

# 腸管免疫系に対する漢方薬の作用の解析

## —補中益気湯と葛根湯を例にして—

申請代表者 清原 寛章 北里大学北里生命科学研究so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

### 【報告セミナー要旨】

年間生産量が上位50位までの特掲医薬品・漢方製剤のうち29製剤が炎症性の病態や免疫低下の病態に対する臨床適用を有しており、これらの免疫調節作用の解析がその臨床応用の合理的説明や新たな臨床応用につながると考えられる。造血系から産生され末梢にリクルートされるリンパ球や樹状細胞の一部は腸管免疫系のリンパ濾胞装置であるパイエル板などに移送されるとともに、リンパ球は再び腸間膜リンパ節を介してリンパ行性および血行性に免疫実効組織に移送されることが明らかとされてきた。また、粘膜下樹状細胞は腸間膜リンパ節においてパイエル板から移動したリンパ球の機能を修飾することも示唆されている。これらのことから、向免疫的作用を有する漢方方剤が腸管免疫装置の免疫細胞への作用を介してその臨床効果を発現している可能性が考えられる。

本研究では、これまでに申請者らが明らかとしてきた補中益気湯による上気道粘膜免疫系に対する賦活化作用および葛根湯による食物アレルギーへの改善効果の作用メカニズムを腸管のパイエル板および粘膜固有層の樹状細胞の免疫機能に対する観点から解析する。また、その研究法から、これらの2方剤の作用の比較解析のための方法論の構築を目指す。

葛根湯の投与は卵白アルブミン(OVA)で感作したマウスへの複数回のOVAの経口投与により惹起されるアレルギー性消化器症状を軽減する。同モデルに対する補中益気湯の効果を評価した結果、本方剤の投与ではアレルギー性消化器症状の改善は認められなかった。葛根湯による改善効果の一部は制御性Tリンパ球の誘導が関与していることが推定されたことから、樹状細胞の機能への葛根湯の作用を検討することを目的として、骨髓細胞から誘導した樹状細胞を用い、抗原取込能および成熟化を指標にした評価系を構築し、葛根湯の作用を検討した。

一方、上気道粘膜免疫系の維持・調節にはパイエル板からのリンパ球の帰巢による免疫制御が関与している。これまでの検討で、補中益気湯の投与が上気道免疫組織へのホーミングに関与するselectin (CD62L)を発現するBリンパ球数をパイエル板で増加させることが明らかとなっていることから、本方剤のパイエル板免疫機能に対する作用の検討を行った。抗がん剤のmethotrexateを投与したマウスではパイエル板でのCCL20 (MIP-3 $\alpha$ )のmRNA発現が有意に低下していたが、補中益気湯の投与により回復し、その発現変化はリンパ濾胞関連上皮(FAE)で起こっていることが示唆された。また、FTY720の投与で前処置したマウスへの補中益気湯の投与により、CD62LやCCR6 mRNAの発現が有意に上昇するとともにIFN- $\gamma$ やIL-21のmRNA発現も有意に増加していた。

これらの粘膜固有層樹状細胞およびパイエル板免疫細胞の機能に対する評価法から、2処方および漢方方剤全般の腸管免疫系に対する作用の比較のための方法論が構築できると考えられる。

## ■背景・目的

漢方薬物治療は生体の恒常性維持に重きを置く薬物治療体系であり、年間生産量が上位50位までの漢方薬の約半数が免疫機構の恒常性の破綻が原因となる病態に適応されており、生体の重要な制御システムである免疫系は漢方薬の大きな標的となっている。これまで、これらの免疫系制御を目的とした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。しかし、漢方薬が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（腸管粘膜免疫系）に直接大きな影響を与える可能性が示唆されている。また近年、腸管粘膜免疫系からの免疫系細胞の遊走などが、呼吸器や泌尿生殖器などの他の局所粘膜免疫系や全身免疫系に作用することが示唆されるようになってきた。しかしながら、これまで漢方薬の腸管局所の免疫系への作用や腸管粘膜免疫系を介した遠隔の他の免疫系への作用の検討はほとんど行われていない。

腸管局所での免疫応答は主として腸管上皮細胞と樹状細胞との相互作用により誘導されることが知られている。また、樹状細胞はパイエル板においても重要な役割を果たしており、薬物の免疫制御作用を明らかにするためには、これら免疫細胞・免疫組織への作用の解析が重要であると考えられている。さらに、パイエル板では特異に配置された樹状細胞、Tリンパ球およびBリンパ球から構成されるリンパ濾胞組織で、腸管腔から取り込まれる種々の抗原や病原体、食物成分に対する種々の免疫応答を引き起こすことが知られている。しかし、これら腸管局所からの免疫制御系に対して、漢方薬の作用による制御について詳細な検討はなされていない。

補中益気湯は、臨床においてがん化学療法時での食欲不振に対する改善作用や免疫弱者での呼吸器感染症の予防に有効性が確認されていることから、腸管局所での免疫系と遠隔の粘膜免疫機構に作用を及ぼすことが推定されてきた。これまでに本研究課題申請者（清原寛章）らは、病態モデル動物を用いて小腸上皮細胞での炎症改善作用や腸管免疫系を介した上気道粘膜免疫機構への賦活化作用を明らかとしている。一方、葛根湯は古来より風邪の初期に対する作用や蓄膿症などの炎症性疾患に対する治療効果が知られており、免疫系制御による効果が示唆される。これまでに本研究課題の共同研究者（山本武）らは食物アレルギーモデルマウスに対する本漢方薬の有効性についての基礎科学的知見を得ており、本漢方薬が食物抗原による下痢の改善、腸管局所でのマスト細胞の浸潤誘導に対する抑制的作用や制御性Tリンパ球の誘導に対する作用を明らかにしている。さらに、補中益気湯及び葛根湯の両漢方薬の経口投与により、サイトカイン遺伝子発現などの免疫学的パラメーターの変化が誘導されることも明らかにしている。

これらのことから、両漢方薬は免疫機構に対する制御的な作用を有し、腸管局所の腸管粘膜免疫系を制御するとともに遠隔の免疫機構に対する作用を合わせ持つことが推測される。さらに、腸管パイエル板からは腸管以外の粘膜局所へのリンパ球の移送現象に関わることに加え、腸管局所へのリンパ球の移送にも関わっており、特に葛根湯の腸管局所への作用の一部がパイエル板を介した制御性Tリンパ球誘導などの作用により発現されている可能性も推定される。

そこで本研究では、漢方薬全般の腸管免疫系に対する作用の解析法の構築を目指し、免疫制御を行う補中益気湯および葛根湯の腸管免疫系に対する作用メカニズムの解析として、腸管パイエル板および樹状細胞に対する作用の解析を行い、それらの効果およびメカニズムを比較検討した。

## ■結果・考察

### 1. 補中益気湯の小腸上皮組織およびパイエル板の免疫機能に対する作用の解析

BALB/cマウス(雌性, 7週齢)にmethotrexate (MTX, 100mg/kg)を腹腔内投与した結果, ヘマトキシリンエオジン染色法(HE染色法)にてMTX投与1日後から絨毛上皮組織での障害が認められ, MTX投与1-3日後に小腸でのTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$  mRNAの発現上昇が観察された。一方, 本モデルマウスに補中益気湯エキス原末(TJ-41, 1g/kg/day)を経口投与した結果, MTX投与3日後での小腸粘膜への細胞浸潤が改善され, MTX投与2日以降でTNF- $\alpha$ やIL-1 $\beta$ のmRNA発現が有意に低下した。小腸で抗炎症性サイトカインであるIL-10のmRNA発現はTJ-41の投与で変化しなかったが, TLR類の炎症性シグナルカスケードを負に制御するIRAK-MのmRNA発現がTJ-41の投与によりMTX投与1日後までに有意に増強していた。

TJ-41からIRAK-M発現増強成分の探索を行うため, TLR9/NOD2発現増強を指標としてIRAK-M発現増強成分の探索を行った結果, kestoneoligosaccharideにIRAK-M発現増強活性が認められた。*In vivo*においてkestoneoligosaccharide (0.82mg/kg/day)をMTX誘発小腸上皮傷害モデルマウスに経口投与した結果, MTX投与1日後に小腸でIRAK-M mRNAの発現増強が, また2日後にTNF- $\alpha$  mRNAの発現低下が認められた。

BALB/cマウスのmethotrexate処置によりマウスパイエル板でのCCL20mRNAの発現は有意に低下し, TJ-41の投与でその発現は有意に回復した。CCL20はパイエル板のリンパ濾胞上皮(FAE)に強く発現されるケモカインであるが, 抗CCL20抗体を用いた免疫染色により, TJ-41を投与したmethotrexate処置マウスでもFAE領域にCCL20の強い染色像が観察された(図1)。

TJ-41のいずれの分画画分, またはその脂溶性低分子含有画分と高分子多糖画分を組合せて経口投与した場合には, 経鼻接種インフルエンザワクチンによる2次免疫モデルマウスでの鼻腔中の抗原特異的IgA産生に変化は認められなかったが, 腸上皮系細胞でIRAK-M発現増強作用が認められたkestoneoligosaccharideを含有する分画画分をさらに合わせることで, 抗体産生増強作用が認められた。

### 2. 葛根湯および補中益気湯の食物アレルギーモデルマウスに対する作用の比較と樹状細胞機能に対する作用の解析

BALB/cマウス(雄性, 5週齢)に卵白アルブミン(OVA, 2.5mg/kg)を水酸化アルミニウムゲルとともに腹腔内に投与し全身感作を行い, その後OVA(2.5g/kg)の経口投与を行い, 食物アレルギー性消化器症状を誘発させた。この食物アレルギー病態モデルに対して, 葛根湯(TJ-1, 500mg/kg)もしくは補中益気湯(TJ-41, 500mg/kg)の投与を行った。その結果, 葛根湯は食物アレルギー性消化器症状を抑制したが(図1), 補中益気湯は抑制しなかった(図2)。従って, 両漢方薬は腸管に対する免疫作用を有するが, 異なった効果を示し, その作用メカニズムは異なっていることが推察された。

これまでに, 葛根湯が腸管粘膜免疫系のTh2型免疫応答の過剰亢進を抑制することによって治療効果を示すことを明らかにしている。そこで, 両漢方薬の作用メカニズムを解明するために, 腸管粘膜免疫系の制御に対し中心的な役割を担う樹状細胞に対する漢方薬の効果の実験系を確立するため, マウス骨髄細胞を採取し, 10%Fetal bovine serum, 55 $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 100units/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin, 292 $\mu$ g/ml Glutamine含有RPMI-1640培養液に, 10ng/mlGM-CSFの添加により未成熟樹状細胞を分化誘導し, 6日後に採取した。



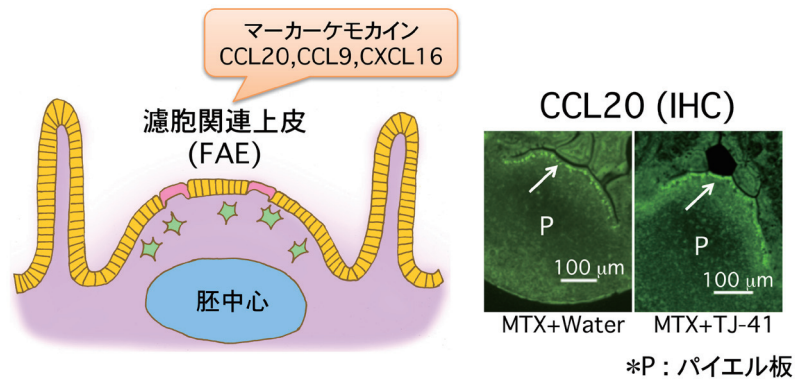


図1. メソトレキセート投与マウスのパイエル板濾胞関連上皮 (FAE) での CCL20 発現に対する補中益気湯の影響

メソトレキセート (100 mg/kg) を腹腔内投与後 1 週間 TJ-41 (1g/kg/day) を経口投与したマウスパイエル板を採集し、抗 CCL20 抗体を用いて免疫組織染色を行った。

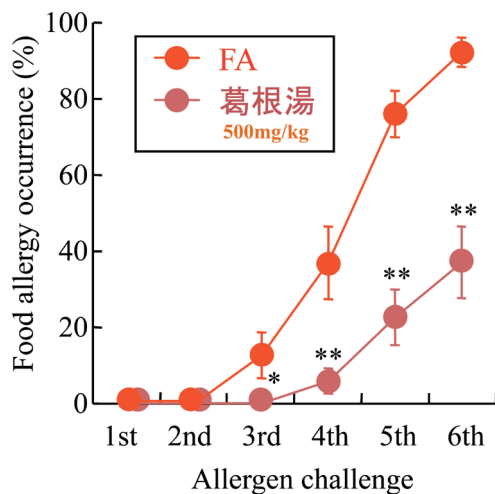


図2. 葛根湯によるアレルギー性消化器症状誘発抑制効果

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.

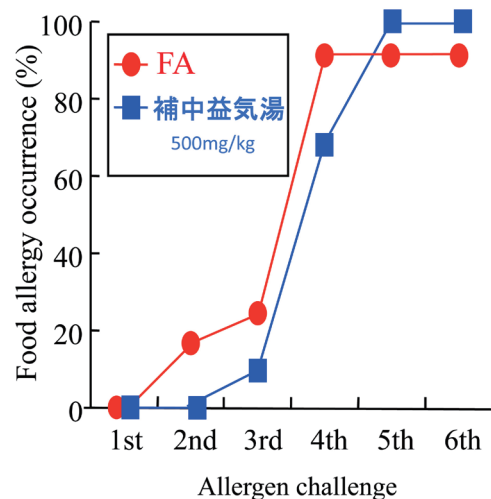


図3. 補中益気湯によるアレルギー性消化器症状誘発抑制効果

食物アレルギー性消化器症状の発症率を示す。補中益気湯投与により症状の発症は抑制されなかった。

未成熟樹状細胞は、病原体などを取り込み、その一部を抗原としてTリンパ球に提示し、Tリンパ球の分化を誘導することにより免疫系を制御する。そこで、分化誘導した未成熟樹状細胞を、FITC標識OVA (10μg/ml) 添加培地で1時間培養し貪食作用をフローサイトメーターにより測定した。その結果、未成熟樹状細胞の約60%が、FITC標識OVAを貪食した。この貪食作用に対し、葛根湯 (10μg/ml, 100μg/ml) を同時処置し、葛根湯の効果を検討した。その結果、有意な作用は検出されなかった。従って、樹状細胞の貪食作用には、葛根湯が効果を示さないことが明らかになった。

また、樹状細胞は成熟化に伴い、サイトカイン等を分泌し免疫系を制御する。そこで、分化誘導した未成熟樹状細胞を、Lipopolysaccharide (LPS, 0.1μg/ml) により24時間刺激を行ない、成熟化を誘導した。樹状細胞は成熟化に伴い、細胞表面分子であるMHC class II, CD80, CD86の発現を増

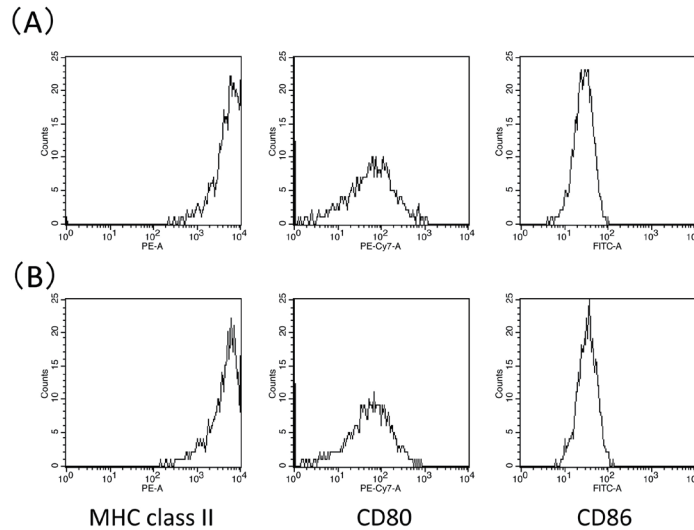


図4. 樹状細胞の細胞表面分子発現に対する葛根湯の効果

LPS刺激による樹状細胞の細胞表面分子の発現を示す。(A)未成熟樹状細胞はLPS刺激により、細胞表面分子 (MHC class II, CD80, CD86) の発現が誘導された。(B)葛根湯処置 (500µg/ml) は、MHC class II, CD80, CD86の発現に効果を示さなかった。

加させるため、分化誘導した細胞表面分子を指標としてフローサイトメーターにより測定した。この成熟化に伴い発現する細胞表面分子を指標に、葛根湯の効果を検討した。LPS刺激により、樹状細胞は、MHC class II, CD80, CD86の細胞表面分子を発現した (図3A)。葛根湯 (500µg/ml) をLPS添加とともに培地中に添加し、葛根湯の効果を測定した結果、葛根湯処置によって細胞表面分子の発現量は変化しなかった (図3B)。従って、樹状細胞の成熟化には、葛根湯が効果を示さないことが示唆された。

以上の結果から、腸管粘膜免疫系の制御機構として樹状細胞機能として成熟化に着目した検討を行い、測定系は確立することができたが、葛根湯による効果は検出されなかった。

## ■結論

補中益気湯は小腸上皮系細胞におけるIRAK-Mの発現誘導を介して小腸上皮細胞の障害による炎症性反応を改善する作用を有する可能性を初めて示した。またIRAK-M発現増強成分としてoligofructose鎖構造を含むオリゴ糖を初めて見出した。また、補中益気湯はパイエル板濾胞関連上皮 (FAE) におけるCCL20の発現増強を介して免疫応答を調節することを推定した。さらに、補中益気湯による上気道粘膜免疫系賦活化作用の発現には複数の含有成分が関与することを初めて明らかとし、オリゴ糖類が小腸上皮系細胞とともにパイエル板の所属免疫細胞の機能も制御できる可能性を示した。

葛根湯は、食物アレルギー性消化器症状発症病態モデルマウスの腸管の過剰に亢進したTh2型免疫応答を抑制し、症状を改善することを明らかにした。このことから、免疫系制御に中心的役割を担う樹状細胞の機能、特に本年は樹状細胞の貪食作用と成熟化について着目し、測定系を確立し葛根湯の効果を検討したが、葛根湯はこれらには効果を示さないことを明らかにした。しかし、測定系の確立により、補中益気湯など他の漢方薬による免疫系への作用を検討することが可能であり、今後の漢方薬の免疫系の検討に繋がる可能性を示した。