

研究課題名	葛根湯の併用による経口免疫寛容の治療効率の向上及びその機序の解明
フリガナ	ヤマモト タケシ
代表者名	山本 武
所属機関（機関名） （役職名）	富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学 助教
本助成金による 発表論文，学会発表	<ol style="list-style-type: none"> 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 2017, 6, 16-18, 東京. 長田夕佳, <u>山本 武</u>, 門脇 真：食物アレルギー病態モデルに対する葛根湯と経口免疫療法併用療法によるレチノイン酸代謝酵素抑制を介した制御性 T 細胞の誘導. 第 34 回和漢医薬学会学術大会, 2017, 8, 26-27, 福岡. <u>山本 武</u>, 長田夕佳, 林美智慧, 苟巧, 門脇 真：経口免疫療法と葛根湯の併用療法による食物アレルギーの治療効果増加の機序の検討.

研究結果要約

食物アレルギーは患者数が増加しているにもかかわらず、未だ有効な治療法がない疾患である。近年、経口免疫療法は食物アレルギーを根本的に治癒する可能性がある治療法として考えられる様になってきた。しかし、経口免疫療法は、原因抗原の経口摂取により行なわれるため重篤な副作用を誘発する場合があること、長期の治療期間にもかかわらず治療成績は十分には高くないことなどから一般診療に推奨されていない。申請者らは、漢方薬がアレルギー疾患の治療に頻用されていることから、経口免疫療法による食物アレルギーの治療に漢方薬を併用することが経口免疫療法を安全にかつ効率的に行うために有効ではないかと考えた。そこで、食物アレルギーの発症を予防的に抑制すること明らかにしている葛根湯を経口免疫療法と併用し、その効果を明らかにするとともに治療機序を検討した。食物アレルギー病態モデルに臨床研究で行われている経口免疫療法と同様の経口免疫療法を行う経口免疫療法モデルを作製し、葛根湯の併用効果について検討した。葛根湯の併用は食物アレルギーの治療効率を増加し、その治療機序には腸管の制御性 T 細胞の増加が関与することを明らかにした。さらに、制御性 T 細胞の誘導には腸管粘膜のレチノイン酸量の増加が関与することを明らかにした。本研究は、食物アレルギーの治療への経口免疫療法と葛根湯の併用の有効性を示し、安全で効率的な治療法の確立の可能性を示唆した。

研究目的

わが国において食物アレルギーの患者数は増加しているとされているが、食物アレルギーは未だ有効な治療法がない疾患である。食物アレルギーの治療は、現状では原因抗原を除去する除去療法及び発症した症状を抑制する薬物による対症療法のみであり¹⁾、根本的治癒に至る治療法の開発が強く望まれている。現在、経口免疫療法は食物アレルギーを根本的に治癒する可能性がある治療法として一部の医療機関において臨床研究が行なわれている。しかし、経口免疫療法は重篤な副作用を誘発する可能性があることや長期の治療にもかかわらず治療成績が十分には高くないために一般診療として推奨されていない。しかし、現状では経口免疫療法は食物アレルギーに対する唯一の根本的治癒に至る可能性がある治療法として期待されている。

複合薬物である漢方薬は複数の治療標的に作用することにより、生体の調節機構（神経系、免疫系、内分泌系等）の病的なバランスの偏りを改善することを目的にしているものが多く、アレルギー疾患の治療にも頻用されている。申請者らは、これまでに食物アレルギー病態モデルマウスを用いて治療薬の検討を行い、漢方薬の葛根湯が食物アレルギーの発症を予防的に抑制することを明らかにしている²⁾。さらに、葛根湯が制御性 T 細胞の誘導作用など複数の免疫学的機序を介し効果を示すことを明らかにしている³⁾。

そこで本研究では、食物アレルギーを根本的に治癒する可能性がある経口免疫療法を安全にかつ効率的に行うために、食物アレルギー病態モデルマウスに対して臨床研究で行われている経口免疫療法と同様の処置を行う経口免疫療法モデルを作製し、葛根湯併用の有効性と治療機序の検討を行い、食物アレルギーの治療を安全にかつ効率的に行う筋道を確立することを目的とする。

