

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 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590772

研究課題名（和文）漢方薬の免疫調節性分泌膜小胞を介した薬効発現機序の解析に関する研究

研究課題名（英文）Study on clarification of action mechanism of a Kampo medicine, Hochuekkito through immunomodulating exosome

研究代表者

山田 陽城（YAMADA HARUKI）

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：60096691

研究成果の概要（和文）：補中益気湯の投与により発現が変化するタンパク分子をトランスクリプトミクス分析により特定した。補中益気湯の投与によるパターン認識分子(NOD2、TLR9)、制御性分子(IRAK-M)や補助分子(RANKL)の発現増強が示唆された。さらに、末梢血血清から得られた exosome の western blotting による分析から、NOD2 含有量が増加する可能性が推定された。

研究成果の概要（英文）：In this study, effect of oral administration of a Kampo medicine, Hochuekkito was analyzed on expression of immunologically-relevant protein molecules in exosome of mice. Analyses of mRNA expression suggest that oral administration of Hochuekkito up-regulates mRNA of NOD2, TLR9, IRAK-M (intestinal epithelia) and RANKL (Peyer's patches) of mice. Western blotting analysis of exosome from peripheral blood of mice assumes that NOD2 content in the exosome may increase by oral administration of the formula.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：漢方薬、補中益気湯、液膜小胞、粘膜免疫機構、腸上皮細胞、プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

漢方薬の補中益気湯は、近年、無作為化臨床試験などの実施により、喘息、アトピー性皮膚炎や COPD の治療に西洋医学的薬物治療の補助薬として治療ガイドラインに収載されている。一方、本薬剤は、慢性化した風邪症候群の回復促進、外科手術後の感染予防やがん患者の全身状態の改善に

も有効との臨床報告がなされており、免疫増強と免疫調節の相反する両面的な作用を有する薬剤として理解されている。本薬剤の薬効も免疫増強（免疫低下、感染やがんモデル動物への作用）と免疫調節（気道炎症、アトピー性皮膚炎様や食物アレルギーモデル動物への作用）の両面から基礎研究的に証明されているが、この両面的な薬

効が何故に発現されるかについてはまったく明らかとはなっていない。その解明は本薬剤を臨床で用いる上での選択基準を提示しうするため、重要な課題と考えられる。近年、免疫担当細胞は MHC class I, II や heat shock protein などの 200 数十種にわたる種々のタンパクを表出および内包した脂質二重膜からなる数十 nm の大きさの膜小胞 (exosome) を常時分泌していること、さらに近傍および遠隔の組織中の免疫細胞の機能が従来のサイトカイン産生・分泌などを介した機序とともに、この膜小胞により調節されること等が明らかとなっている。これまでに本研究課題申請者は、補中益気湯が免疫低下モデルである加齢マウスに対し、腸管免疫系を介して上気道粘膜免疫機構に免疫増強的に作用すること、その標的はパイエル板免疫細胞と腸上皮細胞であることを明らかとした。これらのことから、本薬剤の粘膜や全身免疫系に対する作用発現に腸管や全身の免疫細胞から分泌される膜小胞が関与している可能性が想定される。

2. 研究の目的

臨床的に頻用される補中益気湯の両面的な免疫薬理作用の本質的なメカニズムの一端を解明するため、この膜小胞に焦点を当て、補中益気湯の投与後の血中の膜小胞を構成する免疫関連タンパクの組成の変化を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Exosome の調製と含有タンパクの分析

BALB/c マウスに補中益気湯エキス (1g/kg/day) を 1 週間経口投与後、末梢血を採血し、血清を調製した。本血清について超遠心分離法もしくは exoquick を用いた簡易 exosome 分離法を用いて exosome を調製した。含有タンパクについては、SDS-PAGE を用いた電気泳動後、CBB 染色、銀染色および各種の抗免疫関連分子抗体を用いた Western Blotting 法により分析を行った。

