

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390224

研究課題名(和文) 内因性 型インターフェロン産生細胞を介した漢方薬の感染防御機構の研究

研究課題名(英文) Investigation of Kampo medicine mechanism against the infection via type 1 interferon producing cells

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(和文):

われわれはこれまでの研究により、漢方薬十全大補湯が1型インターフェロンであるインターフェロンの遺伝子発現経路に作用してインターフェロン産生を制御していることを見出した。本研究ではさらなる機序解明のため、大腸の固有粘膜層に存在するインターフェロン(IFN)産生細胞について明らかにするとともに、Toll Like Receptor (TLR) 4およびMyD88ノックアウトマウスを使用してそのメカニズムを解明する事を試みた。その結果、十全大補湯はTLR4依存かつMyD88非依存のシグナル経路に働きかける事が明らかとなった。また、MyD88ノックアウトマウスでは型インターフェロン関連遺伝子の定常状態における発現レベルが高くなっており、十全大補湯により発現レベルが減少する事が認められ、同様の現象が無菌(GF)マウスでも認められた。さらに、それらの作用細胞は全て同じ単球系細胞であったが、既報のインターフェロン産生細胞とは異なることが示された。次に十全大補湯の感染防御能を確かめる目的でインフルエンザ感染実験を行ったが、対照群の補中益気湯と比べ、十分な抗インフルエンザ効果が認められなかった。マウスの系統やウイルスの特性によって十全大補湯の実験系に影響を及ぼす事が考えられた。また補中益気湯について、その感染防御メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文):

We have found the Kampo medicine, jumentaihoto acts on interferon (IFN) gene expression signal pathway and controls the IFN production. For the further investigation of the mechanisms of IFN production, we have tried to identify the IFN producing cells in the large intestine and Kampo drugs action mechanisms. Analysis of toll like receptor 4 (TLR-4) and MyD88 knock-out mice, the mechanism of action of jumentaihoto was observed via TLR-4 dependent and MyD88 independent signal pathway. In the MyD88 knock-out mouse, type 1 IFN related genes, like IRF-7 was elevated. This elevation was also observed in the germ free mouse. Among all these mice, certain type of monocytes played an important role. These monocytes have not identified yet. In order to investigate the role of jumentaihoto on the influenza infection, we applied jumentaihoto to C57BL/6 mouse. However the protective action against influenza virus was stronger with hochuekkito than with jumentaihoto. We investigated the mechanism of action of hochuekkito against the influenza virus and found the defensin 4 was elevated in vivo. In vitro experiments, adhesion of influenza virus to MDCK cells was inhibited by hochuekkito. These mechanism may explain the effectiveness of hochuekkito against the influenza virus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	10,000,000	3,000,000	13,000,000

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：十全大補湯、インターフェロン、toll like receptor、MyD88、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

人類は結核をはじめとする多くの感染症に対して抗生物質の開発で対処してきた。しかしながら近年鳥インフルエンザ、重症急性肺呼吸器症候群（SARS）など新興感染症が脅威となっており、その大流行により多くの死者が出る事が予測されている。こうした新興ウイルス感染症に対してタミフルやリレンザなどのノイラミニダーゼ阻害剤が開発されたが、初期に投与しなくてはならないなどその効果には限界がある。一方漢方薬は即効性がなく慢性疾患にしか用いられない、と考えられているが、古来漢方薬はあらゆる急性疾患に対処してきた歴史があり、1800年前に書かれた『傷寒論』は急性感染症に対する漢方治療が記載されている。実際に麻黄湯とタミフルの単独群ならびに併用群の三者を比較した研究がある（窪智宏：Medicament News 2005 Sep 5; 1846: 15）。その結果は解熱までの時間は麻黄湯単独群が最も短く、医療費も安価であった。また、赤瀬朋秀らの研究（日東医誌 50 巻 4 号, 2000）でも一シーズンのかぜ症候群治療に関して漢方薬単独群が西洋薬治療群、併用群に比して、治療期間が短く薬剤費も安価であったことを報告している。この結果を基に漢方薬がファーストチョイスとなることでかぜ症候群治療に年間 415 億円の経費削減が可能と試算している。

インフルエンザなどのウイルス感染に対しては内因性インターフェロン(IFN)の役割が重要であることが知られている。IFN は分子量約 2 万の糖タンパクで、ウイルスの増殖を抑える働きを持っている。IFN 自体は抗ウイルス作用を持つものではなく、感染細胞に働き、細胞内でのウイルス増殖を妨げる。この

作用は非特異的であるため、内因性 IFN の産生はすべてのウイルスに対応可能である。IFN は Th1CD4 細胞で産生されるが、IFN α 、IFN β は Ⅰ型 IFN と呼ばれ主に形質細胞様樹状細胞などの単球系細胞により産生される。

Ⅱ型 IFN は C 型肝炎、HIV 感染に対しても有用なサイトカインとして注目されているが、その詳細についてはまだ明らかではない。その産生に対しては Toll 様受容体 (TLR) の一つである TLR9 を介して Ⅰ型 IFN の産生を促す事が示された (Akira ら: J Exp Med 201(6):915-923) が、詳細な点については未だ不明な部分も多く、多くの研究者により研究が進められている。

漢方薬の基礎研究においては補中益気湯という漢方薬がインフルエンザ感染による死亡率を下げ、その機序として Ⅱ型 IFN 産生を早める事によりウイルスの大量増殖を未然に防ぐ効果がある事が示された (Mori ら Antiviral Research 44:103-111)。この報告において詳細なメカニズムは明らかではないものの、内因性 Ⅱ型 IFN 産生能を高める漢方薬の薬効は、インフルエンザのみならず、すべてのウイルス感染症に対して有効な治療法となり得る。

申請者は漢方薬が内服により腸管免疫を賦活することに着目し、腸内細菌叢との関係において、特にアレルギーの発症予防・治療ならびに感染予防についての研究を進めてきた。研究を進めるに当たり、複合成分である漢方薬が複雑系の生体に作用する全体像を理解するために、網羅的遺伝子解析をスクリーニングの手法として用いている。腸管においては漢方薬十全大補湯が大腸における Ⅱ型 IFN 関連遺伝子を活性化することが見出された。特に IRF7 は Ⅱ型 IFN 産生のために必須であり、通常の感染ではその発現までに時

間を要するが、十全大補湯は IRF7 遺伝子発現増加を促すものの、IFN は産生されない状態を作り出す。すなわち準備段階の状態は作られるが、最終産物である IFN は産生されない。その為、感染等の IFN が必要な状況になると十全大補湯投与群ではいち早く IFN の産生が起きるため、感染が最小限に抑制される事が予測される。

2. 研究の目的

大腸における内因性 型 IFN 産生を介した十全大補湯の感染防御機構を明らかにする。特に toll like receptor を介したメカニズムについて解明するとともに、実際の感染における十全大補湯の感染防御能を確認する。

3. 研究の方法

(1) ノックアウト (KO) マウスを用いた十全大補湯のメカニズム解明

IFN 産生の上流にあり十全大補湯のターゲットであろうと想定される TLR 近傍で働くアダプター分子 MyD88 (Cell Death Differ 13(5):816-825) のノックアウト (KO) マウス、および漢方薬中に含まれる多糖類で免疫調整作用に関連があるとされる LPS 様物質のターゲットであろうと想定される TLR4 のノックアウトマウスを使用して十全大補湯の薬効が維持されるかどうかを検討した。型 IFN を産生するのは TLR3、4、7/8、9 であり、このうち MyD88 は、TLR4、7/8、9 のシグナル伝達に関わる (TLR4 には MyD88 非依存経路も存在する)。そこで、7 週齢、雄性の MyD88 KO マウス、TLR4 KO マウス及びそれらのマウスの wild type である C57BL/6 マウス各 12 匹を 2 群に分け (n=6)、control 群には精製水、十全大補湯群には十全大補湯 1g/kg/day を胃ゾンデで 2 週間連続強制経口投与した。その後大腸を採取し、液体窒素で瞬時に凍結させ保存した。大腸より RNA を抽出し、網羅的に遺伝子発現レベルを検出した後、ゲノムオントロジーの手法であるメタジーン・プロファイラー (メタ GP) 解析

