

# 免疫修飾作用を有する漢方薬（葛根湯・補中益気湯）による 粘膜免疫制御機構の解明

申請代表者 佐藤 克明 理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター樹状細胞機能研究チーム チームリーダー  
所外共同研究者 清原 寛章 北里大学 北里生命科学研究所 和漢薬物学 准教授  
所内共同研究者 山本 武 病態制御部門 消化管生理学分野 助教

## ■背景・目的

粘膜組織は多くの病原体や抗原の初期侵入経路であるため、独自の粘膜免疫系を発達させ、異種抗原を選択的に排除するかたわら、食物成分や共生関係を構築すべき常在細菌叢に対しては異種抗原ではあるが自己として寛容するように精妙に調節している。この粘膜免疫組織における防御応答および寛容応答の破綻が多く疾患の発症に関与している。特に消化管は、生体内の最大の免疫系である腸管粘膜免疫系が発達した粘膜組織を有し、消化管局所および本組織を仲介点として遠隔の粘膜免疫機構や全身免疫系に調節作用を示す。以上のことから、この腸管粘膜免疫系での防御応答および寛容応答の破綻がアレルギー性疾患や易感染性病態など多くの疾患の発症・進展に関与すると考えられている。しかし、未だこれらの疾患に対する決定的な治療薬や治療方法は確立されていない。

樹状細胞は、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ重要な抗原提示細胞として知られている。また、パイエル板や腸管上皮組織に存在する樹状細胞は全身免疫系の樹状細胞とは異なる機能を有することが知られている。すなわち、樹状細胞は生体内に侵入した感染性病原体を認識して様々な炎症性サイトカインを産生し、感染初期の防御反応を惹起する。さらに、樹状細胞は感染性病原体を捕食し、病原体に特異的なT細胞と反応し、キラーT細胞及び抗体産生に関わるヘルパーT細胞(IFN- $\gamma$ 産生Th1細胞, IL-4産生Th2細胞, IL-17産生Th17細胞)への分化に主要な役割を果たす。一方、樹状細胞は免疫系の恒常性の維持にも関与し、自己抗原への反応の抑制や制御性T細胞(Foxp3<sup>+</sup>制御性Tリンパ球等)の産生に関与する。さらに、樹状細胞はレチノイン酸やBAFF, APRILを分泌し、炎症性反応を惹起しない分泌型IgA産生を司ることやホーミング受容体発現の調節作用を有することが明らかにされている。従って、樹状細胞は免疫応答制御に対し中心的役割を果たし、その免疫応答調節機能は末梢のみならず粘膜組織においても注目されている。

和漢薬や漢方薬などの複合薬による薬物治療は生体の恒常性の維持に重きを置く薬物治療体系であり、その多くが免疫関連の不調が原因となる病態に応用されていることから、必然的に生体の重要な制御システムである免疫系が大きな標的となっている。これまで、これらの免疫指向性の和漢薬や漢方薬の薬効は有効成分が消化管から吸収された後に起こる全身免疫系への直接作用を想定した検討が行われてきた。一方、和漢薬や漢方薬は通常経口で服用する薬剤であることから、生体内の最大の免疫臓器である腸管の粘膜免疫系に直接大きな影響を与えることや、リンパ球の帰巢現象により腸管粘膜免疫系から共通粘膜免疫機構を介して遠隔の局所粘膜免疫系に作用することが推察される。しかしながら、これまでに和漢薬や漢方薬の腸管粘膜免疫系への直接作用や本免疫系を介した遠隔の粘膜免疫系への作用を対象とした検討はほとんど行われていない。

重点処方の一つである葛根湯は熱性炎症性疾患のみならず、古くは傷寒論にも止瀉作用が記載され消化管疾患に対する薬効を有している。共同研究者の山本らは食物アレルギー性モデルマウスでは腸

管粘膜免疫系が過剰亢進し、葛根湯は末梢性免疫寛容を誘導することにより改善効果を発揮することを報告している。また、補中益気湯は消化器機能の不調を目標にした各種疾患に用いられ、呼吸器・泌尿生殖器感染症、消化管粘膜障害やアレルギー性疾患に適応されている。共同研究者の清原らは、モデルマウスを用いた検討から、補中益気湯が上気道粘膜免疫機構での分泌型 IgA 産生能を賦活化させること、およびその作用発現の一部にパイエル板内でのホーミング受容体発現に対する調節作用が関与することを報告している。

そこで、本研究では腸管免疫系制御の観点からの漢方薬の作用様式の詳細を明らかにする先駆的研究として、重点漢方処方である葛根湯および補中益気湯の方剤の免疫寛容誘導および感染防御免疫誘導のメカニズムの詳細について検討を行った。

## ■結果・考察

### (1) 葛根湯による粘膜免疫系樹状細胞の機能修飾を介した免疫寛容の誘導

食物アレルギーは未だに有効な治療薬・治療方法が確立しておらず、早急な対応が期待されている。そこで、腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答の過剰亢進が病態に関与し症状が発症する食物アレルギー病態モデルマウスを用いて、重点方剤である葛根湯 (TJ-1:ツムラ) による治療効果の検討を行ない、この過剰に亢進した腸管粘膜免疫系を抑制することにより治療効果を示すことを報告している。そこで、さらにこの病態モデルを用いた重点方剤 (葛根湯・補中益気湯) の効果の検討と、これら方剤による腸管粘膜免疫系の制御機構の検討を行った。

#### 1) 重点方剤 (葛根湯・補中益気湯) による治療効果

食物アレルギー病態モデルに対し葛根湯が治療効果を有することから、まず葛根湯 (TJ-1:ツムラ) の治療効果の濃度依存性を検討した。葛根湯投与 (100 - 500mg/kg p.o.) は、濃度依存的に症状を抑制することを明らかにした (図 1)。同様に、補中益気湯投与 (500mg/kg p.o. TJ-41:ツムラ) による効果を検討した。しかし、補中益気湯はこの病態モデルに対してアレルギー性消化器症状の抑制をせず、治療効果を示さなかった。次に、正常マウスに対し葛根湯投与 (500mg/kg p.o.) を行い、近位結腸における IL-4 mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。葛根湯無処置マウスと比較し IL-4 mRNA 発現は変化せず、葛根湯は正常状態では腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答に影響を与えなかった。従って、葛根湯は抗原感作—抗原取り込み—抗原提示—エフェクター T 細胞の活性化の一連の腸管粘膜での免疫応答を調節していることが示唆された。

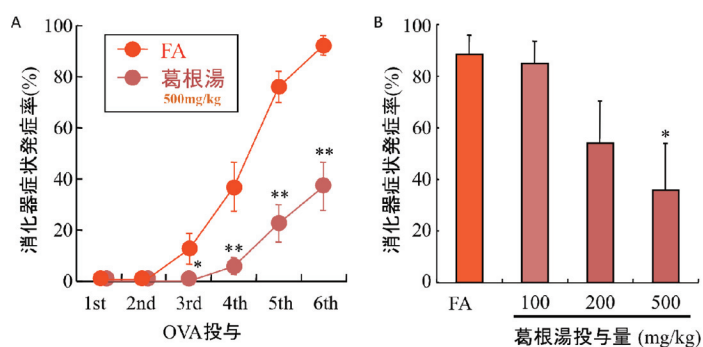


図 1. 葛根湯によるアレルギー性消化器症状誘発抑制効果  
(A) 食物アレルギー性消化器症状の発症率を示す。葛根湯投与により症状の発症は抑制された。(6 independent experiments, total n = 54-66). \* p<0.05, \*\* p<0.01.  
(B) 葛根湯による治療効果の濃度依存性を示す。葛根湯は濃度依存的に消化器症状の発症を抑制した (3 independent experiments, total n = 20-28). \* p<0.05.

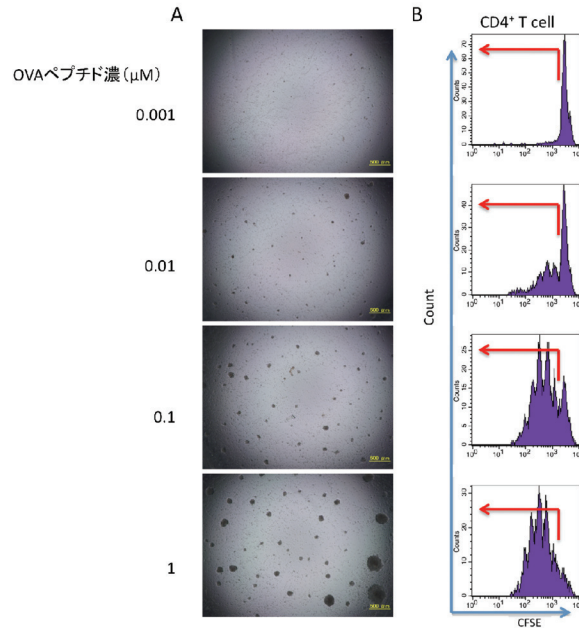


図2. 樹状細胞-Tリンパ球混合培養試験による抗原特異的T細胞増殖  
 (A)細胞増殖によるクラスタ形成を示す。共培養3日後のwellの典型例を示す。OVAペプチド濃度依存的にクラスタ形成が増多した。(B)フローサイトメータによる解析結果を示す。CFSE標識したCD4<sup>+</sup>T細胞は抗原特異的に増殖し、細胞内CFSE量が減少した細胞の割合が増加した。

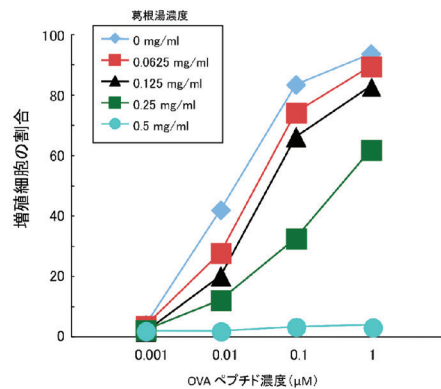


図3. 抗原特異的T細胞増殖に対する葛根湯の効果  
 OVAペプチド特異的な細胞増殖した割合を示す。OVAペプチドの濃度依存的に細胞増殖が誘導された。この増殖に対し、葛根湯処置は濃度依存的に抑制効果を示した。

## 2) 樹状細胞による抗原提示を介した T 細胞増殖に対する葛根湯の効果

葛根湯が腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答の亢進の誘導を抑制することから、T 細胞に抗原提示し分化増殖を誘導する樹状細胞とエフェクター細胞としての T 細胞に着目して検討を行った。DO11.10.TG マウス脾臓から OVA ペプチドを認識する TCR を発現した CD4<sup>+</sup> T 細胞を分取し、正常マウスの腸間膜リンパ節から樹状細胞分取して混合共培養を行い、OVA ペプチドを抗原として CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖に対する葛根湯の効果を検討した。樹状細胞と CFSE で標識した CD4<sup>+</sup> T 細胞の3日間の混合共培養において、CD4<sup>+</sup> T 細胞は培養液中 OVA ペプチドに対して特異的に増殖した。また、その増殖は OVA ペプチド (0.001 – 1μM) に濃度依存的であった (図2)。この共培養系において葛根湯を培地中に添加することにより CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖は抑制され、この葛根湯による増殖抑制効果は濃度依存的 (62.5 – 500μg/ml) であった (図3)。従って、葛根湯による食物アレルギー治

療効果の作用機序の一つとして、樹状細胞を介した食物アレルギー抗原提示によるエフェクター T 細胞の増殖を葛根湯が抑制することが示唆された。

しかし、葛根湯は樹状細胞の生存率、及び抗原提示能に関連する細胞表面抗原 MHC クラス II 分子と共刺激分子である CD80、及び CD86 の発現には影響を与えなかった。

### 3) 制御性 T 細胞誘導に対する葛根湯による効果

近年、抑制性の免疫系制御やアレルギー性疾患の治療に対し制御性 T 細胞の重要性が明らかになってきた。また、この制御性 T 細胞への誘導に対しても樹状細胞の関与が明らかになっている。そこで、次に食物アレルギー性消化器疾患に対する葛根湯の治療効果における制御性 T 細胞の関与を検討した。

葛根湯投与群及び未投与群の病態モデルマウス結腸から、それぞれ腸管粘膜固有層の CD4<sup>+</sup> T 細胞を分取した。これら CD4<sup>+</sup> T 細胞における Foxp3<sup>+</sup> 細胞の割合をフローサイトメータにより解析を行った。葛根湯未投与群に対し葛根湯投与群では CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加し、制御性 T 細胞が作用することが示唆された。そこで、葛根湯による制御性 T 細胞分化誘導能を検討するため、培養液中に TGFβ, レチノイン酸, IL-2, 抗 IL-4 抗体, 抗 IFNγ 抗体を添加し制御性 T 細胞に分化誘導する条件下において、樹状細胞と CFSE で標識した CD4<sup>+</sup> T 細胞の 3 日間の混合共培養を行った。この条件下において OVA ペプチド抗原特異的に制御性 T 細胞への分化は誘導されたが、この条件下においても葛根湯は CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖を抑制した。従って、葛根湯による制御性 T 細胞分化誘導の詳細な作用機序の不明である。

## (2) 補中益気湯による腸管粘膜免疫機構の機能修飾作用の解析

補中益気湯は暴飲暴食による消化機能の低下に基づくと考えられる種々の疾患に対する治療薬として歴史的に開発されたと解釈されている。腸管を覆う腸上皮細胞は栄養分の吸収機能に加え、樹状細胞機能の調節や抗菌ペプチド/タンパクの分泌など多彩な免疫機能を有しており、パイエル板から遠隔免疫組織に供給されるリンパ球の機能を調節することも知られている。そこで、本研究課題では、補中益気湯の腸上皮細胞に対する作用とパイエル板でのホーミング受容体発現に対する作用について検討を試みた。

### 1) 小腸上皮細胞に対する調節からの解析

医療用補中益気湯エキス (TJ-41; ツムラ) のラット十二指腸由来の非がん細胞株 (IEC-6 細胞) における免疫関連因子 mRNA 発現に対する *in vitro* での作用の検討を行ったところ、補中益気湯の添加はケモカイン (TECK, MIP-3α や MIP-2), サイトカイン (G-CSF や IL-6) およびパターン認識分子 (TLR9 や NOD2) の mRNA 発現を上昇させた。これらの免疫関連分子のうち、感染防御免疫能の増強とともに炎症の抑制にも関与する TLR9 や NOD2 の mRNA 発現に対する補中益気湯の *in vivo* での作用の検討を行った。6 ヶ月齢の加齢マウスへの補中益気湯の投与 (7 日間もしくは 28 日間) は空腸上皮組織でのこれらのパターン認識分子 mRNA 発現を変化させなかった。一方、抗がん剤の methotrexate (MTX, 100 mg/kg, i.p.) を単回投与したマウスへの補中益気湯の経口投与は MTX 投与 7-10 日目において空腸や回腸上皮組織での TLR9 および NOD2 mRNA 発現を有意に増強した (図 4)。また、MTX のみ投与したマウスでは 7-10 日目で炎症マーカーの TNF-α mRNA 発現の上昇が認められたが、補中益気湯投与群では正常レベルにまで改善していることが示唆された。この MTX 投与による TNF-α mRNA の発現上昇から本抗がん剤による上皮障害で腸内細菌のトランスロケーション

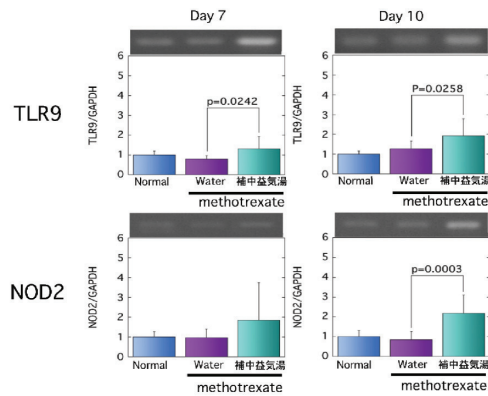


図4. 補中益気湯投与によるmethotrexate投与マウス空腸でのTLR9およびNOD2 mRNA発現増強作用  
methotrexate処置マウス空腸におけるパターン認識分子mRNA (TLR9およびNOD2)の変化を示す。Mean±SD (n=7-8)