研究計画及び研究手法

経口免疫療法と葛根湯の効果を検討するために、抗原摂取によりアレルギー性消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルを作製し、その食物アレルギー病態モデルに対して臨床研究と同様に経口免疫療法を行い、経口免疫療法モデルを作製した。さらに、これらのモデルに対して葛根湯の併用投与を行い食物アレルギーに対する治療効果の検討を行った。

I 食物アレルギー病態モデルの作製

水酸化アルミニウムゲルをアジュバントとして卵白アルブミン（OVA）による全身感作（100 µg/マウス）を2週間おきに2回行い、その2週間後から1日おきに6～7回のOVAの経口投与（50 mg/マウス）を行い、アレルギー性消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルを作製した。

II 短期経口免疫療法モデルの作製

食物アレルギー病態モデルに対しOVAを経口投与し消化器症状発症を確認（経口負荷試験）後、経口免疫療法として臨床での応用を踏まえて加熱処理したOVAを1日1回、微量から増量しながら経

口投与 (0.5-20 mg) した。OVA 投与終了後、経口負荷試験と同様に OVA を投与し、経口免疫療法による食物アレルギー症状の改善効果を検討した。

Ⅲ 葛根湯の併用効果の検討

経口免疫療法の加熱 OVA 投与 1 時間前に葛根湯 (500 mg/kg) の経口投与を行い、葛根湯併用投与の有無による治療効果の検討を行った。

Ⅳ 長期経口免疫療法モデルとの葛根湯の併用

上記の経口免疫療法において治療効果が得られた用量の加熱 OVA を連続投与し、耐性獲得の有無を検討する予定であったが、臨床研究での重大な事故報告があったことや葛根湯併用で治療効率が増加したことから、経口免疫療法として OVA を長期間投与する検討を行う前に、経口免疫療法後に葛根湯のみを長期間に投与する検討を行った。

以上の各病態モデルマウスについて治療機序の検討として、これまでの臨床報告から推察される機序や申請者が葛根湯によるアレルギー症状発症抑制効果として明らかにした腸管粘膜免疫系への効果を中心に下記の検討を行った。

(1) 結腸及び脾臓の免疫バランスの検討

摘出した各組織から RNA を抽出しリアルタイム PCR により各 mRNA 発現量を測定し、治療機序の検討を行った。

(2) 免疫細胞に対する作用の検討

制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺制御性 T 細胞) について、フローサイトメトリーにより結腸、脾臓、末梢血中の割合を解析した。また、粘膜型マスト細胞 (c-kit⁺FcεRI⁺マスト細胞) についても同様に結腸中の割合を解析し、また免疫組織化学法により組織内分布を解析した。さらに、血漿中 mMCP-1 (mouse mast cell protease 1) 量を測定し脱顆粒を検討した。

(3) イムノグロブリン抗体価に対する効果の検討

血漿中各イムノグロブリン抗体価 (IgE 抗体価、IgG1 抗体価) を ELISA 法により測定した。

結果と考察

効率的で安全な経口免疫療法の検討を行うために、抗原摂取によりアレルギー性消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスを用いて経口免疫療法モデルの作製を行った。臨床研究で行われている加熱処理もしくは未処理の原因抗原を 1 回ごとに微量から漸増させて投与する経口免疫療法について検討を行うために、食物アレルギー病態モデルマウスに対して、加熱処理または未処理の原因抗原 (OVA) を用いて投与量と投与期間の検討を行った。加熱未処理の OVA 投与は少量でもアレルギー性消化器症状が誘発され漸増させた投与を行えなかった。一方、加熱処理 OVA 投

与では症状が誘発されず、投与量を漸増させた投与が可能であった。そこで、次に加熱処理 OVA を用いて投与量と投与期間の検討を行った。加熱処理 OVA 投与量を 0.5 mg から 20.0 mg に漸増させた 8 日間の処置は、食物アレルギー病態モデルマウスの約 30%においてアレルギー性消化器症状を改善した。そこで本研究では、この加熱処理 OVA を 8 日間漸増させながら投与するプロトコルを経口免疫療法とした。

申請者らはこれまでに葛根湯の投与によりアレルギー症状の発症を予防することを明らかにしている²⁾。そこで、次に食物アレルギー発症後にも葛根湯が有効か検討を行った。食物アレルギーの発症を抑制した量の葛根湯 500 mg/kg を経口免疫療法と同じ 8 日間投与した。しかし、アレルギー一症状発症後の葛根湯の投与は、食物アレルギー病態モデルマウスに治療効果を示さなかった。

