麻黄含有漢方方剤の気管支ぜん息治療効果に対する免疫学的な機序解明およびその活性物質の探索

～ケモカイン受容体CCR３，CCR４，およびCCR８に対するトリプルアンタゴニストに焦点を絞って～

申請代表者	中山　隆志	近畿大学薬学部医療薬学科化学療法学研究室	教授
所外共同研究者	田中　宏幸	岐阜薬科大学薬理学研究室	准教授
〃	義江　　修	近畿大学医学部細菌学教室	教授
所内共同研究者	小泉　桂一	臨床科学部門　漢方診断学分野	准教授

【報告セミナー要旨】

【目的】現在，ケモカイン受容体はアレルギー性疾患を初めとする炎症性疾患の創薬標的分子として注目を集めている。我々は，平成21年度共同研究において，和漢薬ライブラリーを用いた網羅的探索により，マオウエキスがケモカイン受容体CCR3，CCR4，およびCCR8に対するトリプルアンタゴニスト活性を有していることを明らかにしてきた。そこで，本研究では，(1)麻黄含有漢方方剤のぜんそく治療に対する有用性を動物モデルにより解析する。さらに，(2)そのアンタゴニスト活性成分体の同定を行う。ことを2年間の研究目的とした。

【結果】

(1)ぜん息動物モデルによる麻黄湯の評価：平成22年度共同研究において，我々はマウス気道炎症に対して，麻黄湯が有効であることを明らかにしている。そこで，本研究では卵白アルブミン(OA)および，チリダニ抗原(Der f)をマウス気管内に反復投与する喘息モデルを用いて麻黄湯の影響を検討した。その結果，OAモデルでは感作およびその後の抗原反復曝露によりアセチルコリンに対する気道過敏性，BALF中好酸球を中心とする炎症性細胞の浸潤ならびに血清中抗原特異的IgE値の上昇が認められた。これに対し，麻黄湯はほとんど影響を及ぼさなかった。一方，麻黄湯はDer f誘発による気道過敏性ならびにBALF中炎症性細胞の浸潤に影響を及ぼさなかった。

(2) アンタゴニスト活性成分体の同定：初めにマオウの主成分であり既に抗アレルギー作用が知られているエフェドリンについて，ケモカインCCR3，CCR4とCCR8受容体に関して検討した結果，優位なアンタゴニスト活性は確認できなかった。そこで次にマオウエキスから，4つの分画を調整した結果，酢酸エチル非可溶性分画にもとのマオウエキスより強いCCR3とCCR4に対するアンタゴニスト活性が確認された。

【考察と今後の展望】本研究において，麻黄湯はぜん息動物モデルに対する効果は確認出来なかった。その理由としては，麻黄湯エキスは麻黄エキスと較べて，そのCCR3およびCCR4に対するアンタゴニスト活性が弱いことが考えられる。一方で，アンタゴニスト活性が濃縮された分画を得ることが出来た結果，マオウにはエフェドリン以外の抗アレルギー作用をもつ物質が存在することが示唆された。今後は，定法に従って，CCR3およびCCR4に対するアンタゴニスト成分を同定し，その成分を上記ぜん息動物モデルにて再評価する予定である。

