

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460123

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎の安全な寛解維持療法に対する漢方薬の有効性

研究課題名(英文)Utility of herbal medicine for remission maintenance therapy of ulcerative colitis

研究代表者

橋本 真一 (HASHIMOTO, Shinichi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40530217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Dextran sulfate sodium (DSS)による潰瘍性大腸炎マウスモデルを用いて大建中湯(DKT)の抗炎症効果や生存期間に対する影響を検討したところ、DKT投与群ではDSSによる大腸長の短縮や貧血の予防効果が認められ、DSSマウスモデルの生存期間の延長がDKT投与群で認められたため、DKTは潰瘍性大腸炎に対する新たな治療薬となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of daikenchuto(DKT) on dextran sulfate sodium-(DSS-) induced ulcerative colitis(UC) mouse model. the colon lengths of DKT group were longer than those of the DSS group. the DKT group maintained significantly higher levels of serum hemoglobin. The DKT group exhibited significantly longer survival time than the DSS group. Our results indicate that DKT prevented inflammation in the colon, indicating its potential as a new therapeutic agent for UC.

研究分野：消化器内科

キーワード：潰瘍性大腸炎 大建中湯 dextran sulfate sodium

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎、クローン病に代表される炎症性腸疾患は近年驚異的な患者数の増加を認めているものの、現在も完全な病態の解明は成されておらず、根治的治療法も存在しない。潰瘍性大腸炎では50~60歳台での高齢発症も珍しくなく、潰瘍性大腸炎の患者数増加に伴い高齢の患者も今後増加してくると考えられている。現在日常診療において使用可能な治療薬はステロイドをはじめ、免疫調節薬や抗TNF抗体など、殆どが免疫抑制および易感染性を伴うものであり、高齢者に対する使用は危険性が高く免疫抑制を伴わない安全な治療薬の開発が急務であるといえる。

大建中湯 daikenchuto (TJ-100;DKT)は乾姜、人參、山椒を含有する漢方製剤であり、これまでは術後の麻痺性イレウスに多く用いられていたが、近年欧米でもその効果が着目されている。特に、クローン病に対する治療効果について注目されており、本邦においてクローン病に対する多施設共同試験が進行中である(日薬理誌 2011)。作用機序に関して、一部の研究で大建中湯によりアドレノメデュリン(ADM)の遊離作用が増強することがわかっており、これによってTNF-等の炎症性サイトカインを直接阻害して抗炎症作用を発揮すると言われている。(図2)しかし未だ詳細なメカニズムは不明であり、分かっていない。

2. 研究の目的

(1) 大建中湯の抗炎症効果の評価：大建中湯を潰瘍性大腸炎の疾患モデルとされているDSS (dextran sulfate sodium) 実験腸炎マウスへ投与して治療効果の評価する。評価に用いる項目としては、血便の有無、体重の推移、ヘモグロビン濃度、摘出した大腸長、組織学的炎症像である。

(2) 抗炎症効果の作用機序の解明：摘出大腸組織からRNAを抽出してサイトカインレベルの変化を検討する。

(3) 生存期間の検討：長期的な大建中湯の効果について検討する。

3. 研究の方法

(1) 大建中湯の抗炎症効果の評価

マウス：検討には8週齢で体重が18-20gのC57BL/6マウスを用いた。飼育条件は22℃で12時間ごとに昼夜を設定した。

炎症の評価：マウスは以下のように3群に分類した。Normal群は特に処置なしの群で、DSS群はDSSを給水ビンから自由飲水し、DSS+DKT群はDSSの自由飲水に加えて体重(g)あたり6mgのDKTを、ゾンデを介して連日投与した。他の群のマウスには0.2mlの蒸留水をゾンデで投与した。DSSの濃度は5%とした。体重の変化を記録し7日目にサクリファイスして血清と大腸を摘出した。

病理組織学的評価：摘出した大腸組織の遠位部を検討に用いた。ホルマリン固定後、パラフィン包埋して4μmに薄切しHE染色し

た。評価に用いたスコアは以前にMorohoshiらが報告したものに準じた。

炎症細胞浸潤の項目については浸潤無しが0、粘膜固有層に散発的な浸潤が1、粘膜固有層に多数の浸潤が2、粘膜下層まで及ぶ広範囲の浸潤が3とした。組織障害の項目については障害なしが0、リンパ管上皮障害が1、粘膜上皮びらんもしくは限局性潰瘍が2、高度の粘膜障害と腸管壁深部に至る障害が3としてその合計で計算した。

(2) 抗炎症効果の作用機序の解明：Total RNAを遠位大腸から抽出し、interleukin-(IL-)10, IL-1β, と tumor necrosis factor-(TNF-) に関して定量的リアルタイムPCRで測定した。

(3) 生存期間の検討：2%DSSを自由飲水した2%DSS群と大建中湯を併用した2%DSS+DKT群を設定した。大建中湯は体重(g)あたり3mgを投与した。100日間経過観察した。

4. 研究成果

(1) 大建中湯の抗炎症効果の評価

体重の変化

7日目の体重においてNormal群と比較してDSSおよびDSS+DKT群は有意に体重の減少を認めたと、DSS群とDSS+DKT群との間に有意差を認めなかった(図1)。

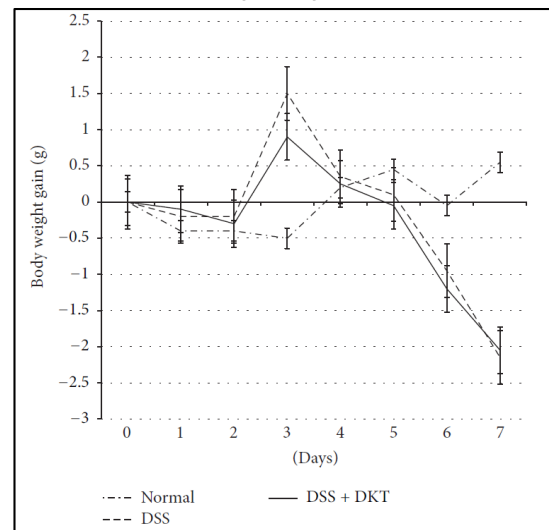


図1 各群における体重の変化

摘出大腸長

各群における摘出大腸標本を図2に示す。

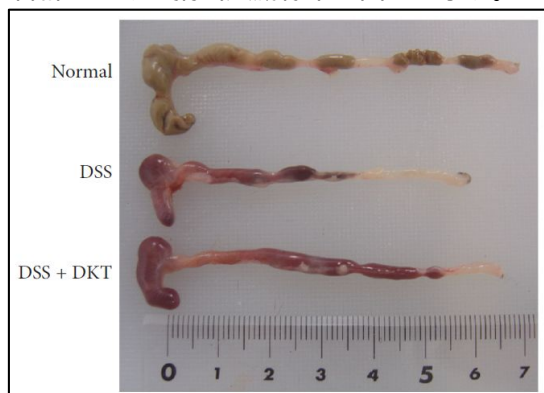


図2 各群における摘出大腸標本

摘出大腸長を各群で比較すると、Normal 群よりも DSS 群で有意に大腸長が短縮しており、DSS+DKT 群では DSS 群と比較して有意に大腸長の短縮が軽減されていた (図 3)。

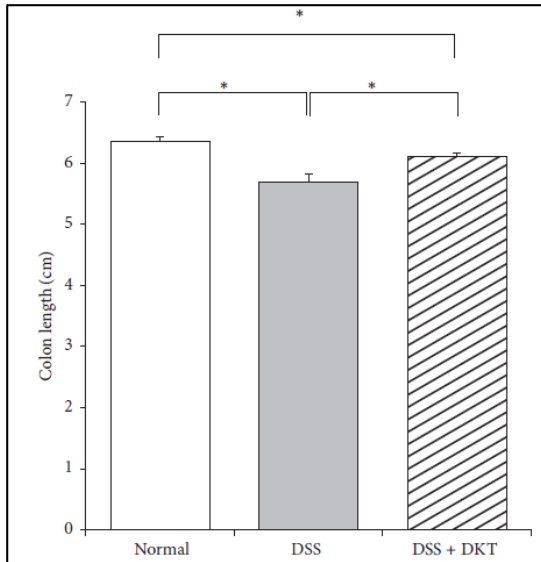


図 3 各群における摘出大腸長

ヘモグロビン濃度

ヘモグロビン濃度を各群で比較すると、Normal 群よりも DSS 群で有意に低下しており、DSS+DKT 群では DSS 群と比較して有意に高値であった。(図 4)

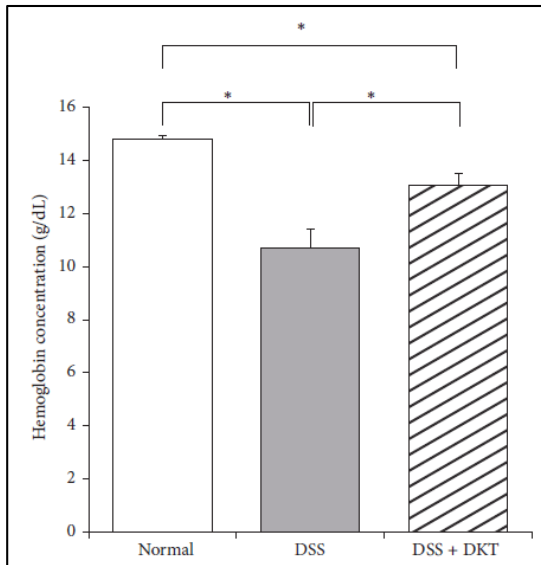


図 4 各群におけるヘモグロビン濃度

病理組織学的評価

図 5 で各群における病理組織学的所見を示す。Normal 群では腺管構造の乱れや腸管壁の肥厚はみられないが、DSS 群では腺管構造の乱れや腸管壁の肥厚がみられる。DSS+DKT 群では、Normal 群と比較すると腺管構造の乱れや腸管壁の肥厚が認められるが、DSS 群よりは軽度である。

病理組織学的スコアリングに関しては、Normal 群よりも DSS 群で有意にスコアが高値であり、DSS+DKT 群では DSS 群と比較して有意にスコアが定価していた (図 6)。

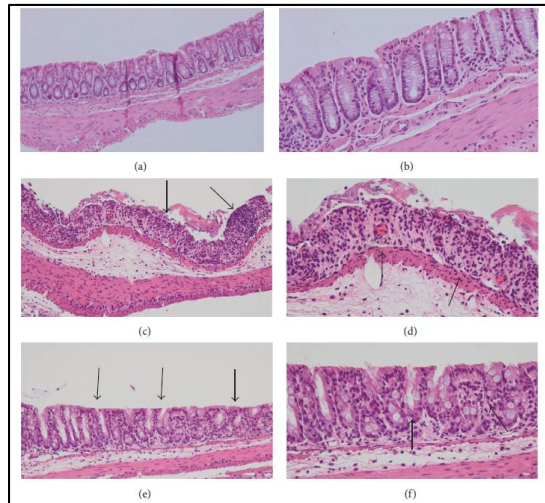


図 5 各群における病理組織学的所見
Normal 群 (a)倍率 20 倍(b) 倍率 40 倍
DSS 群 (c)倍率 20 倍(d) 倍率 40 倍
DSS+DKT 群 (e)倍率 20 倍(f) 倍率 40 倍

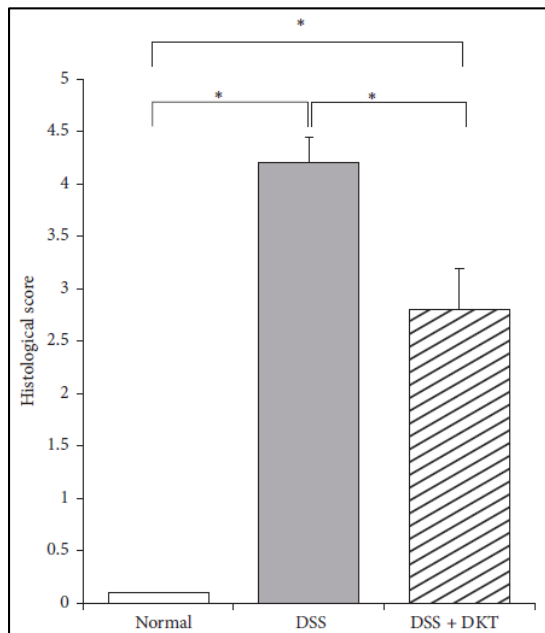


図 6 各群における病理組織学的スコア

(2) 抗炎症効果の作用機序の解明

各群の摘出した大腸から抽出した total RNA を定量的 RT-PCR にかけたところ、抗炎症サイトカインである IL-10 の発現レベルにおいて、DSS 群よりも DSS+DKT 群で有意な上昇を認めた。炎症性サイトカインである IL-1 は有意差を認めないものの、DSS 群の方が DSS+DKT 群よりも上昇している傾向がみられた。また、炎症性腸疾患治療において非常に重要な因子である TNF- α に関しては明らかな傾向はみられなかった(図 7)。

(3) 生存期間の検討

2% DSS を用いた生存期間に関する検討では、2% DSS+DKT 群の方が 2% DSS 群と比較して有意に生存期間の延長を示した。生存期間の平均値は 2% DSS+DKT 群が 70 日で DSS 群は 44 日であった (図 8)。

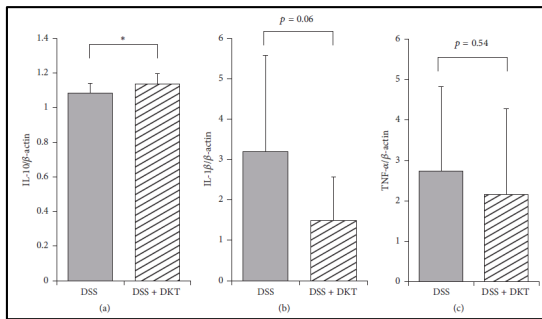


図7 各群における RT-PCR 結果
(a) IL-10, (b) IL-1, (c) TNF-

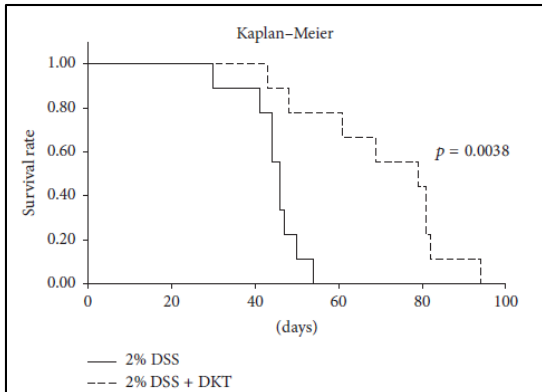


図8 各群の生存期間

以上の結果より、大建中湯は DSS 実験腸炎モデルマウスにおいて抗炎症作用を示し、サイトカインレベルでも影響が示され、生存期間の改善にも繋がっており、これらの知見から大建中湯が潰瘍性大腸炎治療における安全な治療薬となり得る可能性が示唆された。

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 1 件)

Matsunaga T, Hashimoto S, Yamamoto N, Takami T, Sakaida I(11人中2,3,8番目).
Protective Effect of Daikenchuto on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice.
Gastroenterol Res Pract.
2017 ;2017:1298263. (査読有)
DOI: 10.1155/2017/1298263.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 真一 (HASHIMOTO, Shinichi)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 4 0 5 3 0 2 1 7

(2) 研究分担者

高見 太郎 (TAKAMI, Taro)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 6 0 5 1 1 2 5 1

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

山口大学・大学教育機構・准教授

研究者番号: 9 0 4 4 8 2 8 3

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし