

6. 糖尿病での呼吸器免疫系異常と八味丸の改善作用の解明

清原 寛章

北里大学 北里生命科学研究所 和漢薬物学研究室

Key words : 糖尿病, 呼吸器粘膜免疫系異常, 八味丸, 煎剤

緒言

糖尿病患者では、長期にわたる高血糖状態によって様々な合併症が引き起こされることが知られている。「糖尿病との闘いは合併症との闘い」ともいわれ、特にⅡ型糖尿病の治療目標は、合併症の予防にあると言っても過言ではない。糖尿病の三大合併症としては糖尿病性腎症、網膜症、糖尿病性神経障害などがよく知られている。一方、糖尿病患者では感染症の罹患率が高いことや重症化例の多いことも臨床現場で重要課題となっている。このため、糖尿病患者での感染症が高齢化社会を反映して特に重要な合併症として位置付けられており、ワクチン接種以外の予防的な手段の探索は重要な課題となっている¹⁾。

糖尿病の合併症の症状改善を目的に、漢方医学的治療が補助療法として併用されており、八味丸や清心蓮子飲、牛車腎気丸や温清飲、桂枝茯苓丸が糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、その他瘀血（微小循環障害）病態の改善に主として用いられている²⁾。しかしながら、高血糖病態での易感染性の改善に対するこれらの漢方薬の作用についてはまったく検討をされてきていない。そこで本研究では、高血糖病態で起こる呼吸器粘膜免疫系異常を明らかにするとともに、糖尿病患者に頻用される八味丸煎剤の作用について解析を行った。

方法および結果

1. 呼吸器局所粘膜における抗体価の変化からの検討

雄性 C57BL6J マウス (8 週齢) に STZ (150 mg/kg) を単回腹腔内投与した結果、投与 1 日後には平均血糖値が 500 mg/dL を超え、体重の増加も抑制されていた。マウス身体機能を一定期間高血糖状態に晒すため、STZ 投与 10 日後までは八味丸煎剤の投与は行わず、11 日目以降から八味丸煎剤 (1 g/kg/day) の注射用水溶液を連日 40 日間経口投与した。Control マウスには八味丸煎剤の代わりに注射用水を投与し、Normal 群には STZ の代わりに生理食塩水を腹腔内投与および注射用水を経口投与した。STZ 投与 50 日目の鼻腔洗液 (NLF) および気管支肺胞洗浄液 (BALF) について総 IgA および総 IgG 抗体価を測定した結果、Control 群では Normal 群と比較し総 IgA および総 IgG 抗体価は有意に増加していた (Fig. 1)。

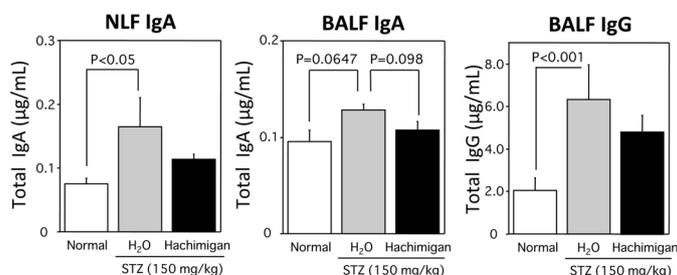


Fig. 1. Effect of Hachimigan (1 g/kg/day) on total IgA/ IgG titers in local mucosa of C57BL/6J mice treated with Streptozotocin (STZ; 150 mg/kg/day)

Mean ± SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

一方、八味丸煎剤投与群では気管支肺胞洗浄液総 IgA 抗体価で改善傾向が観察されたが (Fig. 1)、鼻腔洗液総 IgA 抗体価や気管支肺胞洗浄液総 IgG 抗体価では改善されている可能性が考えられたが有意差は認められなかった (Fig. 1)。

2. 肺での免疫関連因子 mRNA 発現からの解析

2-1. サイトカイン発現の変化の解析

高血糖病態では終末糖化産物 (advanced glycation end product, AGE) に対する受容体の RAGE や Angiotensin II 受容体の AT1a の刺激により低レベルの慢性炎症が誘導されることが報告されている³⁾。そこでまず炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および IFN- γ) の mRNA 発現変化の検討を行った結果、予想に反し本高血糖モデルマウスの肺組織では TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の大きな発現変化は認められず、IFN- γ のみの有意な発現低下が観察された (Fig. 2)。これに対し、八味丸煎剤の投与群では逆に TNF- α mRNA では発現の有意な上昇が認められ、IL-6 mRNA では有意な発現低下が、また IFN- γ では上昇する可能性はあるものの有意な変化は認められなかった (Fig. 2)。