申請者らはこれまでに葛根湯による食物アレルギー発症予防効果の機序には、腸管での制御性 T 細胞の誘導が関与することを明らかにしている³⁾。経口免疫寛容の確立や経口免疫療法の治療機序として、制御性 T 細胞が関与することが報告されていることから、単独では治療効果を示さないが制御性 T 細胞を誘導する作用を持つ葛根湯を併用することで、経口免疫療法の治療効率や安全性を増加させることが出来るのではないかと考え、葛根湯と経口免疫療法の併用療法を検討した。食物アレルギー病態モデルマウスを用いて、未治療群、加熱処理 OVA を投与した経口免疫療法群 (OIT 群)、加熱処理 OVA 投与と共に葛根湯を経口投与した葛根湯と経口免疫療法の併用療法群 (OIT+葛根湯群) を作製した。未治療群では、8 日後にはほぼすべてのマウスがアレルギー性消化器症状を発症した。一方、OIT 群では治療後症状発症率が 55.7%に有意に低下し、葛根湯を併用投与した OIT+葛根湯群では症状発症率が 33.4%に有意にさらに低下し、治療効率が増加した (図 1)。

経口免疫療法の臨床研究では、血漿中抗原特異的 IgG4 抗体価の増加や抗原特異的 IgE 抗体価の減少が治療機序のひとつであることが報告されており、抗原特異的 IgG4 は抗原特異的 IgE と競合することで治療効果が示されると推察されている。そこで、各群の病態モデルマウス血漿を採取し、抗原特異的 IgG1 (ヒト IgG4 に相当すると考えられている) と抗原特異的 IgE の抗体価を ELISA により測定した。しかし、各治療によってこれらイムノグロブリンの抗体価は変化しなかった。

次に、脱顆粒によりアレルギー症状を誘発する食物アレルギーのエフェクター細胞である粘膜型マスト細胞について検討を行った。血漿中 mMCP-1 量を測定し粘膜型マスト細胞の脱顆粒を検討した。血漿中 mMCP-1 量は、未治療群と OIT 群に対し OIT+葛根湯群では有意に低値であった。一方、腸管の粘膜型マスト細胞数は、フローサイトメトリーや免疫組織化学法により解析した結果、未治療群と比較し OIT 群や OIT+葛根湯群で増多していた。分布する細胞数が多いにもかかわらず血漿中 mMCP-1 量が低下していることから、経口免疫療法と葛根湯の併用療法により粘膜型

マスト細胞の脱顆粒が抑制されたことが明らかになった。従って、経口免疫療法と葛根湯の併用療法では血漿中イムノグロブリンの抗体価に影響しない粘膜型マスト細胞の脱顆粒の抑制機構があることが示唆された。

食物アレルギーの発症には腸管の腸管粘膜免疫系が関与していることが報告されている⁴⁾。我々も、食物アレルギー病態モデルでの検討により、腸管粘膜免疫系の重要性を明らかにしている。そこで、腸管粘膜免疫系について治療効果の検討を行った。各群のマウス腸管から RNA を抽出し、リアルタイム PCR により Th2 サイトカイン (IL-4、IL-13) mRNA の発現量を測定した。IL-4 と IL-13 の mRNA 発現量は、未治療群に対し OIT 群で有意に低く OIT+葛根湯群で有意にさらに低かった。従って、腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答の過剰な亢進が治療により改善したことが明らかになった。

申請者らはこれまでに葛根湯が腸管粘膜に制御性 T 細胞を誘導する作用を示すことを報告している³⁾。そこで、葛根湯併用による治療効率の増加や腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答の抑制に、制御性 T 細胞の誘導が関与するか検討を行った。各群のマウス腸管から腸管粘膜層の細胞を分取し、フローサイトメーターにより制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺T 細胞) の割合を測定した。

CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の割合は、未治療群に対し OIT 群では有意に高く、OIT+葛根湯群では有意にさらに高かった (図 2)。従って、腸管粘膜に制御性 T 細胞が増加していることが明らかになり、制御性 T 細胞の免疫抑制作用により腸管粘膜免疫系の Th2 型免疫応答が抑制されて治療効果が示されたことが示唆された⁵⁾。また、OIT+葛根湯群ではレチノイン酸の代謝関連遺伝子の発現量が変化していたことから、腸管での制御性 T 細胞の増加にはレチノイン酸量の増加が関与することが示唆された。

