

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790657

研究課題名(和文) 潰瘍性大腸炎に対する新規治療薬の探索研究 - 大建中湯の作用機序解明

研究課題名(英文) Search for Therapeutic Drugs Against Ulcerative Colitis-Mechanism Elucidation of Daikenchuto

研究代表者

林 周作 (Hayashi, Shusaku)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：10548217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎は難治性の慢性炎症疾患であり、その病態解明ならびに新規で有用な治療薬の創出が求められている。本研究では、漢方薬である大建中湯の急性大腸炎および大腸炎関連発がんに対する作用について検討を行った。

大建中湯は急性大腸炎の発生を抑制し、大腸組織における炎症性サイトカインの上昇を有意に抑制した。また大建中湯は腸管マクロファージにおけるTNF- α の発現を低下させた。さらに大建中湯は、大腸炎関連発がんモデルにおける腫瘍形成を有意に抑制した。本研究から、大建中湯は腸管マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生阻害を介して大腸炎および炎症関連発がんを抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Daikenchuto (DKT) is a traditional Japanese medicine composed of four medicinal herbs. In the present study, we examined the effect of DKT on dextran sodium sulfate (DSS)-induced experimental colitis and colitis-associated cancer (CAC) in mice and investigated the underlying mechanisms of the protective action.

DKT reduced the severity of DSS-induced colitis and the elevation of inflammatory cytokines in the colon of colitis mice. In addition, DKT suppressed the expression of TNF- α on the intestinal macrophages of inflamed colonic mucosa. Interestingly, DKT significantly reduced the number and size of colonic tumors in mice with CAC. The present study demonstrates that DKT suppresses acute colitis and colitis-associated tumorigenesis. Furthermore, it is presumed that DKT downregulates the expression of inflammatory mediators, thereby reducing the colonic tumorigenesis associated with chronic colitis.

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：潰瘍性大腸炎 大腸炎関連発がん 腸管粘膜免疫 腸管マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) は、難治性の慢性炎症疾患であり、その病態解明ならびに新規で有用な治療薬の創出が求められている。IBD は、遺伝的素因を背景としながら、食生活などの生活習慣や腸内細菌といった環境因子が作用し、免疫担当細胞や腸管上皮細胞の機能異常が過剰な免疫反応を引き起こしている病態と考えられている。また IBD の病態形成には、腸管に存在するマクロファージが大きく関与することが知られており、我々も腸管マクロファージに着目し、IBD の病態研究を行っている。

また IBD は慢性炎症疾患であり、重大な合併症の 1 つは腫瘍形成であり、腸管粘膜の慢性炎症を背景とした大腸炎関連発がんの発生は、臨床において大きな問題となっている。

腸管は、免疫系、神経系および内分泌系が共に緊密なクロストークを行い生体の恒常性を精巧に維持している。精巧な制御システムにより調節されている腸管の疾患は、病因や病態が多岐にわたるため、薬理学的メカニズムに限られる単剤を用いる治療法では治療効果に限界がある場合も数多くある。腸管の免疫疾患に対する治療・創薬戦略には、消化管全体を 1 つのシステムとして捉え、「消化管全体のシステムを調節する」という考え方が必要である。一方、複数の薬理作用を持つ多成分系の薬物である漢方薬は、生体のバランスや恒常性の維持に重きを置く薬物治療体系であり、生体の最も重要な制御システムの 1 つである免疫系は、漢方薬の主要な治療標的となっている。従って、現代医療の中でも、消化管は漢方薬治療が比較的多く取り入れられている領域となっている。

我々は、IBD モデルマウスを用い、その病態解析および治療薬の探索を行っている。この過程において、漢方薬である大建中湯が大腸炎の病態を改善することを見出した。大建中湯は術後の腸管運動麻痺改善を目的に使用されることが多く、本邦において最も処方されている漢方薬である。また我が国だけでなく、米国のメイヨークリニックで行われた臨床試験において大建中湯が腸管機能の改善に有効であることが証明されている。

大建中湯は複数の薬理作用を持つ複合薬物であり、これまでにない IBD に対する治療標的を見出せる可能性を有している。ゆえに大建中湯が腸管粘膜免疫系を調節することにより IBD の病態を改善すると仮説を立て取り組む本研究は、独創性の高い研究テーマであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、IBD に対し病態改善効果を示す大建中湯の作用機序について、腸管粘膜免疫

系に対する作用を中心に解明することを目的としている。特に大腸炎の病態形成に大きく関与する腸管マクロファージの機能に対する作用について検討を行う。さらに本研究の成果から、新規メカニズムを持つ IBD に対する治療薬としての大建中湯の有用性を示し、新たな治療戦略の提供に繋げることが最終目標である。

3. 研究の方法

本研究において用いる IBD モデル動物は、マウスに 2~3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 溶液を 5~7 日間自由飲水させることにより作製する。大建中湯 (100-1000 mg/kg) は DSS の飲水期間中 1 日 2 回、経口投与を行う。

大腸炎関連発がんモデルマウスは、変異原性物質であるアゾキシメタンの単回投与後、DSS の反復飲水を行い作製する。大建中湯は経口投与または飲料水中に混合し、マウスに与える。

腸管粘膜免疫系に対する大建中湯の効果は、マウスから大腸粘膜を単離し、大腸粘膜固有層単核細胞 (cLPMCs) を採取し、免疫系細胞の機能を解析し、評価を行う。

4. 研究成果

(1) 大腸炎モデルマウスに対する大建中湯の抑制効果

大腸炎モデルマウスでは正常マウスと比較し、DSS 溶液の飲水に伴い恒常的な体重減少、下痢および下血などの症状が観察された。大建中湯 (100-1000 mg/kg) はこれらの大腸炎症状を用量依存的に抑制した。また大建中湯は、大腸炎モデルで認められた大腸丈の短縮、大腸粘膜構造の破綻および炎症性細胞の粘膜内への浸潤を改善した。

大建中湯は、大腸炎モデルマウスの大腸組織におけるミエロペルオキシダーゼ活性 (炎症マーカー) の上昇を有意に抑制した。さらに大建中湯は、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 および IFN- γ の大腸組織における mRNA の発現上昇を有意に抑制した。

これらの知見から、大建中湯は DSS 誘起大腸炎の病態を抑制することが明らかとなった。この抑制作用には、炎症性サイトカインの産生阻害が関与することが示唆された。

(2) 腸管マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現に対する大建中湯の抑制効果

マウスの大腸粘膜固有層から単離した cLPMC をマクロファージのマーカーで標識し、腸管マクロファージの分取を行った。大腸炎マウスの大腸管マクロファージにおける TNF- α および IL-6 の mRNA の発現は、正常マウスの大腸管マクロファージと比較し有意に上昇していた。大建中湯は炎症時の腸管マ

クロファージにおける TNF- α および IL-6 の mRNA の発現の上昇を阻害していた。よって大建中湯の大腸炎抑制作用には、腸管マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生阻害が一部関与していることが考えられた。

(3) 大腸炎関連発がんモデルマウスに対する大建中湯の抑制効果

大腸炎関連発がんモデルマウスでは、DSS 溶液の反復飲水 3 回目終了後から大腸粘膜に腫瘍の形成が認められた。大建中湯の投与はモデルマウスにおける腫瘍形成を数および大きさともに有意に抑制した。また、大建中湯は、大腸炎関連発がんモデルマウスの大腸組織における TNF- α および IL-6 の mRNA の上昇を阻害していた。よって大建中湯は、大腸炎関連発がんの形成において重要である炎症性メディエーターの阻害を介し、腫瘍形成を抑制することが示唆された。

(4) 結論

本研究から、大建中湯は大腸炎および大腸炎関連発がんを抑制することが明らかとなり、その作用機序には腸管マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生阻害が一部関与することが考えられる。本研究の成果はまだ発展途上であり、より詳細な大建中湯の作用機序をこれからも明らかにしていく予定である。

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 4 件)

Yamamoto T, Kodama T, Lee J, Utsunomiya N, Hayashi S, Sakamoto H, Kuramoto H, Kadowaki M. Anti-Allergic Role of Cholinergic Neuronal Pathway via $\alpha 7$ Nicotinic ACh Receptors on Mucosal Mast Cells in a Murine Food Allergy Model. PLoS One, 9:e85888 (2014).

査読有.

DOI: 10.1371/journal.pone.0085888.

Hayashi S, Kurata N, Kitahirachi E, Nishimura Y, Amagase K, Yano T, Takeuchi K. Cinacalcet, a Calcimimetic, Prevents Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage in Rats. J Physiol Pharmacol, 64:453-463 (2013). 査読有. http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/08_13/pdf/453_08_13_article.pdf

Lee J, Yamamoto T, Hayashi S, Kuramoto H, Kadowaki M. Enhancement of CGRP Sensory Afferent Innervation in the Gut During the Development of Food Allergy in an Experimental Murine Model. Biochem Biophys Res Commun,

430:895-900 (2013). 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.058.

Wang X, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Yamamoto T, Kadowaki M. Sphingosine Kinase-1-Dependent and -Independent Inhibitory Effects of Zanthoxyl Fructus to Attenuate the Activation of Mucosal Mast Cells and Ameliorate Food Allergies in Mice. Evid Based Complement Alternat Med, 862743 (2012). 査読有. DOI: 10.1155/2012/862743.

[学会発表](計 8 件)

林 周作, 濱田貴之, 石井陽子, 笹原正清, 門脇 真. ニコチンは IL-6/Stat3 経路の阻害を介して大腸炎関連発がんを抑制する. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19-21 日. 仙台.

濱田貴之, 林 周作, 門脇 真. DSS 誘起大腸炎モデルマウスにおける腸管マクロファージの機能制御を介した PI3K p85 α の役割. 日本薬学会北陸支部第 125 回例会. 2013 年 11 月 17 日. 金沢.

Hayashi S, Hamada T, Kadowaki M. Nicotine Suppresses Colonic Tumorigenesis Associated with Chronic Colitis in Mice through the Inhibition of IL-6 and TNF- α Expression. Digestive Disease Week 2013. 2013 年 5 月 18-21 日. Orlando, USA.

林 周作, 濱田貴之, 門脇 真. ニコチンは大腸炎関連発がんの形成を抑制する. 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21-23 日. 福岡.

山本 武, 金内優也, 林 周作, 門脇 真. $\alpha 7$ ニコチン受容体による JAK2-カスパーゼの活性を介した形質細胞様樹状細胞遊走抑制作用. 第 14 回日本神経消化器病学会. 2012 年 11 月 9 日. 大阪.

Hayashi S, Wang X, Umezaki M, Yamamoto T, Kadowaki M. Shikonin suppresses the activation of mucosal mast cells through the inhibition of nuclear orphan receptors NR4A expression. 5th International Symposium on Scientific Research of Traditional Medicine. 2012 年 10 月 13 日. 富山.

王 曉宇, 林 周作, 山本 武, 門脇 真. 紫雲膏の主要活性成分シコニンの核内オーファン受容体 NR4A の遺伝子発現抑制を介したマスト細胞に対する作用. 第 29 回和漢医薬学会学術大会. 2012 年 9 月 1-2 日. 東京.

林 周作, 大城百恵, 山本 武, 門脇 真. マウス DSS 誘起大腸炎における PI3K p85 α サブユニットの役割. 第 49 回日本消化器免疫学会総会. 2012 年 7 月 5-6 日. 鹿児島.

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 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

林 周作 (HAYASHI, Shusaku)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号：10548217