

101. 和漢薬を応用した炎症性腸疾患に対する新規治療薬探索

林 周作

富山大学 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野

Key words : 炎症性腸疾患, 腸管マクロファージ, IL-10, 伝統薬物

緒 言

クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患 (IBD) は、病因不明の慢性炎症疾患であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。絶えず腸内細菌や食事抗原などの外界と接している腸管粘膜では“寛容と排除”という両極端の反応を支配する腸管粘膜免疫システムが高度に発達している。IBD には腸管粘膜免疫システムの異常が関与していると考えられているが、その全貌は明らかにされていない。また既存の治療法では十分な病態改善に至らないことも多く、IBD の発症および病態形成機構の解明ならびに新規で有用な治療薬の創出が求められている。我々は、腸管粘膜に存在する腸管マクロファージに着目し研究を行う過程において、抗炎症性サイトカインである IL-10 を高産生する腸管マクロファージは IBD 病態を改善することを明らかにし、腸管マクロファージにおける IL-10 の産生を亢進させることは IBD に対する新たな治療戦略として有用である可能性を示してきた。そこで本研究では、伝統薬物である和漢薬や天然薬物を創薬リソースとして活用し、腸管マクロファージの IL-10 産生亢進を介した IBD に対する新規治療薬の探索を試みた。

方 法

1. 骨髄細胞由来マクロファージの作製

骨髄細胞由来マクロファージ (BMDM) は、BALB/c マウス (4-6 週令) の頸骨および大腿骨から採取した骨髄細胞を macrophage colony-stimulating factor (100 ng/ml) 存在下で 7 日間培養し作製した。BMDM (5×10^5 cells) に対して LPS (100 ng/ml) 刺激を行い、24 時間培養後、培養上清中の IL-10 タンパク質レベルを測定した。生薬エキス (10 μ g/ml) または生薬由来化合物 (10 μ M) は LPS 刺激 1 時間前に添加した。培養上清中の IL-10 タンパク質濃度は Cytometric Beads Array Kit を用いて測定した。

2. 実験的大腸炎モデルの作製

実験的大腸炎は、炎症惹起物質デキストラン硫酸ナトリウム (DSS; 36-50 kDa) の 3% 水溶液を BALB/c マウス (8-10 週令) に 7 日間飲水投与し作製した。体重、糞便の固さおよび下血の程度を毎日測定し、大腸炎症状は下痢および下血をスコア化し、その和を disease activity index として評価した¹⁾。BMDM の移入は、DSS 飲水開始 2 日前および 1 日後に腹腔内投与にて行った。また、抗 IL-10 抗体は DSS 飲水開始 2 時間前および 1 日おきに腹腔内投与した。

3. 腸管マクロファージの単離

マウス大腸組織を 0.5 mM EDTA 溶液で攪拌し、粘膜上皮層を剥離後、コラゲナーゼを用いて細胞を分散させた。コラゲナーゼ処理により得られた細胞を 40/75% パーコール溶液で遠心分離し、密度勾配法による細胞精製を行った。中間層に存在する細胞を腸管粘膜固有層単核細胞とし、磁気細胞分離法を用いて CD11b 陽性細胞を分離し、腸管マクロファージとして用いた。腸管マクロファージ (2×10^5 cells) に対して LPS (100 ng/ml) 刺激を行い、24 時間培養後、培養上清中の IL-10 タンパク質レベルを測定した。生薬エキス (10 μ g/ml) は LPS 刺激 1 時間前に添加した。

結 果

1. 実験的大腸炎の発症に対する IL-10 を高産生するマクロファージの効果

我々は、これまでに脂質キナーゼである PI3K p85 α を欠損したマウスではマクロファージの IL-10 産生能が WT マウスに比べ上昇していることを見出している。IL-10 を高産生するマクロファージが実験的大腸炎の病態を改善するかを解析するため、WT または PI3K p85 α 欠損 (p85 $\alpha^{+/-}$) マウスから作製した BMDM を WT マウスに移入し、DSS 誘起大腸炎モデルを作製した。両遺伝子型から作製した BMDM は、移入 2 日後には腸管粘膜に同程度局在していた (WT BMDM; $4.2 \pm 0.2\%$, p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM; $4.6 \pm 0.3\%$)。p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM の WT マウスへの移入は、DSS 飲水による体重減少および大腸炎症状スコアの上昇を有意に抑制した (図 1A、B)。一方、WT BMDM の移入は、DSS 飲水による体重減少および大腸炎症状スコアの上昇に対して影響を与えなかった。組織学的検討から p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM の移入は、腸管粘膜における病理学的異常を WT BMDM の移入に比べ改善することが示された (図 1C、D)。また、p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM を移入した大腸炎マウスの大腸組織における IL-10 の mRNA 発現は、WT BMDM を移入した大腸炎マウスと比較し有意に高かった (図 1E)。さらに、p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM の移入による大腸炎の改善効果は、抗 IL-10 抗体の投与によって有意に抑制された (図 1F、G)。これらの結果は、IL-10 を高産生する p85 $\alpha^{+/-}$ BMDM が DSS 誘起大腸炎の発症を抑制することを示している²⁾。