(<http://metagp.ism.ac.jp>) およびシグナル伝達解析 (Cell Illustrator Online; <https://cionline.hgc.jp>) を用いて解析を行った。解析は東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンターとの共同で行った。その結果注目された遺伝子の発現についてはリアルタイム RT-PCR で確認を行った。

(2) 十全大補湯のターゲット細胞の同定

マウスに十全大補湯および経口 IFN 誘導剤 (ABMP もしくは tiloron analog R11567DA) を用いて内在性 IFN を誘導した。大腸の組織切片を作成し、IFN 産生細胞を免疫染色で同定する。型 IFN 関連タンパク抗体で IFN 産生細胞を認識させた後、種々の抗体を用いて二重染色もしくは三重染色を行い細胞

を同定した。IFN の産生細胞は一般的に好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球等の白血球と云われるが、近年では樹状細胞による IFN 産生が注目されている。これらの細胞は活動的に生体内を往来し、その場の状況に応じて様々な分化をするため大腸における IFN 産生細胞はこれまで報告されてきた IFN 産生細胞の細胞表面抗原発現とは異なる可能性も考えられた。そこでこれまで報告されてきた一般的に使用される抗体のみならず多岐にわたる種類の抗体で免疫染色を行い、大腸における 型 IFN 産生細胞を同定した。

(3) 十全大補湯による wild type マウス、MyD88KO マウス、Germ free (GF) マウスにおける作用細胞の相違

十全大補湯によって同様の遺伝子 (型 IFN 関連遺伝子) が変動するが、マウスの処置によって作用方向性が異なっていることが明らかとなった事象を受けて、これらが同一の細胞に対する作用であるかを検討した。wild type (C57BL/6) マウス、MyD88KO マウス、GF マウスに水もしくは十全大補湯を 1g/kg/day 胃ゾンデで 2 週間連続経口投与した後、大腸を採取して凍結切片を作成した。その後、上記の実験と同様の抗体を用いて免疫染色を行い、マウス間における相違を比較検討した。

(4) 十全大補湯と他漢方薬の抗インフルエンザ感染能の検討

C57BL/6 マウスを 4 群に分け (n=10)、control 群には精製水、十全大補湯群、補中益気湯群、葛根湯群には各 1g/kg/day を胃ゾンデで 2 週間連続強制経口投与した。その後インフルエンザウイルス A 型/PR/8/34 株 (H1N1) を経鼻投与し、生存観察を行った。

(5) 補中益気湯の抗インフルエンザ作用機序の解明 (in vivo)

C57BL/6 マウスを 2 群に分け (n=10)、control 群には精製水、補中益気湯群には補中益気湯 1g/kg/day を胃ゾンデで 2 週間連続強制経口投与した。その後インフルエンザウイルス A 型/PR/8/34 株 (H1N1) を経鼻投与し、経時的に肺洗浄液および肺を採取した。肺洗浄液をサンプルとして Plaque assay 法でインフルエンザウイルス力価を検討、Vesicular stomatitis virus を用いた生物学的 IFN 活性測定法で IFN 活性を検討した。また、肺 homogenate をサンプルとして RNA を抽出し、Defensin family 遺伝子発現を検討した。

(6) 補中益気湯の抗インフルエンザ作用機序の解明 (in vitro)

補中益気湯がインフルエンザウイルス増殖過程のどの部分に作用するかを検討する目的で、MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させる実験系において感染 1 時間前 ~ 4 8 時間後、感染 1 時間前 ~ 感染直前、感染

