

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790472
 研究課題名 (和文) 網羅的遺伝子発現解析等を用いた食物アレルギーモデルに対する葛根湯の治療機序の解明
 研究課題名 (英文) The therapeutic mechanisms of action of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms.
 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)：

近年、食物アレルギー患者数が増加しているが、未だ十分に効果を得られる治療薬はない。そこで、治療薬の開発を目指し消化器症状を発症する病態モデルを用い、葛根湯の有用性を見出した。また、食物アレルギー性消化器症状の発症には、腸管粘膜免疫系の過剰な亢進や粘膜型マスト細胞の浸潤が関与し、葛根湯はこれらを抑制することを明らかにした。さらに網羅的遺伝子解析を行い、葛根湯が腸管の T 細胞の分化や活性化及びその調節因子を制御する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 increased dramatically over the last several decades. However, there is no effective drug for food allergies. My results indicate that kakkonto has therapeutic effects on the development of allergic diarrhea in mouse food allergy model. The development of allergic diarrhea resulted from the enhancement of immune responses and the infiltration of mucosal mast cells in the colon. Kakkonto has immunosuppressive effects on the enhanced immune responses and interferes with the infiltration of mucosal mast cells in the colons of food allergy mouse, leading to improvement of allergic symptoms. Moreover, the transcriptome analyses reveal that the effects of kakkonto is due to the regulation of the differentiation and the activation of T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化管生理学、薬理学、免疫学

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：食物アレルギー、葛根湯、腸管粘膜免疫、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性疾患は患者数の急増から新たな国民病とまで言われている。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り、対応が急務である。食物アレルギーの症状は、湿疹や蕁麻疹等の皮膚・粘膜症状や下痢や嘔吐等の消化器症状などが主であるが、時にはアナフィラキシー・ショックなど生死にも関わる重篤な症状を引き起こす症例も報告されている。疫学的研究・調査により、統計的に腸管粘膜免疫機構の未熟な小児に発症頻度が高いこと、多種多様な食物抗原が存在することなどが報告されている。しかも、未だに発症機序も十分には解明されておらず、特異的で十分に効果が得られる治療方法・治療薬がない。従って、早急に有用な治療方法の開発や治療薬の創出が強く求められている。

漢方薬は、一般的に不定愁訴の多い消化器疾患に対して多く用いられている。また、生体の恒常性維持に重きを置く治療薬体系であり、免疫系のバランスを保つ作用があると考えられている。従って、アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎などの免疫系が関与するアレルギー性疾患にも多く用いられている。従って、食物アレルギー性消化器疾患にも効果が期待される。しかし、食物アレルギー性疾患に対する検討は未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、未だ治療薬のない食物アレルギー性疾患について、ヒトと同様に症状を発症する病態モデルマウスを確立し、治療薬の探索・その機序解明を行うことを目的とする。

近年、食物アレルギーの発症・病態形成には消化管の関与が示唆され、さらに全身免疫系よりも腸管粘膜免疫系の関与が示唆されている。このことから、不定愁訴が多い消化器疾患に多く用いられ、かつ生体の免疫バランスを制御することにより作用する漢方薬に着目した治療薬の検討を行い、葛根湯の有用性を見出した。この葛根湯の治療機序を明らかにすることを目的とする。さらに、複合的な効果を持つ漢方薬（葛根湯）の特性をより明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析を行いその詳細な機序を明らかにし、食物アレルギーの治療薬の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)食物アレルギー性消化器症状発症病態モデルマウスの確立

BALB/c と C57BL/6 マウスを用い、OVA/水酸化アルミニウムゲルによる全身感作を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。

(2)漢方薬のスクリーニング

OVA 経口投与の1時間前に各種漢方方剤を投与し、アレルギー性下痢症状に対する効果を検討した。

(3)葛根湯による治療機序の検討

①「血漿中 IgE 量」の測定

各病態モデルマウスを解剖し血漿を採取し、ELISA 法により OVA 特異的 IgE 発現量を測定した。

②「腸管炎症度の測定

各病態モデルマウスを解剖し摘出した結腸を用い、好中球の浸潤を炎症度の指標として用い、好中球中に存在するミエロペルオキシダーゼ (MPO) を測定した。

③「サイトカイン量」の測定

各病態モデルマウスを解剖し、脾臓（全身免疫系）と結腸（腸管粘膜免疫系）を摘出後 RNA 抽出を行い、リアルタイム PCR により各サイトカイン mRNA 発現量を測定した。

