

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460891

研究課題名(和文) 葛根湯の粘膜免疫系での制御性T細胞誘導による抗アレルギー効果

研究課題名(英文) Anti-allergic effect of kakkonto by regulating intestinal mucosal immunity through the induction of regulatory T cells in the colon

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) 3,900,000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、未だ有効な治療方法がない疾患である。申請者は、病態モデルマウスを用いた検討により、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。近年、腸管粘膜免疫系が食物アレルギーの発症に関与することが明らかになってきた。そこで本研究では、葛根湯による腸管粘膜免疫系に対する効果の検討を行い、葛根湯が腸管に制御性T細胞を誘導し、腸管粘膜免疫系を制御することにより治療効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with food allergy has dramatically increased. Although satisfactory drug therapies for food allergy are not available, we found that kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, suppressed the occurrence of allergic symptoms in a food allergy mouse model. Recently, it has been reported that intestinal mucosal immunity plays an important role in food allergy. Thus, we investigated whether kakkonto could regulate intestinal mucosal immunity of the colon. We demonstrated that kakkonto significantly increased the proportion of regulatory T cells in the colon. The induction of regulatory T cells in the colon as a novel mechanism underlying the therapeutic action of kakkonto could be utilized for the development of a novel anti-food allergy drug.

研究分野：消化管生理学、免疫学、薬理学

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

1. 研究開始当初の背景

食物アレルギーは未だ治療薬や治療法が確立していない疾患である。しかし、患者数が急増していることやショック症状などの重篤な症状が発症することなどから、早急な治療薬や治療法の確立が望まれている。

腸管粘膜は、生体維持に必須の栄養素を摂取する際の生体外とのインターフェイスとなっているため、病原性微生物等の侵入の危険性にも直接的・恒常的に曝されている。従って、腸管粘膜には、病原性微生物等の排除と食物成分という異種抗原に対する寛容を精妙に調節し、恒常性の維持を担っている腸管粘膜免疫系が発達している。この腸管粘膜免疫系の破綻により、恒常性が失われ、腸管感染性腸炎、炎症性腸疾患、食物アレルギー、セリアック病などの腸管免疫性疾患が発症する(1)。なかでも、食物アレルギーは、食物成分に対する寛容の破綻により、過敏で過剰な2型ヘルパーT細胞(Th2)型免疫応答が誘発されて発症すると考えられている。

腸管粘膜免疫系の重要性や疾患の発症への関連性の認識に伴い世界的に活発な研究が行われている。腸管粘膜免疫系の新たな制御機構や免疫細胞の存在が報告されるようになり、腸管粘膜免疫系には全身免疫系とは異なった制御機構が存在し、複雑かつ巧妙に制御されていることが明らかとなった。しかし、未だ十分には解明されておらず、不明な点が多い。

複合薬物である漢方薬は、殆どの西洋薬が単一の治療標的に対する作用を目的とするとは異なり、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にしているものが多い。アレルギー疾患は免疫系のバランスの偏りにより発症する疾患であり、臨床的に有用な治療薬・治療方法が少ない薬剤満足度や治療満足度の低い疾患である。従って、多因子性疾患であるアレルギー疾患には、多成分系である漢方薬による治療が有効な場合も多く、漢方薬が比較的多く用いられている領域の一つである。例えば、アレルギー性鼻炎に対し小青竜湯や葛根湯加川芎辛夷等、アトピー性皮膚炎に対し温清飲等、喘息には小青竜湯や麦門冬湯等、多くの有効症例が報告されているが、多成分系であるために方剤の作用機序は未だ十分には明らかになっていない。

申請者は、これまでに実際に下痢症状を発症する食物アレルギー病態モデルを用いて、詳細な発症機序・病態形成機序の検討や治療薬の探索とその薬理作用機序の検討を行い、アレルギー症状の発症には腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の過剰な亢進が関与すること、さらに、治療薬の探索を行い漢方薬である葛根湯がTh2型免疫応答を抑制し症状を改善することを明らかにしている(2)。

2. 研究の目的

食物アレルギーの治療薬の確立を目指し、疾患の発症に關与する腸管粘膜免疫系の制御機構について検討を行うとともに、葛根湯による腸管粘膜免疫系の制御について検討を行い、葛根湯による食物アレルギーの詳細な治療機序を明らかにすることを目的とする。さらに、詳細な治療機序の解明をもとに、葛根湯をベースとした新規方剤の開発や葛根湯をリソースとした創薬研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 病態モデルに対する治療効果の検討

ヒトの病態に近い有用な病態モデルとして、ヒトと同様に原因抗原の経口摂取により症状を呈する食物アレルギー病態モデルを用いて検討を行った。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回行った。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。葛根湯、構成生薬及び含有成分はOVAの経口投与の1時間前に経口投与した。

(2) 腸管粘膜固有層細胞の検討

各種処理を行った病態モデルマウスから大腸を摘出し、EDTA処理およびcollagenase処理により粘膜固有層から免疫系細胞を採取し、各種抗体(CD4、Foxp3、CD69、CD25、CD11c、CD103等)で染色し、フローサイトメーターによりT細胞や樹状細胞のサブタイプの細胞数の変化を解析した。さらに、各種細胞をIMAGもしくはセルソーターにより分取し、mRNA発現をリアルタイムPCRにより測定した。また、病態モデルマウスから摘出した大腸を用いて、免疫組織化学的染色により細胞の分布変化を検討した。

(3) 樹状細胞の抗原提示能とT細胞の分化制御に対する作用の検討

マウス骨髄由来樹状細胞または脾臓分取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(D011.10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。各種培地条件において培養後、核内因子Foxp3の染色を行い制御性T細胞の分化・増殖を、フローサイトメーターにより測定した。培養液中に葛根湯および含有成分を添加し、制御性T細胞の分化・増殖に対する効果を検討した。また、マウス骨髄由来樹状細胞の分化誘導に対する葛根湯および含有成分の効果も検討した。

4. 研究成果

(1) 葛根湯による治療効果

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 1)。

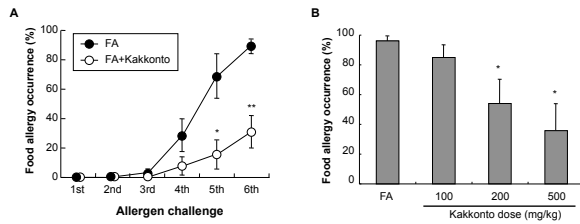


図1 葛根湯による食物アレルギー症状発症の抑制

葛根湯は、腸管粘膜固有層中の CD4⁺T 細胞の割合に影響を及ぼさなかったが、CD4⁺T 細胞中の CD69、CTLA4 および CD25 陽性細胞の割合を減少させた (図 2)。従って、葛根湯が腸管粘膜固有層中の活性化 T 細胞の割合を減少させることを明らかにした。また、葛根湯は CD4⁺T 細胞での GATA3 mRNA 発現を抑制した。従って、葛根湯が腸管粘膜固有層中の Th2 細胞の割合を減少させることを明らかにした。葛根湯は腸管粘膜固有層中の T 細胞の活性化や Th2 細胞への分化を抑制する作用をもつことが示唆された。