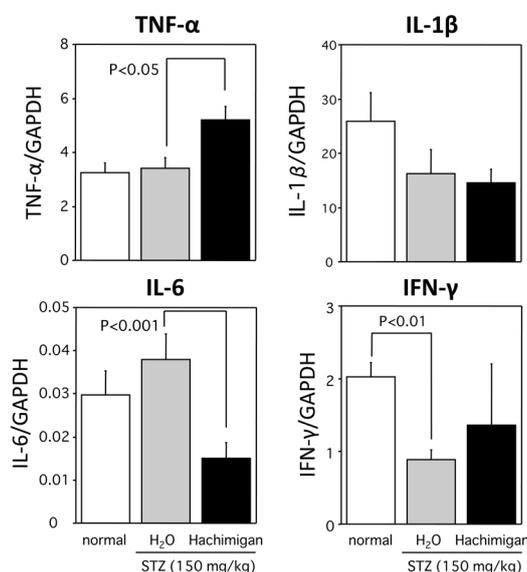


Fig. 2. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expressions of pro-inflammatory cytokine in lung from C57BL/6J treated with streptozotocin (STZ; 150mg/kg)

Mean \pm SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

2-2. 免疫細胞の変化の解析

マクロファージマーカー (F4/80) の mRNA 発現については高血糖病態で顕著に低下していたが、八味丸煎剤の投与でさらなる変化は認められなかった (Fig. 3)。一方、好中球などの顆粒球マーカー (Gr-1) の発現では高血糖病態で増加傾向が示され、八味丸煎剤投与では有意差は認められなかったものの抑制されている可能性が考えられた (Fig. 3)。単球や顆粒球のホーミングに参与するケモカインの発現変化についても検討したところ、好中球などの遊走に参与する 2 種のケモカイン (MIP-2 および KC) で高血糖病態で MIP-2 は有意な上昇を示し、八味丸煎剤の投与で有意な発現低下が観察された (Fig. 3)。

T リンパ球マーカー (CD3e) の発現は高血糖病態下で有意に低下し、八味丸煎剤の投与による改善は観察されなかった (Fig. 4)。さらに、T リンパ球サブセットの変化についてマーカー転写因子の発現変化から検討した結果、高血糖病態で GATA3(Th2)/ T-bet(Th1)比は有意に上昇したが、八味丸煎剤の投与で Th1 側へ有意に配向が変化していた (Fig. 5)。一方、制御性 T リンパ球のマーカー転写因子 (Foxp3) mRNA 発現は、高血糖病態では変化していなかったが、八味丸煎剤の投与で上昇傾向が認められた (Fig. 5)。

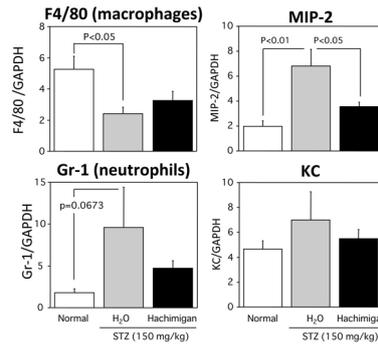


Fig. 3. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expression of marker molecules of macrophages/neutrophils and chemokines in lung from C57BL/6J treated with streptozotocin (STZ; 150mg/kg)

Mean \pm SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

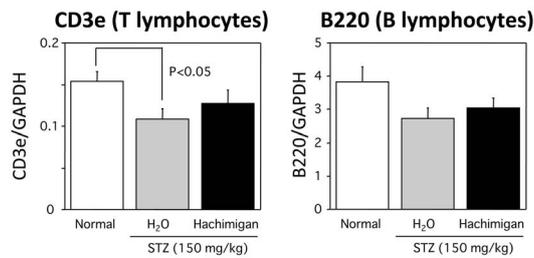


Fig. 4. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expression of marker molecules related to T and B lymphocytes in lung from C57BL/6J treated with streptozotocin (STZ;150mg/kg)

Mean \pm SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

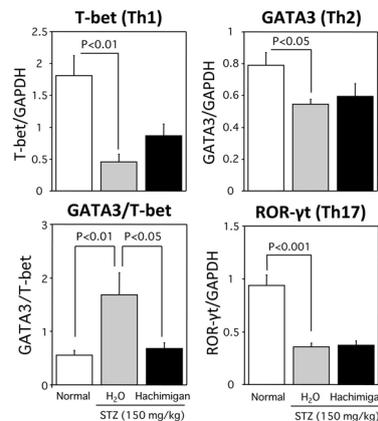


Fig. 5. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expressions of marker transcription molecules related to Th1 and Th2, Th17 cells in lung from C57BL/6J treated with streptozotocin (STZ; 150mg/kg)

Mean \pm SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

3. 脾臓での免疫関連因子 mRNA 発現からの解析

高血糖病態ではレニン・アンジオテンシン系が活性化され、炎症性ペプチドの angiotensin II の産生が増加し、その受容体 (AT1a) を介した炎症反応が惹起される⁴⁾。肺組織での *AT1a* の発現変化では、高血糖病態で有意に変化しなかったが、八味丸煎剤の投与で予想に反し顕著な発現上昇が観察された (Fig. 6)。

