

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590895

研究課題名(和文)小腸上皮細胞の免疫機能を介する補中益気湯の薬効発現機構の解析

研究課題名(英文)Elicidation of action mechanism of Hochuekkito through immunomodulation of intestinal epithelial cells

研究代表者

清原 寛章 (Kiyohara, Hiroaki)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：70161601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：補中益気湯は免疫弱者の呼吸器感染症の罹患予防効果や抗がん剤による消化管での粘膜炎症に伴う食欲不振の改善に用いられるがその作用メカニズムは不明な点が多い。本研究では抗がん剤で誘発される小腸粘膜炎症に対し、小腸上皮組織において炎症性シグナルカスケードの制御性アダプター分子の発現増強を補中益気湯が起こすこと、本漢方薬の上気道粘膜免疫系に対する賦活活性発現の作用成分が含有されるオリゴ糖群であること、本オリゴ糖がパイエル板免疫細胞や小腸上皮細胞に対する免疫調節作用を示すこと、および本オリゴ糖群がメソトレキセート誘発小腸上皮障害を一部の制御性アダプター分子の発現増強を介して改善することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Japanese herbal prescription "Hochuekkito" has been used for prevention of upper respiratory infection and treatment of anorexia based on intestinal mucositis induced by anti-cancer chemotherapy, however, action mechanism of the prescription for these clinical effects have not been well clarified. The present study proposed that 1) the prescription enhanced induction of regulative adaptor molecules such as IRAK-M to result improvement of drug-induced mucositis, 2) oligosaccharides in the prescription play as active ingredients for enhancement of mucosal immune system of upper respiratory tract, 3) the oligosaccharides could modulate immune function of immunocompetent cells in Peyer's patches as well as epithelial cells of small intestine, 4) the oligosaccharides could improve drug-induced mucositis in small intestine through induction of IRAK-M.

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科一般、東洋医学

キーワード：補中益気湯 メソトレキセート 粘膜炎症 上気道粘膜免疫系 小腸上皮細胞 パイエル板

## 1. 研究開始当初の背景

補中益気湯はこれまでに比較臨床試験において、免疫虚弱者や COPD 患者での呼吸器感染症や MRSA 尿症に対する予防・治療効果、抗がん剤投与患者での全身倦怠・消化器症状の改善、アトピー性皮膚炎患者に対する有用性などが報告され、現代医療において最も頻用される漢方製剤の1つとなっている。本漢方薬は漢方医学的には消化器機能の低下した病態が大きな目標となっている。しかしながら、本漢方薬の消化器機能へのいかなる作用が呼吸器感染症の予防効果や抗がん剤投与患者での消化器症状の改善効果の発現につながるかについては不明の点が極めて多い。

## 2. 研究の目的

小腸上皮細胞の中には抗菌ペプチドや同タンパクの産生・分泌など先天性防御機構に関与するパネート細胞や内分泌細胞が存在する。また、小腸上皮細胞全般は Toll-like receptor (TLR)類などのパターン認識分子を発現し、種々の免疫関連因子や E-cadherin などの接着分子の分泌・発現を介して上皮直下の樹状細胞の機能調節を行う。さらに、この樹状細胞は腸管膜リンパ節移送後にパイエル板から流入するリンパ球と相互作用することにより、機能調節や各免疫組織への指向性を賦与し、最終的に腸管からホーミング受容体依存的に上気道や皮膚、泌尿生殖器などの遠隔の局所粘膜免疫機構に移送されたリンパ球がこれらの遠隔粘膜免疫組織の維持・調節に関与することも近年明らかにされつつある。このため、補中益気湯の腸管局所での作用と上気道粘膜免疫系への作用の発現が小腸上皮細胞を介して発現する可能性が考えられる。そこで、本研究では補中益気湯の小腸上皮細胞に対する作用を解析するとともに、当該上皮細胞に対する作用の上気道粘膜免疫系への作用の関与についても併せて解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) methotrexate 誘発小腸上皮障害モデルマウスの作成: 若年 BALB/c マウス(雌、7週齢)