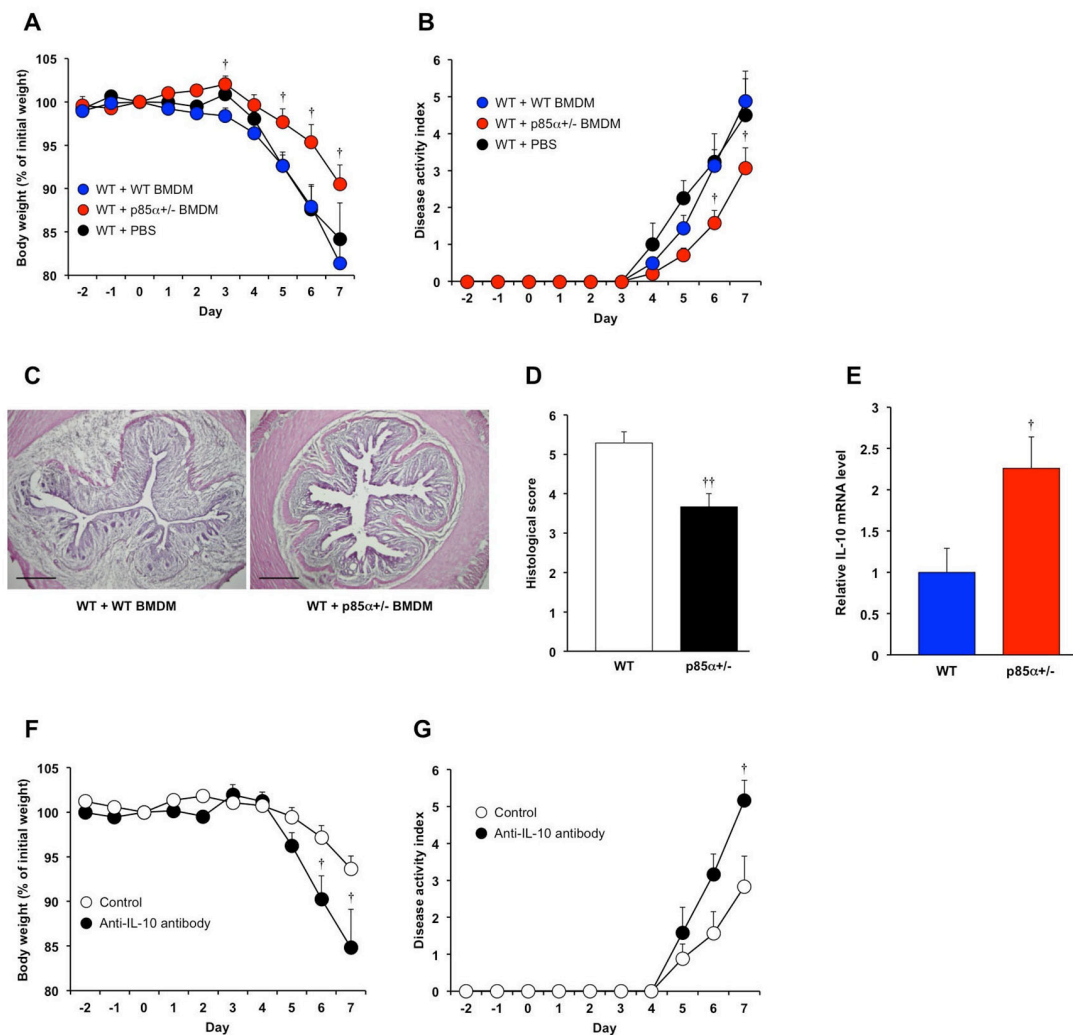


図 1. 実験的大腸炎の発症に対する IL-10 を高産生するマクロファージの効果

IL-10 を高産生する p85 α +/− BMDM の移入は、WT マウスにおける DSS 誘起大腸炎の発症を抑制する。(A) 体重変化、(B) 症状スコア、(C) 大腸炎マウスの大腸組織の病理像 (ヘマトキシリン&エオジン染色) を示す。Scale bar : 300 μ m. (D) 病理像の組織学的スコアを示す。(E) 大腸炎マウスの大腸組織における IL-10 mRNA 発現を示す。(F, G) p85 α +/− BMDM の移入による大腸炎改善作用に対する抗 IL-10 抗体の効果。(F) 体重変化および (G) 症状スコアを示す。データは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学的有意差は Student's unpaired t-test または repeated measures two-way ANOVA を行った後に Bonferroni's multiple-comparison test を用いて解析した。† p < 0.05; †† p < 0.01。

2. 腸管マクロファージの IL-10 産生を亢進させる薬物の探索

和漢医薬学総合研究所が所有する和漢薬ライブラリー (頻用されている和漢薬に含まれる生薬エキス 120 種類および生薬由来化合物 96 種類) を用い、腸管マクロファージの特徴を有する BMDM の IL-10 産生を亢進させる生薬エキスまたは生薬由来化合物の探索を行った。生薬エキス 120 種類のうち、11 種類の生薬エキスが溶媒群 (LPS 刺激のみ) と比較して BMDM の IL-10 分泌を 2 倍以上上昇させた (図 2A)。このうち、4 種類の生薬エキスは炎症性サイトカインである TNF- α の産生も上昇させた為、以降の検討には 7 種類の生薬エキスを用いた。腸管粘膜から単離した腸管マクロファージの IL-10 産生に対する 7 種類の生薬エキスの効果について解析したところ、2 種類の生薬エキスが溶媒群

(LPS 刺激のみ) と比較して腸管マクロファージの IL-10 分泌を亢進させた (図 2B)。また生薬由来化合物 96 種類のうち、3 種類の生薬由来化合物が溶媒群 (LPS 刺激のみ) と比較し BMDM の IL-10 分泌を 2 倍以上上昇させた (図 3)。