が起きていることが推定された。

一方、腸上皮細胞はIgAへのクラススイッチに関与するレチノイン酸の合成酵素(ALDH1A1)を発現することが知られている。マウスへのMTX投与では小腸上皮組織でのALDH1A1 mRNA発現に変化は認められなかったが、補中益気湯の投与により本mRNAの有意な上昇が観察された。また、この作用は加齢マウスへの直接の補中益気湯の投与によっても観察された。さらに、パイエル板を覆う上皮細胞(FAE)はその他の腸上皮細胞とは異なる機能を有することが示唆されている。FAEではケモカインのMIP-3 $\alpha$ が特異的に発現されているが、MTX投与マウスではそのmRNA発現は有意に低下し、本マウスへの補中益気湯の投与によりその発現は有意に改善された。また、この現象は非リンパ濾胞性腸上皮細胞では観察されなかった。

## 2) パイエル板免疫細胞のホーミング受容体 mRNA 発現に対する作用の検討

パイエル板から遠隔の粘膜局所や造血系、全身免疫系へのリンパ球の移送はリンパ球上の接着因子とケモカイン受容体のセット(ホーミング受容体)に依存して行われている。補中益気湯のホーミング受容体発現に対する作用の解析は本漢方薬の作用の発現する臓器特異性を理解する上で重要な情報を与えることが期待される。本研究では、パイエル板免疫細胞上のホーミング受容体の発現変化について mRNA 発現レベルでの検討を試みた。ニューキノロン系抗生物質のlevofloxacinを投与したBALB/cマウスパイエル板を用いて検討した結果、levofloxacin投与によりintegrin類( $\alpha 4$ ,  $\beta 1$ および $\beta 7$ )のうち $\alpha 4\beta 1$ の低下が観察されたが、補中益気湯の投与による回復は認められず、ケモカイン受容体 mRNA(CCR4, CCR10, CXCR3)の発現変化も観察されなかった。

## ■結論

### (1) 葛根湯による粘膜免疫系樹状細胞の機能修飾を介した免疫寛容の誘導

葛根湯は腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の過剰亢進が関与する食物アレルギー性消化器症状を改善した。葛根湯は樹状細胞により抗原提示された抗原特異的T細胞の増殖反応を抑制する作用と、制御性T細胞を分化誘導する作用を有することを明らかにした。これらの効果により、葛根湯は腸管粘膜免疫系の過剰亢進の抑制することが示唆された。

## (2) 補中益気湯による腸管粘膜免疫機構の機能修飾作用の解析

補中益気湯は非リンパ濾胞性腸上皮細胞のパターン認識分子発現やレチノイン酸合成，並びにリンパ濾胞性腸上皮細胞（FAE）での MIP-3 $\alpha$  発現を介して，その下層の樹状細胞，マクロファージやリンパ球の機能を修飾していることが推定された。一方，パイエル板免疫細胞のホーミング受容体 mRNA 発現にも影響を与える可能性も推定されたが，パイエル板からの，免疫細胞の遊出は常時起こっていることから，補中益気湯の作用の把握にはさらに検討を要することが示唆された。

以上のように腸管粘膜免疫系制御の観点から，重点方剤としての葛根湯と補中益気湯の作用を解析し，免疫寛容誘導および感染防御免疫誘導のメカニズムの一端を明らかにした。今後さらに，これらの重点方剤の腸管粘膜免疫系に対する詳細な作用機序の検討を行い，本方剤の臨床応用での適応拡大や EBM にも繋げるとともに，他の和漢薬や漢方薬の粘膜免疫系に対する解析法の提示にも繋がることを期待する。