に methotrexate (100 mg/kg)を腹腔内に単回投与することにより粘膜障害モデルマウスを作成した。本モデルマウスに methotrexate 投与直後から補中益気湯エキス原末 (1g/kg/day)を3日間連日経口投与した。マウス空腸を採取後、real-time PCR により炎症関連因子 mRNA の発現を測定した。

2) インフルエンザワクチン経鼻接種モデルマウスの作成: 加齢 BALB/c マウス(雌、6ヶ月齢)に 5 µg/mouse の用量でインフルエンザプリットワクチン(H1N1 亜型)を経鼻接種することにより2次免疫マウスを作成した。補中益気湯エキス原末(0.1 g/kg/day)および分画画分(エキス原末 0.1 g/kg/day 相当量)を1次免疫1週間前より実験終了まで連日経口投与した。2次免疫2週間後に生体試料を採取し、インフルエンザウイルス特異的抗体価を ELISA 法により測定した。

## 4. 研究成果

1) methotrexate 誘発小腸上皮障害に対する補中益気湯の作用

雌性 BALB/c マウスに methotrexate を腹腔内投与することにより作製した小腸粘膜障害マウスでは投与1日後から絨毛上皮の脱落が始まり、3日目に至ってもその障害は持続して観察された。一方、本障害モデルマウスに補中益気湯エキス製剤原末(TJ-41, 1 g/kg/day)を連日経口投与した結果、小腸上皮障害は1日目では水投与群と比較して差異は認められなかったが、3日目では障害の程度は軽減していた。さらに、粘膜層への細胞浸潤が補中益気湯エキスの投与により改善していたことから小腸上皮組織での炎症の改善が関与している可能性が考えられた。そこで、炎症性サイトカイン類の mRNA の発現変化を定量的 PCR により検討したところ、補中益気湯エキスの投与2日目から TNF- $\alpha$  および IL-1 mRNA の発現が本漢方薬エキスの投与により軽減していた。また、小腸上皮組織内の IL-1 タンパクの軽減傾向も投与3日目に観察された。

補中益気湯エキス原末の小腸粘膜炎症の改善作用のメカニズム解析を目的に、TLR や IL-1R のアダプター分子である MyD88 下流の

シグナルカスケードに關与する制御性分子の発現に対する補中益氣湯エキス原末の投与の影響を検討した。これまでに腸管での粘膜炎症の制御に IRAK-M が關与することが報告されていることから IRAK4 の制御性アダプター分子の IRAK-M および TOLLIP の mRNA 発現に対する作用を検討した。その結果、methotrexate 投与1日後の小腸上皮組織で補中益氣湯エキス原末の投与により IRAK-M mRNA の発現は有意に増強されたが、TOLLIP mRNA の発現変化は觀察されなかった。そこでさらに MyD88 の制御性分子の SIGIRR, Cyld, ST2, A20 および Triad3 の mRNA 発現の検討を行ったところ、補中益氣湯エキス原末の投与で SIGIRR, A20 および Cyld mRNA に対する発現増強作用が確認された。また、ラット小腸上皮細胞株の IEC-6 細胞およびマウスマクロファージ株化細胞の RAW264.7 細胞を用いた検討から、補中益氣湯エキス原末の添加によりいずれの細胞でも IRAK-M mRNA 発現に対する増強作用が認められた。以上のことから、補中益氣湯エキス原末は methotrexate による小腸粘膜炎症に対し、小腸上皮細胞や粘膜下層マクロファージでの制御性分子の IRAK-M, SIGIRR, A20 および Cyld の発現増強を介して粘膜炎症を改善する作用を有することが強く示唆された。

