

氏名 いぬじま あきこ
犬嶌 明子

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 富医薬博乙第 72 号

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 6 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目
漢方薬の免疫調節機能の解明とワクチンアジュバントへの応用に関する研究
(Study on immunomodulatory effects of Kampo medicine and its application for vaccine adjuvant)

論文審査委員

(主査) 教授 門脇 真
(副査) 教授 東田 千尋
(副査) 教授 柴原 直利 (紹介教員)

論文内容の要旨

漢方薬は古来人々に利用されてきた。また、周知の通り、漢方薬を構成する生薬の成分からは数多くの薬剤が開発され、現代の医療に多大な貢献をしてきた。本研究は、そのような歴史ある漢方薬や生薬、およびその成分を、現代の医療が直面する諸問題を解決するための新しいツールとして利用することを検討したものである。新規薬剤の開発には副作用の懸念が必ず付随するが、長年利用されてきた実績のある漢方薬についてはその点において既にアドバンテージがあると考えられる。本研究において特に注目したのは、漢方薬の免疫調節機能である。若年層に比べ免疫システムが脆弱な高齢者人口の割合が増加している日本において、感染症の予防は重要な課題のひとつである。また、感染症予防を目的とした従来のワクチンに加え、がんやアルツハイマー病などの疾患においても治療を目的としたワクチンの開発が進んでいる。しかし、これらのワクチンに使用される抗原は概して免疫を誘導する性質が弱く、ワクチン効果を増強するワクチンアジュバントの利用が欠かせない。一方で、これまでに我々は、漢方薬の中でも、特に十全大補湯に関して、自然免疫調節機能およびその応用に関して精力的に研究を行ってきた。

本研究では、漢方薬が免疫を調節する目的で長年利用されてきたこと、ならびに、現在、自然免疫受容体の発見を基に、自然免疫が獲得免疫を制御することが明らかになってきたことを踏まえ、第1章から第3章では漢方薬である十全大補湯のワクチンアジュバントとしての応用、およびその効果機序の解明を行った。また、第4章では、研究の過程で見出された生薬由来の免疫抑制（抗アレルギー）化合物に関して概説する。さらに、第5章では、基礎研究に留まらず、高齢者に対する臨床試験において、十全大補湯の投与がインフルエンザワクチンに及ぼすアジュバント効果に関して検討した結果を報告する。

第1章(参考文献1) マウスのがんワクチンモデルにおける十全大補湯の併用効果を検証した。本実験では卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原としてマウスに予め接種し、その後OVA発現腫瘍細胞をマウスに移植し、その増殖を調べることでOVAワクチンの効果を評価した。OVAワクチンに十全大補湯の経口投与を併用することにより、OVAワ

クチンのみの場合と比較して腫瘍細胞の増殖は有意に抑制され、マウスの生存率も増加した。この結果は十全大補湯がOVAワクチンの効果を増大させたことを示すものである。その後のメカニズムの解析により、OVA特異的IgG2a産生やIFN- γ 産生細胞の有意な増加が確認され、OVA特異的細胞傷害性T細胞（CTL）についても増加する傾向が観察された。これらの結果は、十全大補湯の経口投与をがんワクチン療法におけるアジュバントとして利用する可能性を示すものである。

第2章（参考文献2） 第1章において十全大補湯のワクチンアジュバント効果が確認されたことを受け、その機序を解明するため、十全大補湯の構成生薬のひとつである生薬「芍薬」由来成分1,2,3,4,6 penta-O-galloyl- β -D-glucose（PGG）の樹状細胞に対する作用について検討した。樹状細胞は免疫システムの要であり、樹状細胞によるクロスプレゼンテーションは抗がん免疫において主要な働きを示す抗原特異的CTLの活性化につながる重要なプロセスである。そこで、本実験では樹状細胞によるクロスプレゼンテーションに対するPGGの効果を検討した。その結果、PGGの添加によりモデル抗原であるOVAの樹状細胞への貪食は促進され、クロスプレゼンテーションの増加が確認された。これは、PGGががんワクチンのアジュバントの候補となる可能性を示すものである。また、第1章で観察された十全大補湯のがんワクチンアジュバント効果の要因のひとつとして、PGGの関与が示唆される結果であった。

第3章（参考文献3） 第2章で観察された樹状細胞の貪食促進効果を受け、がん免疫療法において抗がん免疫を増強するために開発されている樹状細胞への遺伝子導入において、PGGの併用による効果を検討した。本実験では、変異型green fluorescent proteinタンパク質（EGFP）をコードしたDNAプラスミドを樹状細胞へリポフェクションし、PGG併用がEGFPの発現に及ぼす効果を調べた。その結果、PGGはEGFPの発現を増加することが明らかとなった。この結果はPGGを樹状細胞への遺伝子導入促進剤として利用する可能性を示すものである。

