

201208007A

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24年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小泉 桂一

平成25年（2013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. 樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索 5

小泉 桂一

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 12

國澤 純

3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明
. 22

平山 謙二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 32

IV. 研究成果の刊行物・別刷 33

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。

そこで本年度は、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC class I および II) に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。その結果、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索された 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose を含めて、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Epihesperidin (陳皮成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmatine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Perillaldehyde (蘇葉)、Rosmarinic Acid (蘇葉成分)、Sennoside A (大黄成分)、Sennoside B (大黄成分) の 9 種類が探索された。さらに、MHC Class II 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin (黄芩成分) が探索された。

一方で、免疫増強する漢方薬や生薬そのものを、アジュバントとして応用することは、新たに開発するアジュバント剤とは異なり、すでに使用されている漢方薬や生薬は、ある程度の安全性は担保され、かつ、迅速な普及が期待できる。そこで、昨年までに、種々 *in vivo* モデルにおけるアジュバント効果が確認できた漢方薬である補中益気湯および十全大補湯の機序解明、さらには、将来的な臨床応用をめざして、脳マラリアのマウスモデルを用い、補中益気湯と十全大補湯の病態への影響を調べた。その結果、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導の場であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みを促進することで IgA 抗体産生細胞の質 (IgA 高産生 CD11b 陽性細胞の誘導) ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の総量を増加させていることが作用機序の一つの可能性として考えられる。さらに、脳マラリアというマラリアが引き起こす最も重篤な合併症のモデルに対する漢方薬の影響を見ることにより、病害制御に有効な免疫応答とは何かを探ろうと試みた。その結果、補中益気湯と十全大補湯に病態を改善する明白なエビデンスを認めたことで、今後有効性の標的となる免疫応答についてのさらなる詳細な解析が必要である。

分担研究者

國澤 純 東京大学医科学研究所
(H24.12 まで) (独) 医薬基盤研究所 (H25.1 から)
平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所免疫
遺伝学分野

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・平山が連携して免疫学的な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. 樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索
小泉 桂一

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

3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明

平山 謙二

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. 樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索

生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC class I および II) に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。

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

腸管 IgA 反応を増強する補中益気湯の主要作用部位と考えられたパイエル板に焦点を当て、パイエル板依存的に誘導される IgA 産生細胞の解析と補中益気湯による IgA 産生増強との関連について検討した。

3. 漢方薬ならびにその有効成分によるマラリア感染免疫修飾機序の解明

免疫調節作用を有する漢方薬により、マラリア感染の際の免疫応答が修飾され、脳マラリアモデルの病態に変化が起こるか否かについて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は富山大学、東京大学医科学研究所および長崎大学熱帯医学研究所のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

小泉の研究結果から、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索された PGG を含めて、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Epihesperidin (陳皮成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmitine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Perillaldehyde (蘇葉成分)、Rosmarinic Acid (蘇葉成分)、Sennoside A (大黄成分)、Sennoside B (大黄成分) の 9 種類が探索された。さらに、MHC Class II 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin (黄芩成分) が探索された。

また、國澤の研究結果から、パイエル板依存的に誘導される IgA 抗体を高産生する細胞サブセットを同定した。一方で補中益気湯を投与した群では、これら IgA 抗体を高産生するサブセットの割合は増えていなかったことから、IgA 抗体の産生細胞の質的变化ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞を総量的に増加させることが作用機序であることが示唆された。

さらに、平山は、脳マラリアのマウスモデルを用い、補中益気湯と十全大補湯の病態への影響を調べた。その結果、このモデルにおいて、いずれの漢方薬も神経症状を改善させ、特に十全大補湯では、脳マラリアでの死亡を減少させる効果のあることが示された。これらの薬剤投与による原虫血症の改善は見られなかったことから、この効果は病態と関係する免疫応答を修飾していることが推測された。

D. 考察

E. 結論

本研究の目的は、冒頭にも記したが、

(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。

漢方薬・生薬は基礎および臨床研究においても、自然免疫を活性化させることが明らかとなっている。従って、生薬由来化合物をワクチンアジュバントのシーズとして利用することは理にかなっていると思われる。実際に、ワクチンアジュバントの開発に用いられる樹状細胞の抗原提示試験を用いて、生薬由来化合物ラブラリーから 9 種類もの候補化合物が探索されたことは、非常に効率の良い結果である。従って、今後は、本研究から探索された生薬由来の化合物のワクチンアジュバント効果を *in vitro* および *in vivo* で解析し、それをリード化合物とした新規ワクチンアジュバントの開発を行う予定である。

一方で、免疫増強する漢方薬や生薬そのものを、アジュバントとして応用することは、新たに開発するアジュバント剤とは異なり、すでに使用されている漢方薬や生薬は、ある程度の安全性は担保され、かつ、迅速な普及が期待できる。そこで、昨年までに、種々 *in vivo* モデルにおけるアジュバント効果が確認できた漢方薬である補中益気湯および十全大補湯の機序解明、さらには、将来的な臨床応用をめざして、脳マラリアのマウスモデルを用い、補中益気湯と十全大補湯の病態への影響を調べた。

