

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月21日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19296

研究課題名(和文)臓器拒絶反応に関わる漢方生薬の作用機序の解析と生薬由来成分の同定

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of herbal medicines and identification of ingredients derived from herbal medicines for organ transplant rejection

研究代表者

内山 雅照(Uchiyama, Masateru)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：60713295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：臓器移植における最大の課題である拒絶反応を制御する薬剤の探究のため、保険適応となっている148種類の漢方薬とその構成生薬をマウス心臓移植モデルに投与し、生着延長期間を調査した。148種類の漢方薬の中で、四逆散、小半夏加茯苓湯、六君子湯を調査した。四逆散と小半夏加茯苓湯の投与によって生着期間を認め、制御性T細胞の誘導を確認した。各構成生薬投与群も調査し、甘草投与群のみが生着延長効果を認めため、含有成分のグリチルリチン酸投与群の調査も行い同様の結果を得た。また、六君子湯の調査では、術後1週間の投与により軽度生着延長効果を示すとともに、術後急性期における食事摂取量低下を軽減させる効果も確認した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects on the graft survival of 148 kinds of Japanese herbal medicines recognized officially by Japanese government in the murine cardiac transplant model. In 2016 to 2017, almost all of herbal medicines were completed. Of 148, Shigyaku-san (TJ-35), Shohangekabukuryo-to (TJ-21), and Rikkunshi-to (TJ-43) were furthermore investigated. Our models given TJ-35 and TJ-21 had the significant prolongation of graft survival and could induce the generation of regulatory T cells. In the next study on the mechanisms of each medicine, our models given Kanzo and the main ingredient, Glycyrrhizic acid, could prolong the allograft survivals. In the study of TJ-43, we showed a mild survival prolongation by the administration after grafting and also the improvement of reduction of food intake, suggesting that TJ-43 had the evidence on the treatment of appetite loss after intestinal ileus. This study was published in Transplant International and Transplantation Proceedings.

研究分野：移植免疫

キーワード：移植免疫 漢方薬 漢方生薬 マウス 心臓移植 生着延長 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

- [1] 急性拒絶反応に関してはシクロスポリン等の免疫抑制薬やステロイドの使用により、一定の制御が可能になった。しかし、慢性拒絶反応に関しては、上記の薬剤では制御が困難であり、慢性拒絶反応を制御可能にすることが最新の移植医療の命題である。
- [2] 漢方薬は主にアジア諸国で用いられており、欧米では「補完代替医療 (Complementary and Alternative Medicine(CAM))」の範囲でのみ利用であった。その大きな理由はその「安全性」と「エビデンス不足」に依るものが大きかった。しかし、その「エビデンス不足」打開のために、2009年旭川医科大学の河野らによって、『手術後の腸閉塞に対する大建中湯の有用性とその作用機序 (Kono, et al. Surgery 2009; 146: 837-40)』に関する報告が始まり、徐々に様々な漢方薬のエビデンスの蓄積が成され始めた。

2. 研究の目的

マウス心臓移植モデルを用いて、拒絶反応抑制効果を持つ可能性のある漢方薬・生薬を以下の点において評価し、網羅的に調査する。

- [1] マウス移植心の生着延長期間の測定と制御性T細胞の誘導の有無の確認
- [2] 長期生着移植心の冠血管周囲への炎症性・抗炎症性細胞浸潤評価
- [3] 長期生着移植心の冠動脈内膜肥厚抑制効果の検討
- [4] 高速液体カマトグラーフ法による生着延長効果を持つ漢方生薬内の化学物質の探究と合成

3. 研究の方法

実験モデルはマウスの異所性心臓移植モデルである。方法は原著論文 (Niimi M. J Heart Lung Transplant 2001;20:1123-8.)で詳細に記載されている。手術用顕微鏡は6台あり、その内1台は