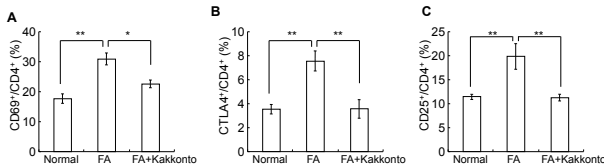


図2 葛根湯による腸管粘膜固有層中の活性化T細胞の減少

病態モデルにおいて葛根湯の投与により腸管粘膜免疫系の過剰亢進が抑制されたため、腸管粘膜免疫系で、主に抑制性制御機構を担うと考えられている制御性 T 細胞についての検討を行った。フローサイトメーターによる解析により、葛根湯が腸管粘膜固有層の CD4⁺T 細胞中の Foxp3 陽性細胞の割合を増加させることを、また免疫組織化学的解析により腸管粘膜固有層の Foxp3 陽性細胞数を増加させることを明らかにした (図 3)。増加した制御性 T 細胞を詳細に検討するために、CD4⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞中の CD25 陽性細胞の割合を検討した。葛根湯によって、CD4⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞中の CD25 陽性細胞の割合は増加しなかった。さらに、抗 CD25 抗体の投与は、葛根湯による治療効果や CD4⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞の増多に影響しなかった。従って、葛根湯によって腸管に誘導され治療効果に関与する制御性 T 細胞は、CD25 陰性であることが推察された。

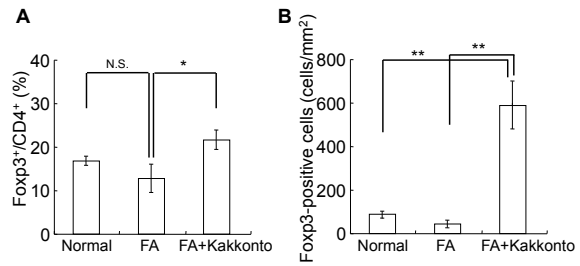


図3 葛根湯による腸管粘膜固有層中の制御性T細胞の増加

さらに葛根湯による治療機序の詳細な検討を行うために、葛根湯の構成生薬及び含有成分を用いた治療効果の検討を行った。構成生薬を用いた検討により、葛根エキスのみが治療効果を示し、さらに、葛根の主成分であるプエラリンが治療効果を示した。プエラリンも葛根湯と同様に腸管粘膜固有層の制御性 T 細胞を増多し治療効果を示した。従って、葛根湯による治療効果は、主にプエラリンによる作用であることが示唆された。しかし、プエラリンや葛根エキスのみでは葛根湯よりも治療効果が弱く、葛根湯による治療効果は葛根・プエラリンと他の構成生薬との複合的な作用であることが示唆された。

制御性 T 細胞の誘導機序を検討するために、*in vitro* での樹状細胞とナイーブ T 細胞の共培養系において、葛根湯やプエラリンによる制御性 T 細胞の誘導に対する効果を検討した。しかし、葛根湯とプエラリンは、制御性 T 細胞の誘導を増加しなかった。従って、葛根湯やプエラリンが樹状細胞やナイーブ T 細胞に直接作用して制御性 T 細胞を誘導していないことが示唆された。

樹状細胞やナイーブ T 細胞や制御性 T 細胞に対し直接の作用がなかったことから、病態モデルを用いて腸管粘膜固有層での検討を行った。プエラリンの投与は、腸管に免疫寛容を誘導する CD103⁺樹状細胞を増多した。また、制御性 T 細胞と CD103⁺樹状細胞の誘導に関与するレチノイン酸の合成酵素の発現を増加することを明らかにした。従って、葛根湯やプエラリンは、腸管でのレチノイン酸産生を増加することにより CD103⁺樹状細胞を増多し制御性 T 細胞を増多することを明らかにした。葛根湯やプエラリンはレチノイン酸産生の増加により、腸管粘膜免疫系の破綻を改善し食物アレルギー症状に対して治療効果を示すことが示唆された。

(2) 腸管粘膜免疫系の制御機構の検討

① α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化を介した治療効果

近年、コリン性抗炎症機構として、α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化を介した抗炎症作用が報告されている (3)。そこで、この受容体の活性化が、食物アレルギーの症状に対しても効果を示すか検討を行った。ニコチン投与による α 7 ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化は、食物アレ

ルギーの発症を抑制した(図 4)。また、ニコチン投与は食物アレルギー病態モデルマウスの腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答を抑制し、腸管の粘膜型マスト細胞の増加を抑制した。さらに、大腸においてコリン作動性神経と粘膜型マスト細胞が近接していることを明らかにし、腸管神経と粘膜型マスト細胞が $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体の活性化を介して相互作用している可能性を示唆した。

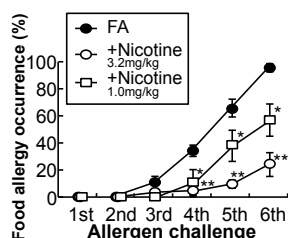


図4 ニコチンによる食物アレルギー症状発症の抑制

② 粘膜型マスト細胞と神経ペプチド CGRP

食物アレルギー症状の発症に関与する粘膜型マスト細胞が神経ペプチド CGRP を発現した神経と近接して増多することを明らかにした。この結果から、骨髄細胞から分化誘導した粘膜型マスト細胞を用いて、CGRP による粘膜型マスト細胞の制御について検討を行った。CGRP がマスト細胞の脱顆粒を増強させることを明らかにした。さらに、食物アレルギー病態モデルマウスにおいて、CGRP 受容体の阻害剤の投与によりアレルギー症状の発症が抑制された。従って、マスト細胞の脱顆粒が CGRP によって制御され、その脱顆粒が食物アレルギーの発症に関与することを明らかにした。

以上のように、腸管粘膜免疫系は食物アレルギーの発症と密接に関与しており、さまざまな制御機構により制御されていることを明らかにした。葛根湯は腸管に制御性 T 細胞を誘導することによって過剰に亢進した腸管粘膜免疫系を抑制し、食物アレルギーの発症を抑制することを明らかにした。

<引用文献>

- (1) Macdonald TT, Monteleone G.: Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 307, 2005, 1920-1925.
- (2) Yamamoto T, Fujiwara K, Yoshida M, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shibahara N, Kadowaki M.: Therapeutic effect of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms. *Int Arch Allergy Immunol*. 148, 2009, 175-185.

- (3) de Jonge WJ, Ulloa L.: The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol* 151, 2007, 915-929.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yamamoto T, Fujiwara K, Tsubota Y, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Kadowaki M.: Induction of Regulatory T Cells as a Novel Mechanism Underlying the Therapeutic Action of Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, in a Murine Food Allergy Model. *Int Arch Allergy Immunol*. 査読有, 169, 2016, 146-156. DOI: 10.1159/000445433.
- ② Wang X, Hayashi S, Umezaki M, Yamamoto T, Kageyama-Yahara N, Kondo T, Kadowaki M.: Shikonin, a constituent of *Lithospermum erythrorhizon* exhibits anti-allergic effects by suppressing orphan nuclear receptor Nr4a family gene expression as a new prototype of calcineurin inhibitors in mast cells. *Chem Biol Interact*. 査読有, 224C, 2014, 117-127. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.021.
- ③ Kim JH, Yamamoto T, Lee J, Yashiro T, Hamada T, Hayashi S, Kadowaki M.: CGRP, a neurotransmitter of enteric sensory neurons, contributes to the development of food allergy due to the augmentation of microtubule reorganization in mucosal mast cells. *Biomed Res*. 査読有, 35, 2014, 285-293. DOI: 10.2220/biomedres.35.285
- ④ Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi S, Sakamoto H, Kuramoto H, Kadowaki M.: Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via $\alpha 7$ nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model. *PLoS One*. 査読有, 9, 2014, e85888. DOI: 10.1371/journal.pone.0085888.
- ⑤ 山本 武, 門脇 真.: 食物アレルギーに対する漢方薬治療を目指した病態モデルを用いた基礎的検討. アレルギーの臨床. 8月号, 2014, 643-646.
- ⑥ Lee J, Yamamoto T, Hayashi S, Kuramoto H, Kadowaki M.: Enhancement of CGRP

sensory afferent innervation in the gut during the development of food allergy in an experimental murine model. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有, 430, 2013, 895-900.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.058.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 門脇 真, 李 在敏, 八代 智江, 緒方華子, 金 志玄, 山本 武: 食物アレルギーの病態形成における腸管神経の病態生理学的役割. 生体機能と創薬シンポジウム 2015, 2015, 8, 27-28, 船橋.
- ② 山本 武, 松並 恵未, 小森 宏次, 門脇 真: 葛根湯の主成分プエラリンのレチノイン酸依存的な制御性 T 細胞の誘導による食物アレルギーに対する治療効果. 第 32 回和漢医薬学会学術大会, 2015, 8, 22-23, 富山.
- ③ Yamamoto T., Matsunami E., Komori K., Kadowaki M.: Augmentation of retinoic acid production in the colonic epithelial cells ameliorates food allergy via the induction of foxp3+ regulatory T cells in a murine model. 17th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI2015), 2015, 7, 14-18, Berlin.
- ④ 山本 武, 松並 恵未, 小森 宏次, 門脇 真: 葛根湯の制御性 T 細胞の誘導による食物アレルギーモデルでの治療効果. 第 36 回 富山免疫アレルギー研究会, 2015, 6, 25, 富山.
- ⑤ 小森 宏次, 山本 武, 門脇 真: ダイオキシン受容体は食物アレルギーの創薬標的になりうるのか. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会, 2015, 5, 28, 富山.
- ⑥ 山本 武, 松並 恵未, 小森 宏次, 門脇 真: 葛根湯の主成分プエラリンのレチノイン酸依存的な制御性 T 細胞誘導による食物アレルギーモデルでの治療効果. 第 64 回日本アレルギー学会学術大会, 2015, 5, 26-28, 東京.
- ⑦ 松並 恵未, 山本 武, 小森 宏次, 門脇 真: 葛根の主成分 puerarin は腸管に制御性 T 細胞を誘導して食物アレルギー病態モデルで有効性を示す. 日本薬学会北陸支部 第 126 回例会, 2014, 11, 16, 金沢.
- ⑧ 山本 武, 小森 宏次, 松並 恵未, 門脇 真: 葛根湯成分プエラリンによる食物アレルギー抑制機序の検討. 第 31 回和

漢医薬学会学術大会, 2014, 8, 30-31, 千葉.

- ⑨ Kim JH., Yamamoto T., Kadowaki M.: CGRP can enhance activation of mucosal mast cells by augmenting microtubule organization. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014, 5, 9-11, 京都.
- ⑩ 山本 武, 小森 宏次, 松並 恵未, 門脇 真: ダイオキシン受容体アゴニストは食物アレルギー病態モデルで治療効果を発揮する. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014, 5, 9-11, 京都.
- ⑪ 小森 宏次, 山本 武, 門脇 真: 食物アレルギー病態モデルにおける制御性 T 細胞の誘導によるプエラリンの治療効果. 日本薬学会北陸支部 第 125 回例会, 2013, 11, 17, 金沢.
- ⑫ 金 志玄, 李 在敏, 山本 武, 門脇 真: CGRP enhances calcium ionophore-induced degranulation of mucosal type murine bone marrow-derived mast cells. 日本薬学会北陸支部 第 125 回例会, 2013, 11, 17, 金沢.
- ⑬ 山本 武, 小森 宏次, 数馬 恒平, 門脇 真: 葛根湯成分プエラリンによる食物アレルギー抑制機序の検討. 第 30 回和漢医薬学会学術大会, 2013, 8, 31-9. 1, 金沢.
- ⑭ Yamamoto T., Kadowaki M.: Induction of Foxp3⁺CD4⁺ Regulatory T Cells as a Novel Mechanism Underlying the Therapeutic Action of Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, in a Murine Food Allergy Model. 16th International Congress of Mucosal Immunology, 2013, 7, 17-20, Vancouver, Canada.

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

(3) 連携研究者

林 周作 (HAYASHI SHUUSAKU)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号: 10548217