## 2) 上気道粘膜免疫系賦活化作用発現への補中益氣湯含有成分の關与

これまでに補中益氣湯エキス原末の投与は加齢マウスでの上気道粘膜免疫系の賦活化を惹起し、経鼻接種抗原に対する抗原特異的抗体産生を増強することが明らかとなっている。さらに、補中益氣湯エキス原末を分画した場合、その分画画分のいずれにも上記の上気道粘膜免疫系の賦活化作用を見出すことができず、含有成分の複合効果が重要であることが示唆されている。そこで、この複合効果の発現に關与する含有成分について検討を試みた。本漢方薬エキスの高分子画分と MeOH 可溶性の低分子含有画分を再混合し、経鼻接種インフルエンザワクチンの2次免疫モデルマウスへ経口投与した結果、上気道での抗原特異的抗体価に対する産生増強活性は認められなかった。そこで、水溶性の中程度

の分子量の分画画分中の含有成分を分析した結果、種々のオリゴ糖が含まれていることが明らかとなった。そこで、エキス原末の高分子画分、MeOH 可溶性の低分子含有画分およびオリゴ糖画分を再混合し、上気道粘膜免疫系に対する作用を検討した。その結果、これらの3種の画分の再混合により上気道での抗原特異的抗体産生は有意に増強され、補中益氣湯エキス原末中のオリゴ糖が免疫系に対し何らかの作用を及ぼす可能性が考えられた。

## 3) 補中益氣湯に含有されるオリゴ糖のパイエル板免疫細胞および小腸上皮に対する作用

補中益氣湯エキス原末には鎖長の異なるオリゴ糖が含まれていた。そこで、中鎖長(重合度 10-4 程度)および短鎖長(重合度 4-2 程度)のオリゴ糖画分を調製し、FTY720 (1.25 mg/kg/day, p.o.)で3日間前処置することによりパイエル板からのリンパ球の遊出を阻害した雌性 BALB/c マウス(6ヶ月齢)にこれらのオリゴ糖画分(中鎖長オリゴ糖画分: 13.1 mg/kg/day、短鎖長オリゴ糖画分: 29.1 mg/kg/day、補中益氣湯エキス原末 1g/kg/day 相当量)を3日間経口投与後、パイエル板を採取し、各種免疫関連因子の mRNA 発現の変化を real-time PCR により解析した。その結果、Tリンパ球サブセットでは Foxp3 や GATA3 mRNA 発現の有意な増加が認められ、制御性 Tリンパ球や Th2 リンパ球の誘導促進が推定された。また、サイトカイン類では IL-4, IL-6 や IL-10 mRNA の発現促進が中・短鎖長のオリゴ糖画分いずれの投与群でも觀察された。

一方、methotrexate 誘発小腸粘膜障害モデルマウスに補中益氣湯エキス由来の中鎖オリゴ糖画分を経口投与した結果、補中益氣湯と同様に methotrexate 投与2日目において炎症性サイトカイン(TNF- および IL-1)の mRNA 発現の抑制が觀察されるとともに投与1日目での IRAK-M mRNA 発現の有意な上昇が認められたが、その他の制御性因子では SIGIRR mRNA のみで発現増強が起こっていた。

以上のことから、補中益氣湯エキス原末の上気道粘膜免疫系賦活化作用および抗がん

剤による小腸粘膜障害に伴う炎症改善作用の発現には共通して本漢方薬中のオリゴ糖群が活性成分として関与すること、上気道粘膜免疫系に対する作用の発現の一部にはオリゴ糖群のパイエル板免疫細胞への作用が関与しているのに対し、粘膜障害改善作用の発現には小腸上皮細胞や上皮直下のマクロファージが関与している可能性が考えられた。今後これらのオリゴ糖群の共存によるパイエル板免疫細胞の機能の変化や腸間膜リンパ節でのリンパ球機能の変化についての解析が上皮細胞機能およびパイエル板免疫機能を介する補中益気湯の粘膜免疫機構調節作用の解明に重要となると考えられる。

#### 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 2 件)

- 1) Slavov A, Kiyohara H, Yamada H: Immunomodulating pectic polysaccharides from waste rose petals of *Rosa damascena* Mill., *Int. J. Biol. Macromol.*, 59, 192-200 2013.8.1
- 2) Sekiya M, Kiyohara H, Maruyama H, Yabe T, Yamada H: Modulation of chemokine expression on intestinal epithelial cells by Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito, and its active ingredients., *J. Nat. Med.*, 67: 626-635 2013.7.1

[学会発表](計 13 件)

- 1) 小堀雄貴、永井隆之、白畑辰弥、小林義典、清原寛章 サポニンの粘膜関連リンパ組織の免疫機能への作用の解析 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.28 [日本薬学会第 134 年会要旨集]
- 2) 黄子綾、丸山弘子、永井隆之、鄭美和、清原寛章 高血糖病態下における呼

吸器粘膜免疫系の変化と八味地黄丸の作用の解析 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.28 [日本薬学会第 134 年会要旨集]

- 3) 梶田祐三子、永井隆之、清原寛章 補中益気湯煎じエキスの粘膜免疫系調節作用の解析 日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014.3.28 [日本薬学会第 134 年会要旨集]
- 4) 清原寛章 黄耆の薬理作用 第 29 回生薬に関する懇談会(東京) 2013.12.7 [第 29 回生薬に関する懇談会講演要旨集 p.15-20]
- 5) 施 嘯睿、関谷路子、永井隆之、山田陽城、清原寛章 補中益気湯の腸管パイエル板に対する作用の解析 第 30 回和漢医薬学会学術大会(石川) 2013.9.1 [J. Trad. Med. 30 (supple) p.70]
- 6) 清原寛章 漢方薬は共通粘膜免疫機構を介してその薬効を発現するのか? 天然薬物研究方法論アカデミー第 16 回シンポジウム(岐阜) 2013.8.24 [天然薬物研究方法論アカデミー第 16 回シンポジウム講演要旨集 p.18-20]
- 7) 関谷路子、清原寛章、丸山弘子、山田陽城 補中益気湯の抗がん剤誘発小腸上皮傷害改善作用の解析 日本薬学会第 133 年会(神奈川) 2013.3.30 [日本薬学会第 133 年会要旨集 3 p.195]
- 8) 関谷路子、清原寛章、丸山弘子、山田陽城 メソトレキセート誘発小腸上皮傷害に対する補中益気湯の作用の解析 第 29 回和漢医薬学会学術大会(東京) 2012.9.2 [J. Trad. Med. 29 (supple) p.71]
- 9) 施 嘯睿、関谷路子、清原寛章、山田陽城 補中益気湯の腸管免疫調節活性成分の探索 第 29 回和漢医薬学会学術大会(東京) 2012.9.2 [J. Trad. Med. 29 (supple) p.104]

- 10) 清原寛章、関谷路子、西本裕紀、永井隆之、丸山弘子、山田陽城 補中益気湯の作用の腸管免疫系からの解析 第29回和漢医薬学会学術大会(東京) 2012.9.2 [J. Trad. Med. 29 (supple) p.54]
- 11) Kiyohara H, Yamada H  
Immunomodulatory functions of polysaccharides from medicinal and edible plants in intestinal immune system The 79th Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology (Daejeon, Korea) 2012.6.15 [Food Science & Communications p.106]
- 12) 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(北海道) 2012.3.29 [日本薬学会第132年会要旨集 3 p.83]
- 13) 西本裕紀、関谷路子、清原寛章、矢部武士、山田陽城：補中益気湯の水溶性腸上皮細胞免疫機能調節成分の解析 第28回和漢医薬学会学術大会(富山) 2011.8.27[J. Trad. Med. 28 (supple) p.90]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清原寛章 (KIYOHARA HIROAKI)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号：70161601

### (2)研究分担者

丸山弘子 (MARUYAMA HIROKO)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：50129269

### (3)連携研究者

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