第4章（参考文献4） 免疫応答を調節する漢方薬の機能のひとつとして、牡丹皮の水抽出物の抗アレルギー作用について検討した。その結果、牡丹皮の水抽出エキスの一部の分画（MCA）に、マスト細胞の脱顆粒を抑制する効果があることが明らかになった。また、マウスの化合物48/80誘導性掻き動作の観察では、MCA塗布により掻き動作が有意に減少した。現在主に使用されているワクチンアジュバントであるアルミニウム塩は、アレルギーの原因となるIgEも誘導して副作用を発現させることが知られている。本実験により得られた結果は、牡丹皮の水抽出物を、ワクチンやアジュバントの副作用を軽減する、あるいは、アレルギー性疾患に対する内服薬あるいは外用製剤として利用する可能性を示すものである。

第5章（参考文献5） 高齢者に対するインフルエンザワクチン接種に十全大補湯の経口投与を併用した効果について、ヒトにおける無作為化比較試験を実施し検討した。その結果、十全大補湯の投与により接種後4週から24週の長期間にわたり、A/Victoria/210/2009型抗原ワクチンに対する抗体価が高い傾向が持続した。このことは、十全大補湯が高齢者のインフルエンザワクチン接種に対し、アジュバント効果をもつことを示したものと考えられた。加齢に伴う免疫応答の変化により、高齢者は感染症に罹患しやすく重篤化しやすい。そのため、十全大補湯にこのような効果が観察されたことは、高齢者社会において重要な助けとなる可能性がある。

以上を総括すると、本研究により、十全大補湯にワクチンの効果を増強するアジュバントとしての活性があることが示された。さらに、臨床研究の結果、高齢者に対するインフルエンザワクチン接種に十全大補湯を併用することにより、ワクチンの効果が持続することが明らかとなった。その作用機序の解明を行った結果、十全大補湯の構成生薬のひとつである芍薬の成分PGGが、樹状細胞による抗原の貪食を促進し抗原提示を増加する機能を有することの関与が示唆された。これらの結果は、がん免疫療法や高齢者などの免疫が脆弱な人における感染症予防等、免疫機能の調節が必要な様々な局面において、漢方薬やその成分を応用することにより状況を改善する可能性を示すものである。

参考文献

1. Takeno N, Inujima A, Shinohara K, Yamada M, Shibahara N, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Immune adjuvant effect of Juzentaihoto, a Japanese traditional herbal medicine, on tumor vaccine therapy in a mouse model. *Int J Oncol.* 2015; 47: 2115–2122.
2. Inujima A, Yamada M, Takeno N, Hoshina A, Oe M, Shinohara K, Shibahara N, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Herbal plant-derived compound, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, increases cross-presentation by dendritic cells. *Traditional & Kampo Medicine.* 2015; 2: 43–49.
3. 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: 1878–1885.
4. Kee JY, Inujima A, Andoh T, Tanaka K, Li F, Kuraishi Y, Sakurai H, Shibahara N, Saiki I, Koizumi K. Inhibitory effect of Moutan Cortex aqueous fraction on mast cell-mediated allergic inflammation. *J Nat Med.* 2015; 69: 209–217.
5. Saiki I, Koizumi K, Goto H, Inujima A, Namiki T, Raimura M, Kogure T, Tatsumi T, Inoue H, Sakai S, Oka H, Fujimoto M, Hikiami H, Sakurai H, Shibahara N, Shimada Y, Origasa H. The long-term effects of a kampo medicine, juzentaihoto, on maintenance of antibody titer in elderly people after influenza vaccination. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 568074.

学位論文審査の要旨

若年層に比較して免疫システムが脆弱な高齢者人口の割合が増加している本邦において、感染症予防は重要課題の一つである。また、従来の感染症予防を目的としたワクチンの使用に加え、がんやアルツハイマー病などの疾患においても治療を目的としたワクチンの開発が進められている。しかし、これらのワクチンに使用される抗原は概して免疫を誘導する性質が弱く、ワクチン効果を増強するワクチンアジュバントの利用が不可欠である。

これまでに、自然免疫受容体の発見を機に自然免疫系が獲得免疫系を制御することが明らかになってきていること、さらに十全大補湯が漢方薬の中でも特に自然免疫系に対する高い調節機能を有していることが報告されていることから、本研究は、十全大補湯のワクチンアジュバントとしての応用、およびその効果発現機序を検討するとともに、インフルエンザワクチン接種に対する十全大補湯のアジュバント効果について高齢者を対象とした臨床研究において検討した。本研究の内容の骨子および審査結果は次の通りである。

1. がんワクチンモデルマウスにおける十全大補湯の併用効果

予め卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原としてマウスに接種し、その後OVA発現腫瘍細胞を移植してその増殖を検討することでOVAワクチンの効果を評価した。その結果、OVAワクチンに十全大補湯を併用することにより、OVAワクチンのみと比較して腫瘍細胞の増殖は有意に抑制され、マウスの生存率も上昇した。さらに、OVA特異的IgG2a産生およびIFN- γ 産生細胞が有意に増加し、抗がん免疫機構において主要な働きを示すOVA特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) も増加する傾向を示した。従って、十全大補湯をがんワクチン療法におけるアジュバントとして利用することが可能であると考えられた。

2. 芍薬由来成分1,2,3,4,6 penta-O-galloyl- β -D-glucose (PGG) の樹状細胞に対する作用

樹状細胞は免疫応答機構において要となる細胞であり、抗原特異的CTLの活性化に繋がる樹状細胞でのクロスプレゼンテーションは、抗がん免疫機構において重要なプロセスである。そこで、樹状細胞でのクロスプレゼンテーションに対するPGGの効果を検討したところ、PGGの添加によりモデル抗原であるOVAの樹状細胞による貪食が促進され、クロスプレゼンテーションが増加した。これは、十全大補湯のがんワクチンに対するアジュバント効果にPGGが関与することを示唆するとともに、PGGががんワクチン療法での有用なアジュバントとなる可能性を示すものである。

3. 樹状細胞への遺伝子導入におけるPGGの併用効果

PGGが樹状細胞において貪食促進効果を示したことから、がん免疫療法において抗がん免疫応答を増強するために開発されている樹状細胞への遺伝子導入において、PGGの併用効果を検討した。改良型緑色蛍光タンパク質 (EGFP) をコードしたDNAプラスミドを樹状細胞へリポフェクションし、PGGの併用がEGFPの発現に及ぼす影響を検討したところ、PGGを併用することによりEGFPの発現は増加した。これはPGGを樹状細胞への遺伝子導入促進剤としても利用可能であることを示唆するものである。

4. 牡丹皮の熱水抽出物の抗アレルギー作用

漢方薬の免疫調節機能の一つとして牡丹皮の水抽出物の抗アレルギー作用を検討したところ、牡

丹皮の熱水抽出エキスの一部の分画(MCA)は、マスト細胞の脱顆粒に対する抑制効果を示した。また、マウスでcompound 48/80誘導性搔破行動に対する作用を検討したところ、MCA塗布により搔破行動が有意に減少した。現在ワクチンアジュバントとして主に使用されているアルミニウム塩(アラム)はアレルギーを惹起するIgEも誘導することから、牡丹皮の熱水抽出物はワクチンやワクチンアジュバントによるアレルギー症状などの副作用を軽減するために利用出来る可能性がある。

5. 高齢者のインフルエンザワクチン接種における十全大補湯の併用効果

インフルエンザワクチン接種に対する十全大補湯の併用効果について、高齢者を対象とした無作為化比較試験により検討したところ、十全大補湯併用によりインフルエンザワクチン接種後4週から24週の長期間にわたり、A/Victoria/210/2009(H3N2)型抗原ワクチンに対する抗体価が有意に上昇した。この結果より、十全大補湯は高齢者のインフルエンザワクチン接種においてアジュバント効果を発揮することが示唆された。

以上の結果から、十全大補湯にはワクチン効果を増強するアジュバントとしての活性があり、その機序には、構成生薬の一つである芍薬の含有成分PGGが有する樹状細胞での抗原貪食促進作用、抗原提示増加作用が関与することが示唆された。さらに、臨床研究において高齢者に対するインフルエンザワクチン接種に十全大補湯を併用すると抗体価が長期間にわたり有意に上昇することが示された。本研究の成果は、がん免疫療法や感染症予防などに漢方薬やその成分を応用することにより、その効果を安全に高めることが出来る可能性を示すものであり、漢方薬のワクチンアジュバントとしての新たな利用法の開発に資すると考えられる。主査および副査は、犬寫 明子氏に面接試験を行うと共に、論文内容について審査を行い、博士(薬学)の学位を授けるに値すると判定した。

1. Takeno N, [Inujima A](#), Shinohara K, Yamada M, Shibahara N, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Immune adjuvant effect of Juzentaihoto, a Japanese traditional herbal medicine, on tumor vaccine therapy in a mouse model. *Int J Oncol.*, 47: 2115–2122, 2015.
2. [Inujima A](#), Yamada M, Takeno N, Hoshina A, Oe M, Shinohara K, Shibahara N, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Herbal plant-derived compound, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, increases cross-presentation by dendritic cells. *Traditional & Kampo Medicine*, 2: 43–49, 2015.
3. 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.*, 33: 1878–1885, 2010.
4. Kee JY, [Inujima A](#), Andoh T, Tanaka K, Li F, Kuraiishi Y, Sakurai H, Shibahara N, Saiki I, Koizumi K. Inhibitory effect of Moutan Cortex aqueous fraction on mast cell-mediated allergic inflammation. *J Nat Med.*, 69: 209–217, 2015.
5. Saiki I, Koizumi K, Goto H, [Inujima A](#), Namiki T, Raimura M, Kogure T, Tatsumi T, Inoue H, Sakai S, Oka H, Fujimoto M, Hikiyama H, Sakurai H, Shibahara N, Shimada Y, Origasa H. The long-term effects of a kampo medicine, juzentaihoto, on maintenance of antibody titer in elderly people after influenza vaccination. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2013: 568074, 2013.