

## E. 結論

### 1. 臨床研究（COPD に対する補中益気湯の有用性）における結論

COPD に対する補中益気湯の臨床的有用性の評価を、多施設共同、無作為比較試験の形で進行中である。平成 18 年 1 月の時点で、6 ヶ月の経過観察治療を終了しえた、解析可能対象症例は 43 症例であった。この時点で、明確な結論は出ていないが、途中解析結果では、補中益気湯投与により、気虚の状態、臨床症状の改善が得られ、栄養状態・炎症病態の改善が得られることが示唆されている。

### 2. 基礎研究における結論

各分担研究報告書の中に記載した。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

(主任研究者) 福地 義之助

Fukuchi Y, et al. Tomato juice prevents senescence-accelerated mouse P1 strain from developing emphysema induced by chronic exposure to tobacco smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 290: L394-404.

Fukuchi Y, et al. Predictive equations and the reliability of the impulse oscillatory system in Japanese adult subjects. *Respirology*. 2005 ;10: 310-5.

Fukuchi Y, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology*. 2004 ;9: 458-65.

(分担研究者) 中山 勝敏

Nakayama K, et al. Association of susceptibility to the development of pneumonia in older Japanese population with the haem oxygenase-1 gene promoter polymorphism *J Med Genet* (in press).

Nakayama K, et al. Carbocysteine reduces frequency of common colds and exacerbations in COPD patients. *J Am Geriatr Soc*. 2006; 54: 378-380

Nakayama K, et al. Increased blood carbon monoxide from endogenous production in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* (in press).

Nakayama K, et al. Is the arteriovenous carboxyhemoglobin gradient really a useful marker in systemic inflammation? *Chest* 2005; 128: 3771-3772.

Nakayama K, et al. Inflammatory indicators and therapeutic targets in COPD during exacerbations. *Chest* 2005; letter July 17

Nakayama K, et al. Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1246-51.

(分担研究者) 杉山 幸比古

Sugiyama Y, et al. Macrolides inhibit epithelial cell-mediated neutrophil survival by modulating granulocyte macrophage colony-stimulating factor release. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 30:569-75.

(分担研究者) 永井 厚志

Nagai A, et al. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* (in press)

Nagai A, et al. Differences in airway remodeling between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004; 27: 35-43.

Nagai A, et al. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in

patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 2004; 125: 626-32.

(分担研究者) 三嶋 理晃

Mishima M, et al. Matrix metalloproteinase-9 promoter polymorphism associated with upper lung dominant emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172:1378-82.

Mishima M, et al. Relationship of airway wall thickening to an imbalance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in asthma. *Thorax*. 2005; 60:277-81.

Mishima M, et al. Risk and severity of COPD is associated with the group-specific component of serum globulin 1F allele. *Chest*. 2004 125 : 63-70.

Mishima M, et al. Possible maximal change in the SF-36 of outpatients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *J Asthma*. 2004; 41:355-65.

Mishima M, et al. Longitudinal changes in health status using the chronic respiratory disease questionnaire and pulmonary function in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Qual Life Res*. 2004; 13 :1109-16.

(分担研究者) 一ノ瀬 正和

M. Ichinose, et al. Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulm Pharm Ther* 2005; 18: 297-302

M. Ichinose, et al. Microvascular hyperpermeability in COPD airways. *Thorax* 2005; 60: 882

M. Ichinose, et al. Quantitative assessment of protein-bound tyrosine nitration in airway secretions from patients with inflammatory

airway disease. *Free Radical Research* 2004; 38 :49-57

(分担研究者) 相澤 久道

Aizawa H, et al. Once-daily administration of fluticasone propionate does not worsen controlled airway hyperresponsiveness in patients with asthma. *Respiration*. 2005; 72: 480-5.

Aizawa H, et al. Thioredoxin suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 334: 1141-8.

Aizawa H, et al. Characterisation of patients with frequent exacerbation of asthma. *Respir Med*. 2005 Jul 2

Aizawa H, et al. Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: L860-7.

Aizawa H, et al. Enhanced Expression of IL-18 and its Receptor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004; 31: 619-625

(分担研究者) 巽 浩一郎

Tatsumi K, et al. Metabolic activity in skeletal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease studied by <sup>31</sup>P-MRS. *Respirology* 10: 164-170, 2005.

Tatsumi K, et al. Clinical phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease : Results of a nationwide epidemiological survey in Japan. *Respirology* 2004; 9: 331-336

福地義之助、植木純、巽浩一郎 COPD 治療における医薬品の適正なガイドライン 日本呼吸器

学会雑誌 43: 10 633-646, 2005.

巽浩一郎 COPD 治療において漢方は有用か— Polypharmacy の視点から— 4. 漢方治療の観点から 漢方と免疫・アレルギー 18: 146-164, 2005.

巽浩一郎 漢方による COPD の管理は? The Lung Perspectives 13: 210-211, 2005

巽浩一郎、伊藤隆 COPD に対する漢方治療 Progress in Medicine 25: 1064-1068, 2005.

巽浩一郎 漢方によるかぜの治療 —かぜには葛根湯? 呼吸器診療のコツと落とし穴 (編集: 工藤翔二) 第1巻「呼吸器感染症」中山書店, 東京 118-119 2005.07

(分担研究者) 宮田 健

Miyata T, et al. Neutrophil elastase stimulates MUC1 gene expression through increased Sp1 binding to the MUC1 promoter. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 289: L355-L362. 2005.

Miyata T, et al. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 326: 521-526.

(分担研究者) 植木 純

Fukuchi Y, Ueki J, et al. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) 2nd edition, Pocket Guide. The Japanese Respiratory Society, Tokyo, 2004

福地義之助、植木純、ほか: COPD (慢性閉塞性肺疾患) 診断と治療のためのガイドライン第2版. 日本呼吸器学会, 東京, 2004

植木純: 呼吸リハビリテーションマニュアル

ル—運動療法—のインパクト. 日呼管誌 14, 333-336, 2005

鈴木勉、植木純、ほか: 連続呼気採取法 (intrabreath 法) による肺拡散能の測定. 日呼吸会誌 43: 347-353, 2005

福地義之助、植木純、巽浩一郎、ほか: 在宅呼吸ケア白書. 日本呼吸器学会在宅呼吸ケア白書作成委員会 (編), 文光堂, 東京, 2005

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

# Ⅱ 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

ムチンによる Toll 様受容体機能の抑制と和漢薬の作用  
— 気道粘液の新規機能と粘液正常化に向けた薬理学的基礎研究 —

分担研究者 宮田 健、  
研究協力者 磯濱 洋一郎  
熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物活性学分野

## 研究要旨

気道粘液の過剰産生は、炎症性の呼吸器疾患に共通の症状として見られ、慢性閉塞性肺疾患（以下 COPD）では、初期症状として持続的な痰が咳嗽とともに現れる。従来、粘液の産生亢進は炎症初期に上皮細胞がサイトカイン刺激を受容した結果であり、気道閉塞の原因とは考えられているものの、好中球の活性化による組織破壊や易感染などの COPD の病態形成とは独立の関係にあると考えられている。本研究では、まず、気道粘液を構成するムチンの一種である MUC1 の発現調節ならびに MUC1 の機能について新たな視点から検討した。MUC1 の発現に対する好中球エラスターゼの作用を調べ、エラスターゼが上皮細胞の MUC1 発現を転写レベルで促進することを見出した。また、MUC1 を Toll 様受容体 -5 (TLR5) と共発現させると、TLR5 のシグナル伝達は著明に抑制された。これらの結果は、炎症性気道疾患の病態形成および自然免疫系の調節機構に粘液がある種のモジュレーターとして一部組み込まれている可能性を示唆しており興味深い、また同時に気道粘液の正常化のための粘液産生制御およびクリアランス促進に、実効性の高い新たな医薬品の開発の必要性を提唱している。そこで本研究では次に、気道粘液の正常化のための基礎研究として、気道粘液の産生抑制に対する補中益気湯およびその構成生薬である甘草の主成分グリチルリチンの粘液産生に対する作用を調べた。その結果、グリチルリチンはグルココルチコイド様の転写調節作用を示し、少なくともムチン遺伝子 MUC5AC の mRNA 発現を著明に抑制したが、補中益気湯は今回の実験条件では粘液遺伝子の発現に著明な作用を示さなかった。これらの知見は、未だ断片的ではあるが、慢性気道炎症の病態形成とその治療の原理を考える上で新たな情報として興味深い。

## A. 研究目的

慢性閉塞性肺疾患（以下 COPD）を始めとする慢性炎症性の呼吸器疾患の病態形成において、炎症性サイトカイン類や好中球エラスターゼの重要性は明らかである。しかし、気道粘液の過剰産生については、咳嗽とならび病態の初期から認められる症状であることや、過剰な粘液によって形成された痰が気道閉塞の原因となりえることは認識されているものの、粘液過剰産生の生じる機序の詳細や病態生理学的意義については十分に理解されておらず、COPD の治療における去痰の重要性もあいまいである。気道粘液の主成分は高分子糖タンパク質のムチンであり、特に気道系では細胞膜結合型の MUC1、MUC4 および分泌型ムチン

MUC5AC、MUC5B が主要な成分となる。気道炎症時にはこれらのムチン遺伝子の産物は高度に糖付加を受け、この糖鎖が緑膿菌などの感染細菌の主要な接着部位となることが報告されている (Ramphal et al, Glycoconj J. 18, 709-13, 2001)。気道に侵入した細菌は、従来、Toll 様受容体（以下 TLR）によって受容され、下流のシグナルおよびサイトカイン類の産生を介した自然免疫系によって排除される。しかし、気道に炎症が生じムチン産生が亢進した状態では、細菌と TLR の結合は競合的に阻害される可能性が考えられ、ムチンは自然免疫系を抑制している可能性が考えられる。

一方、COPD 患者では、好中球エラスターゼの慢性的な放出、活性化が組織破壊などその病

態形成に重要な役割を果たしているが、近年、エラスターゼは種々の遺伝子の発現を調節する因子としても注目を集めている。ムチンとエラスターゼの関係についても、膜結合型ムチンである MUC1 がエラスターゼによって切断され、細胞外へ遊離することが知られるなど、エラスターゼがムチンの生合成経路に重要な役割を果たしている可能性が高い。

このような背景のもと、本研究では、まずムチンの自然免疫系に対する新たな機能を解明するために、粘液成分の一種であるムチン MUC1 高発現下での、TLR5 を介したシグナル伝達およびサイトカイン IL-8 の産生能について調べるとともに、MUC1 発現に対する好中球エラスターゼの作用を調べた。その結果、MUC1 が TLR シグナルのネガティブレギュレーターとして働くこと、また好中球エラスターゼによって MUC1 の mRNA 発現が促進されることを見出した。すなわち、COPD 患者の肺で活性化された好中球から遊離したエラスターゼは、ムチンの産生をも促進し、その結果、TLR の阻害によって易感染性が成立する可能性が考えられ、ムチンの産生量を制御することが COPD 患者の感染を防ぐために重要と考えられた。そこで本研究では、ムチン産生制御のための薬理学的基礎研究として、ムチン産生に対する生薬成分グリチルリチンおよび漢方方剤、補中益気湯の作用についても併せて検討した。

## B. 研究方法

### 1) MUC1 および TLR5 高発現細胞

本研究には、HEK293T および A549 細胞株を用いた。HEK293T 細胞には内因性の MUC1 および TLR5 のいずれも発現していないこと、また、A549 細胞は両遺伝子を高レベルで発現することをウエスタンブロット法により確認した。

HEK293T 細胞株に MUC1 および TLR5 遺伝子を一過性に導入し、両タンパク質の高発現細胞を調製した。

### 2) TLR5 シグナル

TLR5 下流のシグナルの活性化は、NF- $\kappa$ B 依存的な ELAM-1 プロモーター遺伝子を用いた

レポータージーンアッセイおよび内因性 IL-8 の産生量をもとに評価した。レポータージーンアッセイには、市販のデュアルルシフェラーゼアッセイキット（プロメガ社）を用い、IL-8 量は ELISA キット（パイオソース社）を用いて測定した。

### 3) ムチン遺伝子およびタンパク質の発現

ムチン遺伝子 mRNA の発現は、Northern blot 法、Real-time PCR 法または半定量的 RT-PCR 法により測定した。ムチンタンパク質量は、MUC1 抗体を用いた ELISA 法または、ムチン非特異的抗体を用いたドットプロット法により測定した。また、MUC1 遺伝子のプロモーター活性は、5' 末端 2.8 kb の MUC1 プロモーター DNA をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドを導入した細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。

### 4) SO<sub>2</sub> ガス曝露による気管支炎ラットの作成と薬物の投与

Wistar 系雄性ラットを、特注の SO<sub>2</sub> ガス曝露装置（美和製作所製）にて、300-500 ppm の SO<sub>2</sub> ガスに 2 時間/日、8 週間曝露し、気管支炎を惹起した。Glycyrrhizin (15, 45, 134 mg/kg) および対照としての dexamethasone (0.2 mg/kg) は、SO<sub>2</sub> ガス曝露の 4 週目より皮下投与した。

## C. 研究結果

### 1) MUC1 による TLR5 シグナルの抑制

TLR5 を発現させた HEK293T 細胞に熱処理により殺菌した緑膿菌または緑膿菌の培養上清より生成したフラジェリンを添加すると、ELAM-1 プロモーターの活性化が認められた。この細胞に MUC1 を共発現させると、MUC1 導入量に依存して、ELAM-1 プロモーターの活性は減少した (Fig. 1A)。MUC1 によるフラジェリンの反応性の低下は、IL-8 の分泌でも同様に認められた (Fig. 1B)。次に、内因性の MUC1 および TLR5 をもつ A549 細胞を用いて、本細胞の MUC1 発現を MUC1 の siRNA を導入して抑制すると、ELAM-1 プロモーター活性で評価した TLR5 のシグナルは著明に亢進し

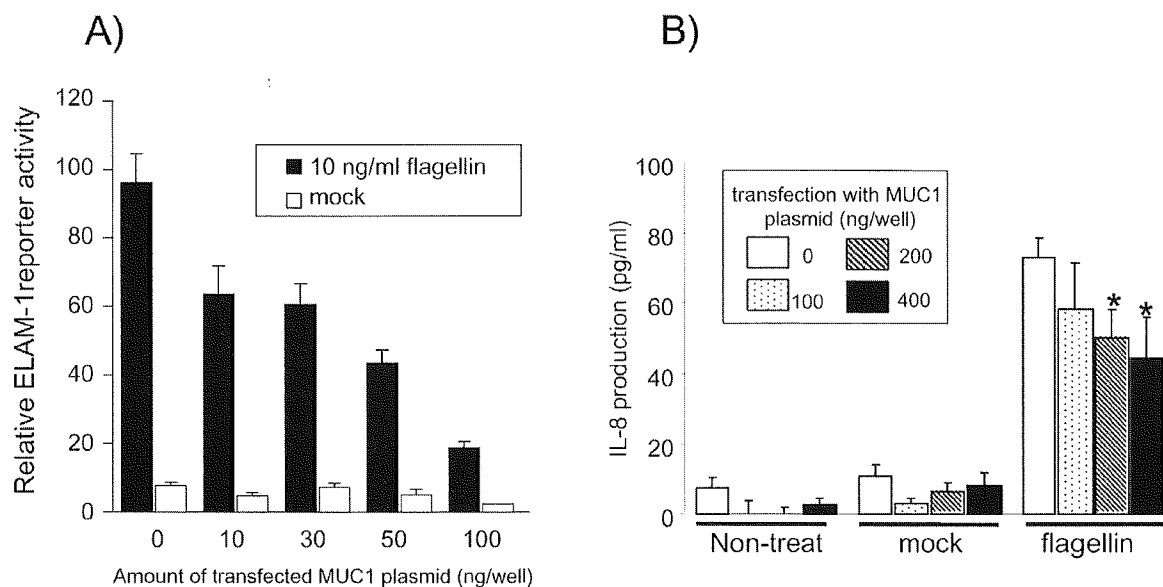


Fig. 1. MUC1 inhibits ELAM-1 promoter activity (A) and IL-8 production (B) in HEK293T cell following the treatment with flagellin

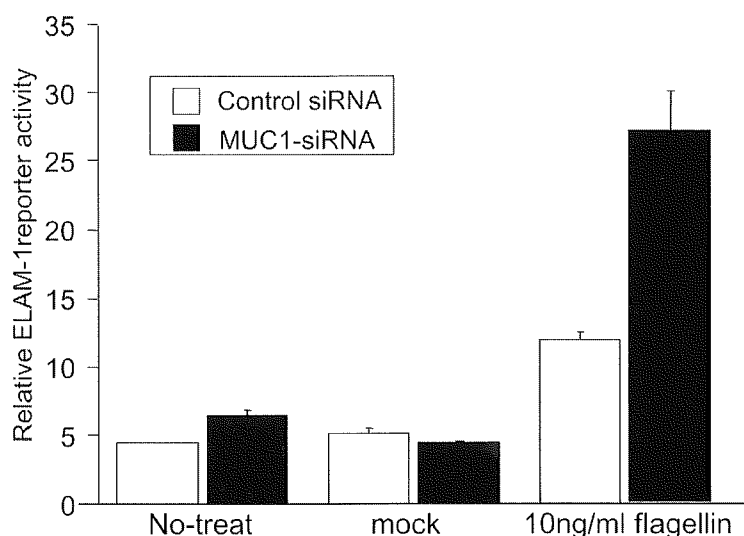


Fig. 2. Transient down-regulation of MUC1 by MUC1-siRNA treatment augments NF- $\kappa$ B activity followed by flagellin treatment in A549 cells

た (Fig. 2)。これらの結果より、MUC1 が緑膿菌およびフラジェリンによる TLR5 のシグナルを抑制すると考えられた。

従来、MUC1 を始めとするムチンの糖鎖は緑膿菌の結合部位であると考えられており、緑膿菌およびフラジェリンの TLR5 への結合を MUC1 の細胞外糖鎖が競合的に阻害したことが、その機序の一部として想定される。そこで、MUC1 の種々の変異体を作成し、TLR5 シグナルの抑制作用について調べた。その結果、WT の MUC1 によって生じた TLR5 シグナル

の抑制は、MUC1 の細胞外領域を除去した変異体 ( $\Delta$ EC) で消失し (Fig. 3)、緑膿菌の MUC1 細胞外領域への結合が、本作用に一部関与することが推定された。しかし、興味深いことに、MUC1 の細胞内領域を除去した変異体 ( $\Delta$ CT) でも TLR5 シグナルの抑制は消失した (Fig. 3)。この結果より、MUC1 による TLR5 シグナルの抑制作用には、細胞外での単純な結合部位の競合だけでなく、細胞内シグナルでのクロストークが一部関わっている可能性が考えられた。

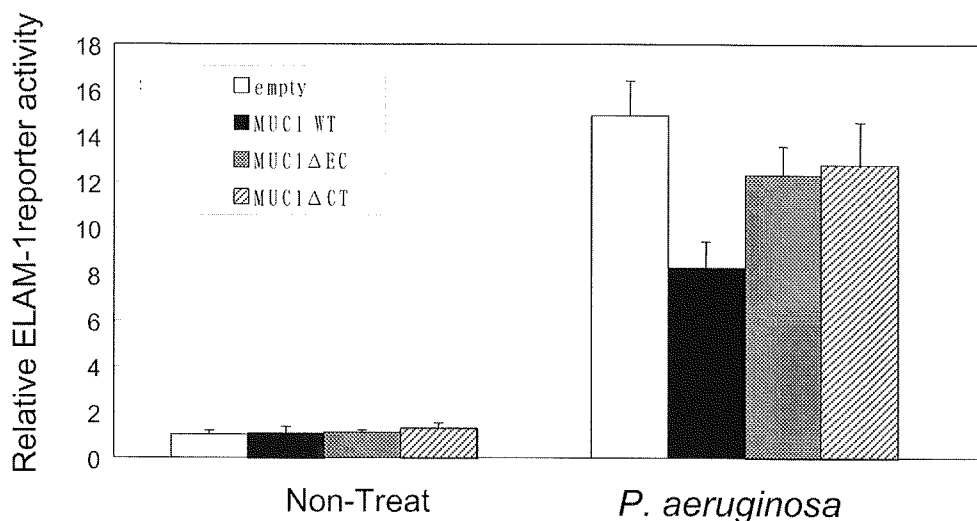


Fig. 3. Effects of MUC1 deletion mutants on ELAM-1 promoter activity in HEK293T cell following the treatment with heat killed *P. aeruginosa*

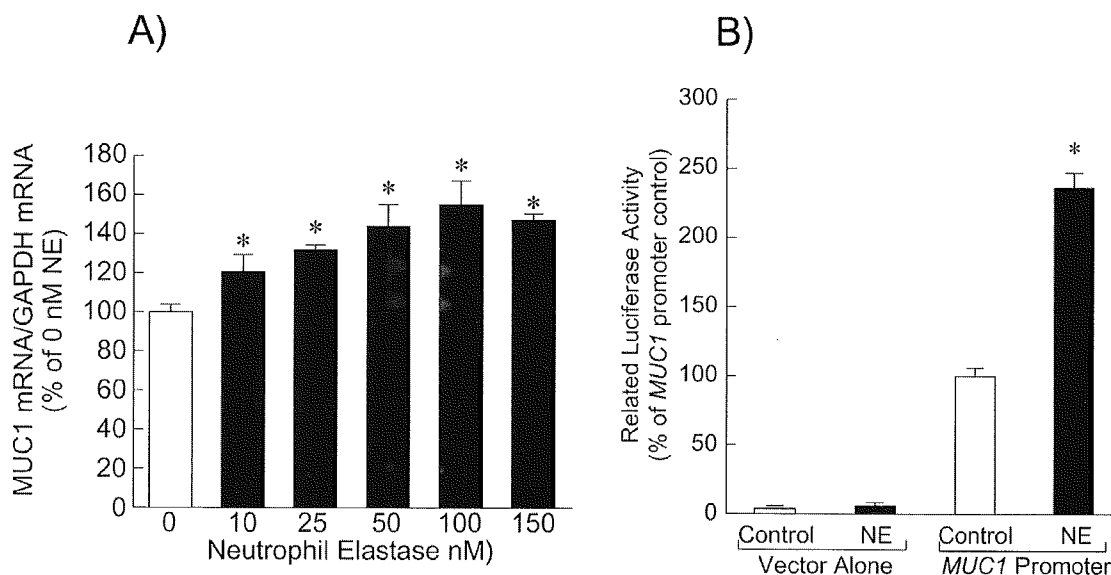


Fig. 4. Neutrophil elasetase increased MUC1 mRNA expression (A) and MUC1 promoter activity (B) in A549 cells

## 2) 好中球エラスターゼの MUC1 発現に対する作用

好中球エラスターゼは、COPD の病態形成に重要な物質であるが、近年、エラスターゼが種々の遺伝子の発現を調節することが分かってきている。そこで、前項の実験により、TRL シグナルを抑制する MUC1 の発現に対する好中球エラスターゼの作用を調べた。

内因性 MUC1 を発現する A549 細胞を用いて、本細胞の培養上清に種々の濃度 (0, 10, 25, 50, 100 or 150 nM) のエラスターゼを添加し、24 時間培養した。MUC1 の mRNA 量およびエラスターゼにより消化切断され培養上清中に遊

離した MUC1 タンパク量はともに、エラスターゼ濃度に依存して増加した (Fig. 4A)。また、ルシフェラーゼアッセイにより調べた MUC1 プロモーターの活性も、エラスターゼによって著明に亢進したこと (Fig. 4B)、および MUC1 mRNA の細胞内半減期には著明な作用がなかったことから (データ示さず)、エラスターゼが MUC1 遺伝子の転写を促進したと考えられた。さらに、MUC1 プロモーターの変異体をおよび阻害薬を用いた検討により、エラスターゼによる MUC1 の転写亢進には、Sp1 転写因子が関与することが分かった (Fig. 5)。



### 3) 粘液産生制御に関する薬理的検討

これまでの成績より、気道炎症時に肺内で遊離したエラスターゼは上皮細胞で遺伝子発現を介して MUC1 産生を亢進し、それが自然免疫系を不活性化する可能性が考えられた。すなわち、COPD 患者の感染防御のためには粘液産生を薬理的に制御することが重要と考えられる。しかし、ムチンの発現を直接抑制する薬物は、現在のところグルココルチコイド以外にはなく、長期投与が前提となる COPD への使用にはその

副作用が問題となる。そこで、我々がすでにグルココルチコイド様の作用をもつことを明らかにしている甘草の主成分 glycyrrhizin のムチン発現に対する作用を in vitro および in vivo の実験系により調べた。

MUC2 および MUC5AC を主要なムチンとして発現する NCIH292 細胞を用いて、本細胞に glycyrrhizin、dexamethasone またはこれら両薬物を添加し、48 時間後にムチン遺伝子の発現量をノザンプロット法にて調べた。その結果、

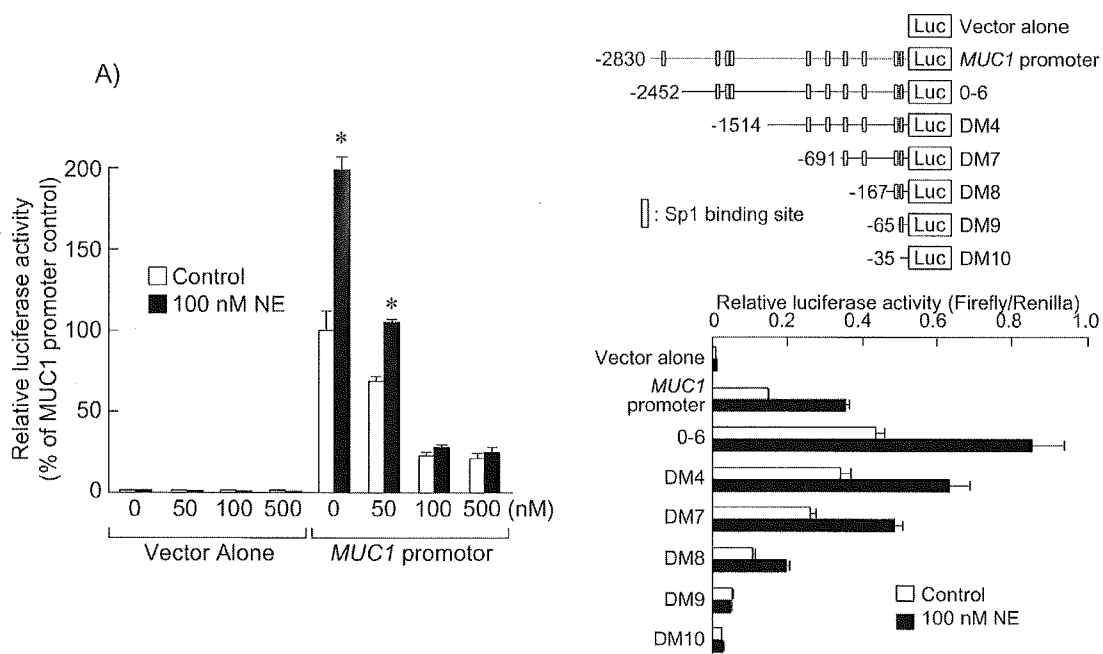


Fig. 5. Sp1 Transcription factor in MUC promoter segment at -167/-65 is important for NE-induced MUC1 transcription. A) Effect of Sp1 inhibitor on MUC1-induced inhibition of ELAM-1 promoter activity, B) Effects of MUC1 promoter deletion mutants

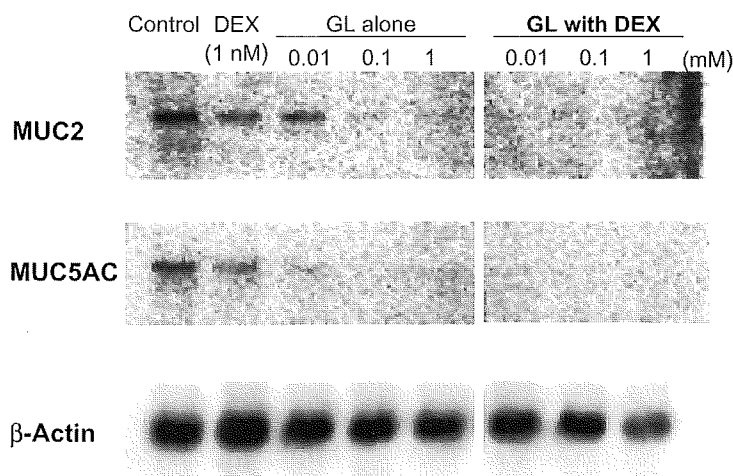


Fig. 6. Effects of Dexamethasone, Glycyrrhizin and Their Combination on MUC2 and MUC5AC mRNA Expression in NCI-H292 Cells

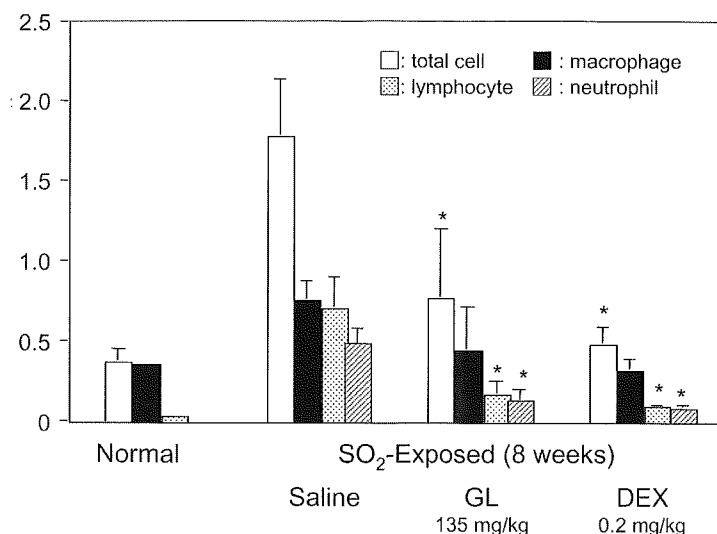
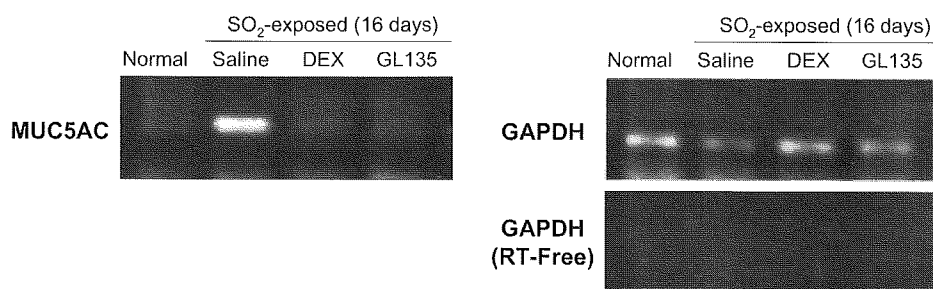


Fig. 7. Effect of glycyrrhizin and dexamethasone on cell number in BALF from SO<sub>2</sub>-exposed rat lungs. \*: p<0.05 vs. saline

### A) MUC5AC mRNA



### B) Mucus Glycoprotein in Lung

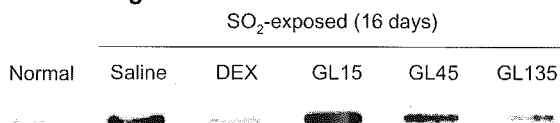


Fig. 8. Effects of glycyrrhizin and dexamethasone on mucus production in SO<sub>2</sub>-exposed rat lung

glycyrrhizin は 0.01-1 mM の濃度で濃度依存的に MUC2 および MUC5AC の mRNA 発現を抑制し、dexamethasone (10 nM) の抑制作用に匹敵した (Fig. 6)。

そこで次に、ラットに SO<sub>2</sub> ガスを 7 週間曝露して作成した気管支炎モデルにおける気道粘液の産生分泌量に対する glycyrrhizin の作用を検討した。Glycyrrhizin (15, 45 および 135 mg/kg) は用量依存的に BAL 中の細胞数により評価した気道炎症を抑制するとともに (Fig. 7)、肺での気道粘液ムチン MUC5AC の mRNA 発現を抑制し (Fig. 8A)、肺ホモジネート中のムチン量を著明に抑制し (Fig. 8B)、これらの作用

は 1 mg/kg の dexamethasone に匹敵した。

4 週間 dexamethasone を連日投与したラットでは、体重の減少および胸腺の萎縮が著明で、臨床的なステロイド性抗炎症薬の副作用に相当する作用が認められたが、興味深いことに glycyrrhizin 投与群ではこれらの副作用は全く認められなかった (Fig. 9)。

### 5) 補中液気湯の作用

今回明らかとなった気道粘液による炎症・感染に関する調節作用を踏まえ、COPD に対する補中益気湯の有効性を評価するために、ムチン産生の抑制および MUC1 による TLR 機能の抑制に対する作用を検討した。

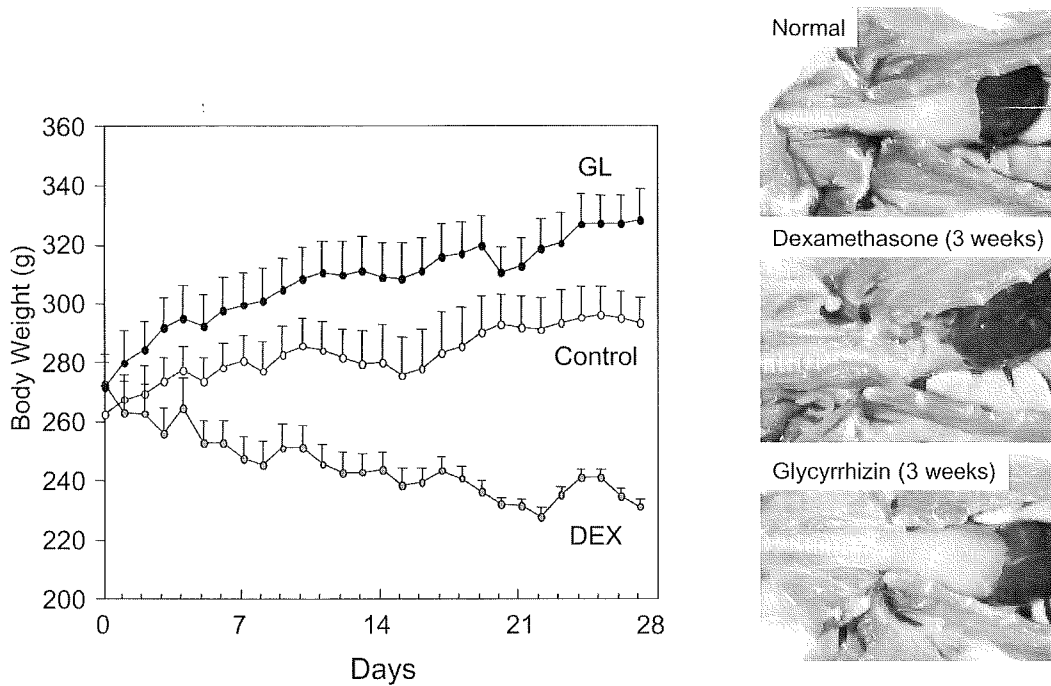


Fig. 9. Effects of GL and DEX on body weight and thymus apoptosis in  $\text{SO}_2$ -exposed rats

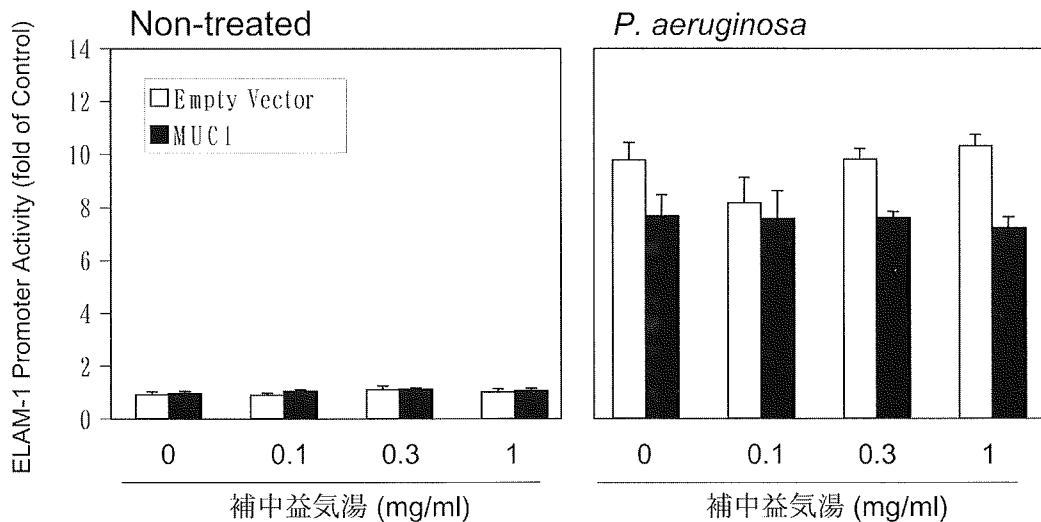


Fig. 10. Effect of Hochuekkito on MUC1-induced Reduction of TLR5 Signaling in HEK293T Cells

HEK293T 細胞に MUC1 および TLR5 を共発現させた細胞の培養上清に熱処理した緑膿菌を加え、ELAM-1 プロモーター活性を測定した。MUC1 の発現亢進は、先のフラジェリンを用いた実験結果とよく一致して、緑膿菌による TLR5 シグナルを抑制した。しかし、補中液気湯 (0.01-1 mg/ml) はこの MUC1 による TLR5 シグナルの抑制に著明な作用を示さなかった (Fig. 10)。

一方、A549 細胞に補中液気湯 1 mg/ml を添

加し、24 または 48 時間培養した細胞で steady state level での MUC1 および MUC5AC の mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法により調べたが、いずれのムチン遺伝子の mRNA 量にも著明な作用を示さなかった (Fig. 11)。

#### D. 考案

本研究で得られた結果は、ムチンの産生亢進が TLR のシグナルに対しネガティブレギュレーターとして機能し、細菌感染に対する自然免

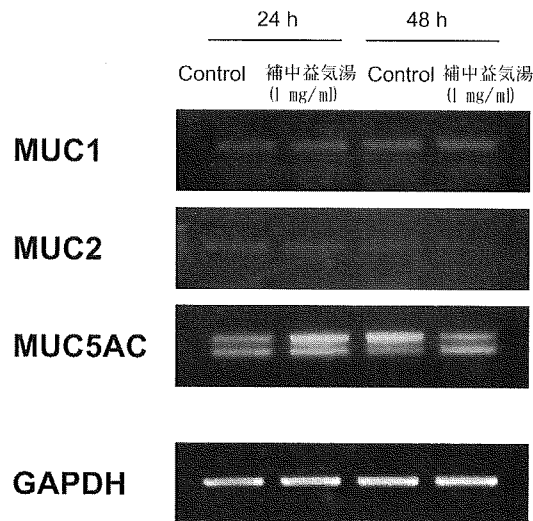


Fig. 11. Effect of Hochuekkito on Mucin mRNA Expression in A549 Cells

疫系の応答を減弱させる機能をもつ可能性を示唆している。ムチンの構造中の糖質は、緑膿菌などの細菌に対する結合部位となりえることは既に知られていた。従って、本研究では細菌が細胞外でムチンへ結合することにより、細胞膜上のTLRとの結合を競合的に阻害し、TLRシグナルを抑制するのではないかと推定していた。予想通り、MUC1の発現亢進により生じたTLRのシグナルの低下は、MUC1の細胞外領域すなわち細菌結合部位を切除した変異体では生じず、細胞外でムチンと細菌が結合することが重要であることは検証された。しかし、MUC1の細胞内領域を除いた変異体でも、TLRシグナル抑制が消失したことは興味深い。本変異体がHEK-293T細胞へのTLR5遺伝子の導入効率あるいは発現効率に影響を与えた可能性を考え、TLR5発現量を確認したが、発現には著明な影響は認められなかった。すなわち、膜結合型ムチンであるMUC1によるTLRシグナルの抑制は、細菌結合の競合的阻害という単純なものではなく、細胞内でのシグナル伝達での機序が関わっている可能性がある。我々の共同研究者であるDr. KimらグループはTLRを持たないCHO細胞MUC1を発現させ緑膿菌を感染させると、コントロール細胞では生じないERK1/2のリン酸化が生じることを見出し、MUC1が細菌に対するある種の受容体として機能し、細胞内へ刺激を伝えている可能性も示されている。このことと本研究の成績を考え

合わせると、MUC1によるTLRのシグナル抑制は、細胞内シグナルレベルでのある種のクロストークの結果であると考えられ、今後、さらに詳細な検討を行う予定である。

一方、本研究によりCOPDの病態形成に重要な好中球エラスターゼがMUC1の転写促進を介してその産生を亢進することが明らかとなった。エラスターゼによる同様のムチン遺伝子発現亢進作用は、MUC1以外にも、MUC4、MUC5ACなど、気道系に豊富なアイソフォームがエラスターゼによって増加することが他の研究グループにより最近、報告されている。エラスターゼによるこれらのムチン遺伝子の発現亢進作用の機序の詳細や、MUC1以外のムチンによるTLR機能の抑制作用などは今後解明する必要があるが、気道のムチン産生がCOPDで生じる組織破壊の原因となる好中球の活性化と複雑に関わっていることを示唆しており非常に興味深い。本研究はTLRを自然免疫系を担い、細菌感染に対する生体防御系という観点から捉えてはいるが、TLRはその欠損動物の表現型解析から種々の慢性炎症の形成にも重要な役割を果たしていることが示されている。すなわち、エラスターゼによる粘液の産生亢進は炎症の慢性化を制御する負の調節機構として、慢性の気道炎症病態形成の機序に組み込まれた制御因子である可能性も否定できない。いずれにせよ、本研究で見出したTLRの抑制はムチンの新たな機能として注目に値すると考えている。

ムチンの産生制御に関する薬理学的研究では、補中益気湯とともにその構成生薬の一つでありすでにグルココルチコイドによる転写調節の亢進作用をもつことを明らかにしているグリチルリチンの作用を併せて検討した。その結果、グリチルリチンは *in vitro* および *in vivo* の両実験系において気道粘液の産生を抑制したが、補中液気湯では著明な作用を見出せなかった。グリチルリチンによるムチン産生抑制作用には比較的高用量が必要であったため、補中液気湯中の含量が不十分であったためと考えられる。また、MUC1 の発現亢進による TLR5 のシグナル抑制に対しても、補中益気湯は著明な作用を示さなかった。今後、さらに実験条件を変えて検討する必要がある。

#### E. 結論

気道粘液ムチンには、気道の細菌感染防御に重要な TLR シグナルを抑制する作用があり、また好中球エラスターゼが気道ムチンの産生を亢進する。したがって、COPD 患者に生じる気道感染の予防または治療には、粘液の産生を制御またはクリアランスを改善する薬物が有効である可能性がある。

#### G. 研究発表

Ohinata A, Nagai K, Nomura J, Hashimoto K, Hisatsune A, Miyata T, Isohama Y. Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 326, 521-6, 2005.

Kuwahara I, Lillehoj EP, Hisatsune A, Lu W, Isohama Y, Miyata T, Kim KC. Neutrophil elastase stimulates MUC1 gene expression through increased Sp1 binding to the MUC1 promoter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289, L355-62, 2005.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

「ライノウイルスの培養気道上皮感染に対する補中益気湯の影響」

分担研究者 東北大学老年呼吸器内科 中山 勝敏

研究協力者 東北大学老年呼吸器内科 山谷 睦雄

東北大学先進漢方内科 岩崎 鋼

## 研究要旨

ライノウイルス感染は風邪の主因であり、慢性閉塞性肺疾患の急性増悪を引き起こす。そこで今回、ライノウイルスのヒト気道上皮への感染メカニズムに対する補中益気湯の影響を検討した。補中益気湯の処理により、RV14 感染させた培養ヒト気道上皮細胞からのウイルス放出は 100 分の 1 近くに抑制された。また、補中益気湯の処理により、ICAM-1(RV14 感染受容体)の発現量および RV14 感染後の炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ : ICAM-1 の発現を誘導する)の発現量は有意に抑制された。さらに RV14 感染に重要な酸性エンドゾームの数も、補中益気湯の処理により時間依存的に減少した。以上から、補中益気湯は複数のメカニズムを通じて、気道上皮に対するライノウイルスの感染・伝播を抑制すると考えられた。

## A. 研究目的

ライノウイルスは風邪の主因であり、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)の急性増悪を引き起こす。従って、ライノウイルス感染をコントロールすることができれば、炎症性呼吸器疾患の増悪を予防することができる。ライノウイルスの主要型(RV14)は、ICAM-1 を感染受容体とし、酸性エンドゾームを通過してウイルス RNA を細胞内に移行させる。一方、補中益気湯は、消化機能・免疫機能を増強する漢方薬で、COPD 患者の感冒罹患回数を減少させ体重増加をもたらすことが報告されている。しかし、ライノウイルスの感染・伝播機構に対する補中益気湯の効果を解析した研究は報告されていない。そこで今回、我々は、ライノウイルス(RV14)の培養気道上皮感染メカニズムに対する補中益気湯の効果を検討した。

## B. 研究方法

1) 培養気道上皮へのライノウイルス感染: 14 型ライノウイルス(RV14)と培養ヒト気道上皮細胞を用いた。コラーゲン・コート処理した丸底硝子チューブに HTE cells を  $5 \times 10^5$  にて培養し、 $10^5$  TCID<sub>50</sub>U/mL の RV14 を 33°C にて 1 時間回転培養しながら感染させる。

2) 補中益気湯: 10mg/mL として DMSO に

溶解し、遠心後その上清を  $10^{-4}$  希釈にて使用した。対象群に対しても、溶媒(DMSO)は同様の濃度で処理されている。

3) ウイルス収量: 培養気道上皮に補中益気湯(10mg/mL 溶液上清  $10^{-4}$  希釈)または対照溶液を処理し 3 日後、RV14 を  $10^5$  TCID<sub>50</sub>U/mL にて感染させた。その後の培養気道上皮からのウイルス放出を補中益気湯処理群と対象群について経時的に調べた。またウイルス放出抑制効果に関して、補中益気湯の用量依存性(10mg/mL 溶液上清  $10^{-3} \sim 10^{-6}$  希釈)を調べた。

4) 感染メカニズムに対する効果の検討: RV14 は、ICAM-1 を感染受容体とし、酸性エンドゾームを通過してウイルス RNA を細胞内に移行させる。さらにウイルス感染細胞からの炎症性サイトカインの産生により、近傍の細胞において ICAM-1(RV14 感染受容体)発現が誘導されさらなるウイルス感染の伝播が起こると考えられている。こうした感染メカニズムに対する補中益気湯の効果を評価するために、補中益気湯処理ヒト培養気道上皮における ICAM-1(RV14 感染受容体)の発現と酸性エンドゾーム(RV14 感染に重要)の経時変化を検討した。また RV14 感染による炎症性サイトカイン発現(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ : ICAM-1 発

現促進)に対し、補中益気湯の前処理がどのような効果をもたらすか検討した。

### C. 研究結果

RV14 感染させた培養ヒト気道上皮細胞からのウイルス放出は感染後3日目に最大となるが、補中益気湯の前処理により、その放出量が100分の1近くに抑制された(図1)。この抑制効果は容量依存性を示し、10mg/mL 溶液上清  $10^{-4}$  希釈の濃度において最大効果に達した(図2)。補中益気湯の処理により、RV14 感染受容体である ICAM-1 発現量は有意に抑制され(mRNA は40%程に、可溶性 ICAM-1 蛋白は70%程に抑制: 図3)、RV14 感染経路に重要な酸性エ

ンドゾームの数は時間依存的に減少した(刺激5分後において、酸性エンドゾーム由来蛍光強度は60%程に抑制された: 図5)。さらに補中益気湯の前処理により、RV14 感染後の炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF $\alpha$ )の発現量も有意に抑制された(感染3日目においてIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF $\alpha$  は対照群の60%程、IL-8 は対照群の90%程: 図4)。

### E. 結論

In vitro の実験系において、補中益気湯は気道上皮に対するライノウイルスの感染を有意に抑制する。そのメカニズムとして、ライノウイルス感染受容体の発現抑制、ウイルス感染後の

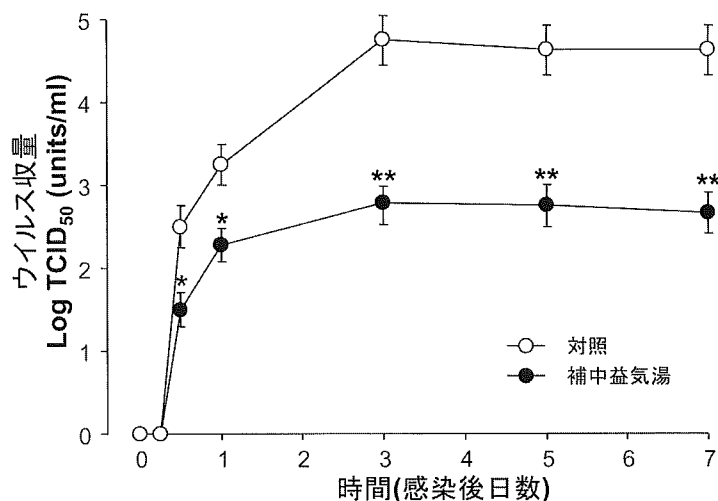


図1. 感染ヒト培養気道上皮からのRV14-ウイルス収量に対する補中益気湯の効果

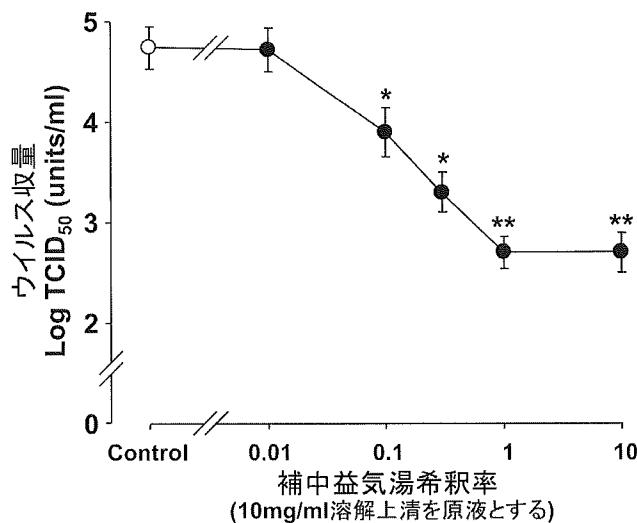


図2. 補中益気湯によるRV14-ウイルス収量抑制効果の用量依存性

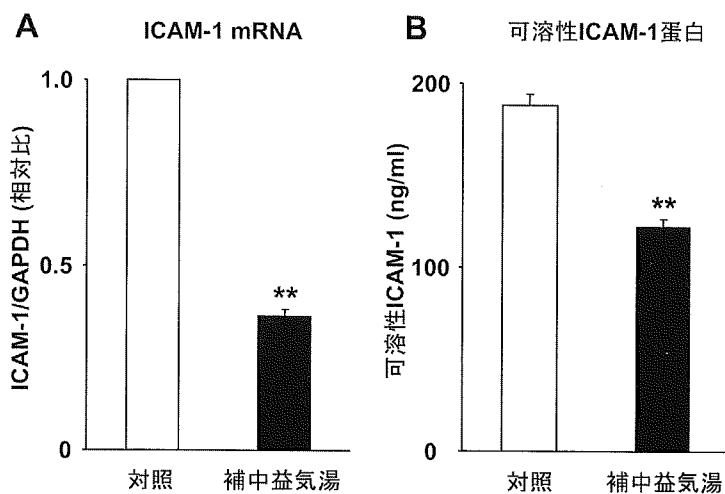


図3. 補中益気湯によるヒト培養気道上皮での ICAM-1 の発現に対する効果

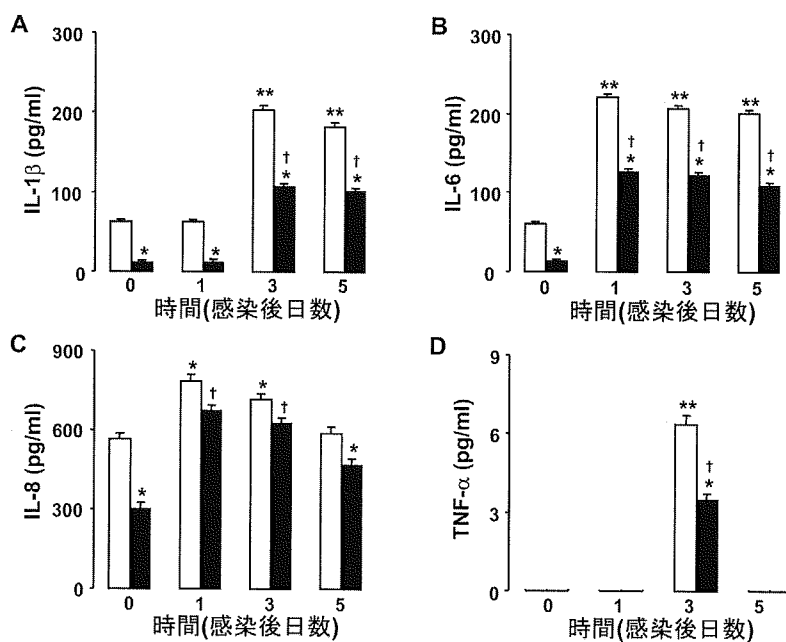


図4. ヒト培養気道上皮の RV14 感染後炎症性サイトカイン産生に対する補中液気湯の効果

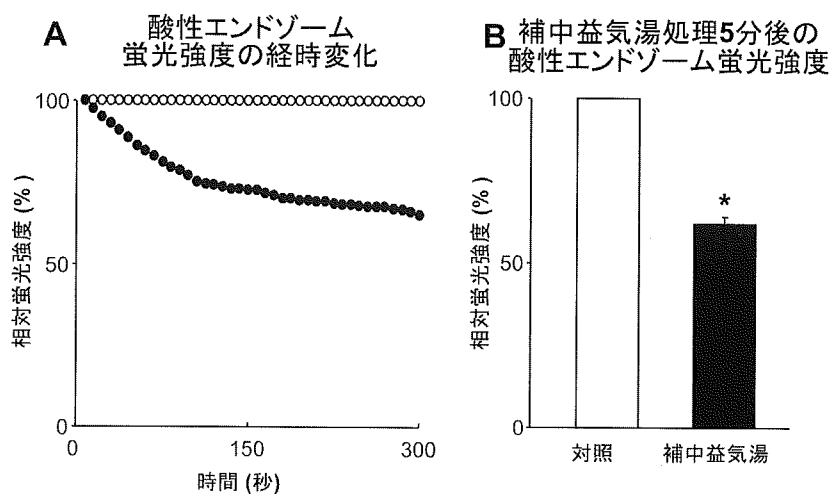


図5. ヒト培養気道上皮内の酸性エンドゾームに対する補中液気湯の効果



炎症性サイトカインの産生抑制、酸性エンドゾームの修飾等によることが考えられた。

## G. 研究発表

### 論文発表

Yasuda H, Yamaya M, Sasaki T, Inoue D, Nakayama K, Tomita N, Yoshida M, Sasaki H. Carbocysteine reduces frequency of common colds and exacerbations in COPD patients. *J Am Geriatr Soc* (in press).

Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Sasaki H. Increased blood carbon monoxide from endogenous production in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1231-1232.

Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Sasaki T, Ebihara S, Ebihara T, Sasaki H. Is the arteriovenous carboxyhemoglobin gradient really a useful marker in systemic inflammation? *Chest* 2005; 128: 3771-3772.

Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Sasaki T, Inoue D, Yoshida M, Sasaki H. Inflammatory indicators and therapeutic targets in COPD during exacerbations. *Chest* 2005; eletter July 17 (<http://www.chestjournal.org/cgi/eletters/127/6/1911#703>).

Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Ebihara S, Sasaki T, Okinaga S, Inoue D, Asada M, Nemoto M, Sasaki H. Increased arterial carboxyhemoglobin concentrations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1246-51.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

マウス急性喫煙曝露モデルに対する補中益気湯の効果

分担研究者 永井 厚志  
研究協力者 青柴 和徹、周 方  
東京女子医科大学 第一内科

### 研究要旨

補中益気湯の COPD に対する有用性の機序を検討するために、8 週齢雄 DBA/2 マウスに週 5 日間、2 週間継続して喫煙または空気のみ曝露を行なった。喫煙および空気曝露マウスを 2 群に分け、実験群には補中益気湯、コントロール群には蒸留水を一日 1 回、胃管を介して投与した。2 週間後に採血および気管支肺胞洗浄 (BAL) を行なった。空気のみを吸入させたマウスでは、補中益気湯の投与により血中の TNF $\alpha$  濃度が増加していた。喫煙曝露後には BAL 液の好中球数が増加したが、補中益気湯投与群では蒸留水群に比べて有意な増加がみられ、BAL 液中の TNF $\alpha$  濃度も上昇する傾向がみられた。血中のレプチン濃度は実験群間で差がなかった。以上の結果から、補中益気湯は生体の免疫力を亢進させて COPD における易感染性を改善する可能性が考えられた。

### A. 研究目的

補中益気湯が COPD 患者の免疫機能や栄養状態を改善するかを検討するために、マウスを用いた動物実験を行った。すなわち補中益気湯の経口投与が、2 週間の喫煙曝露によるマウスの免疫機能や栄養状態の変化に影響を与えるについて検討した。

### B. 研究方法

8 週齢の雄 DBA/2 マウスに週 5 日間、2 週間継続して喫煙または空気のみ曝露を行った。すなわち喫煙群ではマウスを喫煙チャンバー (27 × 27 × 15cm) 内に入れ、一日 3 本のタバコ (Piece®; タール含有量 24mg、ニコチン含有量 24mg) の主流煙を 90 分間吸入させた。空気吸入群には喫煙チャンバー内で空気のみを吸入させた。喫煙群と空気群をそれぞれ 2 群に分け、喫煙または空気吸入の直前に補中益気湯 (ツムラより提供; 20mg を蒸留水 300ml に懸濁) または蒸留水のみを胃管を介して胃内に投与した。喫煙 + 蒸留水群、喫煙 + 補中益気湯群、空気 + 蒸留水群、空気 + 補中益気湯群の各群ともに n=6 匹で実験を開始したが、実験期間中に喫煙 + 補中益気湯群および空気 + 補中益気湯群の各一匹が胃管の気管内への誤挿入のために死亡

した。毎日の喫煙または空気吸入前に体重を測定した。実験最終日に喫煙または空気吸入を行った直後にマウスにペントバルビタール腹腔内注射による深麻酔を施し、下大静脈から採血後、開胸して気管内に 22G のサーフローを挿入して 1ml の PBS を用いて気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。回収した血液サンプルについては血清成分を分離後、TNF $\alpha$  およびレプチン濃度を ELISA キット (Biosource 社) を用いて測定した。BAL 液については細胞遠沈後、メイ・ギムザ染色を行い細胞分画を判定し、上清成分については ELISA キットを用いて TNF $\alpha$  濃度を測定した。すべてのデータは means  $\pm$  SEM として表示し、ANOVA 法および Post-hoc test として Scheffe's F 法を用いて統計学的推定を行った。p 値が 0.05 未満の時に統計学的に有意差ありと判定した。

### C. 研究結果

2 週間の実験期間後にすべての動物群で体重が減少した。動物群間では体重減少量に有意差はなかったが (p=0.07)、空気 + 蒸留水群で最も減少していた (表 1)。血清中のレプチン濃度については動物群間で差はなかった (表 1)。しかし血清中の TNF $\alpha$  濃度については、空気 +

表1 補中益気湯が喫煙曝露マウスに与える影響

|                     | 空気+蒸留水<br>(A 群:n=6) | 空気+補中益気湯<br>(B 群:n=5) | 喫煙+蒸留水<br>(C 群:n=6) | 喫煙+補中益気湯<br>(D 群:n=5) | ANOVA    | Scheffe's F test        |
|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------|-------------------------|
| 体重変化 (g)            | -3.8 ± 0.8          | -2.5 ± 0.3            | -0.3 ± 0.6          | -1.8 ± 0.6            | N.S      |                         |
| 血清レプチン<br>(pg/ml)   | 5.9 ± 1.8           | 5.6 ± 0.8             | 6.0 ± 0.9           | 6.3 ± 2.8             | N.S      |                         |
| 血清 TNFα<br>(pg/ml)  | 13.3 ± 10.4         | 43.0 ± 7.7            | 0.0 ± 0.0           | 1.8 ± 1.8             | p < 0.01 | p < 0.01:A 群<br>vs. B 群 |
| BAL 好中球<br>(%)      | 0.3 ± 0.2           | 1.1 ± 1.1             | 4.2 ± 0.3           | 7.7 ± 0.8             | P < 0.01 | p < 0.01:C 群<br>vs. D 群 |
| BAL TNFα<br>(pg/ml) | 2.1 ± 1.3           | 0.8 ± 0.8             | 2.5 ± 1.3           | 12.7 ± 6.7            | N.S      |                         |

データは means ± SEM として表示した。N.S.は有意差なしを表す。

補中益気湯群では空気 + 蒸留水群に比べて有意に増加していた ( $42.9 \pm 7.7$  pg/ml vs.  $13.3 \pm 10.4$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) (表 1)。BAL 液の検査結果については、喫煙曝露により好中球数が増加したが、喫煙 + 補中益気湯群では喫煙 + 蒸留水群に比べて有意な増加がみられた ( $7.7 \pm 0.8\%$  vs.  $4.2 \pm 0.3\%$ ,  $p < 0.05$ ) (表 1)。BAL 液中の TNFα 濃度については実験群間で有意差はなかったが、喫煙 + 補中益気湯群で増加する傾向がみられた ( $p = 0.08$ ) (表 1)。

#### D. 考察

本研究では補中益気湯が喫煙曝露マウスに与える影響について検討した。その結果、1) 空気のみを吸入させたマウスに補中益気湯を投与すると血清 TNFα 濃度が増加すること、2) 2 週間喫煙したマウスでは、補中益気湯を投与すると蒸留水投与に比べて BAL 液中の好中球数が有意に増加し、TNFα 濃度も増加する傾向がみられた。以上の結果から、補中益気湯は COPD 患者の免疫機能の低下を回復させる可能性が示された。COPD における易感染性は急性増悪をもたらす要因と考えられるが、補中益気湯による免疫機能の亢進はその防御に有用である可能性が考えられた。

本研究ではすべての実験群において体重が減少したが、その原因として連日の胃管の挿入がストレス負荷につながったものと考えられる。したがって補中益気湯が体重を含めた栄養状態に与える影響を検討するには、胃管を用いた薬剤の投与方法よりも混餌による摂取の方法が望ま

しいと考えられた。さらに本研究では喫煙曝露の期間が短期間であったが、ヒトにおける臨床効果に演繹させるためには、長期間および複数の time point における検討が望ましいと考えられる。したがって次年度の研究においては、血中および BAL 液中の炎症性・抗炎症性サイトカイン、ケモカインの変動をより長期間にわたり経時的に測定する予定である。

#### E. 結論

喫煙曝露マウスを用いた基礎実験から、補中益気湯は生体の免疫力を亢進させて COPD における易感染性を改善する可能性が考えられた。

#### G. 研究発表

1. Ishikawa T, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Macrophage-colony stimulating factor aggravates rather than regenerates emphysematous lungs in mice. *Respiration* (in press)
2. Yagi O, Aoshiba K, Nagai A. Activation of nuclear factor-kB in airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* (in press)

#### H. 知的財産権の出願・登録 (特許取得、実用新案登録)

特になし。

平成 17 年度厚生労働科学研究（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

漢方補剤・補中益気湯 (TJ-41) による肺障害抑制効果の検討

分担研究者 杉山幸比古<sup>1</sup>

研究協力者 田島俊児<sup>1,2</sup>、坂東政司<sup>1</sup>、卯木希代子<sup>1</sup>、大野彰二<sup>1</sup>、成田淳一<sup>2</sup>、  
森山寛史<sup>2</sup>、寺田正樹<sup>2</sup>、高田俊範<sup>2</sup>、長谷川隆志<sup>3</sup>、塚田弘樹<sup>2</sup>、鈴木栄一<sup>3</sup>、  
下条文武<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 自治医科大学内科学講座呼吸器内科学部門

<sup>2</sup> 新潟大学大学院医歯学総合研究科

<sup>3</sup> 新潟大学医歯学総合病院総合診療部

### 研究要旨

肺線維症はヘルパー T 細胞 type 2 (Th2) cytokine の、急性肺損傷や慢性閉塞性肺疾患は proinflammatory cytokine の過剰産生がそれぞれの病態形成に関与している。補中益気湯 (TJ-41) には、Th2 cytokine と proinflammatory cytokine の産生を抑制するとの報告がある。今回、我々は肺線維症、急性肺障害およびタバコ煙曝露に対する TJ-41 の効果について動物モデルを用いて検討した。

TJ-41 は、1g/kg/day の投与量となるように配合飼料として調整した。TJ-41 を 8 週間前投与した C57BL/6 マウスに bleomycin (BLM) 2mg/kg を気管内投与して BLM 肺線維症モデルを作成した。また、同様の BALB/c マウスに lipopolysaccharide (LPS) 0.1mg/kg を点鼻投与して LPS 肺障害モデルを作成した。タバコ煙曝露モデルでは、Wister ラットに、タバコ 2 本分の主流煙を 1 回 2 時間、週 3 回、3 週間曝露し、TJ-41 混餌は、タバコ煙曝露と同時に開始した。

BLM モデル肺では、TJ-41 により interleukin (IL)-5/interferon (IFN)- $\gamma$  mRNA の発現比増強の抑制とヒドロキシプロリン量の有意な低下を認めた。LPS モデルでは、TJ-41 により気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, 以下 BALF) 中の好中球数と血清 KC (IL-8) 濃度の有意な低下を認めた。タバコ煙曝露モデルでは、BALF 中の tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の低下傾向を認めた。

以上の結果から TJ-41 は、Th2 および proinflammatory cytokine の産生抑制作用を介して、BLM、LPS、タバコ煙による肺障害を軽減する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) および Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome (ALI/ARDS) は共に難治性の呼吸器疾患であり、それぞれ有効な治療もしくは予防法の解明が待たれている。また、タバコが原因とされる Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) は近年増加傾向にあり、今後、死亡原因の上位になることが予測されている。

ヘルパー T 細胞は、IL-12 により誘導されるヘルパー T 細胞 type 1 (Th1) と IL-4 により誘導される Th2 に分けられる (Immunol

Today 1996; 17:138-146)。Th1 細胞は IFN- $\gamma$  を産生し、Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-13 を産生する。種々の疾患において、Th1/Th2 バランスの変化が病態形成に重要な役割を演じていると考えられている。Th2 cytokine である IL-4 は線維芽細胞の増殖や線維芽細胞からの collagen 産生を促進する一方、Th1 cytokine である IFN- $\gamma$  はこれらを抑制する (Eur Cytokine Netw 1996; 7:363-374)。Wallace らは IPF 患者 10 例の肺生検組織で免疫染色と in-situ hybridization を行い、肺組織への浸潤細胞の IFN- $\gamma$  陽性率は 5% 以下である一