その結果、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導の場であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みを促進することで IgA 抗体産生細胞の質 (IgA 高産生 CD11b 陽性細胞の誘導) ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の総量を増加させていることが作用機序の一つの可能性として考えられる。今後は補中益気湯に含まれる免疫活性物質の同定、さらには生体内での体内動態、宿主免疫系の標的細胞の同定を行うことで、さらに漢方アジュバントの開発に向けた研究へと発展すると期待される。

また、現在種々のタイプのマラリアワクチンが開発されているが、その中には経鼻や経口投与による伝播阻止ワクチンも含まれている。しかし粘膜免疫をねら

ったワクチンのマラリアでの有効性については異論も多い。もっとも大きな問題はマラリア感染の際の免疫応答が非常に複雑でいまだに、ワクチンが一体どのような免疫を付与すべきなのかが明らかでないことである。ここでは、脳マラリアというマラリアが引き起こす最も重篤な合併症のモデルに対する漢方薬の影響を見ることにより、病害制御に有効な免疫応答とは何かを探ろうと試みた。病態を改善する明白なエビデンスを認めたことで、今後有効性の標的となる免疫応答についてのさらなる詳細な解析が必要である。

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

樹状細胞の抗原提示を亢進させる生薬由来化合物の網羅的な探索

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

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、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC class I および II) に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を網羅的に探索した。その結果、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索された PGG を含めて、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Epihesperidin (陳皮成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmatine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Perillaldehyde (蘇葉)、Rosmarinic Acid (蘇葉成分)、Sennoside A (大黄成分)、Sennoside B (大黄成分) の 9 種類が探索された。さらに、MHC Class II 提示能を顕著に亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin (黄芩成分) が探索された。

今後は、これら結果を基に、

- (1) 上記生薬およびこれら生薬で構成される漢方薬をアジュバントとして利用する。
- (2) 上記化合物をリード化合物とした新規ワクチンアジュバントを開発する。

予定である。

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。

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、マクロファージ貪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、我々は、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。

しかしながら、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。これまでに、我々は、十全大補湯が抗原特異的な免疫を誘導することで、樹状細胞に対するがんモデルワクチン抗原特異的な抗原提示能力を増強することを明らかにしている。さらに、この増強効果の結果、十全大補湯のがんワクチンのアジュバントとしての有用性が明らかとなった。

これらの結果をもとに、平成 22 年度の本事業において、樹状細胞の抗原提示能力を亢進する漢方薬の探索およびその機序解析を行った結果、十全大補湯以外に、補中益気湯にもワクチンのアジュバントとしての有用性が確認できた。さらに、平成 23 年度において、十全大補湯の構成生薬である芍薬の成分、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

一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。

このように PGG の探索結果から、漢方薬の構成生薬の成分は、ワクチンアジュバントの有望なシーズになることが明らかとなってきた。

そこで、本年度は、生薬成分由来の新たな経口可能なワクチンアジュバントを開発する目的で、合計 96 種類生薬由来化合物を用いて、樹状細胞の 2 種類の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC class I および II) に対する抗原提示能力を亢進させる生薬由来化合物を探索した。

B. 研究方法

1. 生薬成分由来化合物

富山大学和漢医薬学総合研究が構築した和漢薬標準ライブラリーを使用した (表 1)。

2. 培養液

RPMI1640 (GIBCO) 培養液、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO USA) にペニシリン (penicillin, 0.1mg/ml、明治製菓 東京)、ストレプトマイシン (streptomycin, 0.1mg/ml、明治製菓 東京) を添加し、ミリポアフィルター (0.22 μ m/径、Millipore、USA) にて濾過滅菌後用いた。培養細胞の継代、維持には FCS (終濃度 10%)、2-Mercaptoethanol (2-ME、GIBCO、USA) を加えて完全培地とした。なお、本研究に用いた FCS はすべて 56°C、30 分間の非働化処理を行った。ダルベッコ PBS (-) ニュスイは日水製薬株式会社 (東京) より購入した。

3. Class I 抗原提示試験

OVA エピトープペプチドでと 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、37°C、5%CO₂ 環境下单相培養で in vitro にて継代、維持した。OVA を 5mg/ml となるように HBSS (－) に溶解した後、Lipofectin Reagent® (以下 LPF) と 1:2 で混合し、35 分間室温にてインキュベートし、OVA の最終濃度が 50 µg/ml となるように AIM-V 培養液を加えて使用した。DC2.4 を AIM-V 培養液に懸濁し、96well plate に 1well あたり 4×10⁴cells/50 µl で播種し、5%CO₂、37°C で培養した。15 分後、漢方薬を 50 µL ずつ添加し、1 時間半後、上記に準じた方法で調製した OVA-LPF 溶液を 100 µl ずつ添加した。(最終濃度：漢方薬または生薬エキス 200 µg/ml、OVA50 µg/ml、LPF20 µg/ml)。5%CO₂、37°C で 24 時間培養し、抗原である OVA を取り込ませた PBS (－) で 1 回洗浄を行い、0.05%グルタルアルデヒド (室温、5 分) 処理により細胞を固定化し、PBS で 2 回洗浄したあと、CD8-OVA1.3 細胞を 4×10⁴cells/200 µl/well で播種した。5%CO₂、37°C で 24 時間培養後、上清を回収し、IL-2 を ELISA により定量した。

4. Class II 抗原提示試験

マウス小腸上皮細胞由来 MODE-K 細胞を IFN-γ 100 unit/ml で 3 日間培養後、MODE-K の培地を Mitomycin C 50 ug/ml 入りの培地に交換し、45 分間培養した。トリプシンで細胞をはがし、96 穴プレートに 5×10⁴/well でまき、2 時間培養後に、培地を除去し、lipofectin と 35 分間前培養した HEL (鶏卵由来リゾチーム蛋白) 入りの DMEM に交換した。5 時間培養後に、RPMI で 3 回洗浄、3A9 細胞を 5×10⁴/well で播種し、24 時間後、プレートを遠心し、上清を

回収した。ELISA で上清中の IL-2 を測定し、抗原提示を評価した。詳細は、Class I 抗原提示試験に準拠した。

5. 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

96 種類におよぶ多数の生薬の探索結果から、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class I 提示能を 1.5 倍以上亢進させる生薬由来化合物として、昨年度に探索された PGG を含めて、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Epihesperidin (陳皮成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmatine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Perillaldehyde (蘇葉)、Rosmarinic Acid (蘇葉成分)、Sennoside A (大黄成分)、Sennoside B (大黄成分) の 9 種類が探索された。

特に、Coptisine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Gomisin A (五味子成分)、Palmatine Chloride (黄柏, 黄連成分)、Sennoside B (大黄成分) 4 種類は、樹状細胞の MHC Class I の抗原提示能を極めて亢進させることが明らかとなった (図 1)。

一方で、対照群と比べて、樹状細胞の抗原特異的な MHC Class II 提示能を 2 倍以上亢進させる生薬由来化合物として、Wogonin (黄芩成分) が探索された (図 2)。

D. 考察

E. 結論

種々ワクチンが汎用され、また、経口ワクチンを含めた新規ワクチンが多数開発されている現在、その効果を増強するワクチンアジュバントの開発が求められている

この開発過程において、数万種類の化合物から構成される、いわゆるケミカルライブラリーが、ワクチンアジュバントのシーズとして利用されている。確かに、その種類は多いが、これらケミカルライブラリーには効果に関する付帯情報はほとんどない。

その点、漢方薬・生薬は基礎および臨床研究においても、自然免疫を活性化させることが明らかとなっている。従って、生薬由来化合物をワクチンアジュバントのシーズとして利用することは理にかなっていると思われる。実際に、ワクチンアジュバントの開発に用いられる樹状細胞の抗原提示試験を用いて、薬由来化合物ラブラリーから9種類もの候補化合物が探索されたことは、非常に効率の良い結果である。

今後は、これら結果を基に、二つの方向性をもって、ワクチンアジュバントを開発していく必要性がある。

(1) 漢方アジュバント

ワクチンの効果を増強する漢方薬や生薬そのものを、アジュバントとして応用するものである。新たに開発するアジュバント剤とは異なり、すでに使用されている漢方薬や生薬は、ある程度の安全性は担保され、かつ、迅速な普及が期待できる。

従って、本研究で探索された化合物を成分として含む生薬、例えば、黄柏および黄連を含む漢方薬である黄連解毒湯や五味子、蘇葉および陳皮を含む漢方薬である杏蘇散のワクチンアジュバント効果を *in vitro* および *in vivo* で解析し、最終的には、高齢者のインフルエンザ、子宮頸がんおよび高病原性鳥インフルエンザ対策に関して、現在医療現場で用いられている漢方

薬を、安全性の高い経口ワクチンアジュバントとして、速やかに応用することで、多大な貢献をもたらすことが期待される。

(2) 新規ワクチンアジュバントの開発

これまでに、生薬の成分をシーズとして揮発された医薬品は多数存在する。最近でも、冬虫夏草をリード化合物とする新規機序を有する免疫抑制剤である FTY720 の開発が挙げられる。従って、本研究から探索された生薬由来の化合物のワクチンアジュバント効果を *in vitro* および *in vivo* で解析し、それをリード化合物とした新規ワクチンアジュバントの開発が期待される。

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) Orawin Prangsaengtong, Jun Yeon Park, Akiko Inujima, Yoshiko Igarashi, Naotoshi Shibahara and Keiichi Koizumi: Enhancement of lymphangiogenesis *in vitro* via the regulations of HIF-1 α expression and nuclear translocation by deoxyshikonin, Evid Based Complement Alternat Med. 2013, in press.
- 2) Sanphanya K, Wattanapitayakul SK, Prangsaengtong O, Jo M, Koizumi K, Shibahara N, Priprem A, Fokin VV, Vajragupta O.: Synthesis and evaluation of 1-(substituted)-3-prop-2-ynylureas as antiangiogenic agents. Bioorg Med Chem Lett. 2012 ;22(8):3001-5.

2. 学会発表

なし

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

化合物 (生薬含有成分)

No.	品名 (英)	No.	品名 (英)
1	Aconitine	51	Ginsenoside-Rd
2	Albiflorin	52	Ginsenoside-Re
3	Alisol A	53	Ginsenoside-Rg1
4	Alisol B	54	Glabridin
5	Alkannin	55	Glycyrrhizic Acid
6	Amygdalin	56	Gomisin A
7	Arbutin	57	Gomisin N
8	Astragaloside IV	58	Hesperidin
9	Atractylenolide III	59	Hirsutine
10	Atractylodin	60	Honokiol
11	Atropine Sulfate	61	Hypaconitine
12	Aucubin	62	Icarin
13	Baicalein	63	Isofraxidine
14	Baicalin	64	Isorhynchophylline
15	Barbaloin	65	(Z)- Ligustilide (0.1mg/ml Methanol Solution)
16	Benzoylmesaconine Hydrochloride	66	Limonin
17	Berberine Chloride	67	Liquiritin
18	Bergenin	68	Loganin
19	Bisdemethoxycurcumin	69	Luteolin
20	Bufalin	70	Magnolol
21	Bufotalin	71	Mesaconitine
22	Capillarisin	72	Naringin
23	(E)- Capsaicin	73	Nodakenin
24	Catalpol	74	Osthole
25	(E)- Chlorogenic Acid	75	Oxymatrine
26	(E)- Cinnamic Acid	76	Paeoniflorin
27	Cinobufagin	77	Paeonol
28	Cinobufotalin	78	Palmatine Chloride
29	Coptisine Chloride	79	Perillaldehyde
30	Corydaline	80	Praeruptorin A
31	Costunolide	81	Puerarin
32	Curcumin	82	Rhynchophylline
33	Dehydrocorydaline Nitrate	83	Rosmarinic Acid
34	Dehydrocostuslactone	84	Saikosaponin a
35	demethoxycurcumine	85	Saikosaponin b2
36	Dihydrocapsaicin	86	Saikosaponin c
37	Dimethylesculetin	87	Saikosaponin d
38	Eleutheroside B	88	Schizandrin
39	(-)-Epigallocatechin Gallate	89	Sennoside A
40	Epihesperidin	90	Sennoside B
41	Ergosterol	91	Shikonin
42	beta-Eudesmol	92	[6]-Shogaol
43	Evodiamine	93	Sinomenine
44	(E)- Ferulic Acid	94	Swertiamarin
45	Geniposide	95	Timosaponin A-III
46	Geniposidic Acid	96	Wogonin
47	Gentiopicroside		
48	[6]-Gingerol		
49	Ginsenoside-Rb1		
50	Ginsenoside-Rc		

IL-2濃度(%control)

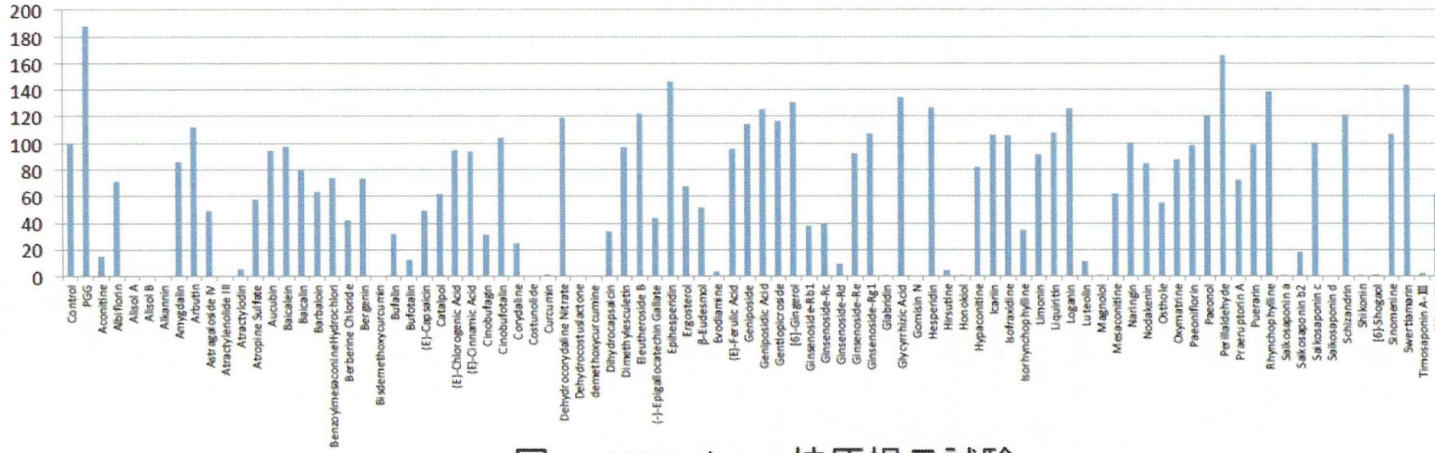


图1. MHC class I 抗原提示試験

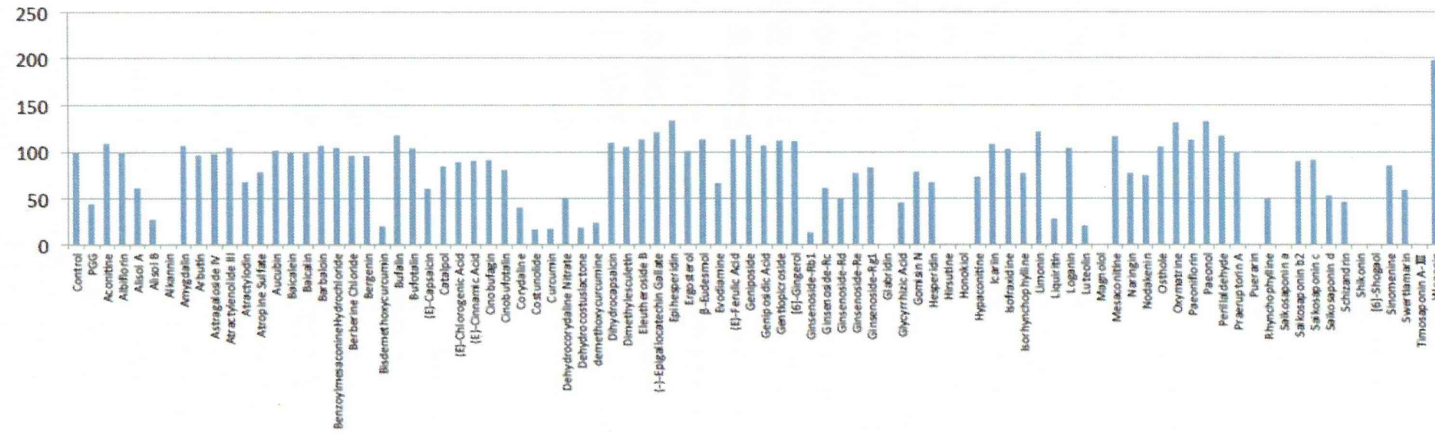


图2. MHC class II 抗原提示試験

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

研究分担者 國澤 純 東京大学医科学研究所（H24.12 まで）
（独）医薬基盤研究所（H25.1 から）

研究要旨

古くより多くの漢方薬は免疫系に作用することが知られており、その作用メカニズムについても、ここ最近の精力的な研究から脾臓などの全身系の免疫に対する機序は徐々に明らかとなってきた。一方で、漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、最も影響を受けると考えられる腸管の免疫システムへの影響についてはほとんど未解明である。本事業においては、研究分担者の國澤がこれまで得てきた腸管免疫に関する知的・技術基盤をもとに、漢方薬の腸管免疫に対する作用を明らかにする為の研究を推進している。本事業の3年度にあたる24年度は、これまでの知見から腸管IgA反応を増強する補中益気湯の主要作用部位と考えられたパイエル板に焦点を当て、パイエル板依存的に誘導されるIgA産生細胞の解析と補中益気湯によるIgA産生増強との関連について検討した。その結果、パイエル板依存的に誘導されるIgA抗体を高産生する細胞サブセットを同定した。一方で補中益気湯を投与した群では、これらIgA抗体を高産生するサブセットの割合は増えていなかったことから、IgA抗体の産生細胞の質的变化ではなく、抗原特異的IgA抗体産生細胞を総量的に増加させることが作用機序であることが示唆された。

A. 研究目的

古くから免疫調整作用があることが知られている漢方薬であるが、その作用メカニズムの多くは不明である。特に漢方薬の多くが内服処方なのにも関わらず、直接的な影響を受けると予想される腸管免疫に対する作用はほとんど未解明であると言っても過言ではない。研究分担者の國澤はこれまでに冬虫夏草をリード化合物とするFTY720を用いた研究から、生体防御に関わるIgAの産生やT細胞の遊走制御を始めとする腸管免疫制御機構に関する研究を進めてきた。本事業においてはこれらの研究から得た知的・技術基盤をもとに、漢方薬の

有する腸管免疫に対する制御機能、ならびに経口ワクチンに用いるアジュバントとしての作用を中心にその作用メカニズムを明らかにする為の研究を遂行している。本事業におけるこれまでの研究から、免疫調節機能があることが報告されている漢方薬のうち、補中益気湯が経口ワクチン投与時における腸管での抗原特異的IgA抗体の産生を増強することを見いだした。さらにそのIgA抗体の産生増強効果はワクチン抗原投与と同時に投与した時のみで認められることから、IgAの産生過程のうち誘導フェーズにおいて作用していることが示唆された。そこで本研究においてはIgA抗体の腸管で

の主要誘導組織であるパイエル板に依存的に誘導される IgA 抗体産生細胞の解析を行うと共に、補中益気湯による IgA 抗体の産生増強との関連について検討した。

B. 研究方法

1. パイエル板欠損マウスの作製と細胞分布解析

胎生 14 日目に抗 IL-7 α 受容体抗体を 500 μ g 投与することでパイエル板欠損マウスを作製した。パイエル板欠損マウス、ならびにコントロール抗体を投与したマウスの腸管から単核球を回収し、フローサイトメトリー法にて解析を行った。

2. CD11b 陽性 IgA 産生細胞の機能解析

正常マウスの腸管から回収した単核球を IgA 抗体と CD11b 抗体で標識した後、Cell sorter により CD11b 陽性 IgA 陽性細胞と CD11b 陰性 IgA 陽性細胞を分取した。それらの細胞から RNA を回収し、両サブセットにおける遺伝子発現の違いを Microarray 法で解析した。

3. 単離 IgA 陽性細胞からの in vitro における IgA 産生能の評価

上記 2 の方法により単離した CD11b 陽性 IgA 陽性細胞と CD11b 陰性 IgA 陽性細胞をそれぞれ 1×10^4 cells/well に調整し 3 日間培養した後、培養液中に産生された IgA 量を ELISA 法で測定した。

4. 補中益気湯投与マウスにおける腸管 IgA 産生細胞の解析

補中益気湯の投与は週 5 回の頻度とし、1 回当たりマウスに 40 mg 経口投与した。1 ヶ月間投与したマウスの腸管から単核球を回収し、フローサイトメトリー法により IgA 産生細胞を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は東京大学医科学研究所と医薬基盤研究所のガイドラインに則り行った。

C. 研究結果

腸管での IgA 抗体の産生において補中益気湯の作用標的の候補として考えられる代表的な腸管関連リンパ組織のパイエル板に依存的な IgA 抗体応答に関する基礎的な検討を行った。胎生 14 日目に IL-7 受容体中和抗体を投与したマウスから産まれた仔マウスはパイエル板のみが欠損している。このパイエル板欠損マウスの腸管での IgA 抗体産生細胞を解析することで、パイエル板依存的 IgA 抗体産生細胞の解析を行った。様々なマーカー分子を指標に解析を行ったところ、通常のマウスの腸管では IgA 陽性細胞は CD11b の発現の有無により二つのサブセットに分類されること、そのうち CD11b 陽性細胞がパイエル板欠損マウスで減少することが判明した (図 1)。形態や細胞表面マーカーは CD11b の発現に関わらず同一でどちらも抗体産生形質細胞としての表現型を示したことから、マイクロアレイ解析により遺伝子レベルでの機能的差異の検討を行った。その結果、CD11b 陽性 IgA 産生細胞は CD11b 陰性細胞に比べ、細胞周期や増殖に関わる分子を強く発現していることが判明した (図 2)。さらに CD11b 陽性 IgA 産生細胞と CD11b 陰性細胞をそれぞれ単離、精製した後、in vitro での抗体産生能を比較したところ、CD11b 陽性細胞は陰性細胞に比べ IgA 産生能力が高いことが判明した (図 3)。すなわちパイエル板依存的に誘導される CD11b 陽性 IgA 産生細胞は、細胞増殖活性と IgA 抗体の産生能力が高いことが判明した。

これらの結果から、補中益気湯は IgA 高産生サブセットである CD11b 陽性細胞を誘導し、その結果、IgA 産生が増強した可能性が考えられた。しかしながら補中益気湯を一ヶ月投与したマウスにおける CD11b 陽性 IgA 産生細胞と CD11b 陰性細胞を比較したところ、コントロール群と比較して同程度

であった (図 4)。

D. 考察

昨年度までの検討から腸管 IgA 産生の増強効果があることが示された補中益気湯に焦点を当て、その作用メカニズムを検証する実験を行った。これまでの結果から、補中益気湯による経口ワクチンに対する IgA 産生増強強化は、ワクチン接種時に投与することで発揮されること、一方でワクチン接種後の投与では効果が得られないことが示されていた。これらの知見から、補中益気湯が IgA 産生応答の中で特に誘導相において作用していることが考えられた。

腸管組織において IgA 産生の主要誘導組織として機能しているのがパイエル板である。パイエル板を覆う上皮細胞層には M 細胞と呼ばれる抗原取り込みに特化した細胞が存在し、経口的に投与された抗原をパイエル板内に輸送する。M 細胞の直下においては樹状細胞が存在し、M 細胞を介して取り込んだ抗原を補足し、T 細胞、ならびに B 細胞を介した抗原特異的免疫応答を惹起する。これらの性質から経口ワクチンの重要なデリバリー標的組織であると考えられている。

今回の検討からパイエル板依存的に誘導され、IgA を高産生する CD11b 陽性 IgA 産生細胞を同定することが出来た。上記の知見を考えると補中益気湯はパイエル板依存的に誘導される CD11b 陽性 IgA 抗体産生細胞の誘導促進を行うことで腸管組織での IgA 抗体の産生量が増加した可能性が考えられたが、今回の結果から補中益気湯の増強効果は CD11b 陽性サブセットの増加ではないことが示された。研究代表者である小泉がこれまで行ってきた検討から、パイエル板での IgA 抗体反応の誘導の鍵となっている樹状細胞が補中益気湯の標的細胞の一つとなっており、特に補中益気湯は樹状細胞による抗原取り込みを増強することが判明し

ている。このことを考え合わせると、補中益気湯による IgA 産生増強効果は、IgA 誘導の場であるパイエル板における樹状細胞の抗原取り込みを促進することで IgA 抗体産生細胞の質 (IgA 高産生 CD11b 陽性細胞の誘導) ではなく、抗原特異的 IgA 抗体産生細胞の総量を増加させていることが作用機序の一つの可能性として考えられる。今後は補中益気湯に含まれる免疫活性物質の同定、さらには生体内での体内動態、宿主免疫系の標的細胞の同定を行うことで、さらに漢方アジュバントの開発に向けた研究へと発展すると期待される。

E. 結論

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Takagi, Y. Saito, A. Hijikata, S. Tanaka, T. Watanabe, T. Hasegawa, S. Mochizuki, J. Kunisawa, H. Kiyono, H. Koseki, O. Ohara, T. Saito, S. Taniguchi, L. D. Shultz, F. Ishikawa, Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 119: 2768-77, 2012

2) J. Kunisawa, E. Hashimoto, I. Ishikawa, and H. Kiyono, A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo, *PLoS One* 7: e32094, 2012

3) S. Tanaka, Y. Saito, J. Kunisawa, Y. Kurashima, T. Wake, N. Suzuki, L. D. Shultz, H. Kiyono, and F. Ishikawa, Development of mature and functional hum

- an myeloid subsets in HSC engrafted NO D/SCID/IL2r γ KO mice, *J Immunol* 188:6145–55, 2012
- 4) G. F. Sonnenberg, L. A. Monticelli, T. Alenghat, T. C. Fung, N. A. Hutnick, J. Kunisawa, N. Shibata, S. Grunberg, R. Sinha, A. M. Zahm, M. R. Tardif, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. L. Farber, R. G. Collman, A. Shaked, L. A. Fouser, D. B. Weiner, P. A. Tessier, J. R. Friedman, H. Kiyono, F. D. Bushman, K. Chang, and D. Artis, Innate lymphoid cells orchestrate anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria and prevent systemic immune activation, *Science* 336(6086):1321–5, 2012
- 5) T. Shibata, N. Takemura, Y. Motoi, Y. Goto, T. Karuppuchamy, K. Izawa, X. Li, S. Akashi-Takamura, N. Tanimura, J. Kunisawa, H. Kiyono, S. Akira, T. Kitamura, J. Kitaura, S. Uematsu, K. Miyake, PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells, *Int Immunol* 24:613–23, 2012
- 6) M. Kinoshita, H. Kayama, T. Kusu, T. Yamaguchi, J. Kunisawa, H. Kiyono, S. Sakaguchi, and K. Takeda, Dietary folic acid promotes survival of Foxp3⁺ regulatory T cells in the colon, *J Immunol* 189: 2689–78, 2012
- 7) Y. Kurashima, T. Amiya, T. Nochi, K. Fujisawa, T. Haraguchi, H. Iba, H. Tsubutsui, S. Sato, S. Nakajima, H. Iijima, M. Kubo, J. Kunisawa* (*corresponding author), and H. Kiyono, Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoreceptors, *Nat Commun* 3: 1034, 2012
- 8) T. Kusu, H. Kayama, M. Kinoshita, S. G. Jeon, Y. Ueda, Y. Goto, R. Okumura, H. Saiga, T. Kurakawa, K. Ikeda, Y. Maeda, J. I. Nishimura, Y. Arima, K. Atarashi, K. Honda, M. Murakami, J. Kunisawa, H. Kiyono, M. Okumura, M. Yamamoto, and K. Takeda, Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine, *J Immunol* 190:774–83, 2013
- 9) S. Sato, S. Kaneto, N. Shibata, Y. Takahashi, H. Okura, Y. Yuki, J. Kunisawa, and H. Kiyono, Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells, *Mucosal Immunol* (2013, in press)
- 10) I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. Brileys, J. Kunisawa, Y. Inoue, M. Yamamoto, K. Akiyoshi, and H. Kiyono, Nanogel-based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by Pneumococcus, *Infection and Immunity* 81(5):1625–34, 2013
- 11) Y. Fukuyama, D. Tokuhara, S. Sekine, K. Aso, K. Kataoka, J. Davydova, M. Yamamoto, R.S. Gilbert, Y. Tokuhara, K. Fujihashi, J. Kunisawa, Y. Yuki, H. Kiyono, J.R. McGhee, K. Fujihashi, Potential roles of CCR5⁺ CCR6⁺ dendritic cells induced by nasal ovalbumin plus F

lt3 ligand expressing adenovirus for mucosal IgA responses, *PLoS One* 8(4): e60453, 2013

12) J. Kunisawa, M. Gohda, E. Hashimoto, I. Ishikawa, M. Higuchi, Y. Suzuki, Y. Goto, C. Panea, I. I. Ivanov, R. Sumiya, L. Aayam, T. Wake, S. Tajiri, Y. Kurashima, S. Shikata, S. Akira, K. Takeuchi, and H. Kiyono, Microbe-dependent CD11b⁺ IgA⁺ plasma cells in early-phase robust intestinal IgA responses in mice, *Nat Commun* 4: 1772, 2013

13) 國澤 純、柴田納央子、清野 宏 腸管関連リンパ組織内における共生細菌との免疫学相互作用 医学のあゆみ 241: 181-185, 2012

14) 國澤 純、清野 宏 実用化ステージとなった粘膜ワクチンの今後に向けた新展開 実験医学増刊号「感染・共生・防御の研究最前線」30: 3348-3353, 2012

15) 柴田納央子、國澤純、清野宏 自然リンパ球はリンパ組織内共生細菌の解剖学的な隔離を促進する 細胞工学 31: 1256-1257, 2012

16) 田尻 創、清野 宏、國澤 純 腸管免疫疾患における脂質メディエーター 遺伝子医学MOOK (印刷中)

2. 学会発表

1) 國澤 純 食品開発と創薬標的としての腸管免疫 京都大学 学際融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット第2回シンポジウム、京都(2012年6月13日、招待講演)

2) 國澤 純 冬虫夏草関連化合物 FTY720

を起点とした腸管免疫研究の最前線 第29回和漢医薬学会学術大会、東京(2012年9月3日、招待講演)

3) 國澤 純 腸内メタボリック環境を介した腸管免疫制御と疾患 第33回日本肥満学会 京都(2012年10月12日、招待講演)

4) Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the intestinal immunoregulation IEIIS2012 Satellite Symposium Infection, Inflammation, and Immunity、東京(2012年10月12日、招待講演)

5) Jun Kunisawa Lipids, vitamins, and nucleotides in the development and control of intestinal immune diseases Asia-Pacific Topic Conference、東京(2012年11月3日、招待講演)

6) 國澤 純 粘膜ワクチンの現状と今後に向けた新展開 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜(2012年11月18日、招待講演)

7) 國澤 純 腸内環境免疫ネットワークを介した免疫制御とアジュバント開発への展開 第6回次世代アジュバント研究会 大阪(2013年1月16日、招待講演)

8) 國澤 純 粘膜免疫のユニーク性と創薬への新展開 新適塾「未来創薬への誘い」第21回 大阪(2013年1月25日、招待講演)

9) 國澤 純 粘膜免疫の視点で見る微生物感染と共生 第28回奈良県感染症研究会 奈良(2013年2月2日、招待講演)

10) 國澤 純 粘膜組織における生体防御システムとしての上皮バリアと免疫制御

日本薬学会第 133 年会 横浜 (2013 年 3 月 28 日、招待講演)

11) 國澤 純 腸管免疫における脂質ネットワークを標的とした創薬戦略 日本薬学会第 133 年会 横浜 (2013 年 3 月 30 日、招待講演)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

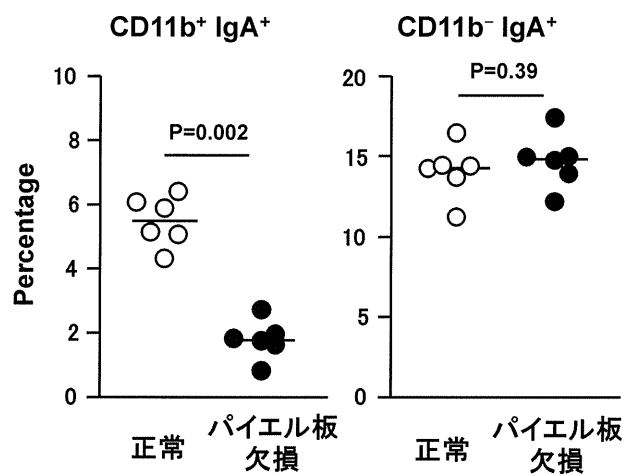


図1 胎生14.5日目に抗IL-7受容体阻害抗体を投与することでパイエル板を欠損させたマウス（●）とコントロール抗体を投与したマウス（○）の腸管から単核球を回収し、CD11bとIgAでFACS解析したところ、パイエル板欠損マウスでCD11b陽性IgA細胞の選択的な減少が認められた。