(2) ラット十二指腸由来株化上皮細胞

(IEC-6) を用いた補中益気湯の免疫機能調節活性の検討法
5% FBS 含有 DMEM 培地で培養した IEC-6 細胞に補中益気湯を添加し、3~24 時間刺激後、mRNA を回収した。各種の免疫関連因子 mRNA 発現の変化について RT-PCR により分析した。

(3) Methotrexate 投与マウスを用いた補中益気湯投与により発現増強する免疫関連因子の探索法

若年 BALB/c マウス (7 週齢、雌) に methotrexate (100 mg/kg, i.p.) を単回投与後、同時に補中益気湯 (1 g/kg/day) を連日経口投与した。空腸を回収後、空腸組織での免疫関連因子 mRNA の発現を realtime PCR により分析した。

(4) 加齢マウスへの補中益気湯の経口投与により変化するパイエル板免疫関連因子の探索法

6 ヶ月齢の BALB/c マウスに 3 日間 FTY-720 (1.25 mg/kg/day) を経口投与し、加えて同期間補中益気湯 (1 g/kg/day) を経口投与した。パイエル板を回収後、各種の免疫関連因子について realtime PCR により分析した。

4. 研究成果

(1) マウスへの補中益気湯の投与による exosome 上のタンパクの発現変化の解析

加齢 BALB/c マウスに 1 週間補中益気湯 (1g/kg/day) 経口投与後、末梢血血清から超遠心分離法を用いて exosome を分離し、SDS-PAGE にて分析を行った。回収された exosome タンパクの収量が低かったため、泳動したタンパクを銀染色にて染色した結果、数十種類のタンパクバンドが観察され、30 と 48kDa のバンドでは補中益気湯の投与により増加、また 34kDa のバンドは低下していることが推定された (図 1)。しかしながら、再現性を検討した結果、タンパクバンドの変化は観察されなかった。

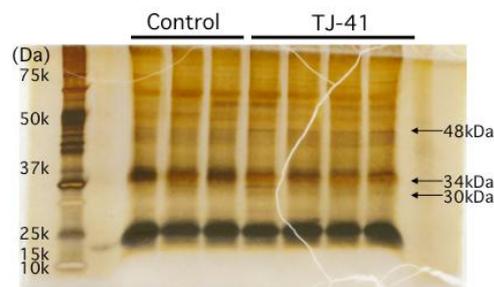


図 1 exosome 中に含まれるタンパクの SDS-PAGE

(2) マウスへの補中益気湯の投与により発現変化する免疫関連因子のトランスクリプトミクス解析

これまでに、exosome からは 200 種を超えるタンパクが報告されている。補中益気湯の投与による含有タンパクの変化が小さい場合、通常の SDS-PAGE ではその差を検出できない可能性が考えられる。そこで、マウスへの補中益気湯の投与により変化する免疫関連因子についての情報を探索し、本因子の exosome 上での発現を western blotting により解析することを試みた。

ラット十二指腸由来の株化上皮細胞 (IEC-6) を補中益気湯により 3 時間刺激後、上皮細胞に発現する膜結合性の免疫関連因子の mRNA 発現変化を RT-PCR により解析した。その結果、TLR2, 4, 5 および 9, NOD2, VCAM-1

や Fas の mRNA 発現が増強されることが示された。そこで、TLR 類に着目し、同様の発現上昇が in vivo でも起こるかについて検討を試みた。若年 BALB/c マウスを methotrexate (100 mg/kg, i.p.) で処置することにより、小腸上皮傷害モデルマウスを作成し、補中益気湯を 1~10 日間経口投与した。マウス空腸について TLR 類の mRNA 発現の変化をモニターした結果、補中益気湯投与 7~10 日後の空腸において TLR9 および NOD2 mRNA の発現増強が観察された。また、methotrexate 投与 1~3 日後では methotrexate による小腸上皮傷害により上皮組織での炎症が起こり、補中益気湯未投与群では TNF- α などの炎症性サイトカイン類の mRNA の発現増強が観察された。これに対し、補中益気湯投与群ではこれらの炎症性サイトカインの発現量は有意に低下した。制御性の免疫関連因子の発現量の解析から、補中益気湯投与群では TLR 類の炎症性シグナル伝達カスケードを抑制的に制御する IRAK-M の mRNA が有意に上昇することが明らかとなった。

一方、加齢マウスにパイエル板からのリンパ球の遊出を止めるため FTY720 (1.25 mg/kg/day) を 3 日間経口投与し、同期間補中益気湯 (1 g/kg/day) を経口投与した。パイエル板を採取後、リンパ球上の補助分子である CD40L や RANKL の mRNA 発現変化について検討した。その結果、補中益気湯の投与により、パイエル板での CD40L および RANKL mRNA の発現増強が観察された。

(3) マウスへの補中益気湯の投与による exosome のパターン認識分子および補助分子タンパクの発現変化の解析

上記での検討から、免疫組織において、補中益気湯の投与によりパターン認識分子の TLR9 および NOD2、補助分子の RANKL、CD40L や接着分子の VCAM-1、および制御性分子の IRAK-M の発現が増強されることが推定された。このことから、免疫組織から分泌され、末梢血中に検出される exosome 中にこれらの免疫関連タンパク分子が補中益気湯投与により増加することが期待される。

加齢 BALB/c マウスに補中益気湯 (1 g/kg/day) を 1 週間経口投与後、末梢血血清から Exoquick 法により exosome を調製した。本 exosome 中の TLR9 および NOD2 を Western blotting により解析した結果、補中益気湯の投与の有無にかかわらず exosome 中に TLR9 および NOD2 が含まれることが明らかとなった。さらに、補中益気湯の代わりに水を投与したマウスと比較したところ、TLR9 量の変化は認められなかったが、NOD2 については有意ではなかったものの、その含量が増える可能性が考えられた (図 2)。さらに、投与日数や検討するマウスの匹数を増やし再検討す

る必要があると考えられる。

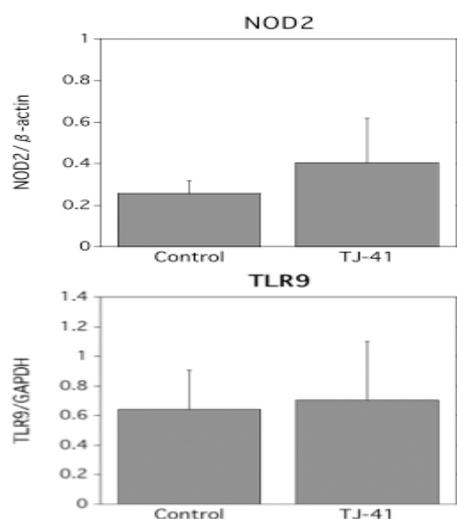


図 2 補中益気湯の投与によるマウス血清 exosome での NOD2 および TLR9 の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) 山田陽城、清原寛章、松本 司、永井隆之 : 漢方薬と免疫、小児科診療、73, 387-391、査読無 (2010)
- 2) Kiyohara H, Nonaka K, Sekiya M, Matsumoto T, Nagai T, Tabuchi Y, Yamada H: Polysaccharide-containing macromolecules in a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito: Dual active ingredients for modulation of immune functions on intestinal Peyer's patches and epithelial cells, Evid. Based Complement. Alternat. Med., in press (doi: 10.1093/ecam/nep193)

[学会発表] (計 19 件)

- 1) 関谷路子、清原寛章、矢部武士、丸山弘子、山田陽城: 補中益気湯のパイエル板免疫機能に対する調節作用の解析、日本薬学会第 132 年会、2012/3/29 (札幌)
- 2) 山田陽城: 漢方薬の作用メカニズムと作用成分の解析—最近の進歩—、第 11 回日本臨床中医薬学会学術総会、2011/11/12 (東京)
- 3) 山田陽城: 漢方医薬学の研究が目指すもの、日本生薬学会第 58 回年会、2011/9/24 (東京)
- 4) 山田陽城: 和漢医薬学の研究力の育成—薬学や学際領域からの視点—、第 28 回和漢医薬学会学術大会、2011/8/28 (富山)

- 5) Yamada H, Kiyohara H, Nagai T, Yabe T : Recent progress on pharmacological evaluation of Kampo medicines for clinical application and new drug development, 2011 American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, 2011/8/1 (San Diego)
- 6) 山田陽城: 漢方医薬学の研究の目指すもの、日本薬学会第 131 年会、2011/3/31 (静岡)
- 7) 関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田陽城: 抗菌タンパク発現増強剤としての補中益気湯、日本薬学会第 131 年会、2011/3/28 (静岡)
- 8) 山田陽城、清原寛章、永井隆之、松本 司、矢部武士: 漢方薬の作用メカニズムの解析から学ぶこと、第 18 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2010/11/12 (東京)
- 9) 山田陽城: 漢方薬の薬効解明と創薬への応用、第一回全国共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウムー酵素学から始まる新たな創薬研究ー、2010/9/10 (東京)
- 10) 関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田陽城: 腸上皮細胞におけるパターン認識分子発現に対する補中益気湯の作用、第 27 回和漢医薬学会学術大会、2010/8/29 (京都)
- 11) 西本裕紀、関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田陽城: 補中益気湯の腸上皮細胞免疫機能調節成分の解析、第 27 回和漢医薬学会学術大会、2010/8/28 (京都)
- 12) Yamada H, Kiyohara H, Nagai T: Recent progress on elucidation of immunomodulating activity and its action mechanism of Kampo (Japanese herbal) medicines, 9th Meeting of Consortium for Globalization of Chinese Medicine (CGCM), 2010/8/24 (Hong Kong)
- 13) 山田陽城: 漢方薬の効き目 ～薬理作用とそのメカニズムから見た特徴～、第 33 回茨城県東洋医学研究会学術講演会、2010/7/1 {茨城}
- 14) 関谷路子、清原寛章、山田陽城: 補中益気湯の腸上皮細胞に対する機能調節作用の解析、日本薬学会第 130 年会、2010/3/30 (岡山)
- 15) 西本裕紀、関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田陽城: 補中益気湯の腸上皮細胞に対する作用成分の解析、日本薬学会第 130 年会、2010/3/29 (岡山)
- 16) 山田陽城: 漢方薬の作用メカニズムの解明とその応用、第 29 回家庭薬開発研究シンポジウム、2010/2/18 (富山)
- 17) 山田陽城: 基礎研究からわかった漢方

薬の作用メカニズム、第 9 回日本臨床中
 医薬学会学術大会、2009/10/24 (東京)

18) 関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田
 陽城: 腸上皮細胞の免疫機能に対する補
 中益気湯の作用の解析、第 26 回和漢医
 薬学会学術大会、2009/8/30 (千葉)

[その他]
 ホームページ等
 北里大学・北里生命科学研究所・和漢薬物学
 研究室
 (http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/bio_pharm/index.html)

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
 山田 陽城 (YAMADA HARUKI)
 北里大学・大学院感染制御科学府・教授
 研究者番号: 60096691
 - (2) 研究分担者
 ()
 研究者番号:
 - (3) 連携研究者
 清原 寛章 (KIYOHARA HIROAKI)
 北里大学・大学院感染制御科学府・准教授
 研究者番号: 70161601
 永井 隆之 (NAGAI TAKAYUKI)
 北里大学・大学院感染制御科学府・講師
 研究者番号: 00172487
 矢部 武士 (YABE TAKESHI)
 北里大学・大学院感染制御科学府・講師
 研究者番号: 40239835