直後～48時間後、感染30分後～48時間後、感染1時間後～48時間後、感染3時間後～48時間後に補中益気湯5μg/mlを添加し、Plaque assay法でウイルス阻害率を検討し、作用時間のタイミングにより補中益気湯の作用機序を考察した。さらにMDCK細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、control群には精製水、補中益気湯群には補中益気湯5μg/mlを添加し、経時的にMDCK細胞を採取して細胞内および細胞外のウイルス価をPlaque assay法で測定する事により、作用部位を検討した。ついで、MDCK細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、control群には精製水、補中益気湯群には補中益気湯5μg/mlを添加し、経時的に細胞切片を作成してNPおよびDAPIで免疫染色を行い、細胞内インフルエンザウイルスの増殖状態を検討した。次にインフルエンザウイルスと補中益気湯との直接的な影響を検討する目的で、control群はインフルエンザウイルスと精製水をMDCK細胞に添加し、補中益気湯前処理群はインフルエンザウイルスと補中益気湯を混和して30分インキュベーションした後MDCK細胞に添加し、補中益気湯同時処理群はインフルエンザウイルスと補中益気湯を同時にMDCK細胞に添加し、経時的にウイルスRNAレベルをリアルタイムRT-PCRによって測定した。またBIACOREシステムによってMDCK細胞・インフルエンザウイルス・補中益気湯の親和性を測定した。

4. 研究成果

MyD88 KO マウス、TLR4 KO マウス及びそれらのマウスのwild typeであるC57BL/6マウスに十全大補湯を投与したマウスの大腸における遺伝子発現をメタGP解析およびシグナル伝達解析を用いて解析した検討した結果、同様の遺伝子が変動するものの、作用方向性が異なっていることが明らかとなった。具体的には型IFN関連遺伝子発現がC57BL/6マウスでは発現増加、MyD88 KOマウスでは発現減少、TLR4 KOマウスでは影響が認められなかった(図1)。このことから十全大補湯のIFN産生能増強の機構はTLR4依存性かつMyD88非依存性のシグナル経路を介したものである事が示唆された(図2)。またこれらの結果はそれぞれのマウスにおける定常状態における遺伝子発現、および腸管内への微生物刺激強度に起因するものと考えられ、MyD88 KOマウスではGFマウスに類似した定常状態における型IFN関連遺伝子発現増加が認められた。そこでこれらが同一の細胞に対する作用であるかを免疫染色によって検討した所、C57BL/6マウス、MyD88KOマウスのcontrolでは、IFN産生(ISG15陽性)細胞はほとんど認められず、十全大補湯+IFN誘導剤(ABMP)によって誘導されるが、GFマウスでは、

controlで既にIFN産生細胞が認められた。またそれはいずれも同様の細胞である可能性が示唆された。これらの結果より腸管への微生物刺激状態により十全大補湯の作用方向性は異なるものの、作用するIFN産生細胞は同様であり、monocyte系の細胞が主体であることが示唆された。