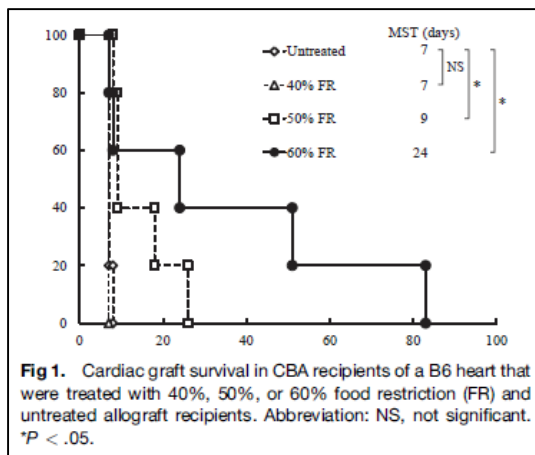
Teaching 可能な眼科脳外科手術用顕微鏡システムであり、多くの国内、国外留学生が実験に使用している。使用する漢方薬、漢方生薬は医薬品の原末を購入している。免疫学的解析設備は現在までに既に整備された状態である。さらに、獨協医科大学医学部マクロ解剖学教室で機材を借用し、免疫組織染色と免疫学的解析等を我々が行っている。

- [1] C57BL/6 マウス心臓を手術用顕微鏡を用いてCBA マウスの腹部に移植すると、無処置 (無治療) では中央値が7~8日で拒絶される。このモデルの移植実験は現在までに1000組以上が行われ、英文論文として多数報告している。現在、帝京大学医学部心臓血管外科学教室では研究代表者の内山雅照が心臓移植を行っており、成功率は99%である。
- [2] 移植手術当日から術後7日目まで、漢方薬 (1~2g/kg/day、titrationも同時に実験) を1日1回全8回経口投与し、移植心の拒絶中央値を測定する。
- [3] 次に、生着延長効果を解析するために漢方薬を構成する生薬を1つ1つ投与し、生着延長効果を示すかどうかを確認する。免疫制御細胞の誘導の解析やIL-10等の抗炎症性サイトカイン測定等の実験を進めていく。
- [4] 生着延長効果が構成生薬そのものの効果であるかどうか、免疫制御細胞の誘導によるものかどうか等をそれぞれ科学的に検証していく。生薬そのものの効果を検証するために、リンパ球混合培養に直接投与する、もしくは精製し刺激したT細胞やB細胞に生薬を投与することでアロー反応性を確認する。また、サイトカイン測定はリンパ球混合培養液内、もしくは移植マウス血清内のヘルパーT細胞type1系サイトカインであるIL-2とIFN- γ 、ヘルパーT細胞type2系サイトカインであるIL-4とIL-10をサンドイッチ法により測定する。

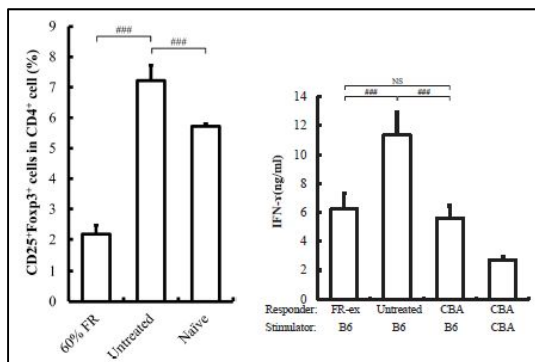
- [5] 免疫制御細胞(regulatory T cell、以下 Treg)の誘導に関しては、養子移植実験を行い検証する。
- [6] 上記検証と同時に、移植心臓の病理組織染色や免疫組織染色を行う。

4. 研究成果

- [1] 食事摂取量調節による免疫制御細胞の誘導と解析 (Food Restriction Prolongs Murine Cardiac Grafts)



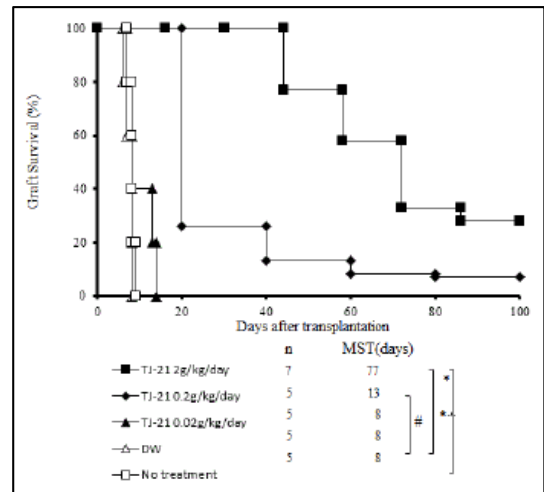
漢方薬を投与する検討の基礎実験として、マウスが摂取するカロリーと免疫反応の関係を調査した。40%、50%制限では免疫反応は変化せず、60%制限をした時に初めて移植免疫反応が破綻することが判明した。破綻理由として、IFN-g 産生細胞の機能低下とともに、免疫制御細胞の誘導不全が同時に発生していた。



