doi: 10.1248/bpb.34.760 (査読あり)
- ⑤ 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. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(1):142-5. doi:

10.1248/bpb.33.142 (査読あり)

- ⑥ 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 Lett. 2010 Jan 4;584(1):111-8. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.007. (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 山本 武, 門脇 真: 葛根成分および代謝物による食物アレルギー性消化器症状の治療効果. 第29回和漢医薬学会学術大会. 2012年9月1-2日. 東京
- ② 王 暁宇, 林 周作, 山本 武, 門脇 真: 紫雲膏の主要活性成分シコニンの核内オーファン受容体NR4Aの遺伝子発現抑制を介したマスト細胞に対する作用. 第29回和漢医薬学会学術大会. 2012年9月1-2日. 東京
- ③ Hayashi S., Wang X., Umezaki M., Yamamoto T., Kadowaki M. Shikonin suppresses the activation of mucosal mast cells through the inhibition of nuclear orphan receptors NR4A expression. 5th International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2012年10月13日. 富山
- ④ 門脇 真, 山本 武: 葛根湯の粘膜免疫系での制御性T細胞誘導による食物アレルギー抑制作用. 第16回日本統合医療学会(招待講演). 2012年12月8-9日. 大阪
- ⑤ 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年8月27-28日. 富山
- ⑥ 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年8月30-31日. 京都

6. 研究組織

(1) 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