

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590701
 研究課題名（和文） 腸内細菌と腸管免疫との相互作用を介した漢方薬の抗アレルギー作用機序解明
 研究課題名（英文） Anti-allergic effect of Kampo medicine : a possible association with enteric microbiota and gastrointestinal immune system.
 研究代表者
 渡辺 賢治（WATANABE KENJI）
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：70191757

研究成果の概要：

漢方薬はアレルギー性疾患によく用いられるが、その作用に、腸内環境の変化を伴うものである、という仮説のもとに研究を進めた。幼少時から抗生剤投与を行うことにより、正常な免疫の発達が阻害された。腸内細菌の攪乱とアレルギー体質との関連を探るために、無菌マウスへ腸内細菌を移植して網羅的遺伝子発現解析を行い、出生直後の無菌状態が Th1/Th2 分化を決定付ける転写因子の発現異常をもたらすことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：アレルギー、漢方薬、腸内細菌、制御性T細胞、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

(1)特に幼少時の抗生物質の使用や環境微生物への接触の減少がアレルギー体質の一因となっている可能性が、疫学的な、あるいは基礎的な研究から示唆されていた。

(2)漢方薬は腸内細菌に影響を与える antibiotics/prebiotics の側面を持ち、これがいわゆる「漢方薬による体質改善」に関与している可能性が古くから指摘されていた。また、漢方薬によるアトピーやアレルギー治療においては、症状の軽減だけでなく長期服用による発症頻度の低減や発症時の症状

の軽減が知られていた。

(3)また、漢方薬の長期服用が感染抵抗性などの向上に資する例も多く報告されていた。

(4)また、漢方薬には腸内細菌同様に自然免疫系を賦活すると推定される多くの成分を含んでおり、また腸管の免疫系に作用して薬効を発揮する例も報告されてきた。

(5)以上のように、漢方薬の抗アレルギー、感染抵抗性の向上などの作用には、漢方薬による腸内細菌およびそれと密接に影響しあ

腸管免疫系への作用が関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

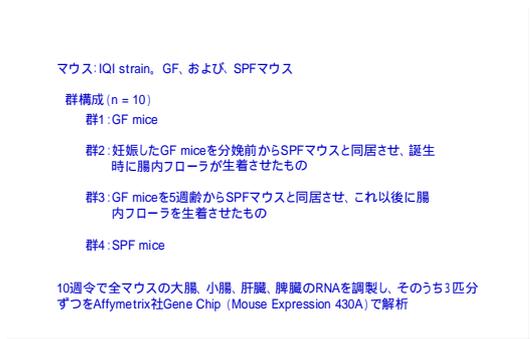
基礎研究から出生直後からの一定期間の間、常在菌と接触することが正常な免疫系の発達に重要であるとされている。その接触が宿主であるヒトや動物の免疫系にどのような影響を与えるかを明らかにし、もってアレルギーの予防・治療に役立てる。

また、このような場合における漢方薬の有用性とその作用機序について、特に腸内細菌と腸管免疫系への作用の観点から解明する。

3. 研究の方法

無菌マウスに出生直後に常在菌を定着させたマウス、無菌マウスの生後5週目に常在菌を定着させたマウスの、大腸、小腸、肝臓、脾臓の遺伝子発現を GeneChip にて網羅的に測定し (Fig1) MetaGene Profiler、Cell Illustrator などのバイオインフォマティクス・ツールでアレルギー体質、アトピー体質の出現メカニズムを探索する。

Fig1



また、より現実に近い系として幼若期に抗生物質に投与したマウスの免疫系の変化や遺伝子発現の網羅的解析を行い、上記の結果と比較検討する。

さらに、これらの動物に、漢方薬を投与し、腸内細菌の攪乱によるアレルギー体質の改善に漢方薬が寄与しうるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 4臓器のうち、腸内細菌の有無によって遺伝子発現が受けた影響は、小腸、脾臓、大

腸、肝臓の順に大きかった (Fig2A 遺伝子数, 2B 変動した Gene ontology の biological process カテゴリ数)。細菌と直接接触する消化管に匹敵する、もしくはそれ以上の規模の遺伝子発現の変動が脾臓で見られたことは、腸内細菌の存在が、免疫系全体の動きに大きな影響力を持つことを示唆している。

Fig2A.GFと比較して有意に変動した遺伝子の数の比較

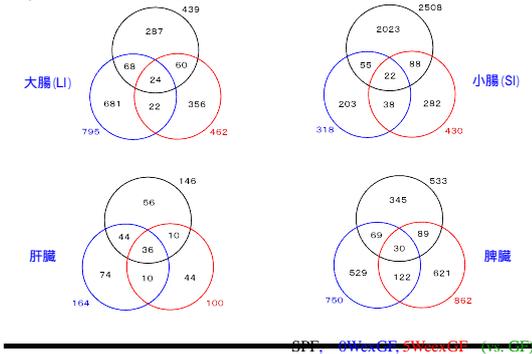
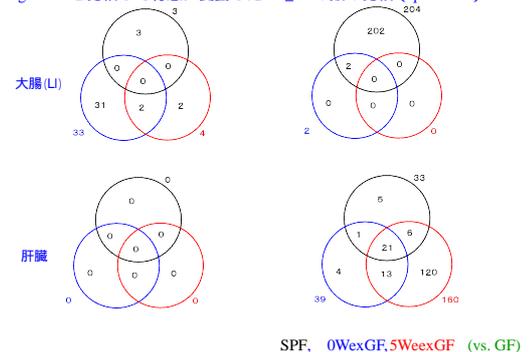