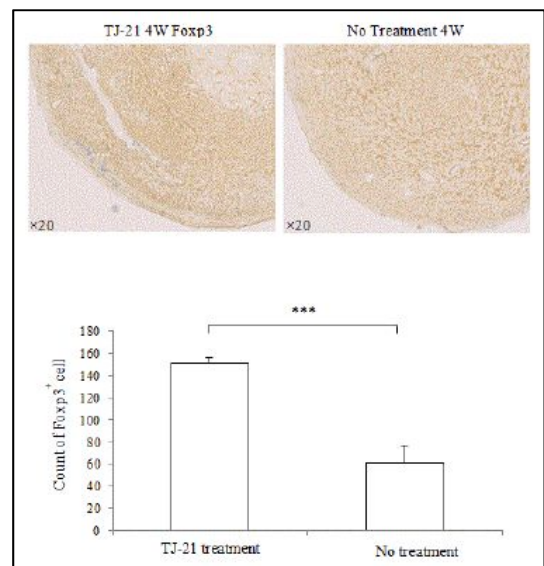
この検討により、様々な薬剤や刺激によるエネルギー摂取制限は免疫反応を破綻させる可

能性が示唆された。

- [2] 小半夏加茯苓湯によるマウス心臓移植片の生着延長効果の検討 (Induction of Regulatory T Cells and Prolongation of Fully Allogeneic Cardiac Grafts by Herbal Medicine, Shohangekabukuryo-to)

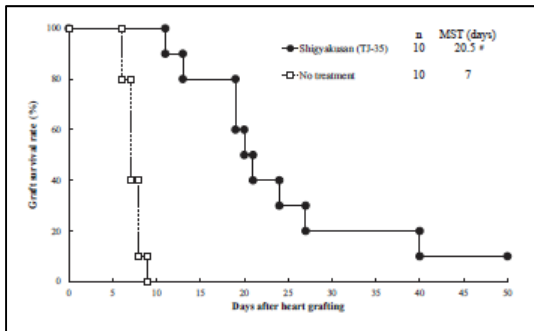


保険適応の 148 漢方薬の中から、半夏・茯苓・生姜から構成される小半夏加茯苓湯 (以下、TJ-21) を調査した。2g/kg/day を術後 7 日間投与したところ、中央値 77 日間の生着延長効果を示した。この効果を調査するために、構成生薬単味投与群、構成生薬一味抜き投与群を作成し、生着延長期間を測定するも、TJ-21 自体を超える実験結果は得られなかった。

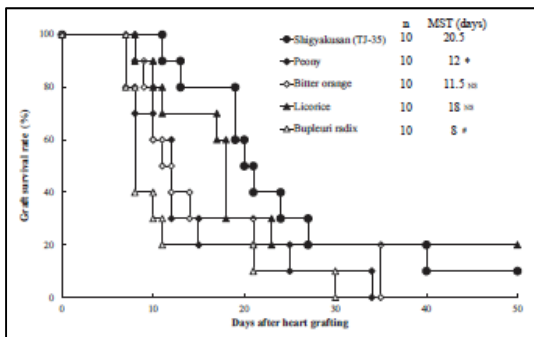


に、生着延長効果の機序を探るために、移植片に浸潤する制御性 T 細胞数や養子移植による機能評価、IL-10 産生量評価を行い、制御性 T 細胞の誘導により心臓移植片生着延長効果を示したことが示唆された。

- [3] 四逆散によるマウス心臓移植片の生着延長効果の検討(Induction of Regulatory CD4+ Cells and Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft by Shigyakusan)
 保険適応の 148 漢方薬の中から、柴胡・芍薬・枳実・甘草から構成される四逆散(以下、TJ-35)を調査した。2g/kg/day を術後 7 日間投与したところ、中央値 20.5 日間の生着延長効果を示した。