④「粘膜型マスト細胞」の検討

結腸から抽出した RNA を用い、粘膜型マスト細胞に特異的に発現する酵素マスト細胞プロテアーゼ 1 (mMCP1) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。また、抗 mMCP1 抗体を用いた免疫組織化学的染色により、結腸における粘膜型マスト細胞の発現分布を検討した。

(4)網羅的遺伝子発現解析による治療機序解析

各病態モデルマウス結腸から抽出した RNA を用い、Genechip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix)を用いて網羅的に発現遺伝子の定量を行った。

4. 研究成果

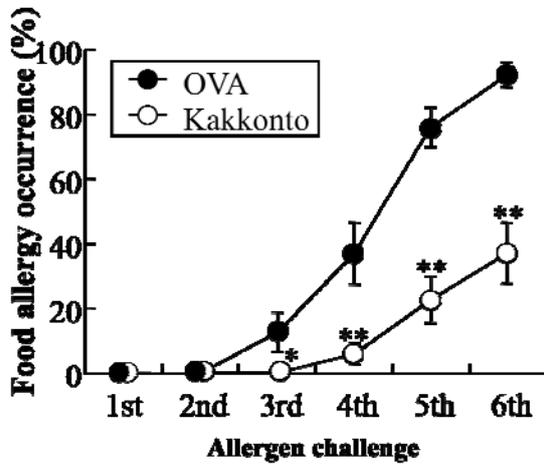
(1)食物アレルギー性消化器症状発症病態モデルマウスと漢方薬の治療効果

食物アレルギー症状の発症には、Th2 型免疫応答の重要性が示唆されている。そこで、Th2 型免疫応答が優位な BALB/c マウスと Th1 型免疫応答が優位な C57BL/6 マウスを用いて検討を行った。OVA を感作した各系統のマウスに OVA 経口投与の回数を重ねると BALB/c マウスのみで消化器症状を発症した。従って、食物アレルギー症状の発症には Th2 型免疫応答優位が関与することが示唆された。

BALB/c マウスにおける食物アレルギー性消化器症状の発症は、OVA 経口投与の繰り返しの伴い増加し、6 回目には 80%以上が消化器症状を発症した (Fig.1 ●, 6 trial n=55-60)。この食物アレルギー性消化器症状に対し、アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻

炎など他のアレルギー症状で有効性が報告されている補中益気湯、小青龍湯、十全大補湯は治療効果を示さなかった。けれども、葛根湯はこの消化器症状の発症率を有意に抑制した (Fig.1 ○, 6 trial n=55-60)。

Fig.1

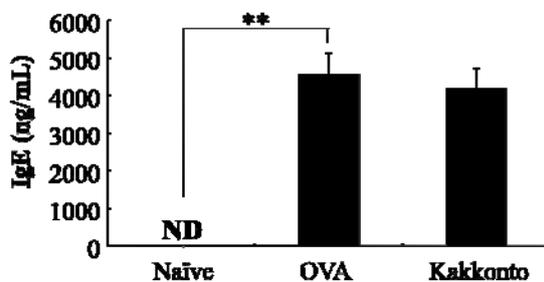


(2)葛根湯の治療機序

一般的に、アレルギー疾患の症状発症にはマスト細胞などの免疫細胞から放出される抗原特異的 IgE の関与が示唆されている。そこで、血漿中 OVA 特異的 IgE についての検討を行った。OVA 特異的 IgE は食物アレルギー性消化器症状の発症により有意に増加したが、葛根湯投与によって消化器症状が抑制されたにもかかわらず、減少しなかった (Fig.2)。つぎに、マウス系統の検討から関与が示唆された全身免疫系の Th2 型免疫応答について検討を行った。全身免疫系の検討として脾臓における IL-4 (Th2 系サイトカイン) mRNA 発現の測定を行った。全身免疫系 (脾臓) では、消化器症状の発症に伴い IL-4 mRNA 発現量が上昇したが、葛根湯投与により減少しなかった。

