

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659386

研究課題名（和文） 補中益気湯による抗インフルエンザ作用機構の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the anti-influenza action mechanism by Hochu-ekkito.

研究代表者

宗形 佳織（MUNAKATA KAORI）

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：40528725

研究成果の概要（和文）：補中益気湯のインフルエンザ予防効果の機構を明らかにすることを目的としてマウスの感染系を用いて検討した。補中益気湯はウイルス粒子と結合しやすく、ウイルスが細胞へ吸着・侵入する過程を阻害すること、また細胞内のウイルス感染シグナル伝達系の防御機構を高めること、例えばインターフェロンレベルの増強や、抗菌ペプチドの誘導、また自己老化成分の分解処理能などの力によって、予防効果を発揮することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the mechanism of the influenza preventive effect of Hochuekkito (Hochu), the infection system of the mouse was used and examined.

Hochu demonstrates a preventive effect by the following actions.

- (1) It is easy to combine with a viral particle.
- (2) Hochu prevented the first stage of the infectious process (adsorption and entry).
- (3) Moreover, it is based on power, such as reinforcement of raising the protective mechanism of an intracellular viral infectious signal, for example, an interferon level, guidance of anti-bacterial peptide, and decomposition processing ability of a self-aging ingredient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、ウイルス、感染症、免疫学、薬理学

1. 研究開始当初の背景
インフルエンザウイルスにおける化学療法、ワクチン療法は、必ずしも十分な環境とは言えない。副作用や、ウイルス表面抗原の変異に伴う無効化、ワクチンの生産量と質の問題、医療コストの面からも改善や発症抑制可能

な新規予防法の確立が急務として望まれている。

インフルエンザに対する漢方薬の臨床適応は、発熱後の治療に対しても麻黄湯が著効した症例などが報告されている。しかし、臨床的な拡大に至っていないのが現状である。

申請者らはこれまでに正常マウスへの十全大補湯（ジュウゼンダイホトウ）の投与による各組織内 mRNA 発現レベルの変動をマイクロアレイを用いて解析した結果、大腸組織内の IFN- α 関連遺伝子及び脾臓での抗菌ペプチド、Defensin family の発現が高いことを明らかにした（BMC Genomics. 26:9:192. 2008, 一部未発表データ）。また漢方薬の Inf 感染前投与による発症抑制効果について、感染後マウスの生存日数の延長を指標とした評価を行い、補中益気湯（補中）の有効性、及び葛根湯では無効であることを確認している。その際、補中投与感染マウスにおける肺組織内の Inf 増殖が抑制されていることも明らかにした（未発表データ）。

更に Inf 感染細胞レベルでは TOLL 様レセプター7、9 を介したシグナルによる I 型 IFN の産生、分泌が上昇することは明らかにされている。また恒常性を維持するための生体防御機構として小胞体ストレス適応システムによって、蛋白フォールディングに必要な遺伝子転写活性の上昇、蛋白合成の抑制、異常蛋白の分解などがバランスよく誘導される（Nature Reviews, 8 (7):519-529, 2007）。また細胞の飢餓状態と同様の自己蛋白分解による存続対応としてのオートファジー機構が発動していることも十分に考えられる（Nature. 441:880-4, 2006）。しかしこれら抗ウイルスシグナルや生体防御機構と漢方薬との関わりはほとんど検討されていない。また Inf の細胞表面レセプターは、プロテオグリカン、ヘパラン硫酸などが想定されているが、単離同定には至っておらず、漢方薬との関連性も明確ではない。

2. 研究の目的

研究では、*in vivo* で有効性の認められた補中の Inf 発症抑制効果にフォーカスして、その作用機構の解明を目的とする。

平成23年度：

(1) Inf 感染増殖過程に対する補中の作用部位の特定：Inf 粒子に対する直接不活化効果、及び *in vitro* における Inf の1段階増殖過程に対する補中の作用部位を Plaque assay 法により特定する。

(2) 感染細胞内における抗ウイルスシグナル伝達系に対する影響（mRNA、タンパク質における検証）：Inf の主な標的組織である肺、及び全身免疫反応を反映すると考えられる脾臓において、Inf 感染シグナルに関わる I 型 IFN または NF- κ B を介する種々抗炎症性サイトカインの変動を定量 RT-PCR を用いて感染対照群と比較検討する。更にウイルス感染に対する小胞体 (ER) ストレス適応システムの作動やオートファジー誘導の有無をウェスタンブロットにより明らかにする。

平成24年度：

(3) Inf レセプターの単離同定の試み及びウイルスとレセプターとの相互作用における補中の関与：BIAcore(GE Healthcare) を用いて2分子間相互作用を検討し、相互作用物質は回収後、質量分析装置 (MALDI-TOF/TOF mass ; BRUKER) を用いて同定を行う。