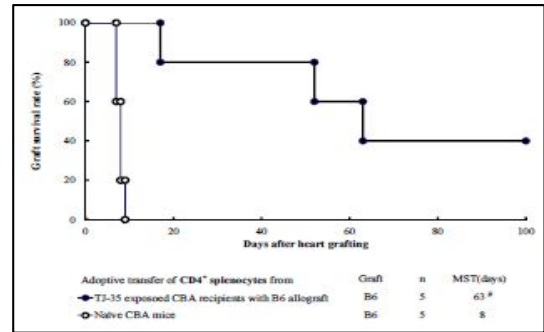


この効果を調査する為に、構成生薬単味投与群の生着延長期間を測定したところ、構成生薬の甘草が TJ-21 自体と同等の結果を得た。甘草単独投与群の機能評価を継続中である。

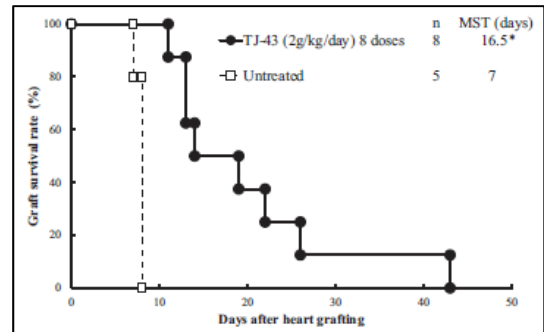


次に、TJ-35 の生着延長効果の機序を探るために、移植片に浸潤する制御性 CD4 陽性 T 細胞数や養子移植による機能評価、IL-10 産

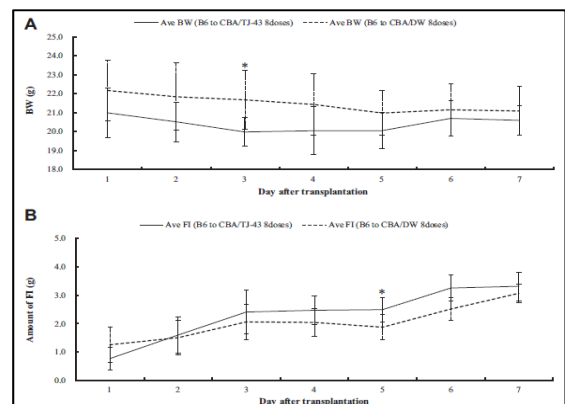
生量評価を行い、制御性 T 細胞の誘導により心臓移植片生着延長効果を示したことが示唆された。



- [4] 六君子湯による食欲低下の改善効果の証明 (Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant Model)



保険適応の 148 漢方薬の中から、食欲増進効果があり、臨床現場で多用される六君子湯(以下、TJ-43)を調査した。2g/kg/day を術後 7 日間投与したところ、中央値 16.5 日と若干の生着延長効果を示した。通常であれば、生着延長効果の機序を探るが、臨床現場における TJ-43 の役割を考慮し、移植マウスの食事摂取量を厳密に評価することで、食欲低下の改善効果を本当に示すのかどうかを調査した。



2g/kg/day を術後 7 日間投与したところ、体重は対照群と同じ傾向を示したが、食事摂取量 (FI) は内服後 2 日目で未内服群よりも増加していた。実際の臨床においても、体重増加効果は無く、食事摂取量を少しだけ増やすという印象と一致した結果であった。

- [5] 漢方薬を構成する 17 生薬投与によるマウス心臓移植片の生着延長効果の検討(Seven Japanese Herbals Prolonged Cardiac Allograft Survival)
保険適応の 148 漢方薬を構成する漢方生薬 17 種類を調査した。構成生薬 (2g/kg/day・1 週間投与) と平均生着延長期間は、甘草 18 日、茯苓 18 日、半夏 17 日、川芎 14 日、芍薬 12 日、黄芩 12 日とであった。これら以外の 10 種は統計学的有意差のある生着延長期間を示さなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- [1] Enzhi Yin, Xiangyuan Jin, Masateru Uchiyama, Qi Zhang, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Yu Guo, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi. Seven Japanese Herbals Prolonged Cardiac Allograft Survival. Transplantation Proceedings (In press), 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2018.04.015
- [2] Yin E, Uchiyama M, and Niimi M. Induction of Regulatory CD4+ Cells and Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft by Shigyakusan. Transplantation Proceedings. 2018;50:274-82. 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2017.12.021
- [3] Yin E, Uchiyama M, and Niimi M.

Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant Model. Transplantation Proceedings. 2018;50:283-92. 査読有

DOI:10.1016/j.transproceed.2017.12.022.

- [4] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Koichiro Uchida, Masafumi Kawamura, Masanori Niimi. Yogurt Feeding Induced the Prolongation of Fully MHC-mismatched Murine Cardiac Graft Survival by induction of CD4+Foxp3+ cells. Transplantation Proceedings. 2017;49:1477-82. 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2017.03.092.
- [5] Uchiyama M, Yin E, Jin X, Niimi M. Food Restriction Prolongs Murine Cardiac Grafts. Transplantation Proceedings. 2015;47:2528-32. 査読有
DOI:10.1016/j.transproceed.2015.09.016
- [6] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Xiangyuan Jin, and Masanori Niimi. Induction of Regulatory T Cells and Prolongation of Fully Allogeneic Cardiac Grafts by Herbal Medicine, Shohangekabukuryo-to. Alternative & Integrative Medicine, 2015,4,4. 査読有
DOI:10.4172/2327-5162.1000198

[学会報告] (計 10 件)

2017 年度 (平成 29 年度)

15th CAST [アジア移植学会](フィリピン・セブ)
11 月 27 日 ~ 30 日開催

- [1] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, and

Masanori Niimi.

7 Components of Traditional Japanese Herbal Medicines Prolonged Survival of Fully Allogeneic Cardiac Grafts in Mice.

- [2] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.

The effects of a traditional Chinese herbal medicine “Huaier” in murine cardiac allograft transplantation.

- [3] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.

Appetite Stimulation by Rikkunshito (TJ-43) Improved Reduction of Food Intake in Murine Cardiac Transplant Model

- [4] Masateru Uchiyama, Enzhi Yin, Masanori Hara, Xiangyuan Jin, Takako Yanagisawa, Akira Inoue, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.

Graft protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor Pravastatin in murine cardiac allograft transplantation.

- [5] Akira Inoue, Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Masafumi Kawamura, and Masanori Niimi.

Glycyrrhizic acid in Licorice prolonged cardiac allograft survival in mice.

2016 年度 (平成 28 年度)

第 67 回日本東洋医学会学術総会 (高松) 6 月 3 日

~ 5 日開催

- [6] 殷恩智、内山雅照、柳澤貴子、水野諭児、星野惠津夫、新見正則
槐耳 (カイジ) 投与によるマウス心臓移植片生着延長効果の検討

TTS[国際移植学会] (香港) 8 月 18 日 ~ 23 日開催

- [7] Enzhi Yin, Masateru Uchiyama, Takako Yanagisawa, Xiangyuan Jin, Satoko Mizuno, Masanori Hara, Shigefumi Matsuyama, Tomohiro Imazuru, Hideo Yagita and Masanori Niimi.
A Traditional Chinese Herbal Medicine “Huaier” Induced Prolongation of Fully MHC-Mismatched Murine Cardiac Allograft.

2015 年度 (平成 27 年度)

第 56 回日本脈管学会総会 (東京) 10 月 29 日 ~ 31 日開催

- [8] 内山雅照、殷恩智、金相元、新見正則
トレッドミル運動によるマウス心臓移植片の生着延長効果と制御性 CD4⁺T 細胞の誘導
- [9] 殷恩智、内山雅照、金相元、新見正則
小半夏加茯苓湯 (TJ-21) 投与によるマウス心臓移植片の生着延長効果と制御性 T 細胞の誘導
- [10] 内山雅照、殷恩智、金相元、新見正則
カロリー制限が免疫に及ぼす影響

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 雅照 (UCHIYAMA, Masateru)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号 : 60713295