このことから、葛根湯の主要な効果は全身性ではないことが示唆された。

Fig.2



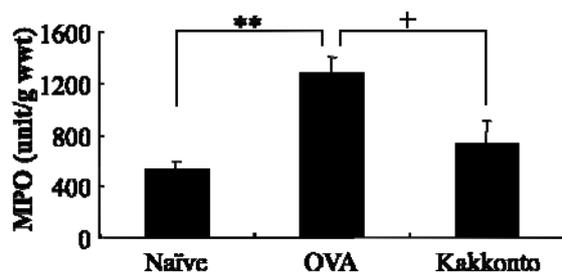
(3)葛根湯の消化管に対する治療機序

つぎに、アレルギー症状が発症する結腸に

対する葛根湯の効果を検討した。

MPO 活性の測定により、食物アレルギー性消化器症状の発症に伴い結腸で炎症が起きていることが明らかになった。この炎症は、葛根湯の投与により MPO 活性が減少することから、葛根湯は症状発症部位である結腸に対して作用することが示唆された (Fig.3)。

Fig.3



そこで、詳細な機序検討を行うために結腸を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。食物アレルギー性消化器症状の発症に伴い、各種サイトカインやケモカインの発現増加が確認された。一方、葛根湯投与により、これら各種サイトカインやケモカインの発現増加が抑制された (Table 1)。さらに、詳細な検討を行うためにリアルタイム PCR 法を用い、Th2 系サイトカイン mRNA 発現量が食物アレルギー性消化器症状の発症に伴い増加し、葛根湯投与によりその増加が抑制されることを明らかにした。また、近年アレルギー疾患と関連が報告され、サイトカインの分化を制御する Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) の発現も、食物アレルギーの発症に伴い増加し、葛根湯投与により減少した (Table 1)。このことから、葛根湯は SOCS3 の発現を制御することにより、腸管粘膜免疫系を制御し消化器症状を改善することが示唆された。

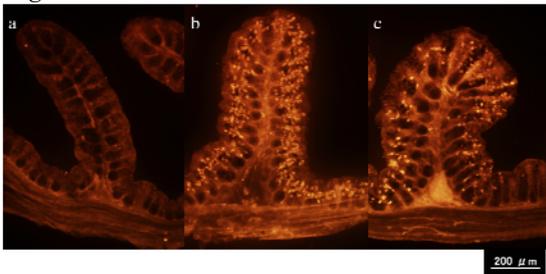
Table1. List of selected genes by Microarray analysis

Accession	Annotation	Fold change Log Ratio	
		OVA/Naive	Kakkonto/OVA
NM_011329	chemokine (C-C motif) ligand 1	5.7	-3.2
U58712	chemokine (C-C motif) ligand 12	2.8	-1.8
AF065933	chemokine (C-C motif) ligand 2	3.4	-2.5
AF261075	chemokine (C-C motif) ligand 24	4.8	-2.3
NM_011337	chemokine (C-C motif) ligand 3	6.7	-3.1
AF128218	chemokine (C-C motif) ligand 4	3.2	-2.8
AF128199	chemokine (C-C motif) ligand 7	4.1	-3.1
NM_021443	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.2	-1.4
NM_048176	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	4.4	-2.9
NM_049148	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5.6	-4.2
NM_049141	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	6.8	-2.3
BC011437	interleukin 1 beta	3.2	-1.6
NM_018743	interleukin 1 receptor-like 1	2.4	-1.4
NM_018548	interleukin 10	2.3	-2.8
NM_048325	interleukin 13	4.7	-2.5
NM_021283	interleukin 4	2.4	-2.1
NM_031168	interleukin 5	8.8	-4.4
NM_048578	mast cell protease 1	3.8	-0.9
NM_048571	mast cell protease 2	5.6	-1.0
BC3226198	mast cell protease 4	8.3	-1.9
NM_018789	mast cell protease 5	3.9	-1.6
NM_018781	mast cell protease 6	2.1	-2.2

(4)葛根湯の粘膜型マスト細胞に対する効果

近年、マスト細胞には結合組織型マスト細胞と粘膜型マスト細胞の2種類の存在が明らかになっている。IgEの放出には結合組織型マスト細胞が関与し、プロテインキナーゼの放出には粘膜型マスト細胞が関与することが報告されている。本病態モデルマウスに対する葛根湯の治療効果には、IgEが関与しないことから、結合組織型マスト細胞は関与しないことが示唆される。粘膜型マスト細胞に特異的に発現するmMCP1の食物アレルギー性消化器症状に伴う増加を、葛根湯が抑制することが明らかになった(Table.1)。また、抗mMCP1抗体による免疫組織化学的検討により、葛根湯が腸管における粘膜型マスト細胞の食物アレルギー性消化器症状の発症に伴う浸潤を抑制することが明らかになった(Fig.4)。申請者は、この粘膜型マスト細胞が消化管特異的に欠損するマウスを用いた検討により、粘膜型マスト細胞が食物アレルギー性消化器症状に必須であることを明らかにしている。従って、粘膜型マスト細胞の浸潤抑制が葛根湯による食物アレルギー性消化器症状治療機序の一つであることが示唆された。