3. 研究の方法

本研究では、補中益気湯において、以下の項目を検討することで Inf に対する予防効果と作用機序を明確にする計画を立案した。

マウスに補中を2週間前投与した後、Inf を経鼻感染し経時的に肺、脾臓を摘出する。各組織内のウイルス、Total RNA、タンパク質を抽出し、それぞれ以下の検討項目に用いる。

(1) Inf 感染増殖過程に対する補中の作用部位の特定

(2) 感染細胞内における抗ウイルスシグナル伝達系に対する影響（mRNA、タンパク質における検証）

(3) Inf レセプターの単離同定の試み及びウイルスとレセプターとの相互作用における補中益気湯の関与

平成 23 年度

予備検討；①： マウス(C57BL/6, 7 週齢、雄性)に漢方薬(補中益気湯または葛根湯)を 1 g/Kg の投与量で日に 1 回、2 週間経口投与した後、Inf. (2 xLD50) を 10 ul、経鼻感染させた。対照群として漢方薬を与えない生理食塩水投与群、及び各前処理群における非感染群も設けた。この実験方法において、まず感染マウスの生存日数の延長効果を確認した。

予備検討；②： ①と同様の実験方法において、感染後、経時的に肺、脾臓を摘出した。各組織内のウイルス、Total RNA、タンパク質を抽出し、肺組織中の Inf.感染価を MDCK 細胞を用いた Plaque assay により測定した。同じく肺組織中の IFN- α の活性を L-929 細胞に対する VSV 感染阻害作用による生物活性評価法で検討した。

(1) Inf 感染増殖過程に対する補中の作用部位の特定

a. ウイルス直接不活化効果： 感染価既知のウイルス希釈液と漢方薬とを混合溶液として、37°C で 1 時間、インキュベーションした後のウイルス感染価をウイルス希釈液 (1%BSA-HBSS) とインキュベーションした群と比較検討することで、判定した。感染価の測定には漢方薬の効果が結果に影響しない濃度まで希釈した検体を用いた Plaque assay を用いた。

b. 感染増殖過程における作用部位の特定： MDCK 細胞の培養系に Inf を感染し、細胞への吸着後は寒天培地で固定した。その培養液中に経時的に添加時間を遅らせながら補中益気湯を加えることで、感染増殖過程の作用部位 (特に吸着侵入過程または細胞内での核

酸合成過程) が想定可能となった。また細胞外への遊出阻害や、2 次感染への評価は Infectious center assay 法で検討した。すなわち、ウイルスを保持した状態の細胞 (感染後 5~6 時間経過) を非感染 MDCK 細胞へ一定数を上層し、軟寒天培地で固定化し、新たな感染 (2 次感染) が成立した場合にはスポットとして確認された。

(2) 感染細胞内における抗ウイルスシグナル伝達系に対する影響

Inf 感染シグナルに関わる TOLL 様レセプター由来 MyD88 経路 I 型 IFN または NF- κ B を介する種々抗炎症性サイトカインの分泌に関わる mRNA レベルを定量 RT-PCR を用いて感染対照群と比較検討した。

TOLL 関連遺伝子では、TLR7, TLR9 について、RIG-I family 関連遺伝子では、MDA5, LGP2, またその下流の IKK-I, IRF3, IRF7, Stat1, Stat2, IFN- β について検討した。

更に正常マウスへの漢方薬投与において mRNA レベルの上昇が認められた Defensin family では α -defensin subtype-1,3,4,5,6 及び β -defensin subtype-1,2,3,4 についても検討した。更に ER ストレス、オートファジーに関して、それぞれ発現マーカーとなる蛋白質 (ER ストレス: IRE1, PERK, オートファジー: LC3) をウェスタンブロットにて検討したが、明確な判定に至らなかったため、GFP-LC3 plasmid を遺伝子導入した MDCK 細胞を用いて、感染細胞及び補中追加感染細胞におけるオートファジー誘導の有無を検討した。

平成 24 年度

(3) Inf レセプターの単離同定の試み及びウイルスとレセプターとの相互作用における補中の関与

Inf の細胞表面レセプターは、プロテオグリカン、ヘパラン硫酸などが想定されているが、多才なウイルス表面抗原とも相まって今だ

単離同定されていないのが現状である。今回 2 分子間相互作用の解析装置である BIACORE を用いて、ウイルス粒子、細胞、補中、3 者間の親和性を検討した。

4. 研究成果

(1) 予備検討 1. 補中益気湯の感染前投与による Inf 感染に対する予防効果 (延命効果) (Fig.1)

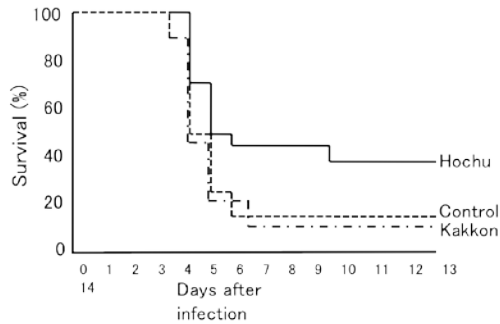


Fig.1

(2) 予備検討 2. 感染後、マウス肺組織内のウイルス感染価は補中投与群で低値を示し、IFN- α は高値を示した。(Fig.2)

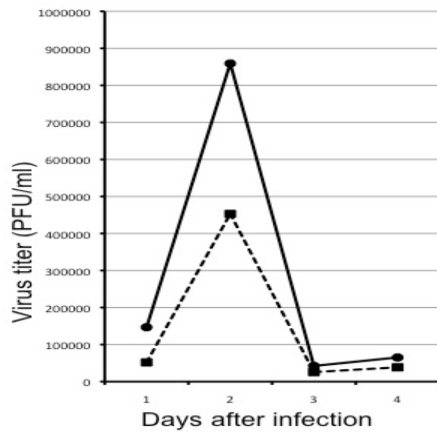


Fig.2

(3) In vitro における感染増殖過程における補中作用部位の特定: 補中は感染直後のウイルスが細胞表面に吸着/侵入する過程を阻害している事が明らかとなった。(Fig.3, 4)

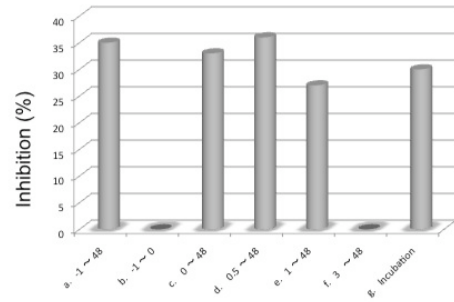


Fig.3

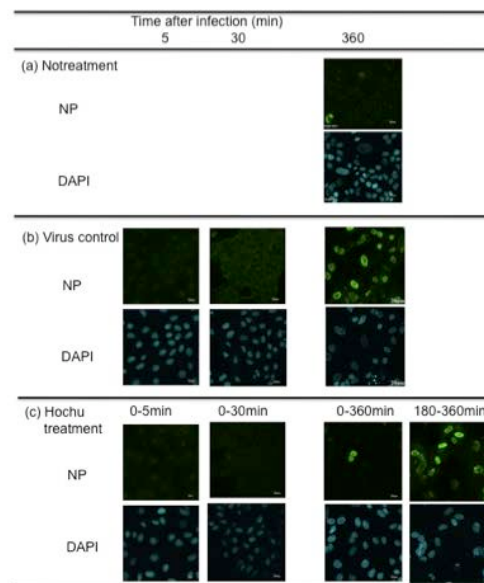


Fig.4

(4) 感染細胞内におけるウイルスシグナル伝達系に対する影響: 感染シグナルに関連する TOLL 関連遺伝子、RIG-I family 関連遺伝子などには、補中による明確な変動が認められなかった。今回検討した抗菌ペプチド、Defensin family が感染によって上昇したが、補中がその上昇を増強していた。特に β -Defensin の上昇が著しく、合成ペプチドを培養細胞系に添加した際の感染抑制効果が補中を添加した際の変動と同様の効果であった。(Fig.5,6,7)

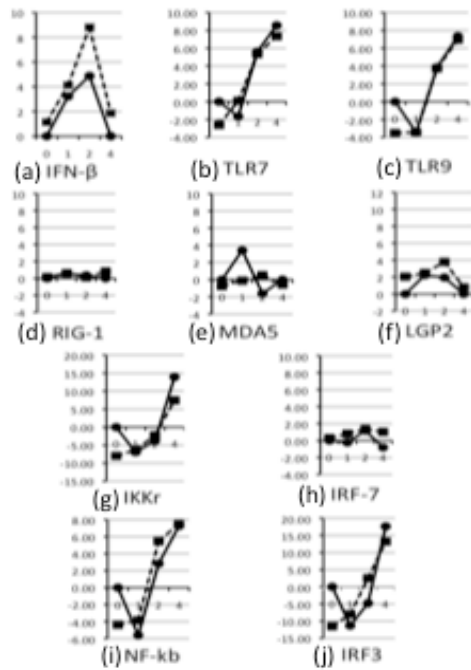


Fig.5

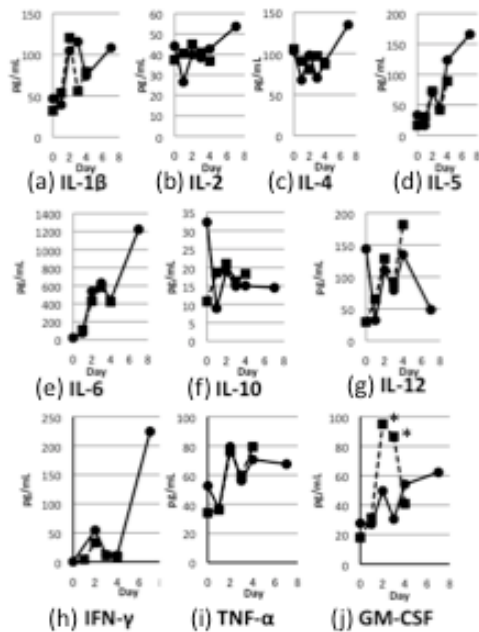


Fig.6

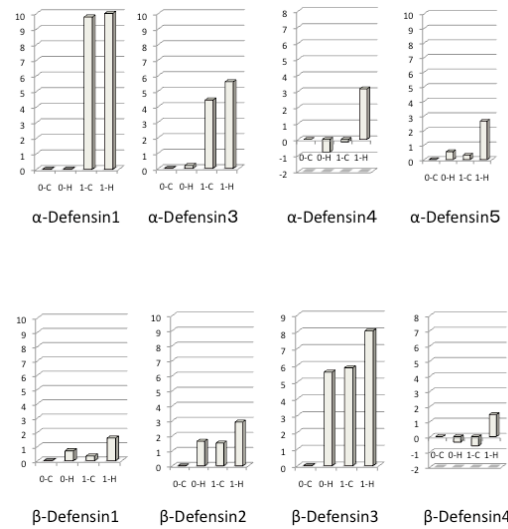


Fig.7

(5) GFP-LC3 導入細胞において、感染によってオートファジーの誘導が確認され、補中によってその発現レベルの増強傾向が認められたが、定量性において更なる再現性を確認する必要がある。

(6) BIACORE を用いて、ウイルス粒子、細胞、補中益気湯、3者間の親和性を検討した結果、補中は MDCK 細胞表面との親和性はむしろ低く、ウイルス粒子との親和性が極めて高い事が明らかであった。(Hochu vs MDCK: $9.48E-05$, Hochu vs Virion: $8.00E-10$) (Table 1.)

Ligand \ Analyte	Analyte			
	MDCK	Virion	Hochu	Kakkonto
MDCK	ND	$1.35E-07$	$1.55E-08$	$1.81E-11$
Virion	$7.30E-10$	ND	$1.52E-08$	$8.96E-08$
Hochu	$9.48E-05$	$8.00E-10$	ND	ND
Kakkonto	$3.32E-08$	$1.60E-08$	ND	ND

Table.1

これらの結果から、補中益気湯は、マウスに投与することにより、インフルエンザ感染における延命効果が認められ、その症状軽減は、肺組織内でのウイルス増殖を直接的に低下

させることが要因または結果として確認された。また IFN など生体防御機構のレベルを高めること及び抗菌ペプチド、Defensin を介する感染防御機構が示唆された。In vitro では補中は感染過程の初期（吸着・侵入）を阻害すると共に、ウイルス粒子との親和性が高いことから、Complex を形成することにより、細胞への感染の妨げになっていることも、想定している。更に、感染防御として、オートファジー機構を増強している可能性が明らかとなり、今後詳細に検討する予定である。

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 1 件）

Katsuaki Dan, Hiroko Akiyoshi, Kaori Munakata,

Hideki Hasegawa, Kenji Watanabe : A Kampo

(Traditional Japanese herbal) Medicine,

Hochuekkito, pretreated in mice prevented

influenza virus replication accompanied with

GM-CSF expression and increase of several

defensin- mRNA levels. Pharmacology, 印刷中,

DOI : 350188

〔学会発表〕（計 2 件）

宗形佳織：補中益気湯の抗インフルエンザ作用. 第 11 回日中臨床中医薬学会学術大会,

2011.11.2., 東京・慶應義塾大学

宗形佳織：補中益気湯によるインフルエンザ予防効果の発現における抗菌ペプチド、

Defensin の果たす役割. 和漢医薬学会,

2012.09.01.~ 02., 東京・北里大学薬学部

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗形 佳織 (MUNAKATA KAORI)

慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）

研究者番号：40528725

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし