

柴苓湯などの柴胡剤による JAK-STAT シグナル抑制作用の分子メカニズムの解明と クローン病腸管狭窄症における線維化予防への応用

申請代表者	加藤 伸一	京都薬科大学病態薬科学系薬物治療学分野	教授
所外共同研究者	松本健次郎	京都薬科大学病態薬科学系薬物治療学分野	助教
所内共同研究者	林 周作	消化管生理学分野	助教

【報告セミナー要旨】

【背景】

柴苓湯 (TJ-114) は抗炎症作用を有することが知られており、臨床において関節リウマチや大腸炎などの治療に使用されている。当研究室ではこれまでに、柴苓湯が抗がん剤により誘起される腸炎に対して抑制効果を発揮すること、またこの作用は TNF- α 発現阻害を介したアポトーシス誘導抑制によることを明らかにしてきた (Kato et al., PLoS One 10: e0116213, 2015)。しかし、柴苓湯のサイトカイン発現抑制における標的細胞ならびに機序については不明である。本研究では、マクロファージ系細胞株である RAW264.7 および大腸上皮細胞株である Young Adult Mouse Colonic cells (YAMC) を用いて、柴苓湯のサイトカイン発現抑制について検討した。

【方法】

RAW264.7 および YAMC 細胞を 12 穴プレートに播種し、一晚培養後に、それぞれ LPS (100 ng/mL) および TNF- α (100 ng/mL) を添加することによりサイトカイン発現を刺激した。各種サイトカインおよび誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) mRNA 発現はリアルタイム RT-PCR により測定した。また、各種細胞内シグナル伝達系の解析については抗リン酸化抗体を用いて western blot により行った。柴苓湯 (0.1 ~ 3 mg/mL) は LPS あるいは TNF- α と同時に添加した。

【結果】

RAW264.7 において、柴苓湯は LPS 刺激による IL-1 β 、IL-6 および iNOS 発現の増大を濃度依存的に有意に抑制したが、TNF- α 発現の増大に対しては何ら影響を与えなかった。一方、YAMC 細胞においては、柴苓湯は TNF- α 刺激による TNF- α および iNOS 発現の増大を濃度依存的に抑制したが、IL-1 β および IL-6 発現の増大に対しては影響を与えなかった。細胞内シグナル伝達系の関与について検討したところ、柴苓湯は LPS 刺激による JAK1 および JAK2、STAT1 および STAT3 の活性化を著明に抑制したが、NF- κ B、JNK、ERK、p38MAPK の活性化に対しては影響を与えなかった。一方、YAMC 細胞においては、柴苓湯は TNF- α 刺激による STAT-3 の活性化を著明に、また ERK の活性化を部分的に抑制したが、NF- κ B、p38MAPK、JNK の活性化に対しては影響を与えなかった。なお、YAMC においては TNF- α の刺激により JAK1 および JAK2 の活性化は観察されなかった。

【結論】

柴苓湯は、各種サイトカイン発現に対して抑制効果を発揮することが判明した。柴苓湯が抑制するサイトカインは、マクロファージと大腸上皮細胞では異なっており、それぞれ IL-1 β /IL-6 および TNF- α 発現を阻害した。これらサイトカイン発現抑制には JAK-STAT あるいは ERK シグナルの阻害が関与しているものと推察される。

■背景・目的

柴苓湯 (TJ-114) は、小柴胡湯と五苓散から成る漢方方剤であり、臨床では下痢や急性胃腸炎などに使用されている。柴苓湯は抗炎症作用を有することが知られており、近年、潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性超疾患に有用であることが報告されている¹⁾。実際、動物実験モデルにおいても、柴苓湯がTh1免疫応答を介してオキサゾロン誘発大腸炎を抑制することが示されている²⁾。

我々は最近、柴苓湯が抗がん剤により誘起される激しい下痢を伴う腸炎 (intestinal mucositis) を抑制することを報告した³⁾。代表的な抗がん剤の一つである5-フルオロウラシル (5-FU) は、高頻度に激しい下痢を伴う腸炎を誘導することが知られている。我々は以前の検討で、5-FU誘起腸炎の病態にはTNF- α やIL-1 β などのサイトカイン発現を介した腸腺窩のアポトーシス誘導が関与していることを報告した^{4,5)}。柴苓湯は5-FU投与後に観察されるこれらサイトカイン発現の増大を阻害することによりアポトーシス誘導を抑制し、腸炎を改善したものと推察される。しかし、柴苓湯のサイトカイン発現抑制機序の詳細については不明であった。

クローン病腸管狭窄症は、クローン病患者において高頻度に認められる合併症であり、腸管閉塞や瘻孔形成を引き起こし、最終的には外科的治療を余儀なくされる要因の1つとなっている。しかし、クローン病は再発を繰り返すことから再狭窄のリスクも高く、さらにクローン病に伴う小腸癌および大腸癌はこれら狭窄や瘻孔部位に多いことが知られている。クローン病腸管狭窄症の病態の背景には、長期間にわたる腸粘膜の炎症に伴う線維化が関与していることがこれまでの研究で明らかになってきたが、その詳細については未だ不明な部分も多い。

小柴胡湯は臨床において慢性肝炎の治療に用いられており、高度の線維化を伴う肝硬変への移行を抑制する可能性が指摘されている。したがって、柴苓湯や小柴胡湯などの柴胡剤が、クローン病腸管狭窄症における線維化に対しても有用である可能性が期待できる。

本研究では、柴苓湯のサイトカイン発現抑制機序について、腸管上皮細胞およびマクロファージレベルにおける細胞内シグナル伝達系の関与を中心に解析し、その成果を基盤に、クローン病腸管狭窄症に対する柴苓湯の有用性について考察した。

■実験材料および方法

使用動物および細胞

実験にはマウスマクロファージ系細胞株であるRAW264.7 (理化学研究所) およびマウス大腸上皮細胞株であるYAMC (Young Adult Mouse Colon : Ludwigがん研究所Whitehead博士より供与) を用いた。RAW264.7は10%FBS含有D-MEM培地で5%CO₂/37℃の条件下で、一方YAMCは5%FBSおよび5 U/mL IFN- γ (5 U/mL) 含有RPMI 1640培地で5%CO₂/33℃の条件下で培養した。

各種サイトカイン発現に対する柴苓湯の効果

RAW264.7およびYAMCを10⁶ cells/wellで12ウェル・マイクロプレートに播種し、24時間後にそれぞれLPS (100 ng/mL) およびTNF- α (100 ng/mL) を添加し、6時間培養した。全RNAはSepasol RNA I (ナカライ) を用いて抽出した。柴苓湯は各培地に懸濁し、95℃ 5分間加熱した後、0.1 ~ 3 mg/mLの濃度でLPSおよびTNF- α と同時に添加した。PrimerScript RT Kit (タカラ) を用いて逆転写反応を行った後、SYBR Premix Ex Taq (タカラ) を用いてリアルタイムPCR (ABI7500) により各種サイトカイン発現を定量した。各種サイトカインに対する特異的プライマーは、マウス

TNF- α (Primer set ID: MA097070)、IL-1 (Primer set ID: MA025936)、IL-6 (Primer set ID: MA039013)、CXCL1 (Primer set ID: MA104685)、CXCL2 (Primer set ID: MA096394) および β アクチン (Primer set ID: MA050368) を用いた。各種サイトカイン mRNA 発現は、相対定量法 ($\Delta\Delta$ Ct法) により Normal 群 (LPS または TNF- α 未処置) に標準化して表示した。また、細胞生存率はトリパンブルー染色により測定した。柴苓湯 (0.1 ~ 3 mg/mL) は LPS と同時に添加した。

各種細胞シグナル伝達系に対する柴苓湯の効果

RAW264.7 および YAMC を 9 cm ディッシュにコンフルエントまで培養し、それぞれ LPS (100 ng/mL) および TNF- α (100 ng/mL) を添加し、6 時間培養した。柴苓湯は各培地に懸濁し、95°C 5 分間加熱した後、3 mg/mL の濃度で LPS および TNF- α と同時に添加した。氷冷したホスファターゼ/プロテアーゼ阻害薬 (Roche) 含有 RIPA バッファーによりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 電気泳動を行った。PVDF メンブレンに転写し、各種シグナル伝達系に対する特異的抗体 (Cell Signaling) および HRP 標識二次抗体 (Santa Cruz) で反応させた後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE) を用いて検出した (VersaDoc/5000)。

■結果・考察

RAW264.7 および YAMC におけるサイトカイン発現に対する柴苓湯の効果

RAW264.7 において、LPS (100 ng/mL) 処置 6 時間後には TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CXCL-1 および CXCL-2 mRNA 発現は著明に増大した (図 1)。柴苓湯の処置は、LPS 処置による IL-1 β および IL-6 mRNA 発現を濃度依存的、0.3 mg/mL 以上の濃度で有意に抑制した。一方、TNF- α 、CXCL-1 および CXCL-2 mRNA 発現の増大は、柴苓湯の処置によっては何ら影響を受けなかった。

YAMC において、LPS (100 ng/mL) 処置は各種サイトカインおよびケモカイン発現に対して何ら影響を及ぼさなかったことから (データ未発表)、本研究では TNF- α を用いて検討した。TNF- α (100 ng/mL) 1 時間後には TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CXCL-1 および CXCL-2 mRNA 発現は著明に増大した (図 2)。柴苓湯の処置は、TNF- α 処置による TNF- α 、IL-1 β および CXCL-1 mRNA 発現の増大を濃度依存的、TNF- α および CXCL-1 では 3 mg/mL、IL-1 β では 0.3 mg/mL 以上の濃度で有意に抑制した。一方、IL-6 および CXCL-2 mRNA 発現の増大は、柴苓湯の処置によっては何ら影響を受けなかった。

柴苓湯は *in vitro* 細胞培養系において、各種刺激によるサイトカインおよびケモカイン発現の増大を抑制することが判明した。しかし、柴苓湯によるサイトカインおよびケモカイン発現の抑制プロファイルはマクロファージおよび腸上皮細胞で異なっていた。

RAW264.7 および YAMC における細胞内シグナル伝達系の活性化に対する柴苓湯の効果

RAW264.7 において、LPS 処置は JAK1 およびその下流の STAT1 および STAT3 のリン酸化を増大させたが、それらの増大はいずれも柴苓湯 (3 mg/mL) の処置により著明に抑制された (図 3)。興味深いことに、柴苓湯は JAK1、JAK2、STAT1 および STAT3 タンパク質発現自体を低下させた。一方、LPS 処置は p38MAPK、JNK、ERK および p65 のリン酸化も増大させたが、これらの増大は柴苓湯の処置によっては何ら影響を受けなかった。RAW264.7 においては、LPS および柴苓湯の処置はいずれも STAT5 のリン酸化およびタンパク質発現には影響を与えなかった。

YAMC において、TNF- α 刺激は STAT-3 および ERK のリン酸化を増大させたが、これらの増大は

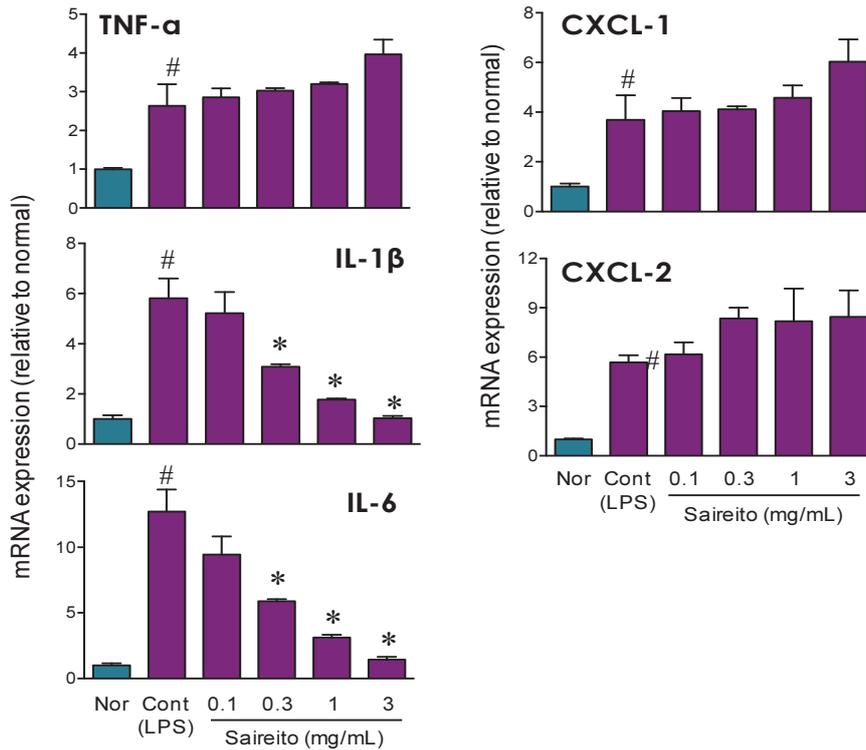


図1. RAW264.7におけるLPS刺激サイトカインおよびケモカイン発現増大に対する柴苓湯の効果
RAW264.7にLPS (100 ng/mL) を添加し、6時間後に全RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRにより各種サイトカインおよびケモカインmRNA発現を定量した。値は正常群 (LPS未処置) に対する相対値として表示した。

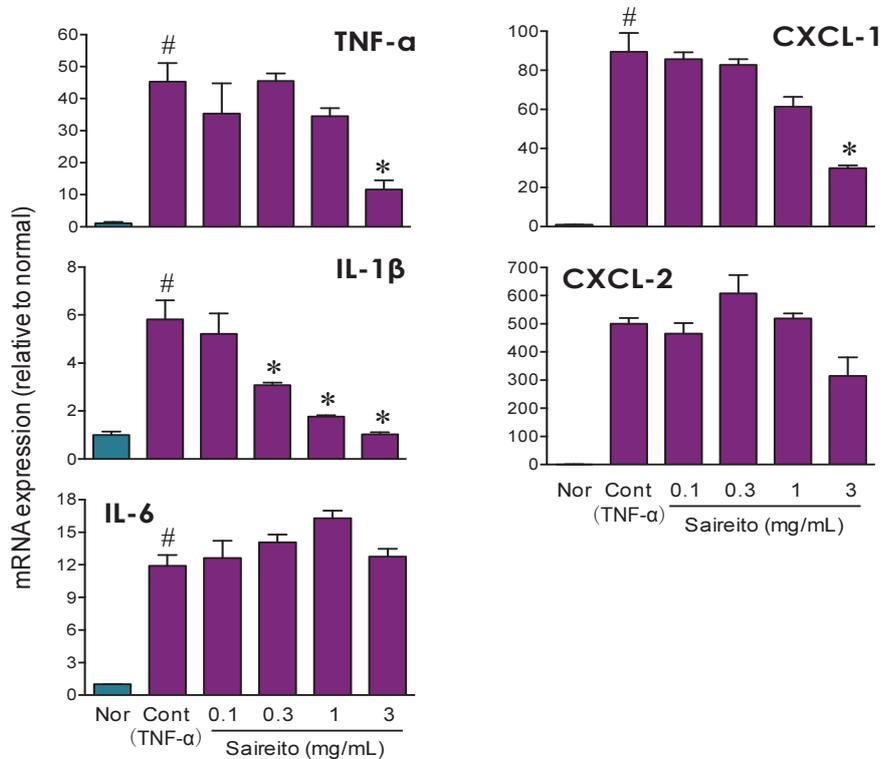


図2. YAMCにおけるTNF-α刺激サイトカインおよびケモカイン発現増大に対する柴苓湯の効果
YAMCにTNF-α (100 ng/mL) を添加し、1時間後に全RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRにより各種サイトカインおよびケモカインmRNA発現を定量した。値は正常群 (TNF-α未処置) に対する相対値として表示した。

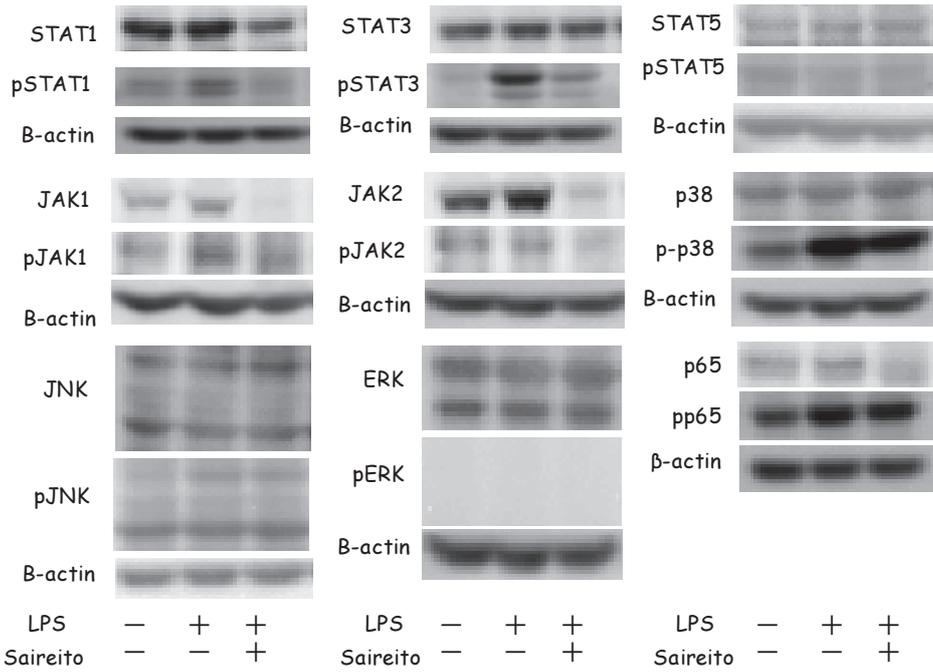


図3. RAW264.7におけるLPS刺激による各種細胞内シグナル伝達系の活性化に対する柴苓湯の効果
RAW264.7にLPS (100 ng/mL) を添加し、6時間後にタンパク質を抽出し、Westerb blotにより各種細胞内シグナル伝達系の活性化を評価した。

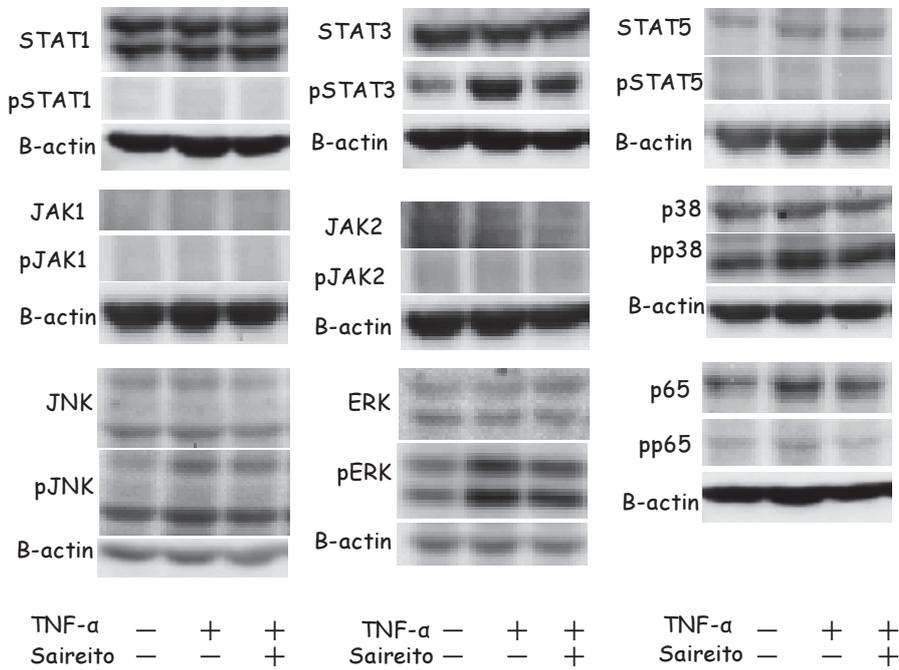


図4. YAMCにおけるTNF-α刺激による各種細胞内シグナル伝達系の活性化に対する柴苓湯の効果
YAMCにTNF-α (100 ng/mL) を添加し、6時間後にタンパク質を抽出し、Westerb blotにより各種細胞内シグナル伝達系の活性化を評価した。

いずれも柴苓湯の処置により抑制された。しかし、その効果はSTAT-3でより顕著であった。一方、JNKおよびp38のリン酸化も増大していたが、それらの増大は柴苓湯によっては影響を受けなかった。YAMCにおいては、TNF- α 刺激はJAK1、JAK2、STAT1、STAT5およびp65のリン酸化の増大は認められなかった。

柴苓湯はin vitro細胞培養系において、各種刺激による細胞内シグナル伝達系の活性化を抑制することが判明した。柴苓湯はマクロファージではSTAT1およびSTAT3の活性化を、また腸上皮細胞ではSTAT3の活性化を顕著に抑制した。興味深いことに、柴苓湯はJAK1、JAK2、STAT1およびSTAT3のタンパク質発現自体も低下させたことから、この機序は、これまで知られているJAK-STAT経路の阻害様式とは異なっている可能性が推察される。柴苓湯のサイトカインおよびケモカイン発現の抑制プロファイルを細胞内シグナル伝達系の抑制で説明することができるかは現時点では不明であり、今後更なる検討が必要である。

腸管線維化に対する柴苓湯の効果については、既存のTNBS反復直腸内投与モデルで検討したが、本モデルでは線維化の程度にバラツキが大きく、効果判定することが困難であった。現在、新規の腸管線維化モデルの確立を進めており、今後柴苓湯の効果について検討を行う予定である。

■結論

柴苓湯は、マクロファージおよび腸上皮細胞における各種サイトカインおよびケモカイン発現の増大を抑制することが判明した。これらの作用には一部、STATの活性化の抑制が寄与している可能性が推察される。

■引用文献

- 1) 増田英樹、加藤克彦、林成興、中村陽一、堀内寛人、渡辺賢治、林 一郎、田中 隆: 柴苓湯投与による潰瘍性大腸炎の治療. 医学と薬学 27: 439-443 (1992).
- 2) Watanabe T, Yamamoto T, Yoshida M, Fujiwara K, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shimada Y, Kadowaki M. The traditional herbal medicine saireito exerts its inhibitory effect on murine oxazolone-induced colitis via the induction of Th1-polarized immune responses in the mucosal immune system of the colon. *Int Arch Allergy Immunol* 151: 98-106 (2010).
- 3) Kato S, Hayashi S, Kitahara Y, Nagasawa K, Aono H, Shibata J, Utsumi D, Amagase K, Kadowaki M. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells. *PLoS One* 10: e0116213 (2010).
- 4) Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Iimori M, Utsumi D, Kitahara Y, Iwata K, Matsuno K, Amagase K, Yabe-Nishimura C, Takeuchi K. Potential role of the NADPH oxidase NOX1 in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302: G1133-1142 (2012).
- 5) Yasuda M, Kato S, Yamanaka N, Iimori M, Matsumoto K, Utsumi D, Kitahara Y, Amagase K, Horie S, Takeuchi K. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppression of apoptosis in murine intestinal crypt cells. *Br J Pharmacol* 168: 1388-1400 (2013).