Fig2B.GFと比較して有意に変動したGO_BPの数の比較 (q < 0.001)



(2) MetaGeneProfiler を用いた Gene Ontology analysis によれば、小腸では代謝や栄養吸収にかかわる遺伝子が大多数であった。脾臓では増殖、分化、細胞内輸送、細胞骨格系など細胞機能の多方面にわたる多様な遺伝子が大規模に変動しており、免疫細胞の分化増殖が大きな影響を受けている可能性が示唆された。

(3) 5週齢で腸内細菌を再構築したマウスは、通常のマウス、出生直後に腸内細菌を再構築したマウスに比べてわずかな遺伝子発現の変化しか認められず、一見したところでは、幼少時の腸内細菌の有無それ自体の影響は大きなものではなかった。

(4) 変化の小さかった5週齢で腸内細菌を再

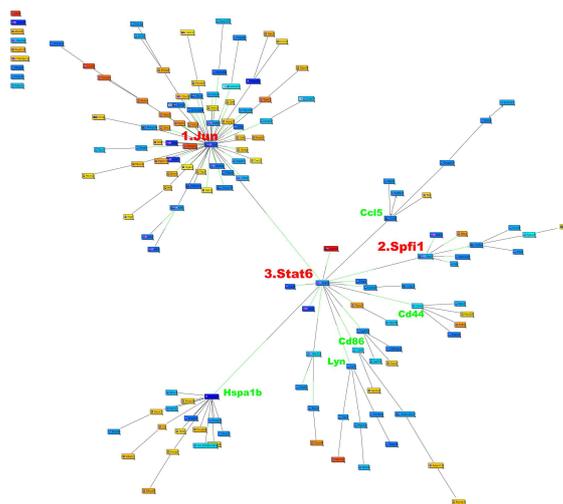
構築したマウスについて、新しく開発されたバイオインフォマティクス・ツール

「Genomatix suites」, 「MetaGeneProfiler」, 「Cell Illustrator」で詳細かつ徹底的な解析を行い、Th分化～アレルギー素因に決定的な影響を及ぼす転写調節因子群が、5週齢で腸内細菌を再構築したマウスで特異的に変動していることを突き止めた (Table1, Fig3)。出生直後の腸内細菌との接触が、これらの転写調節因子の正常な発現と制御に必須であることが示唆された。また、これらの遺伝子は、腸管免疫系の、特に調節性T細胞の、正常な発達に必要なと考えられる。

Table1

GOID	Term	p_val	Num_Pr
GO:0043010	camera-type eye development	0.0067591	8
GO:0009888	tissue development	0.00859635	5
GO:0045749	negative regulation of S phase of mitotic cell cycle	0.01429041	3
GO:0045664	regulation of neuron differentiation	0.03371551	4
GO:0030814	regulation of cAMP metabolic process	0.03371551	4
GO:0043408	regulation of MAPKKK cascade	0.03371551	4
GO:0014047	glutamate secretion	0.03968163	3
GO:0007186	G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger	0.04567102	3
GO:0045628	negative regulation of T-helper 2 cell differentiation	0.04980664	3
GO:0007599	hemostasis	0.0467072	4
GO:0007416	synaptogenesis	0.0472813	4

Fig.3



(5)より臨床に近似した系として幼若期のマウスに抗生剤を投与し、成長時の免疫反応について検討した。抗生剤は各種単剤で使用し、使用量は腸内細菌の網羅的遺伝子解析 (T-RFLP法)によって腸内細菌の変動を認める濃度とした。また、抗生剤投与マウスにおいて、オボアルブミン(OVA)による経口免疫寛容はコントロール群と同様に誘導されたが (Fig.4)、一方で、OVA反復刺激による抗体産生能に異常が認められた (Fig.5)。またこの免疫異常は抗生剤を中止した成長後も継続して観察され、幼少期の抗生剤使用が免疫発達に影響を及ぼすことが示唆された。同モデルにおいて脾臓細胞の flow cytometryの結果からT細胞、B細胞の比に有意差は認め

られず、またコントロール、抗生剤投与群ともにCD4/CD25陽性細胞の存在はとらえられなかった。またOVA刺激による脾臓細胞からのサイトカイン産生測定は引き続き検討中である。現在、本系について網羅的遺伝子発現解析を実施しており、無菌マウスにおける免疫発達との比較検討を行う予定である。