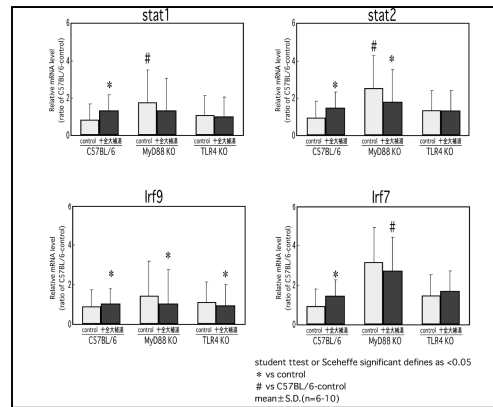


図1: KOマウスにおける型IFN遺伝子発現

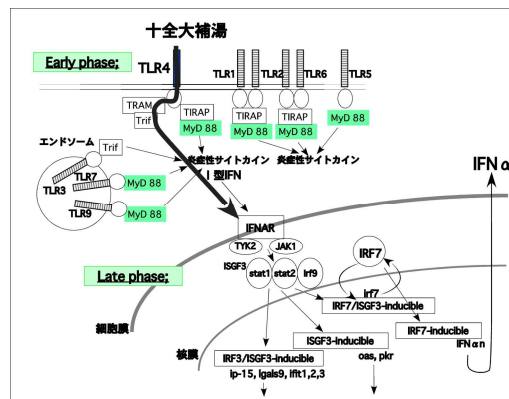


図2: 十全大補湯の作用機序

次に実際の感染における十全大補湯の感染防御能を検討する目的でインフルエンザウイルス感染実験を行った。C57BL/6マウスに水もしくは十全大補湯、補中益気湯、葛根湯を投与し、インフルエンザウイルスA型/PR/8/34株(H1N1)を経鼻投与して生存観察を行ったところ、補中益気湯の生存率が最も高く、続いて十全大補湯、葛根湯の順で生存率が低かった(図3)。臨床において十全大補湯は体力が低下し、疲れやすく貧血症状も認められる状態の患者に適用される処方であるが、本実験で使用したC57BL/6マウスはそのような性質のマウスではない。マウスの系統やウイルスの特性によっては十全大補湯の作用検討の実験系に影響を及ぼす可能性が示唆された。

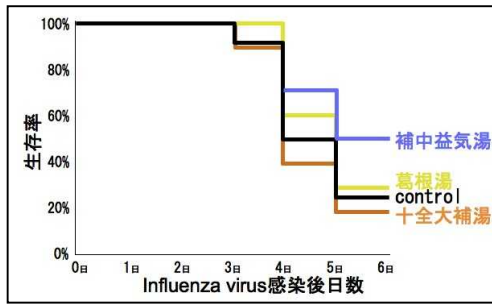


図 3: インフルエンザ感染における生存率

一方、補中益気湯はBALB/cマウスにおいてインフルエンザウイルスに対する延命効果および感染マウス肺中のIFN早期産生、肺損傷の軽減が既に報告されているが、そのメカニズムの全容は解明されていない。そこで、マウスの系統を問わず抗インフルエンザウイルス能を有する補中益気湯について詳細な機序解明を進めることとした。C57BL/6マウスを用いた本実験においても補中益気湯によるインフルエンザウイルス感染マウスの延命および感染マウス肺中のインフルエンザウイルス価抑制、IFN 活性増加が認められ、さらに抗菌ペプチドとして知られるDefensin family遺伝子発現においては Defensin 4を除いてインフルエンザウイルス感染による発現増加および補中益気湯投与によるさらなる発現増加も認められた。ウイルス価を抑制する事とDefensinのサブタイプにほぼ非特異的に作用する事がどのように関係するのかは今後の検討を必要とすると考えられる。In vitroにおける補中益気湯の抗インフルエンザウイルス作用機序解明実験では補中益気湯がウイルス増殖における吸着・侵入・膜融合・脱核・転写複製翻訳・出芽・放出のどの部位にどのように作用するかを検討した。MDCK細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、種々のタイミングで補中益気湯添加し、ウイルス阻害率を検討した結果、感染1時間前～感染直前、感染3時間後～48時間後に補中益気湯を添加した場合にはウイルス阻害が認められなかった。これらの事より補中益気湯は細胞に対する直接的な作用を持たず、感染後早期のインフルエンザウイルス増殖阻害を引き起こす要因をつくる事が示唆された。さらに感染後経時的にMDCK細胞内外のウイルス価を検討した結果、補中益気湯により細胞内ウイルス価上昇が抑制され、細胞外ウイルスは放出タイミングになっても放出が認められなかった。従って補中益気湯はインフルエンザウイルスの細胞侵入過程を阻害している可能性が示唆され、免疫染色においてもこれらの現象が確

認された(図4)。次にインフルエンザウイルスと補中益気湯との直接的な影響を検討した所、インフルエンザウイルスと補中益気湯を混和して30分インキュベーションした後MDCK細胞に添加した補中益気湯前処理群では、吸着完了を想定した時間にウイルスRNA発現量の減少が認められ、全て同時に添加した群では増加が認められた。また放出を想定した時間には前処理群ではcontrolと同様に増加、同時添加群では増加が認められなかった。さらにBIACOREシステムによりMDCK細胞・インフルエンザウイルス・補中益気湯の親和性を測定した結果、補中益気湯はMDCK細胞の約10万倍インフルエンザウイルスに親和性が高い事が認められた。これらの結果より、補中益気湯は細胞外で補中益気湯-インフルエンザウイルス複合体を形成し、感染初期のウイルス侵入を阻害することによって抗インフルエンザウイルス作用を発揮する可能性が示唆された。

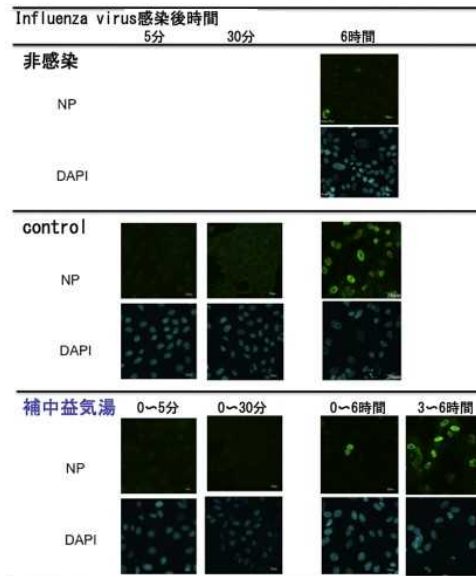


図 4: 補中益気湯によるインフルエンザウイルス侵入阻害作用 (In vitro)

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3件)

Munakata K, Takashima K, Nishiyama M, Asano N, Mase A, Hioki K, Ohnishi Y, Yamamoto M, Watanabe K: Microarray analysis on germfree mice elucidates the primary target of a traditional Japanese medicine juzentaihoto: acceleration of IFN- response via affecting the ISGF3-IRF7 signaling

cascade. BMC Genomics、査読有、13:30
2012

宗形佳織、渡辺賢治：漢方薬十全大補湯が大腸の IFN alpha 産生に及ぼす影響、消化と吸収、査読有、Vol.32 No.2 2010 185 -188
皆川紗代、宗形佳織、渡辺賢治：大腸におけるインターフェロンの産生に対する十全大補湯の作用：MyD88、TLR4 ノックアウトマウスを用いた解析、消化と吸収、査読有、Vol.32 No.2 2010 181 -184

[学会発表](計6件)

宗形佳織、榎本成志、山本雅浩、渡辺賢治：
十全大補湯により誘導される大腸の IFN
産生細胞の解析、和漢医薬学会学術大会、
2010/8/29、京都薬科大学

Munakata K, Yamamoto M, Watanabe K：
Effect of Japanese herbal medicine
(Kampo) on the survival of mice infected
with influenza virus. ICCMR 2010、
2010/5/19、Tromsø, Norway

宗形佳織、渡辺賢治：漢方薬十全大補湯が大腸の IFN alpha 産生に及ぼす影響、第 40
回日本消化吸収学会総会、2009/10/14 -17、
京都

皆川紗代、宗形佳織、渡辺賢治：大腸にお
ける IFN alpha の産生調節機構の解明、第
40 回日本消化吸収学会総会、
2009/10/14 -17、京都

皆川紗代、宗形佳織、山本雅浩、渡辺賢治：
十全大補湯による大腸インターフェロン
産生促進の作用機序、第 26 回和漢医薬
学会学術大会、2009/8/29 - 30、千葉

渡辺賢治、免疫・アレルギー疾患の漢方治
療、第 28 回漢方免疫アレルギー研究会学
術集会、2009/6/27、東京

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

なし

(3)連携研究者

長崎正朗 (NAGASAKI MASAO)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：90396862