■背景・目的

ケモカインは白血球やリンパ球等の免疫担当細胞遊走を誘導するサイトカインの一群であり，その受容体は創薬の代表的な標的分子である7回膜貫通Gタンパク共役型受容体(GPCR)であり，19種類が確認されている。これらケモカインおよびその受容体はアレルギー疾患等に重要な役割を担っている。種々疾患のキーファクターとなるケモカインならびにその受容体が解明され，それら分子の相互作用を阻害することにより，アレルギー疾患を初めとした異常免疫応答に有効な治療効果を発揮できることから，現在，ケモカイン受容体のアンタゴニスト探索が精力的に展開されている。これまでに我々（近畿大学・中山，義江ら）は世界に先駆けて多くのケモカインならびにその受容体のクローニングに成功し，さらに生理的および病的な役割を詳細に明らかにすることで本研究領域を世界的にリードしてきた。さらに，19種類全てのケモカイン受容体に対して，各々一受容体のみを遺伝子工学的に過剰発現させた免疫担当細胞株のラインナップ（細胞パネル）を作製し，これら細胞のケモカインへの遊走阻害を指標に，ケモカイン受容体のアンタゴニストの探索を網羅的に遂行できるシステムの構築してきた。既に，平成21年度共同研究において，本パネルシステムに標準和漢薬ライブラリーを供したところ，麻黄エキスが，ケモカイン受容体CCR3，CCR4，およびCCR8に対するトリプルアンタゴニスト活性を有していることが確認できた。これら3つは，好酸球，および好塩基球等のアレルギー反応惹起担当細胞に発現している受容体であり，特に，これらのトリプルアンタゴニストは，気管支ぜん息治療の有望な候補薬剤となり得るために，その探索が精力的に行われている。そこで，本研究では，上記トリプルアンタゴニスト活性の結果を基盤として，既に，気管支ぜん息治療で汎用されている麻黄含有漢方方剤の効果機序を，世界的なぜんそく治療薬トラニラストの創薬開発に貢献した動物モデル（岐阜薬科大学・田中）により，解析する。さらに，そのトリプルアンタゴニスト活性成分本体の同定を，漢方方剤の薬効を免疫学的に解析し，かつトランスレーショナルリサーチを意欲的に推進している和漢研担当共同研究教員（小泉）が担当する。従って，本研究の目的は，各研究領域で実績を有する3グループの研究者が，平成21年度の共同データをもとに連関を取ることで，ケモカイン受容体CCR3，CCR4，およびCCR8に焦点を絞って，麻黄含有漢方方剤の気管支ぜん息治療効果に対する免疫学的な機序解明およびその活性成分の探索を遂行することにある。

■結果・考察

（1）実験材料および方法

A. ぜん息動物モデルによる麻黄湯の評価

本研究では先ず古典的かつ汎用されている卵白アルブミン(OA)によるマウス喘息モデルを用いて麻黄湯の影響を検討した。次いで，臨床において重要な抗原であるチリダニ抗原(Der f)をマウス気管内に反復投与する喘息モデルを用いて麻黄湯の影響を検討した。すなわち，マウスをOAおよびアラムにて2回腹腔内注射することにより能動的に感作し，その後，OA生理食塩水溶液を4日おきに計3回吸入曝露した。麻黄湯は初回抗原曝露前日から10日間経口投与した。一方，ダニ抗原モデルは吸入麻酔下，マウス気管内にDer fを計8回投与した。麻黄湯は5回目の抗原投与前から10日間連日経口投与した。OAモデルの場合は最終抗原曝露24時間後に，Der fモデルの場合は最終抗原曝露48時間後に，麻酔下人工呼吸下にてアセチルコリンに対する気道収縮を測定し，直後に左気管支は結紮後，気管支肺胞洗浄を行い，気管支肺胞洗浄液(BALF)を得た。その後，BALF中の炎症性細胞

数を計数すると共に，サイトカイン（IL-13・IFN-γ）・ケモカイン(eotaxin)の定量，組織学的解析，血清中抗原特異的IgE値などの定量を行った。

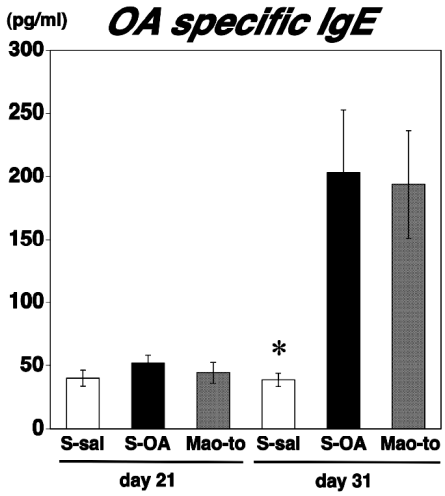
B. アンタゴニスト活性成分体の同定

細胞遊走はCHEMOTXケモタキシスチャンバー（Pore size 5μm）を用いて行った。L1.2細胞のCCR1，CCR2，CCR3，CCR4，CCR5およびCCR8安定発現細胞は細胞遊走バッファー（0.5% BSA，20 mM HEPES pH7.4，RPMI-1640 without phenol red）で洗浄を2回行った後，8×10^6個/mlとなるように懸濁した。ケモカインを細胞遊走バッファーで希釈して下部ウェルに29μl加え，8×10^6個/mlに調整した細胞を上部ウェルに25μl(2×10^5個)加えた。チャンバーは5% CO_2インキュベーター中で37℃，2時間放置した。下部ウェルに遊走した細胞を溶解溶液（0.1% triton-X100，10 mM Tris pH8.0）で溶解し，同時にPicoGreen 2本鎖DNA定量試薬（Molecular Probes，Eugene，OR）を用いてラベルした。蛍光強度を励起光485 nm/測定光535 nmで測定し，細胞数を定量した。細胞遊走は上部ウェルにインプットした細胞の%として標記した。麻黄湯，エフェドリン，麻黄エキス，麻黄分画のケモカイン依存的な細胞遊走に与える影響を検討するために，これらを下部のケモカイン溶液に加えて細胞遊走解析を行い，阻害活性を測定した。細胞はカルシウム濃度上昇反応解析バッファー（1% BSA，10 mM HEPES pH7.4，HBSS）で洗浄を2回行った後，1×10^6個/mlとなるように懸濁した。細胞懸濁液1mlあたりfura2-AM (1 mM DMSO溶液)(Molecular Probes)を3μl加え，37℃で1時間，暗所に放置した。洗浄を2回行った後，細胞を5×10^6個/mlとなるように懸濁した。100μlの細胞懸濁液を石英セルに入れて，蛍光分光光度計Fluorescence Spectrophotometer F-2500（Hitachi，Tokyo，Japan）に配置した。ケモカイン刺激による蛍光強度の増強は励起光485 nm/測定光535 nmで測定した。麻黄由来の酢酸エチル非可溶性分画のケモカイン依存的な細胞内カルシウム濃度上昇反応に与える影響を検討するために，酢酸エチル非可溶性分画をケモカイン刺激の30秒前に前投与して解析を行った。

（2）結果

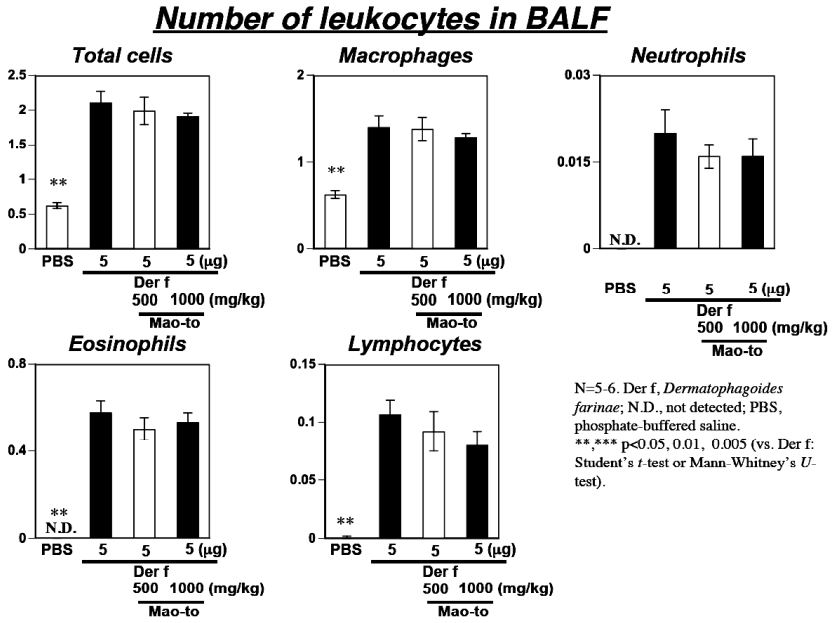
A. ぜん息動物モデルによる麻黄湯の評価

平成22年度共同研究において，我々はマウス気道炎症に対して，麻黄湯が有効であることを明らかにしている。そこで，本研究では卵白アルブミン(OA)および，チリダニ抗原(Derf)をマウス気管内に反復投与する喘息モデルを用いて麻黄湯の影響を検討した。その結果，OAモデルでは感作およびその後の抗原反復曝露によりアセチルコリンに対する気道過敏性，BALF中好酸球を中心とする炎症性細胞の浸潤ならびに血清中抗原特異的IgE値の上昇が認められた。これに対し，麻黄湯はほとんど影響を及ぼさなかった（Fig.1)。一方，麻黄湯はDerf誘発による気道過敏性ならびにBALF中炎症性細胞の浸潤に影響を及ぼさなかった（Fig.2)。



N−6. OA, ovalbumin-inhaled; S, sensitized; Sal, saline-inhaled; IgE, immunoglobulin E.
* p< 0.05 (vs S-OA: Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U*-test)

Fig.1　OA モデルにおける麻黄湯の効果



N=5-6. Der f, *Dermatophagoides farinae*; N.D., not detected; PBS, phosphate-buffered saline.
,* p<0.05, 0.01, 0.005 (vs. Der f: Student's *t*-test or Mann-Whitney's *U*-test).

Fig.2　Der f モデルにおける麻黄湯の効果

B. アンタゴニスト活性成分体の同定

初めに麻黄湯に関して，ケモカインCCR3，CCR4とCCR8受容体に関するアンタゴニスト活性を評価した。その結果，麻黄エキスと比べて麻黄湯のCCR3とCCR4に対するアンタゴニスト活性が弱いこと，およびCCR8に対してはその活性は有しないことが確認された。次に，マオウの主成分であり既に抗アレルギー作用が知られているエフェドリンについて，ケモカインCCR3，CCR4とCCR8受容体に関して検討した結果，これら3種類の受容体に対して，優位なアンタゴニスト活性は確認できなかった。そこでマオウエキスから，酢酸エチル可溶性分画，酢酸エチル非可溶性分画，クロロホルム可溶性分画，および水溶性分画の4つの分画を調整した結果，酢酸エチル非可溶性分画にもとのマオウエキスより強いCCR3とCCR4に対するアンタゴニスト活性が確認された（Fig.3）。次に，麻

黄由来の酢酸エチル非可溶性分画による細胞遊走阻害活性のケモカイン受容体特異性を検討した。既知の全てのケモカイン受容体の系統樹解析を行った結果，CCR3とCCR4はCCR1，CCR2，CCR5およびCCR8に対して構造的類似性が高いことが示された。さらにCCR1～5およびCCR8のL1.2安定発現細胞株を用いた細胞遊走解析により，酢酸エチル不溶性分画のアンタゴニスト活性を解析した。CCR1の細胞遊走はCCL5/RANTES，CCR2はCCL2/MCP-1，CCR3はCCL11/eotaxin，CCR4はCCL22/TARC，CCR5はCCL5/RANTESそしてCCR8はCCL1/I-309を用いた結果，酢酸エチル非可溶性分画は，CCR1に対しても弱いアンタゴニスト活性を示し，比較的CCR3とCCR4に特異的なアンタゴニスト活性を示すことが確認された（Fig.4）。一方，CCR3とCCR4にはそれぞれ複数のリガンドが存在しており，CCR3のリガンドとしては，CCL11/eotaxin，CCL24/eotaxin-2，CCL26/eotaxin-3，CCL13/MCP-4，CCL5/RANTES，また，CCR4のリガンドとしてはCCL22/MDCとCCL17/TARCが知られている。そこで次にこれらのリガンドによるCCR3とCCR4を介した細胞遊走への酢酸エチル不溶性分画の影響を検討した。酢酸エチル非可溶性分画は，これら全てのリガンドによるCCR3とCCR4を介した細胞遊走が阻害した。これらのケモカインのアミノ酸レベルでの相同性は30％程度であることから，酢酸エチル非可溶性分画によるアンタゴニスト活性は，リガンド側ではなく受容体側への直接作用によると考えられた（Fig.5）。また，ケモカイン受容体を介したシグナルは，三量体G蛋白質を介して伝達されるが，細部遊走活性にはGαサブユニットが重要な役割を果たすことが知られている。一方で，βγサブユニットは，PLCβの活性化を介して細胞内小胞体からのカルシウム放出を誘導し，この放出されたカルシウムは細胞遊走活性以外の，遺伝子発現誘導，細胞増殖活性，抗アポトーシス活性，血管新生作用などにおいて重要な役割を果たすと考えらえている。そこで，次に酢酸エチル非可溶性分画のケモカイン刺激によって誘導される細胞内カルシウム濃度上昇反応における影響を検討した。CCL11/eotaxinとCCL22/MDCは，それぞれCCR3とCCR4のL1.2安定発現細胞株において，強い細胞内カルシウム濃度上昇反応を誘導した。これらの反応は，酢酸エチル非可溶性分画の前投与により，有意に抑制されることが確認された。この結果から，酢酸エチル非可溶性分画が細胞遊走活性以外のケモカイン機能も阻害する可能性が示唆された。

（3）考察

本研究において，麻黄湯はぜん息動物モデルに対する効果は確認出来なかった。その理由としては，麻黄湯エキスはマオウエキスと較べて，そのCCR3およびCCR4に対するアンタゴニスト活性が弱いことが考えられる。一方で，アンタゴニスト活性が濃縮された分画を得ることが出来た結果，マオウにはエフェドリン以外の抗アレルギー作用をもつ物質が存在することが示唆された。今後は，定法に従って，CCR3およびCCR4に対するアンタゴニスト成分を同定し，その成分を上記ぜん息動物モデルにて再評価する予定である。

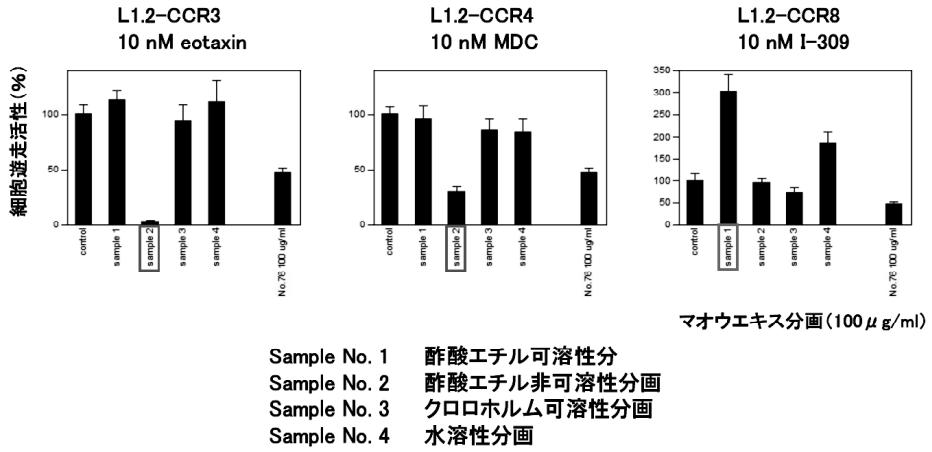


Fig.3　マオウエキスより調整された 4 分画のアンタゴニスト活性の評価

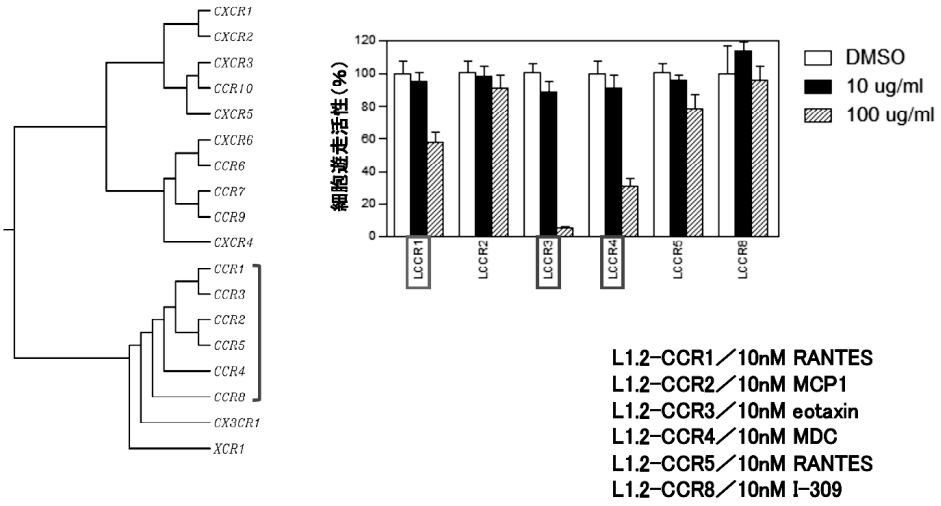


Fig.4　マオウエキス由来の酢酸エチル非可溶性分画による細胞遊走阻害活性の受容体特異性

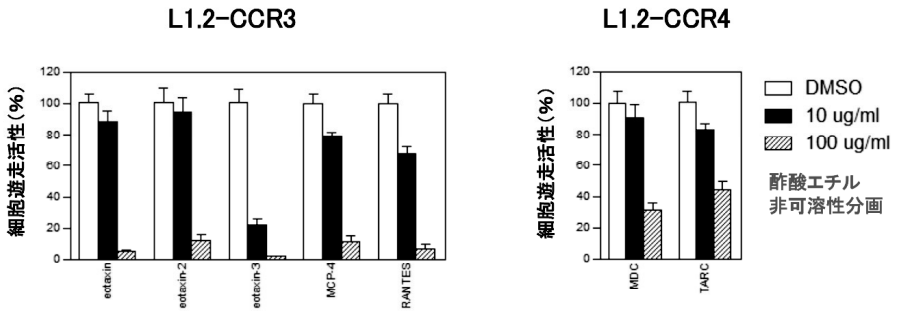


Fig.5　マオウエキス由来の酢酸エチル非可溶性分画の CCR3 と CCR4 リガンドによる細胞遊走への影響