Fig.4

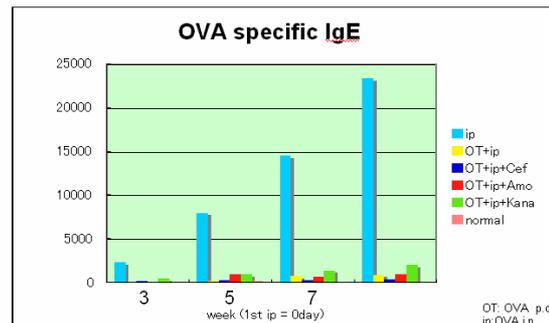
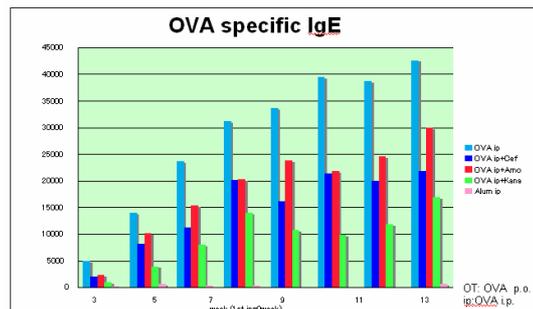


Fig.6



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4件)

Toda T, Saito N, Fujimoto A, Ikarashi N, Ito K, Yamamoto M, Ishige A, Watanabe K, Sugiyama K. Intestinal flora induces Cyp3a in the liver. *Xenobiotica*, 39(4): 323-34, 2009. 査読有

Munakata K, Yamamoto M, Anjiki N, Nishiyama M, Imamura S, Iizuka S, Takashima K, Ishige A, Hioki K, Ohnishi Y, Watanabe K. Importance of the interferon alpha system in murine large intestine indicated by microarray analysis of commensal bacteria-induced immunological changes. *BMC Genomics* 9, 192, 2008. 査読有

Yamaguchi R, Yamamoto M, Imoto S, Nagasaki M, Yoshida R, Tsuiji K, Ishige A, Asou H, Watanabe K, Miyano S. Identification of activated transcription factors from microarray gene expression data of Kampo medicine-treated mice. Genome Informatics 18, 118-129, 2007. 査読有

Kato M, Ishige A, Anjiki N, Yamamoto M, Irie Y, Taniyama M, Kibe R, Oka J, Benno Y, Watanabe K. Effect of herbal medicine Juzentaihoto on hepatic and intestinal heat shock gene expression requires intestinal microflora in mouse. World J Gastroenterol 13, 2289-2297, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

宗形佳織、大竹英恵、小倉智幸、日置恭司、山本雅浩、石毛敦、渡辺賢治。I Q I マウス大腸の type 1 インターフェロン産生における十全大補湯の影響。第 25 回和漢医薬学会学術大会。2008.8.30 ~ 31 大阪。

Munakata K, Takashima K, Yamamoto M, Ishige A, Watanabe K. The effect of a herbal medicine(Juzen-taiho-to)in the large intestine implications for mechanism of prevention of infection. 3rd International Congress on Complementary Medicine Research. 2008.3 .30, Sydney

Watanabe Y, Miura N, Fukutake M, Yamamoto M, Yamaguchi R, Miyano S, Ishige A, Takeda J, Watanabe K. Japanese herbal medicine orengedokuto prevents indomethacin-induced enteropathy: an analysis by microarray and metagene profiler. 3rd International Congress on Complementary Medicine Research. 2008.3 .30, Sydney

宗形佳織：腸管における 型インターフェロン (IFN) の産生 - 十全大補湯の研究から - 第7回腸管の機能と免疫研究会学術集会 2008.2/9 東京

渡辺賢治サイエンスとしての漢方療法第 22 回日本更年期医学会学術集会教育講演 2007/11/17-18 東京

高嶋清江, 宗形佳織, 山本雅浩, 渡辺賢

治: Balb/c における十全大補湯の免疫作用への働きとその作用機序の解明第 24 回和漢医薬学会大会 2007/9/8-9 富山
宗形佳織, 高嶋清江, 山本雅浩, 渡辺賢
治: C 57 B L/6 マウス大腸の type 1 インターフェロン産生における十全大補湯の影響第 24 回和漢医薬学会大会 2007/9/8-9 富山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 賢治 (WATANABE KENJI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：70191757

(2)研究分担者

辨野 義巳 (BENNO YOSHIMI)
独立行政法人理化学研究所・パイオリソースセンター微生物材料開発室・室長
研究者番号：40087599

(3)連携研究者

山本 雅浩 (YAMAMOTO MASAHIRO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：10398604

(4)研究協力者

渡辺 陽子 (WATANABE YOKO)
慶應義塾大学・医学部・大学院生
研究者番号：70338169

添田 亜都子 (SOEDA ATSUKO)
慶應義塾大学・医学部・研究助手