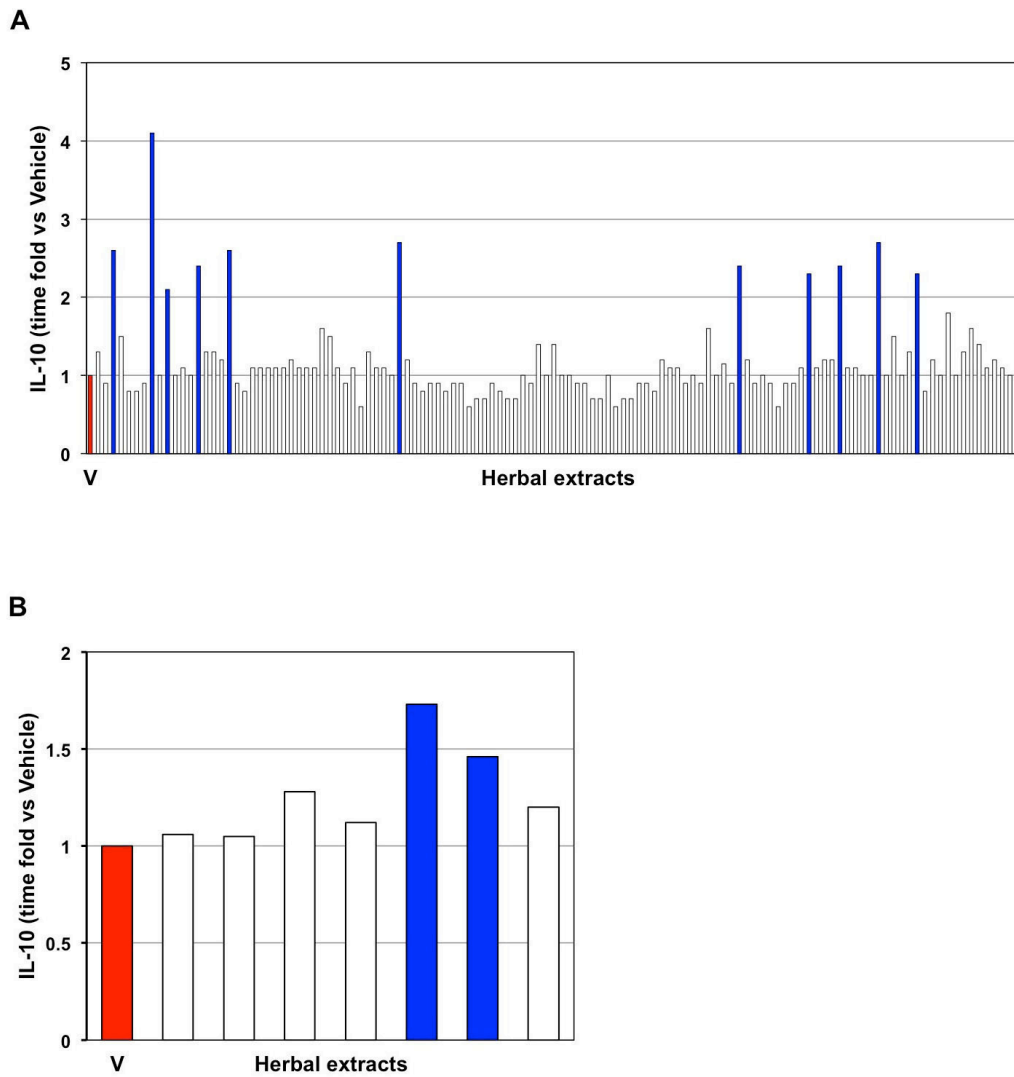


図 2. マクロファージの IL-10 分泌に対する生薬エキスの効果
 (A) 11 種類の生薬エキス (青) が BMDM の IL-10 分泌を溶媒群 (V: 赤) に比べ 2 倍以上上昇させた。(B) BMDM の IL-10 分泌を亢進した生薬エキスのうち 2 種類 (青) が腸管マクロファージの IL-10 分泌を溶媒群 (V: 赤) に比べ上昇させた。

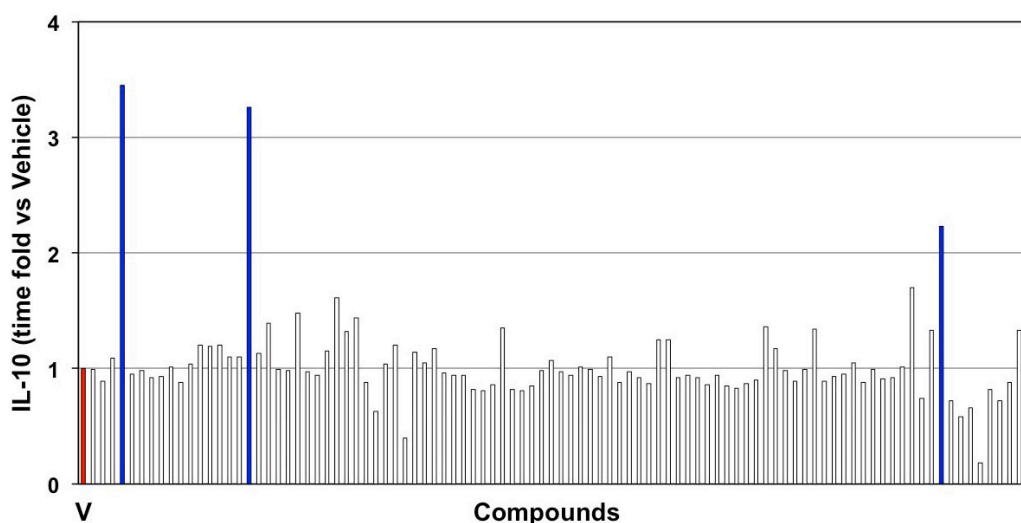


図3. マクロファージのIL-10分泌に対する生薬由来化合物の効果
3種類の生薬由来化合物(青)がBMDMのIL-10分泌を溶媒群(V:赤)に比べ2倍以上上昇させた。

考 察

IL-10は腸管の恒常性維持に極めて重要な役割を担っており、これまでにIBDとIL-10との関連性が報告されている。ゲノムワイド関連解析によって、*IL-10*遺伝子はIBDの疾患関連遺伝子として同定されており³⁾、また、IBDを超早期に発症する患者では*IL-10*受容体遺伝子の変異が認められている⁴⁾。しかし残念なことに、臨床試験においてリコンビナントIL-10の皮下投与は、IBD患者に対し無効であった。IL-10の半減期は短く、全身性の投与では炎症腸管局所に到達する前に大部分が代謝された為、IL-10の抗炎症効果が十分発揮されなかったと推察されている。すなわちIL-10の抗炎症効果を最大限発揮させる為には、作用させる場所、時期および量が重要であると考えられる。腸管マクロファージのIL-10産生を亢進させることは、炎症腸管局所において直接多量のIL-10を作用させることが可能である。故に、本研究成果から見出された腸管マクロファージのIL-10産生を亢進させる薬物は、IBDに対する新規治療薬のシード薬物となる可能性が期待できる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、富山大学和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野のDonald Zinsou および若林ののかである。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Hayashi S, Hamada T, Zaidi SF, Oshiro M, Lee J, Yamamoto T, Ishii Y, Sasahara M, Kadowaki M. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;307(10):G968-78. doi: 10.1152/ajpgi.00346.2013. PubMed PMID: 25258409.
- 2) Hayashi S, Hamada T, Zinsou DGA, Oshiro M, Itoi K, Yamamoto T, Kadowaki M. PI3K p85 α subunit-deficient macrophages protect mice from acute colitis due to the enhancement of IL-10 production. *Sci Rep.* 2017;7(1):6187. doi: 10.1038/s41598-017-06464-w. PMID: 28733636.
- 3) Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):307-17. doi: 10.1038/nature10209. PubMed PMID: 21677747.
- 4) Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2033-45. doi: 10.1056/NEJMoa0907206. PubMed PMID: 19890111.