臨床研究において経口免疫療法による長期間治療を行ったにもかかわらず、抗原投与の中止後にまた症状を発症する減感作状態や短期的な耐性状態の症例が報告されている。従って、葛根湯と経口免疫療法の併用により治療した病態モデルマウスが、抗原投与中止後に長期に症状の発症が抑制されている状態 (経口免疫寛容の確立) か検討するため、抗原除去した状態で飼育し長期間経過を検討中である。抗原除去 3 週間で OIT 群では多くのマウスが再び症状を発症したが、OIT+葛根湯群では約 40%が症状を発症しなかった。従って、これら葛根湯と経口免疫療法の併用療法を行った病態モデルマウスの一部に、経口免疫寛容の確立がなされたことが示唆された。

また、葛根湯と経口免疫療法の併用療法でも発症を完全に治療していないため、治療効率を増加させる目的で経口免疫療法終了後、長期の葛根湯投与の効果を検討中である。

初期の目的として、経口免疫療法に葛根湯を併用することにより治療効率を増加させ、臨床応用への筋道を作ることに成功し、葛根湯を併用した経口免疫療法として臨床研究へと進んでいる。ま

た、治療効率のさらなる増加や治療効果の維持（経口免疫寛容の確立）を目的として併用療法の方法の検討や長期治療の効果を検討中である。本研究結果の一部は、第 66 回日本アレルギー学会学術大会と第 34 回和漢医薬学会で学術大会発表し、経口免疫療法後 3 週間抗原除去した検討結果を第 67 回日本アレルギー学会学術大会に発表予定である。

今後の研究活動について

本研究により、葛根湯と経口免疫療法の併用が経口免疫療法の治療効率を増加させることを明らかにしたが、この併用療法によっても食物アレルギーの治療効率が 65%程度であることから十分であるとは言えない。従って、さらに治療効率を増加させる併用療法の検討が必要である。

また、食物アレルギーの治療後の状態として経口免疫寛容の確立（根本的な治癒、Tolerance）、持続的な耐性の確立（Sustained unresponsiveness もしくは Remission）、脱感作状態（Desensitization）等が報告されている⁶⁾。このなかでも根本的に治癒したと考えられる経口免疫寛容の確立した状態に誘導することが重要である。葛根湯と経口免疫療法の併用療法により治療効果があったマウスでのアレルギー症状の改善が、経口免疫寛容の確立もしくは持続的な耐性の確立を誘導したのか、一時的な脱感作状態を誘導したのかは明らかになっていない。従って、今後これらの観点から長期間の治療効果の検討を行いその詳細な治療機序を明らかにすることも必要となってくる。

以上の様に、葛根湯併用によりさらに治療効率を増加させる治療法の検討を行うとともに、長期間の検討を行うことにより併用療法による治療状態を明らかにする。また、長期間の併用療法の検討を行うことにより、経口免疫寛容の確立を誘導させる治療法やその治療機序の検討を行い、臨床への応用に筋道を立てる研究を行う予定である。

参考文献

- 1) 海老澤元宏, 伊藤浩明, 藤澤隆夫. 食物アレルギー診療ガイドライン 2016. 日本小児アレルギー学会
- 2) Yamamoto T, Fujiwara K, Yoshida M, Kageyama-Yahara N, Kuramoto H, Shibahara N, Kadowaki M. Therapeutic effect of kakkonto in a mouse model of food allergy with gastrointestinal symptoms. *Int Arch Allergy Immunol.* 2009;148(3):175-85.
- 3) Yamamoto T, Fujiwara K, Tsubota Y, Kageyama-Yahara N, Hayashi S, Kadowaki M. Induction of Regulatory T Cells as a Novel Mechanism Underlying the Therapeutic Action of Kakkonto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, in a Murine Food Allergy Model. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;169(3):146-56.

- 4) Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1920-5.
- 5) Nagata Y, Yamamoto T, Hayashi M, Hayashi S, Kadowaki M. Improvement of Therapeutic Efficacy of Oral Immunotherapy in Combination with Regulatory T Cell-Inducer Kakkonto in a Murine Food Allergy Model. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0170577.
- 6) Sampson HA, O'Mahony L, Burks AW, Plaut M, Lack G, Akdis CA. Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Jan;141(1):11-19.

以上