近年 angiotensin II がリンパ球上の AT1a に作用することで、組織炎症が改善されるとの報告がなされた⁵⁾。そこでリンパ球に富む脾臓での *AT1a* の発現変化について検討を行った結果、高血糖病態で有意に上昇し、八味丸煎剤の投与によってさらに発現増強していた (Fig. 6)。さらに T リンパ球のサブセットでは八味丸煎剤投与で *T-bet* (Th1)、*ROR-γt* (Th17) および *Foxp3* (Treg) の mRNA 発現が有意に回復し (Fig. 7)、加えて、*c-Maf* (Tr-1) の mRNA 発現も八味丸煎剤の投与によって増加傾向を示した。

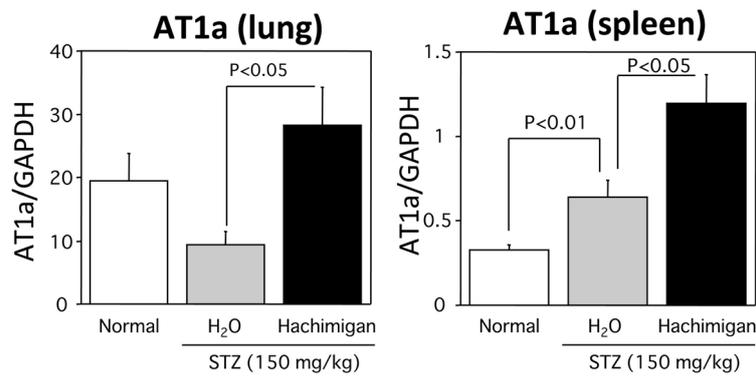


Fig. 6. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expressions of angiotensin II receptor (AT1a) in lung and spleen from C57BL/6J treated with STZ (150mg/kg)

Mean ± SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

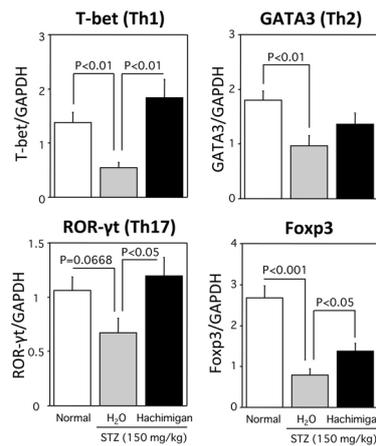


Fig. 7. Effect of oral administration of Hachimigan (1 g/kg/day) on mRNA expressions of marker transcription molecules related to Th1, Th2, Th17 and regulatory T lymphocytes in spleen from C57BL/6J treated with streptozotocin (STZ; 150mg/kg)

Mean ± SE (n=8), Statistical differences between groups were analyzed by Scheffe method.

考 察

高血糖に伴い、複雑な肺粘膜免疫系での異常が起こっていることが本研究により明らかとなった。高血糖モデルマウスへの八味丸煎剤の投与では、一部の抗体産生の異常亢進が改善されるとともに、好中球の肺への集積の改善や Th1 配向への切り替え、Foxp3 陽性の制御性 T リンパ球の誘導が起こることが推定された。加えて、近年、炎症の制御に関与することが示唆されてきているリンパ球上の AT1a 受容体⁵⁾の煎剤投与による発現増強の可能性が示され、今後、AT1a の発現変化の意義についての解析が、八味丸の高血糖に伴う呼吸器粘膜免疫異常に対する有用性の解明に繋がると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は北里大学北里生命科学研究所創薬科学部門の永井隆之および同大学東洋医学総合研究所研究部門の及川哲郎である。

文 献

- 1) 宮川 高一：糖尿病と感染症. 糖尿病学 基礎と臨床, 門脇 孝, 石橋 俊, 佐倉 宏, 戸邊 一之, 野田 光彦 編, 西村書店, 東京, pp 1226-1229, 2006.
- 2) 花輪 壽彦：代謝・内分泌・免疫疾患の漢方治療. 漢方診療レッスン, 金原出版, 東京, pp 128-141, 1995.
- 3) Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos A.N., Grune T, Simmb A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling, Redox Biol. 2014;2:411-29. PMID:24624331. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.016.
- 4) Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling, Braz. J. Med. Biol. Res. 2002;35(9):1001-15. PMID:12219172.
- 5) Zhang JD, Patel MB, Song YS, Griffiths R, Burchette J, Ruiz P, Sparks MA, Yan M, Howell DN, Gomez JA, Spurney RF, Wilson CB, Coffman TM, Crowley SD. A novel role for type 1 angiotensin receptors on T lymphocytes to limit target organ damage in hypertension. Circ. Res. 2012;110(12):1604-17. PMID:22534490. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261768.