Fig. 4



食物アレルギー性消化器疾患には、その症状発症部位である消化管の関与が重要であり、葛根湯はこの消化管に対する効果を持ち、治療効果を示すことを明らかにした。また、その作用は、一つの効果ではなく、腸管粘膜免疫系の抑制、粘膜型マスト細胞の浸潤の抑制、炎症の抑制等の複合的な効果により作用していることが示唆された。

葛根湯は有効ではあるが、完全に食物アレルギー性症状を治療することは出来なかった。従って、今後のより詳細な治療機序の検討により、葛根湯が有効な食物アレルギー性患者を明らかにし、より良い治療効果を期待できることとなる。また、葛根湯は複数の生薬により構成され、多くの薬効成分を含んでおり、葛根湯による複数の効果が、複数の薬効成分による作用であることが示唆される。従って、今後のより詳細な有効成分の検討により、未だ十分に効果がある治療薬のない食物アレルギーの新たな治療薬の確立に繋がると推察される。つまり、これらの検討が葛根湯をモディファイした、より食物アレル

ギー性疾患に有効な治療薬の創出や、薬効成分からの新規の治療薬の開発が期待できる。

本研究は葛根湯が食物アレルギー性疾患の治療薬シードと成り得る可能性を示した。

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5件)

- ① 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.* 査読有;33:142-5. 2010
- ② 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.* 査読有;584:111-8. 2010
- ③ Watanabe T, Yamamoto T, Yoshida M, Fujiwara K, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shimada Y, Kadowaki M.: The Traditional Herbal Medicine Saireito Exerts Its Inhibitory Effect on Murine Oxazolone-Induced Colitis via the Induction of Th1-Polarized Immune Responses in the Mucosal Immune System of the Colon. *Int Arch Allergy Immunol.* 査読有;151:98-106. 2009
- ④ 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.* 査読有;148:175-185. 2009
- ⑤ Leng Y, Yamamoto T, Kadowaki M.: Alteration of cholinergic, purinergic and sensory neurotransmission in the mouse colon of food allergy model. *Neurosci Lett.* 査読有;445:195-198. 2008

[学会発表] (計22件)

- ① 山本 武, 藤原加苗, 氣賀澤愛, 吉田益奈子, 門脇 真: 食物アレルギー性消化器症状誘発病態モデルにおける葛根湯による制御性T細胞への分化亢進を介する腸管粘膜免疫系の制御機構. 第26回和漢医薬学会学術大会, 2009, 8.

29-30, 千葉.

- ② Yamamoto T., Fujiwara K., Yoshida M., Kadowaki M.: Effect of kakkonto, a traditional Japanese herbal medicine, on the differentiation of CD4⁺ T cells in the colon of food allergy model mouse. International Congress of Mucosal Immunology, 2009, 7. 5-9, Boston, U. S. A.
- ③ 藤原加苗, 山本 武, 吉田益奈子, 柴原直利, 門脇 真: 食物アレルギー性消化器症状誘発モデルにおける葛根湯の有効性とその免疫学的作用機序. 日本薬学会北陸支部 第119回例会, 2008. 11. 9, 金沢.
- ④ 藤原加苗, 山本 武, 柴原直利, 門脇真: 消化器症状を誘発する食物アレルギーモデルマウスにおける葛根湯の治療効果とその有効生薬. 第25回和漢医薬学会学術大会, 2008, 8. 30-31, 大阪.
- ⑤ 山本 武, 吉田益奈子, 藤原加苗, 柴原直利, 門脇 真: 食物アレルギーモデルマウスにおける葛根湯の全身免疫系および腸管粘膜免疫系に対する免疫調節作用. 第25回和漢医薬学会学術大会, 2008, 8. 30-31, 大阪.

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし