

201110014A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索と
その有効成分の同定

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小泉 桂一

平成24年（2012年）5月

目 次

I. 総括研究報告

- 粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索とその有効成分の同定 1
小泉 桂一

II. 分担研究報告

1. ワクチン療法における免疫増強に関する研究、Penta-galloyl-glucose の樹状細胞
の抗原提示に与える影響 5
小泉 桂一、条 美智子
2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明 24
國澤 純

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 28

IV. 研究成果の刊行物・別刷 29

粘膜免疫機能を増強する漢方薬の探索とその有効成分の同定

研究代表者 小泉 桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

研究要旨

本事業では、種々漢方薬および生薬成分をスクリーニング源として供し、(1) 単独の服用で、粘膜免疫を活性化する、および、(2) 経口ワクチンとの服用で、アジュバント効果を有する漢方薬を網羅的に探索し、その有効成分の同定と作用機序の解明を行うことを目的としている。そこで、昨年度は、既に臨床での有効性と安全性が確認されている漢方薬を経口アジュバントとして開発・応用するための基礎的な検討を行った。その結果、消化器機能の改善に用いられる補中益気湯を単独で服用するだけで、マウスの腸管免疫が活性化されるだけでなく、経口ワクチンとの併用でワクチン抗原特異的なIgAの産生が顕著に亢進することが明らかとなった。また、In vitro 抗原提示試験の結果から、十全大補湯、および補中益気湯は樹状細胞の抗原提示能力を大きく亢進させることが明らかとなった。さらに、その構成生薬成分である pentagalloylglucose (PGG) および類縁体は、樹状細胞の貪食能力を亢進させることを報告した (Biol. Pharm. Bull., 33: 1878-1885, 2010.)。そこで本年度は、補中益気湯に焦点を当て、IgA 産生増強の作用機序の解明を目的とした研究を遂行した。その結果、補中益気湯によるIgA産生増強効果は経口ワクチンと同時投与した時に認められることを見いだした。これらの結果は補中益気湯が腸管 IgA 産生の誘導相において作用していることを示唆する結果であると考えられる。さらに、樹状細胞への貪食能力亢進効果を利用して、PGG を経口ワクチンへのアジュバントとして開発するべく種々検討を行った。その結果、その結果、芍薬の成分である 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) により、明らかな樹状細胞の抗原提示の促進が観察された。さらに、抗原提示能の亢進の機序を調べることで、PGG により樹状細胞の抗原取り込みの促進ならびに、活性化分子の発現低下が観察された。一方で、PGG により肥満細胞の脱顆粒抑制が確認された。これらの結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。抗原提示の促進機序としては、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っている可能性が考えられた。

分担研究者

國澤 純 東京大学医科学研究所炎症免疫学分野 講師

条 美智子 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 助教

A. 研究目的

(平成 22 年度当初目的の変更はない。)

人類は、新興・再興も含めて、再び感染症の脅威に直面している。この脅威を取りのぞくためにも、効果的な治療、および予防法開発が強く求められている。

粘膜組織は多くの病原体の主要初発感染部位であり、粘膜組織を標的とした経口ワクチンは、自然免疫応答に基づく粘膜防御強化のみならず、ワクチン接種による粘膜系獲得免疫応答の増強も可能である。従って、今後の感染症予防対策の切り札として期待されているが、その殆どが実用化に至っていない理由の一つとして、安全かつ有効なアジュバントの開発が進んでいないことが挙げられる。

これまでに、漢方薬が自然免疫を活性化することは多数報告があり、実際にインフルエンザ等の感染防御効果が報告されている。つい最近、研究代表者の小泉は、漢方薬である十全大補湯が、ワクチン抗原特異的な獲得免疫誘導をも促進することを見出した。このように、投与ルートが経口である事を考えると、漢方薬は粘膜アジュバントとしての応用が期待されるが、粘膜免疫系に対する影響の詳細は解明されていない。そこで、本研究では、種々漢方薬および生薬成分をスクリーニング源として供し、かつ、漢方薬と免疫学に精通した小泉および研究分担者の國澤が連携して免疫学的手法を駆使することで、(1) 単独の服用で、粘膜免疫を活性化し、および、(2) 経口ワクチンとの服用で、アジュバント効果を有する漢方薬を網羅的に探索し、その有効成分の同定と作用機序の解明を行うことを目的とする。その結果、すでに医療現場で使用されており、かつ安価である漢方薬を優れた粘膜アジュバント剤として利用可能となれば、感染症に対策に速やかに貢献することができ、医療経済的にも有利であると考えられる。さらに、本研究より同定された有効成分は、感染症に対する新規医薬品開発に対するシーズとなり、新たなイノベーションも創出すると思われる。このように本研究は学術的にも厚生労働行政的にも大きく貢献

するものであると確信する。

以下に本年度の具体的な研究項目を列挙する。

1. ワクチン療法における免疫増強に関する研究、Penta-galloyl-glucose の樹状細胞の抗原提示に与える影響
小泉 桂一、条 美智子
2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明
國澤 純

なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

B. 研究方法

1. ワクチン療法における免疫増強に関する研究、Penta-galloyl-glucose の樹状細胞の抗原提示に与える影響
初めに、OVA 拘束性の CTL クローン CD8-OVA1.3 細胞株を用い、樹状細胞株 DC2.4 細胞の抗原提示へ影響を与える生薬成分の探索を行った。さらに、探索された生薬成分の副作用を、肥満細胞の脱顆粒反応を指標に評価した。

2. 漢方薬ならびにその有効成分による粘膜免疫強化機序の解明

経口投与した抗原に対する特異的な免疫応答を検討する目的で、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) を粘膜アジュバントであるコレラトキシンと共に経口投与した。投与は1週間に1回の頻度で行い、計3回投与した。補中益気湯の投与は週5回の頻度とした。作用機序を解明する目的で、免疫スケジュールの異なるタイミングで補中益気湯を投与する群を用意した。免疫後の各タイミングで糞便、ならびに単核球を回収し、

それぞれ ELISA 法と ELISPOT 法により OVA 特異的抗体反応を測定した。また同マウスの IgA 産生形質細胞を IgA と CD138 をマーカーに用いたフローサイトメトリー法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は富山大学および東京大学医科学研究所のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

小泉および条の研究結果から、In vitro 抗原提示芍薬の成分である 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) により、明らかな樹状細胞の抗原提示の促進が観察された。さらに、抗原提示能の亢進の機序を調べることで、PGG により樹状細胞の抗原取り込みの促進ならびに、活性化分子の発現低下が観察された。一方で、PGG により肥満細胞の脱顆粒抑制が確認された。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。これらの結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。抗原提示の促進機序としては、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っている可能性が考えられた。

また、國澤の研究結果から、補中益気湯投与群において腸管の OVA 特異的抗体産生細胞数の増加が認められた。一方で、フローサイトメトリーを用いて CD138 陽性 IgA 産生形質細胞を測定したところ、IgA 産生形質細胞の全体数には変化が認

められなかった。

D. 考察

E. 結論

ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。これらの結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。抗原提示の促進機序としては、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っている可能性が考えられた。

従って次年度は、これら作用メカニズムの詳細を検討していくと共に、実際に感染モデルを用いて生体防御反応をより詳細に検討していく予定である。さらに補中益気湯、PGG およびその類縁体のアジュバント作用を検討していく予定である。漢方の分野において「中」とは腹部を指し「補中」は「腹部を補う」という意味であるが、本事業での研究をさらに発展させることで、免疫学的観点からも腹部（消化管）の免疫機能を増強させる補中益気湯の有効性を検証していくことが重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表
 2. 学会発表
- 各分担研究者の項を参照のこと

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ワクチン療法における免疫増強に関する研究、 Penta-galloyl-glucose の樹状細胞の抗原提示に与える影響

研究分担者 小泉 桂一 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授
条 美智子 富山大学和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 助教

研究要旨

人類は、新興・再興も含めて、再び感染症の脅威に直面している。この脅威を取りのぞくためにも、効果的な治療・予防法開発が強く求められている。粘膜組織を標的とした経口ワクチンは、自然免疫応答に基づく粘膜防御強化のみならず、ワクチン接種による粘膜系獲得免疫応答の増強も可能である。従って、今後の感染症予防対策の切り札として期待されているが、その殆どが実用化に至っていない理由の一つとして、安全かつ有効なアジュバントの開発が進んでいないことが挙げられる。そこで、本研究では、経口ワクチンアジュバント効果を発揮する生薬由来の成分を探索することを目的に、樹状細胞の抗原提示能の促進効果を指標として成分を探索、効果機序の検討を行い、その有用性を評価した。初めに、OVA 拘束性の CTL クローン CD8-OVA1.3 細胞株を用い、樹状細胞株 DC2.4 細胞の抗原提示へ影響を与える生薬成分の探索を行った。さらに、探索された生薬成分の副作用を、肥満細胞の脱顆粒反応を指標に評価した。その結果、芍薬の成分である 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) により、明らかな樹状細胞の抗原提示の促進が観察された。さらに、抗原提示能の亢進の機序を調べることで、PGG により樹状細胞の抗原取り込みの促進ならびに、活性化分子の発現低下が観察された。一方で、PGG により肥満細胞の脱顆粒抑制が確認された。ワクチン投与では、局所の炎症反応や全身性のアナフィラキシーなどが副作用として起こることがあり、PGG はこれら副作用の原因の一端を担う肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。これらの結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。抗原提示の促進機序としては、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っている可能性が考えられた。次年度においては、動物実験により PGG のワクチンアジュバント効果を解析していくことが必須である。

A. 研究目的

経口および全身性のワクチンに共通して、その効果を効率的に発揮するには、そのワクチン抗原がプロフェッショナルな抗原提示細胞 (antigen presenting cell :

APC) である樹状細胞やマクロファージなどに取り込まれ、主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex : MHC) と複合体を形成して細胞表面にて提示され、複合体が T 細胞レセプター (TCR)

により認識されるプロセスの効率的な亢進が重要となる。特に成熟した樹状細胞は抗原提示能力がマクロファージやB細胞に比較して高く、T細胞刺激活性は最も強い。従って、ワクチンアジュバントの具備すべき条件としては、樹状細胞の抗原提示能力を亢進させる作用を有することがキーポイントとなる。

ワクチンは18世紀イギリスの医学者、エドワード・ジェンナーによる天然痘の予防が起源とされている。その後、19世紀にルイ・パスツールが病原体の弱毒化株の接種によって効果的な免疫誘導が可能であることを理論的に裏付け、その応用の道を開いたことによって、種々感染症に対するワクチンが開発可能となった。さらに近年では病原微生物に対するワクチンだけでなく、自身から取り出したがんを使用する自家がんワクチンや、がん細胞に多く発現するタンパクやペプチドなどのがん特異抗原によるがんワクチンも臨床的に使用されるようになってきている。しかしながら、免疫原性の低さに起因して、ワクチン接種される抗原のみでは効果的な免疫を誘導するのは困難である。従って、これらを解決するために用いられているワクチンアジュバントは、ワクチン抗原特異的な免疫誘導を促進する免疫賦活剤、あるいは免疫増強剤の一つに分類される。一般的に、抗原の投与局所への貯留性を高めるエマルジョンや沈降物を形成するものが多く、それらは抗原と樹状細胞等の抗原提示細胞(APC)が接触する機会を増加させることで、免疫促進作用を発揮する。代表的なものとして、Freund's Complete Adjuvant(CFA)、Freund's Incomplete Adjuvant(IFA)やAlumなどが挙げられる。しかし、これらのアジュバントの使用には、以下のような問題点が挙げられる。

- (1) CFAは、流動パラフィンに界面活性剤と結核菌の加熱死菌を混合したアジュ

バントで、強い免疫誘導能をもつ反面、副作用も強い。そのため、研究分野における実験動物への使用は条件付きで認められているに過ぎず、ヒトや動物の臨床ワクチンのアジュバントとしては使用できない。

- (2) IFAは、ヒトに対し臨床的に利用可能であるが、接種部に強い炎症を引き起こす。
- (3) Alumは、ヒト用のワクチンに汎用されているが、強いIgEの産生を誘導するため、アレルギー反応を引き起こす可能性がある。

従って、インフルエンザなどのタンパクや、DNA・RNAなどの核酸、がんにおけるウィルムス腫瘍遺伝子(Willms' tumor gene: WT1)、ムチン(mucin: MUC)1などのペプチド、などの種々ワクチン抗原が同定・応用されている現在においても、効果的かつ安全性の高いワクチンアジュバントの開発は重要な検討課題である。

一方で、漢方薬は自然免疫を賦活する作用をもつことが数多く報告されている。代表的な補剤である十全大補湯は、臨床的にはがんなどの全身性消耗疾患の全身倦怠の改善や、化学療法、放射線療法に伴う骨髄抑制の改善に効果を示している。基礎的研究からは、肝臓におけるnatural killer T(NKT)細胞誘導作用、マクロファージ食能の促進及び各種免疫細胞のサイトカイン産生の誘導、抗体産生能の促進、脾細胞のマイトジェン活性の誘導などが報告されている。また、当研究室においては、1998年に大西らによって、マウスに十全大補湯を経口投与することにより門脈内に投与されたマウス大腸がん細胞の肝転移が抑制され、その効果はマクロファージを介して発揮されることを報告してきている。また、2005年に地野らによって、十全大補湯にはマクロファージのlipopolysaccharide(LPS)誘導性Interleukin(IL)-12 p40および

interferon(IFN)- γ 産生を促進する効果があることが明らかにされている。これらの報告からも、漢方薬、特に補剤は有効な生物学的応答調節物質 (biological response modifier:BRM) の一つであると考えられる。

一方、漢方薬の獲得免疫系に対する作用に関して、特に、漢方薬による抗原特異的免疫な誘導機序の解明や、ワクチンアジュバントとしての応用に関する研究は皆無であった。しかし、最近、当研究室において、十全大補湯が抗原特異的な免疫を誘導することを明らかにしている。

投与されたワクチン抗原により、抗原特異的な抗体の産生や、抗原特異的 T 細胞が誘導されるためには、まず、その抗原がプロフェッショナルな抗原提示細胞 (antigen presenting cell : APC) である、樹状細胞 (dendritic cell : DC) ・マクロファージなどに提示されなければならない。その後、抗原ペプチドと主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) class I 分子の複合体を CD8+細胞傷害性 T 細胞が、MHC class II 分子との複合体を CD4+ヘルパー T 細胞が認識し、活性化することで、抗原特異的な免疫反応が生じる (Fig. 2)。従って、ワクチン療法のアジュバントとなり得るためには、T 細胞の活性化または APC の活性化や抗原提示能の促進が必須であると考えられる。

結核の潜在的流行、新型インフルエンザの発生や懸念される高病原性鳥インフルエンザ等、人類が新興・再興感染症の脅威に直面している現在、効果的な感染症治療・予防法開発、ならびに迅速な医療現場への普及が強く求められている。WHO 提言のように、多くの病原体の主要初発感染部位の粘膜組織を標的とした、新規ワクチン・免疫療法が注目されており、感染症の予防戦略としては、(1) 自然免疫応答に基づく粘膜免疫の増強、および (2) ワクチン接種による粘膜系獲得免疫応答の増強が重要であ

る。例えば、粘膜組織における主要抗体 IgA は、通常では交叉反応性の高い自然免疫型の抗体であるのと同時に、粘膜ワクチン接種より、抗原特異的な獲得免疫型抗体として機能し防御機構を発揮する。このような背景から、経口ワクチンは今後の感染症予防対策の切り札として期待されているが、その能力を亢進する粘膜アジュバントの開発も必要不可欠である。

これらの課題を克服するために、平成 22 年度の本研究において、漢方薬の補剤、特に補中益気湯、および十全大補湯に経口ワクチンに対するアジュバント効果が確認された。

そこで、今年度の本研究では、ワクチンアジュバント効果を発揮する漢方方剤の構成生薬由来の有効成分を探索することを目的に、樹状細胞の抗原提示能の促進効果を指標として生薬から成分を探索した。

B. 研究方法

1. 試薬

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (GIBCO, USA) および Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO, USA) は、penicillin; 100 unit/ml および streptomycin; 100 μ g/ml (明治製菓、東京) を添加し、以下の実験に用いた。AIM-V 培養液は GIBCO (USA) より、Lipofection® Reagent は invitrogen (USA) より購入した。Ovalbumin (OVA) は Sigma (St. Louis, USA) の製品で Grade V のものを実験に供した。IL-2 の測定には Mouse IL-2 BD OptEIA ELISA Set を用いた。なお、本研究において、細胞培養に用いた fetal calf serum (FCS) はすべて 56 $^{\circ}$ C、30 分間の非働化処理を行った。スクリーニングに用いた、Astragaloside IV、Catalpol、(E)-Cinnamic acid、Cynnam

aldehyde、beta-Eudesmol、Ginsenoside Rb1、Ginsenoside Rg1、Glycyrrhizic acid、(Z)-Ligustilide、Paeoniflorin は和光純薬工業(株)より、1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) は Tronto Research Chemical Inc. より購入した。FITC ラベル化された抗 mouse CD80, CD86, MHC class I, MHC class II 抗体、PE ラベル化された抗 mouse MHC class I, MHC class II, ICAM 抗体は eBioscience (USA) から購入した。FITC 標識された OVA は invitrogen (USA) より購入した。Eagle's minimal essential medium (EMEM) (GIBCO, USA) は、penicillin; 100 unit/ml および streptomycin; 100 μ g/ml (明治製菓, 東京) を添加し、以下の実験に用いた。Monoclonal Anti DNP (DNP-IgE : clone SPE-7) は SIGMA 社、DNP-Albumin Conjugate, Bovine (DNP-BSA) は CALBIOCHEM 社、p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside は和光純薬工業(株) より購入した。

2. 試薬の調整

スクリーニングに用いた各生薬成分は、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、10mM のストックを作り冷凍保存。用事溶解し、最終濃度 10 μ M になるように調整した。

3. 細胞

マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞 (20) と、OVA257-264 ペプチドと MHC class I (H-2Kb) 複合体を特異的に認識して IL-2 を分泌する T-hybridoma である CD8-OVA1.3 細胞 (21-23) は、大阪大学大学院薬学研究科・中川晋作先生、中西剛先生 (現岐阜薬科大学) から供与された。DC2.4 細胞の培養には 10% FCS、50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME) を含む RPMI 1640 培養液を、CD8-OVA 1.3 細胞の培養には 10% FCS、50 μ M 2-ME を含む

DMEM 培養液を用いた。ラット肥満細胞株 RBL-2H3 細胞は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した。細胞の培養には 10% FCS、を含む EMEM 培養液を用いた。

4. OVA/LPF 溶液の調整

OVA を BSS に溶解した後、Lipofection® Reagent (以下 LPF) と 1:2 で混合し、30 分間室温にてインキュベートしたものを用いた。

5. in vitro 抗原提示試験

培養開始後、2 回以上継代した DC2.4 細胞を、AIM-V 培養液に懸濁し、96-well plate に 1well あたり 2×10^4 cells/50 μ l で播種し、5% CO₂、37 °C で培養した。30 分後 40 μ M に調整した各成分を 50 μ l ずつ加え (終濃度 10 μ M)、1 時間後、上記のように調整した OVA/LPF 溶液を 100 μ l/well で添加した (終濃度 OVA 50 μ g/ml : LPF 20 μ g/ml)。20 時間培養し抗原である OVA を取り込ませた後、その培養上清を除去し、続いて PBS にて洗浄し、0.05% グルタルアルデヒドにて DC2.4 細胞を固定化 (室温、5 分)。PBS にて 2 回洗浄したのち、CD8-OVA1.3 細胞を 3×10^4 cells / 200 μ l/well で播種した。24 時間培養後、上清を回収し、CD8-OVA1.3 細胞の産生する IL-2 を、ELISA にて定量した。

6. 抗原取り込み実験

培養開始後、2 回以上継代した DC2.4 細胞を、AIM-V 培養液に懸濁し、3.5cm dish に 4×10^5 cells/500 μ l で播種し、5% CO₂、37 °C で培養した。30 分後 200 μ M に調整した PGG を 500 μ l ずつ加える (終濃度 50 μ M)。1 時間後、調整した OVA-FITC/LPF 溶液を 1ml/dish で添加した (終濃度 OVA 50 μ g/ml : LPF 20 μ g/ml)。20 時間培養し、抗原である OVA-FITC を取り込ませた後、細胞を回収し、FACS Calibur (Becton-Dickinson) を用

いて FACS 解析を行った。直接観察には、上記と同様の手順で OVA-FITC を取り込ませ 20 時間培養した細胞を、PBS で 2 回洗浄したのち、蛍光倒立顕微鏡（キーエンス BZ-8000）下で FITC 陽性細胞を観察した。

7. FACS による樹状細胞表面マーカーの発現解析

培養開始後、2 回以上継代した DC2.4 細胞を、AIM-V 培養液に懸濁し、3.5cm dish に 4×10^5 cells/ $500 \mu\text{l}$ で播種し、5% CO₂、37 °C で培養した。30 分後、200 μM に調整した PGG を $500 \mu\text{l}$ ずつ加え（終濃度 50 μM ）、1 時間後、調整した OVA/LPF 溶液を 1ml/dish で添加した（最終濃度 OVA100 $\mu\text{g/ml}$: LPF 20 $\mu\text{g/ml}$ ）。20 時間培養し抗原を取り込ませた後、細胞を回収し、2% FCS、0.01% NaN₃ を添加した PBS に懸濁し、抗 mouse CD16/32 (2.4G2) 抗体と 5 分間、氷上で反応させた。その後、各抗体をそれぞれ添加し、1 時間、4 °C で反応させたのち、FACS 解析を行った。

8. RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応

培養開始後、2 回以上継代した RBH-2H3 細胞を、EMEM 培養液に懸濁し、48 well plate に 1×10^5 cells/ $300 \mu\text{l}$ で播種し、5% CO₂、37 °C で培養。10~12 時間後、培養液を除去し、新たに EMEM あるいは、PGG または Carnosine を加えた EMEM を $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。10 分後、DNP-IgE 溶液（EMEM 培養液に溶かす：200ng/ml）を $100 \mu\text{l}$ ずつ各 well に加えた（終濃度；100ng/ml）。6 時間後、培養液を除去し、siraganian buffer で 2 回洗浄し、siraganian buffer contain 5.6mM glucose, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA を $80 \mu\text{l}$ 加え 10 分間予備加温する。その後、siraganian buffer contain 5.6mM glucose, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA 溶液、およびこの溶液で希釈した PGG または Carnosine を $100 \mu\text{l}$ 加えた。10 分後、DNP-BSA 溶液（10

$\mu\text{g/ml}$ ）を $20 \mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、（最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ ）30 分間反応させた後、氷上で 10 分間冷却し反応を停止させ、1000g で 5 分間遠心し、上清を回収した。総酵素量の測定には、細胞を DNP-BSA で反応させる時点で、0.1% tween in PBS を加えインキュベートし、回収した細胞上清を用いた。

9. β -hexosaminidase の測定

上記の方法で回収した溶液 $25 \mu\text{l}$ を 96well plate に入れ、各 well に p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside 溶液を $50 \mu\text{l}$ 加え、37 °C で 30 分間インキュベートする。グリシン緩衝液 $100 \mu\text{l}$ を加え反応を停止させ、405nm の吸光度を測定した。

10. 統計解析

統計的有意性は両側 Student' s t-test により解析し、 $p < 0.05$ を有意であると判断した。

（倫理面への配慮）

動物実験は富山大学のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

1. 樹状細胞の抗原提示を促進する生薬由来成分の探索

抗原特異的な免疫応答は、抗原を取り込み活性化された APC により MHC 分子状に抗原が提示され、その抗原を認識した T 細胞の活性化が起こることで誘導される。従って、ワクチン療法の効果は、接種したワクチン抗原を如何に効率良く抗原提示細胞に提示させるかに依存している。in vitro において、樹状細胞にモデル抗原である OVA（ニワトリ卵白アルブミン）を取り込ませた後、OVA 拘束性 T 細胞クローンを共培

養し、最終的に本クローンから産生される IL-2 の産生亢進率を指標に、抗原特異的な免疫応答を誘導できるアジュバント活性を評価する系がある。免疫学や製剤学などの様々な研究領域で、この抗原提示試験において有効であった化合物や製剤学的な素材は、動物実験レベルでも顕著に抗原特異的な免疫応答を誘導できることが証明されている。これまでに、当研究室において、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞と OVA 特異的 T-hybridoma (CD8-OVA1.3 細胞) を用いた上記評価系を用いて、十全大補湯による抗原提示の促進が確認されている。従って本章では、抗原提示の促進能力を有する成分を明らかにするために、十全大補湯の構成生薬由来の成分探索を行った。

その結果、抗原提示の促進作用を有する生薬成分を、樹状細胞株と T-hybridoma を用いた評価系で検討した結果、十全大補湯の構成生薬成分中では、 $10\ \mu\text{M}$ の濃度において、芍薬の成分である 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) により、明らかな DC2.4 細胞の抗原提示の促進が観察された。しかし、他の成分では、川芎ならびに当帰の成分である Ligustilide にわずかに抗原提示の抑制が観察される他は、抗原提示能に差はほとんど見られなかった (Fig. 3)。

2. PGG による樹状細胞の抗原提示促進の機序解析

芍薬成分である PGG は、樹状細胞の抗原提示を顕著に亢進させることが確認された。ワクチン接種する抗原性が一定である以上、ワクチンの効力を促進させるアジュバントは必須であり、アジュバント活性は APC の抗原提示能を如何に増加させるかに依存している。樹状細胞等の APC は、(1) 抗原を取り込み、(2) 抗原提示の主刺激である MHC 分子と抗原の複合体、および共刺激分子の細胞膜上での発現の上昇を介し抗原を T 細

胞へと提示し活性化する。本研究では、PGG の樹状細胞に対する抗原提示増強効果を、

(1) 抗原の取り込み、および (2) MHC 分子と CD80 などの共刺激分子の発現に焦点を絞って解析した。

その結果、OVA 抗原量は、 $200\sim 800\ \mu\text{g/ml}$ の範囲で抗原提示能に変化が見られず、抗原の取り込みが限界になっていると考えられることから、抗原提示実験に対する至適濃度を $100\ \mu\text{g/ml}$ とし検討を行った。また、PGG は用量依存的に樹状細胞の抗原提示を増大し、 25 あるいは $50\ \mu\text{M}$ の濃度で、その抗原提示能が最大になるという結果が得られた。従って、以後の実験は、PGG 濃度 $50\ \mu\text{M}$ において検討を行った。DC2.4 細胞に OVA-FITC を取り込ませ、細胞内に取り込まれた FITC の蛍光強度を FACS で測定した結果、PGG を $50\ \mu\text{M}$ の濃度で作用させた場合、PGG を作用させていない細胞に比べて、FACS の蛍光強度の最大値で、約 5 倍程度の OVA-FITC の取り込みの上昇が確認された (Fig. 5)。また、蛍光顕微鏡による観察でも、同様の取り込みの増大が確認された (Fig. 6)。一方、抗原提示アッセイと同様の条件下において、DC2.4 細胞の表面分子の発現に及ぼす PGG の効果を FACS により解析を行った結果、抗原提示において、抗原を T 細胞に提示するという主刺激を担当する MHC-class I、MHC-class II 分子の発現の低下が確認された (Fig. 7)。同様に、抗原提示の補助シグナルを担う分子として知られている CD80、CD86 (24-26) や ICAM の発現を調べた結果、CD80、CD86 の発現が、PGG 添加群において低下していることが確認された。 (Fig. 8)

3. PGG による肥満細胞の脱顆粒抑制効果

様々なワクチンが使用されている現在でも、ワクチン療法の効果を増強するために、製剤学的な素材の改良や生理活性物質の利用など、多方面の研究領域から精力的

なアプローチが試みられている。しかし、ワクチンの効果の増強により、アレルギーや炎症反応などの副作用もまた増加することから、臨床での利用の決め手を欠いているのも事実である。最も汎用されている Alum アジュバントも、それ自身に顕著な IgE 産生能を有することから、アレルギー反応の回避が困難である。実際にインフルエンザワクチンの重篤な副作用として、即時型のアレルギー反応であるアナフィラキシー様症状等が上げられる。一方で、ある種の漢方薬は抗ヒスタミン遊離作用等を有することで、アレルギー疾患の治療に有効であり、また、ウィルス感染による全身性消耗疾患の全身症状の改善なども報告されている。本節では、PGG を理想的なワクチンアジュバントとして開発するために、副作用に関する反応として、肥満細胞の脱顆粒を指標に検討を行った。

その結果、ラット肥満細胞株 RBL-2H3 細胞の IgE-DNP-BSA 刺激による脱顆粒反応は、PGG の添加により濃度依存的に抑制され、 $100\ \mu\text{M}$ で 50% の抑制効果を示した (Fig. 9)。なお、PGG の脱顆粒抑制効果は、脱顆粒反応抑制が報告されている Carnosine (10mM) に比べて、1000 倍程度低い濃度で同程度の抑制が認められた。本実験系で肥満細胞の脱顆粒を誘導するには、肥満細胞の DNP-IgE 抗体での感作、それに続く DNP-BSA による刺激が必要である。今回、PGG の影響を両作用時点に分けて解析した結果、PGG を DNP-IgE 抗体での感作時、およびその後の DNP-BSA 添加時の両方に $10\ \mu\text{M}$ で作用させた際の PGG による脱顆粒反応の抑制効果は、PGG を DNP-BSA 添加時にのみ $100\ \mu\text{M}$ で作用させた際と同程度であった。

D. 考察

E. 結論

抗原特異的な免疫応答の誘導は、

(1) 樹状細胞等 (いわゆる抗原提示細胞) が抗原を取り込んだ後に細胞表面上の MHC 分子に抗原を提示する

(2) この提示された抗原に特異的に応答する T 細胞が質・量共に促進・増加することにより起こる。従って、ワクチン療法の効果は、接種したワクチン抗原を如何に効率良く T 細胞に提示させるかに依存している。

現在当研究室では、漢方薬そのものを経口可能なワクチンアジュバントして開発、速やかに臨床応用することを目指し、さらに、漢方薬構成生薬成分からワクチンアジュバントとして有効な成分を探索する漢方アジュバントプロジェクトを遂行している。

初めに、十全大補湯の構成生薬の種々成分存在下で、樹状細胞株 DC2.4 細胞にモデル抗原である OVA を取り込ませた後、OVA 拘束性 T 細胞クローン CD8-OVA1.3 細胞を共培養し、最終的に本クローンから産生される IL-2 の産生亢進率を指標に、抗原特異的な免疫応答を誘導できるアジュバント活性を持つ成分を探索する試みを行った。この樹状細胞株および T 細胞クローンを用いた上記実験系を用いて、すでに数多くのアジュバントが開発されてきており、我々は本試験系に漢方薬を用いた研究に初めて導入した。その結果、抗原提示能を促進することが確認されていた十全大補湯中の、今回試験した 11 種類の成分内 (Table. 1) で、PGG は樹状細胞の抗原提示能を顕著に増加させ、その効果は濃度依存的であった (Fig. 3, Fig. 4)。本試験系を用いることで、十全大補湯の抗原提示能の促進効果の一端を担う成分を探索できたことは、今後の漢方アジュバントのより有効な成分探索の進展においては重要な一歩である。しかしながら、十全大補湯の抗原提示の促進効果の全てが、PGG に依存されているとは考えられない。今後は、十全大補湯の構成生薬に含まれる他の成分も検討するとともに、複

数成分の組み合わせについても検討する必要がある。

一方で、探索された PGG は、抗炎症ならびに抗アレルギー作用を有することが既に明らかとなっている。抗炎症作用に関しては、PGG 単体では、ヒト末梢血単核球 (PBMCs) の TNF- α や IL-1 β の分泌を促進する働きがある一方で、LPS 刺激下の TNF- α や IL-1 β の産生の抑制、ヒトリンパ腫 U937 細胞の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激下での IL-8 の産生の抑制などの相反する作用が報告されている。この PGG による炎症性サイトカイン産生の抑制機序としては、マウスマクロファージ株 RAW264.7 細胞において、LPS 刺激による I κ B kinase (IKK) 活性化の抑制により、nuclear factor- κ B (NF- κ B) の抑制がおこり、nitric oxide synthase (NOS) の増加が抑制されることが報告されている。さらに、抗アレルギー作用に関しては、最近、影山らは PGG がマウスの粘膜型骨髄細胞由来肥満細胞 (mBMMC) の IgE 高親和性の Fc ϵ レセプターの発現を低下させることで、肥満細胞の脱顆粒を抑制することを報告している。ラット肥満細胞株の脱顆粒反応が、PGG を作用させることにより抑制されることを確認している。この際、PGG を、DNP-BSA による刺激時のみに作用させたときに比べて、DNP-IgE 抗体による感作時と DNP-BSA 刺激時の両時点で作用させた場合に脱顆粒の抑制がより強くみられた (Fig. 9)。この結果から PGG は、報告されているように、Fc ϵ レセプターの発現を低下させるだけでなく、IgE と抗原の架橋あるいは、膜安定化、IgE のレセプターへの結合にも作用していることが考えられる。このように、PGG は Alum 等で問題となる副作用である肥満細胞の脱顆粒反応を抑制しつつ、抗原提示を増加させるユニークな特性を有することが明らかになった。この結果から、PGG は I 型アレルギーの惹起に影響を及ぼさない新

規ワクチンアジュバントの成分になり得る可能性が示唆された。第二章において、PGG の樹状細胞に対する抗原提示能の促進機序を解析した結果、DC2.4 細胞に OVA-FITC 抗原の取り込みをさせる時点で PGG を作用させることにより、抗原取り込みの促進が FACS 解析ならびに蛍光顕微鏡の観察で確認できた。しかしながら、抗原を T 細胞に提示する MHC class I/II の発現 (Fig. 7)、ならびに、樹状細胞の共刺激分子である CD80, 86 の発現の低下が観察された (Fig. 8)。

MHC や、共刺激分子の発現の低下は、通常の免疫応答では抑制的に作用するが、第一章から樹状細胞から T 細胞への抗原提示は促進しているという結果が得られている。一方で、抗原提示は抗原の取り込み量に相關するが、抗原を取り込んだ樹状細胞はその刺激で速やかに成熟し、抗原取り込み能力が低下する。従って、本結果から、PGG は、樹状細胞の成熟を抑制することで抗原取り込みの促進を図っているのではないかとこの可能性が考えられる。

次年度においては、動物実験により PGG のワクチンアジュバント効果を解析していくことが必須である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I. A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells. Biol Pharm Bull.

2010;33(11):1878-85.

2. 学会発表

- 1) 保科瑛子、犬寫明子、大江未来広、山田美幸、竹野伸洋、条美智子、櫻井宏明、柴原直利、濟木育夫、小泉桂一 抗原提示試験による経口ワクチン亜糖糖路候補の探索と機序解明、第 28 回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 2) 山田美幸、犬寫明子、竹野伸洋、篠原看奈、櫻井宏明、濟木育夫、小泉桂一 Penta-galloyl-glucose の樹状細胞の抗原提示に与える影響、第 28 回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 3) 小泉桂一、國澤純、犬寫明子、大江未来広、保科瑛子、条美智子、櫻井宏明、柴原直利、清野宏、濟木育夫 漢方薬の経口ワクチンに対するアジュバントとしての有用性、第 28 回和漢医薬学会学術大会、富山、2011
- 4) 条美智子、亀井貴志、藤本孝子、木村真梨、小泉桂一、引網宏彰、後藤博三、嶋田豊、柴原直利 ピオグリタゾン誘発末梢性浮腫に対する五苓散の効果に関する基礎的検討、札幌、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

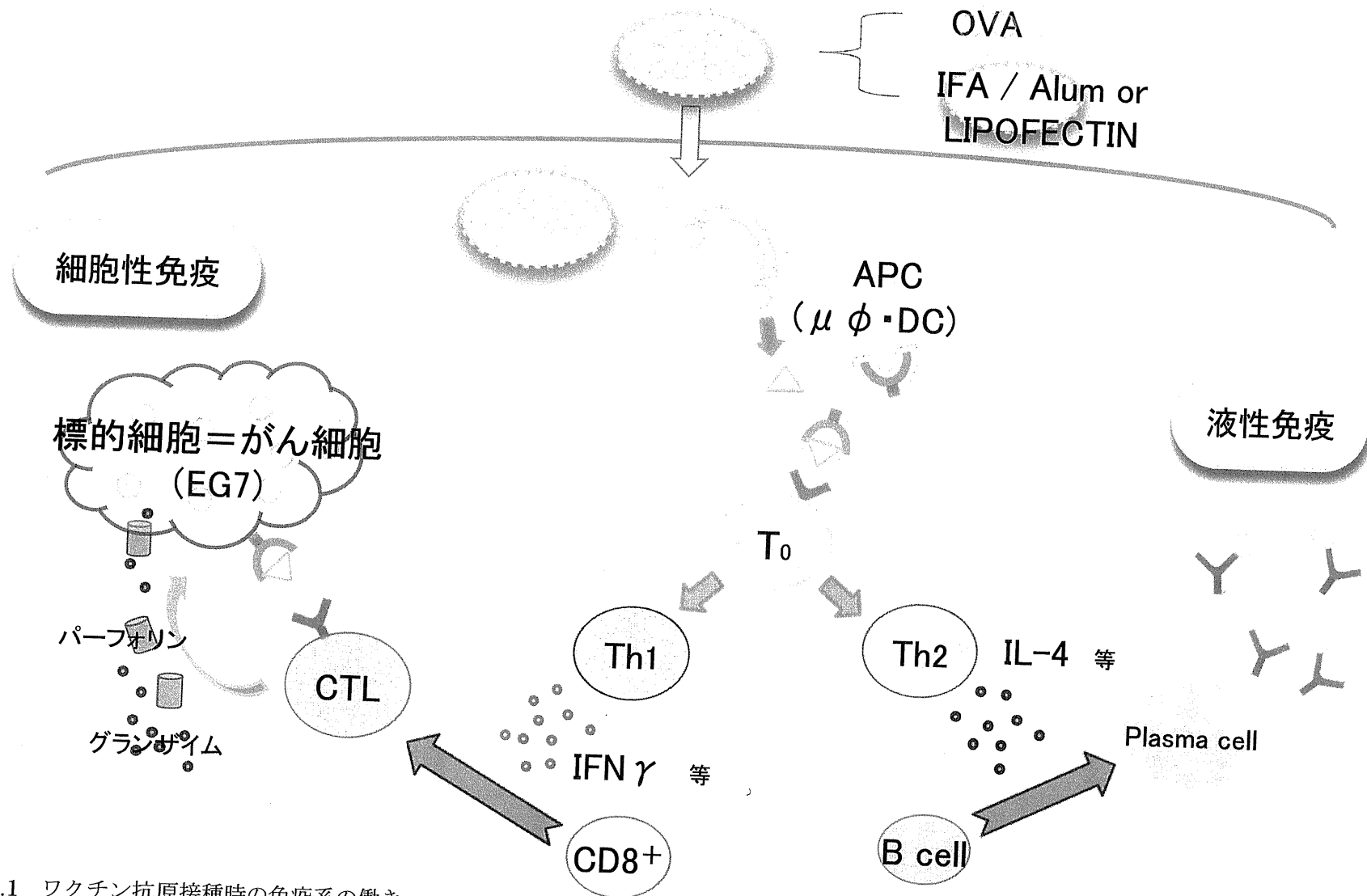


Fig.1 ワクチン抗原接種時の免疫系の働き

モデル抗原であるOVAは、IFAやAlumなどのアジュバントと共にマウスに接種すると、マクロファージ(μφ)や樹状細胞(DC)などのAPCにより取り込まれる。APC(特にDC)は、MHC上に抗原断片を提示し、この抗原を認識し、刺激を受けたナイーブなT細胞(T₀)は、Th1あるいはTh2細胞に分化する。Th1細胞は、IFN γ 等を分泌し、CD8⁺細胞を活性化し、細胞障害性のCTLへ誘導する。CTLは標的となる細胞(実験系ではEG7腫瘍)を認識し、パーフォリンやグランザイムによる細胞の破壊を行う細胞性免疫に働く。一方、Th2細胞はIL-4等を産生し、B細胞を形質細胞に分化させ、抗原特異的な抗体を産生させる液性免疫に働き掛ける。

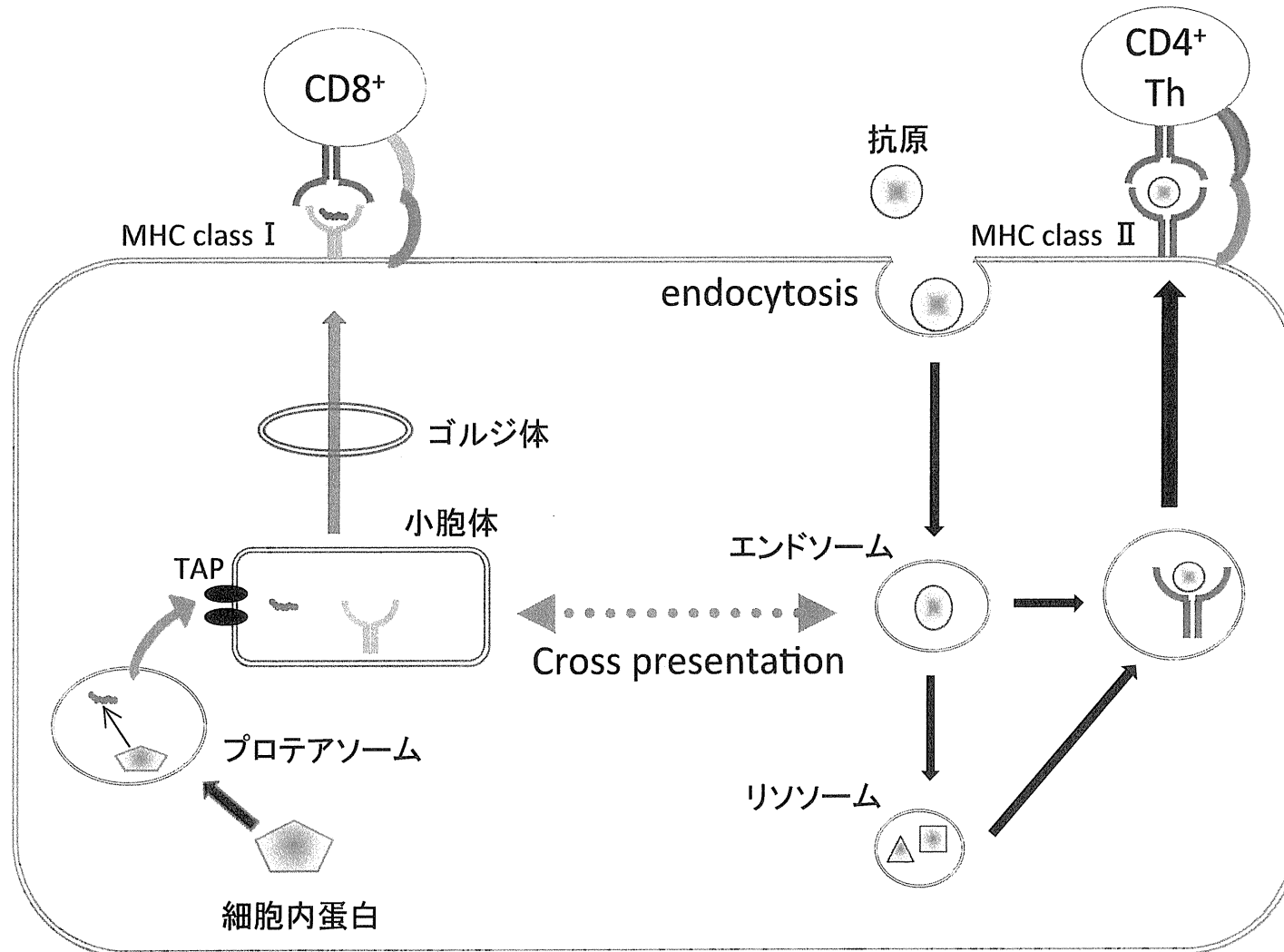


Fig.2 APCによる抗原提示機構

通常、外来から取り込まれた抗原は、エンドソームを経てリソソームで分解され、MHC class II上に提示される。提示された抗原は、CD4⁺のTh細胞により認識され、細胞を活性化する。また、内在性の自己抗原や、細菌・ウイルスなどの蛋白はユビキチン化され、プロテアソームで分解を受け、MHC class I上に提示される。MHC class Iで提示された抗原は、CD8⁺のT細胞を活性化し抗原特異的なCTLへ誘導する。一方で、抗原提示細胞が外来性抗原を取り込み、プロセッシングした後、MHC class Iとともに細胞障害性T細胞へ提示することがあり、この現象をクロスプライミング、その抗原提示機構をクロスプレゼンテーションと称する。

Table.1 十全大補湯構成生薬と抗原提示試験に用いた成分

桂皮	cynnamaldehyde	cinnamic acid
黄耆	astragaloside IV	
人参	ginsenoside Rb1	ginsenoside Rg1
苍朮	beta-eudesmol	
茯苓		
甘草	glycyrrhizic acid	
川芎	ligustilide	
地黄	catalpol	
当归	ligustilide	
芍药	paeoniflorin	1,2,3,4,6-penta galloyl glucose

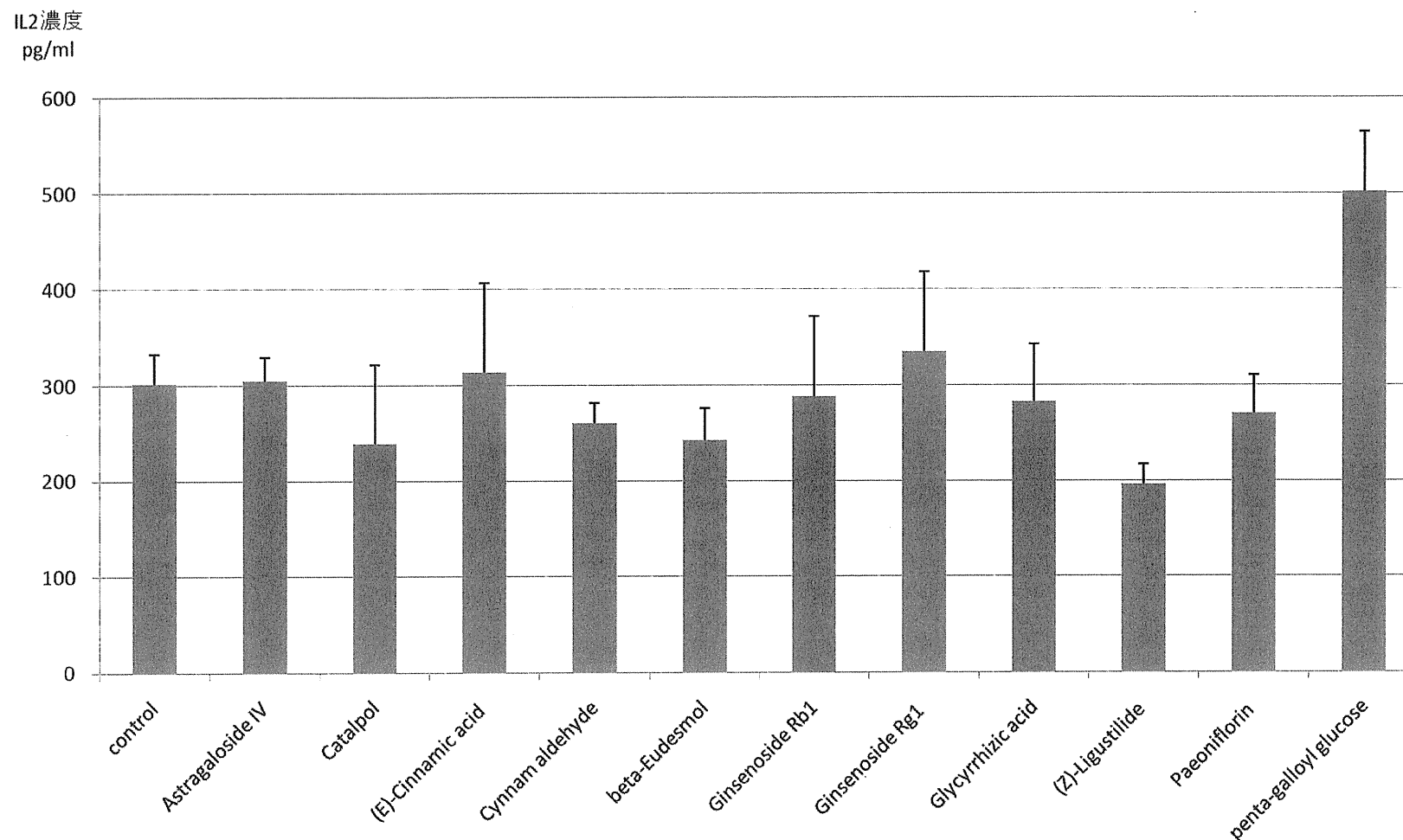


Fig.3 樹状細胞の抗原提示を促進する十全大補湯構成生薬成分の探索
 DC2.4細胞を、96-well plateに 2×10^4 cells/ 50 μ l/wellで播種。30分後40 μ Mに調整した各成分を50 μ lずつ加え(終濃度10 μ M)、1時間後、OVA/LPF溶液を100 μ l/ wellで添加した(最終濃度OVA 50 μ g/ml : LPF 20 μ g/ml)。20時間培養後、PBSにて洗浄し、0.05% グルタルアルデヒドにてDC2.4細胞を固定化(室温、5分間)。PBSにて2回洗浄したのち、CD8-OVA1.3細胞を 3×10^4 cells / 200 μ l / wellで播種した。24時間培養後、上清を回収した。培養液中のIL-2を、ELISAにて定量。グラフでは縦軸にIL-2濃度(pg/ml)、横軸に各成分を示す。

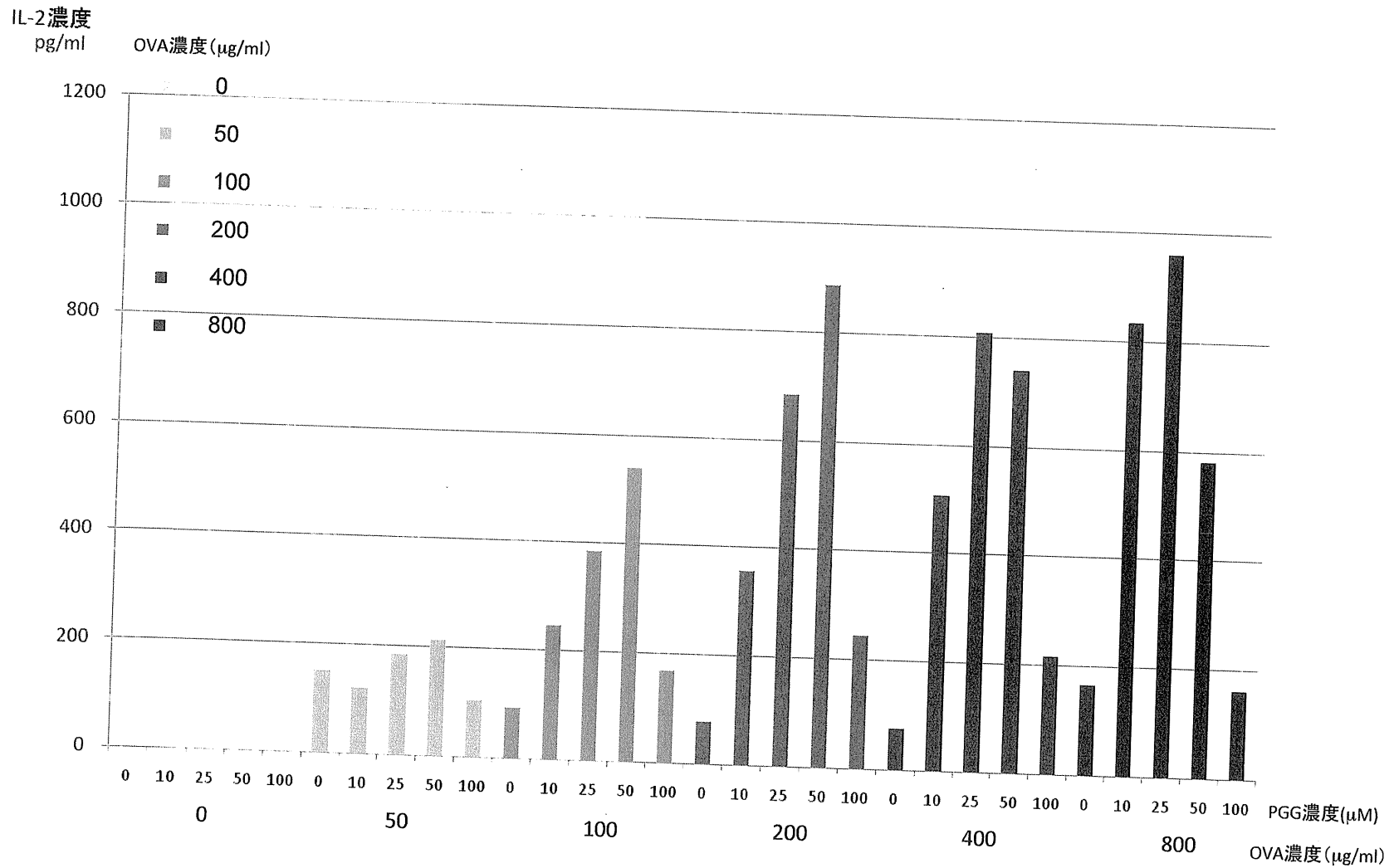


Fig.4 樹状細胞の抗原提示に影響を与えるPGG濃度の検討
 PGG濃度0-100μM、OVA濃度0-800μg/mlの範囲で、抗原提示アッセイにおけるPGGの至適濃度の検討を行う。
 グラフでは、縦軸にIL-2濃度(pg/ml)を取り、横軸はOVA濃度(グラフ中の色で示す：μg/ml)ごとに、PGG濃度(μM)を分けて示し、OVA各濃度において、PGG濃度が抗原提示アッセイに与える影響を示す。